

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN *EPIGALLOCATECHIN-3-GALLAT* (EGCG) DAN *EPIGALLOCATECHIN* (EGC) DALAM TEH HIJAU TERHADAP PROLIFERASI SEL LEUKOSIT MENCIT JANTAN GALUR *Swiss Webster* YANG DIINDUKSI *COLITIS* DENGAN *DEXTRAN SULPHATE SODIUM* (DSS)

Prisca Larasati, 2009; Pembimbing I: Sugiarto Puradisastra, dr., M.Kes.
Pembimbing II: Teresa Liliana Wargasetia, S.Si, M.Kes

Teh hijau merupakan minuman yang sangat populer di dunia. Selain sebagai antioksidan, kandungan utama dalam teh hijau, yaitu *epigallocatechin-3-gallat* (EGCG) dan *epigallocatechin* (EGC), ternyata memiliki fungsi sebagai *immunomodulator*. Salah satu penyakit yang disebabkan kegagalan sistem imun adalah *Ulcerative Colitis* (UC) yang merupakan suatu penyakit inflamasi kronis pada mukosa kolon.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah EGCG dan EGC berperan terhadap proliferasi sel leukosit pada mencit yang diinduksi *colitis* dengan *Dextran Sulfate Sodium* (DSS).

Penelitian bersifat prospektif eksperimental komparatif laboratorium sungguhan dengan Rancang Acak Lengkap (RAL). Mencit jantan galur *Swiss Webster* sebanyak 40 ekor dengan berat rata-rata 20-25 gram dibagi dalam 8 kelompok perlakuan ($n=5$). Kemudian diberi perlakuan *aquadest*; 2.5 % DSS dalam air minum; 0.3 mg EGCG; 0,6 mg EGCG; 1,2 mg EGCG; 0.02 mg EGC; 0.04 mg EGC; dan 0.08 mg EGC. Setelah 14 hari perlakuan, kelompok perlakuan yang diberi EGCG atau EGC berbagai dosis diinduksi *colitis* dengan DSS selama 7 hari. Pada hari ke-22 limpa diambil dan dilakukan pengukuran proliferasi sel leukosit non-T dan limfosit dengan metode *MTT assay* menggunakan *ELISA plate reader*.

Data yang diamati adalah jumlah sel leukosit dalam setiap sumuran. Analisis data menggunakan uji *One-way ANOVA*, dilanjutkan dengan LSD dengan $\alpha = 0,05$. Hasil penelitian didapatkan EGCG 0,6 mg meningkatkan proliferasi leukosit non-T dengan pemberian mitogen (LPS) 1 $\mu\text{g/ml}$ dan 10 $\mu\text{g/ml}$ secara bermakna ($p < 0,05$). EGCG 0,3 mg dan 1,2 mg meningkatkan proliferasi leukosit non-T dengan pemberian mitogen (LPS) 10 $\mu\text{g/ml}$ secara bermakna ($p < 0,05$). Pemberian 1,2 mg EGCG juga dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit T secara bermakna dibandingkan kontrol negatif ($p = 0,000$) dan kelompok perlakuan DSS ($p = 0,000$). Pada Perlakuan EGC tidak memberikan pengaruh yang bermakna baik terhadap proliferasi sel leukosit non-T maupun limfosit T.

Kesimpulan penelitian adalah EGCG meningkatkan proliferasi sel leukosit baik non-T maupun limfosit T pada mencit yang diinduksi *colitis* dengan DSS, sedangkan pada perlakuan EGC tidak.

Kata kunci: *Ulcerative colitis*, EGCG, EGC, proliferasi leukosit dan limfosit T, *Dextran Sulfate Sodium* (DSS)

ABSTRACT

THE EFFECT OF EPIGALLOCATECHIN-3-GALLAT (EGCG) DAN EPIGALLOCATECHIN (EGC) IN GREEN TEA TOWARDS LEUKOCYTES PROLIFERATION IN DSS-INDUCED COLITIS SWISS WEBSTER MALE MICE

Prisca Larasati, 2009; *Supervisor I* : Sugiarto Puradisastra, dr., M. Kes
Supervisor II : Teresa Liliana Wargasetia, S.Si, M.Kes

Green tea is a popular beverage in the world. Beside its effect as antioksidant, the mayor ingridient in green tea which are epigallocatechin-3-gallat (EGCG) and epigallocatechin (EGC), have effect as immunomodulator. One of the disease that is caused by immune regulation failure is ulcerative colitis (UC) which is a chronic inflammatory disease of colonic mucosa.

The aim of this study was to examine the role of EGCG dan EGC towards leucocytes proliferation in colitis mice induced by DSS.

The method of this research was comparative, prospective laboratory experiment with complete Randomized Trial Design. Eight groups (n=5) of Swiss Webster male mice with average weight 20-25 gram were treated with aquadest; 2.5 % DSS on drinking water; 0.3 mg EGCG; 0,6 mg EGCG; 1,2 mg EGCG; 0.02 mg EGC; 0.04 mg EGC; and 0.08 mg EGC. After 14 days treatment, groups which are treated by EGCG or EGC were induced by 2.5 % DSS for 7 days. All mice were humanly sacrificed on the 22th day, lymphocytes were obtained from spleen, cultured, and the proliferation of, lymphocytes were measured using MTT assay method.

Parameter which were measured were the amounts of leukocytes in every wells. Then data were analyzed by One-Way ANOVA continued with LSD (= 0.05). The treatment with 0,6 mg with mitogen (LPS) 1 µg/ml and 10 µg/ml increased non-T leucocytes proliferation significantly. The treatment with 0,3 mg and 1,2 mg with mitogen (LPS) 10 µg/ml also increased non-T leucocytes proliferation significantly. EGCG 1,2 mg could also increase significantly T lymphocytes. Beside, EGC showed insignificant result in increased both non-T leucocytes and T lymphocytes proliferation

As conclusions, EGCG can increase non-T leucocytes and T lymphocytes proliferation significantly in animal models induced-colitis by DSS.

Key words: *Ulcerative colitis, EGCG, EGC, leucocytes and T lymphocytes proliferation, Dextran Sulfate Sodium (DSS)*

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Lembar Persetujuan	ii
SuratPernyataan	iii
Abstrak.....	iv
Prakata.....	vi
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xii
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Grafik	xv
Daftar Lampiran.....	xvi

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Identifikasi Masalah	2
1.3. Tujuan dan Maksud	3
1.4. Kegunaan Karya Tulis Ilmiah	3
1.5. Kerangka Pemikiran dan Hipotesis	3
1.5.1. Kerangka Pemikiran.....	3
1.5.2. Hipotesis.....	4
1.6 Metodologi.....	4
1.7 Waktu dan Lokasi Penelitian	5

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistem Imun	6
2.1.1 Sistem Imun Nonspesifik	6
2.1.2 Sistem Imun Spesifik	7
2.1.2.1 Sistem Imun Spesifik Humoral.....	8
2.1.2.2 Sistem Imun Spesifik Selular.....	8

2.1.3 Limfosit	9
2.1.3.1 Pematangan Limfosit, Seleksi Positif, dan Negatif	9
2.1.3.2 Reseptor Permukaan dan Fungsional.....	10
2.1.3.3 Limfosit T.....	12
2.1.3.4 Limfosit B	14
2.2 <i>Ulcerative Colitis</i> (UC)	15
2.2.1 Epidemiologi	15
2.2.2 Etiologi.....	15
2.2.3 Gambaran Histopatologi	16
2.2.4 Simptom.....	17
2.2.5 Patogenesis	17
2.2.6 Terapi.....	18
2.3 Model Hewan Kolitis	19
2.4 Teh (<i>Camelia sinensis</i>).....	20
2.4.1 Berbagai Cara Pengolahan Teh.....	21
2.3.2 Komposisi Kimia Teh.....	22
2.3.3 Aktivitas Farmakologi Teh	23
2.5 <i>Epigallocatechin-3 Gallat</i> (EGCG) dan <i>Epigallocatechin</i> (EGC)...	24
2.5.1 <i>Epigallocatechin-3 Gallat</i> (EGCG).....	24
2.5.2 <i>Epigallocatechin</i> (EGC).....	25

BAB III. ALAT, BAHAN, DAN METODE PENELITIAN

3.1 Alat	26
3.2 Bahan	
3.2.1 Bahan Kimia dan Reagen.....	27
3.2.2 Hewan Coba	28
3.3 Metode Penelitian	
3.3.1 Desain Penelitian	28
3.3.2 Variabel Penelitian.....	29
3.3.3 Persiapan Penelitian	
3.3.3.1 Pelarutan <i>Epigallocatechin-3-Gallat</i> (EGCG).....	29

3.3.3.2	Pelarutan <i>Epigallocatechin</i> (EGC).....	29
3.3.3.3	Sterilisasi Alat.....	29
3.3.3.4	Pembuatan Medium RPMI 1640 (<i>incomplete</i>).....	30
3.3.3.5	Pembuatan Medium RPMI- <i>complete</i> (RPMI-c).....	30
3.3.3.6	Pembuatan Larutan MTT	31
3.3.3.7	Pembuatan MACS <i>Buffer</i>	31
3.3.3.8	Pembuatan Larutan <i>Lysis Buffer</i>	31
3.3.3.9	<i>Thawing</i> dan <i>Heat Inactivated</i> FBS	32
3.3.3.10	Pengenceran Berseri (<i>Serial Dilution</i>) LPS.....	32
3.3.3.11	Pembuatan Larutan <i>anti-mouse</i> CD3 dan <i>anti-mouse</i> CD28	32
3.3.3.12	Persiapan 96- <i>wells</i> ELISA <i>culture plate</i> steril.....	32
3.3.4	Prosedur Penelitian	
3.3.4.1	Penentuan Perlakuan Hewan Coba	33
3.3.4.2	Isolasi Sel Limfosit	34
3.3.4.3	Isolasi Sel Limfosit Non-T	35
3.3.4.4	Isolasi Sel Limfosit T	35
3.3.4.5	Perhitungan Jumlah Leukosit Non-T dan Limfosit T .	36
3.3.4.6	Pengukuran Proliferasi Sel Limfosit (ELISA).....	36
3.3.5	Pengukuran Hasil Penelitian	37
3.3.6	Data yang Diamati.....	37
3.3.7	Analisis Data	37
3.3.7.1	Hipotesis Statistik	38
3.3.7.2	Kriteria Uji.....	38

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Proliferasi Sel Leukosit Non-T pada Pemberian

Epigallocatechin -3-Gallat (EGCG)..... 39

4.1.2 Proliferasi Limfosit T pada Pemberian

Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG)..... 46

4.1.3 Proliferasi Sel Leukosit Non-T pada Pemberian <i>Epigallocatechin</i> (EGC).....	51
4.1.4 Proliferasi Limfosit T pada Pemberian <i>Epigallocatechin</i> (EGC).....	57
4.2 Pembahasan.....	60
4.3 Uji Hipotesis	63
 BAB V.KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	66
5.2 Saran.....	66
 DAFTAR PUSTAKA.....	67
LAMPIRAN.....	70
 RIWAYAT HIDUP.....	86

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pematangan Sel Limfosit	10
Gambar 2.2	Reseptor Permukaan dan Molekul-Molekul Asesori Sel T Limfosit.....	11
Gambar 2.3	Peran Sel T	12
Gambar 2.4	Gambaran Histopatologis Mukosa Kolon.....	16
Gambar 2.5	Struktur Kimia DSS	19
Gambar 2.6	Tanaman Teh.....	20
Gambar 2.7	Struktur Kimia <i>Epigallocatechin-3-Gallat</i> (EGCG)	24
Gambar 2.8	Struktur Kimia <i>Epigallocatechin</i> (EGC)	25

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Rata-Rata Jumlah Sel Leukosit Non-T pada Setiap Kelompok Perlakuan EGCG	39
Tabel 4.2	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGCG Tanpa Pemberian LPS	40
Tabel 4.3	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGCG dengan Pemberian LPS 0,1 µg/ml	41
Tabel 4.4	Hasil Uji Beda Rata-Rata Metode LSD Jumlah Sel Leukosit Non-T Perlakuan EGCG dengan LPS 0,1 µg/ml	41
Tabel 4.5	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGCG dengan Pemberian LPS 1 µg/ml	42
Tabel 4.6	Hasil Uji Beda Rata-Rata Metode LSD Jumlah Sel Leukosit Non-T Perlakuan EGCG dengan LPS 1 µg/ml	42
Tabel 4.7	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGCG dengan Pemberian LPS 10 µg/ml	43
Tabel 4.8	Hasil Uji Beda Rata-Rata Metode LSD Jumlah Sel Leukosit Non-T Perlakuan EGCG dengan LPS 10 µg/ml	44
Tabel 4.9	Rata-Rata Jumlah Limfosit T Pada Setiap Kelompok Perlakuan EGCG	46
Tabel 4.10	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGCG Tanpa Pemberian <i>Anti-mouse</i> CD3 dan CD28	47
Tabel 4.11	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGCG dengan Pemberian <i>Anti-mouse</i> CD3 dan CD28.....	48
Tabel 4.12	Hasil Uji Beda Rata-Rata Metode LSD Jumlah Limfosit T Menggunakan <i>Anti-mouse</i> CD3 dan <i>Anti-mouse</i> CD28	48
Tabel 4.13	Rata-Rata Jumlah Sel Leukosit Non-T pada Setiap Kelompok Perlakuan EGC.....	51
Tabel 4.14	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGC Tanpa Pemberian LPS.....	52

Tabel 4.15	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGC dengan Pemberian LPS 0,1 µg/ml	53
Tabel 4.16	Hasil Uji Beda Rata-Rata Metode LSD Jumlah Sel Leukosit Non-T Perlakuan EGC dengan LPS 0,1 µg/ml	53
Tabel 4.17	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGC dengan Pemberian LPS 1 µg/ml	54
Tabel 4.18	Hasil Uji Beda Rata-Rata Metode LSD Jumlah Sel Leukosit Non-T Perlakuan EGC dengan LPS 1 µg/ml	54
Tabel 4.19	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGC dengan Pemberian LPS 10 µg/ml	55
Tabel 4.20	Rata-Rata Jumlah Limfosit T Pada Setiap Kelompok Perlakuan EGC	57
Tabel 4.21	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGC Tanpa Pemberian <i>Anti-mouse</i> CD3 dan CD28	58
Tabel 4.22	Hasil Uji <i>One-Way Descriptives</i> dan ANOVA untuk Perlakuan EGC dengan Pemberian <i>Anti-mouse</i> CD3 dan CD28	59

DAFTAR GRAFIK

Grafik 4.1	Perbandingan Rata-Rata Jumlah Sel Leukosit Non-T Perlakuan EGCG dengan dan Tanpa Pemberian LPS	45
Grafik 4.2	Perbandingan Rata-Rata Jumlah Sel Limfosit T Perlakuan EGCG Tanpa Pemberian <i>Anti-mouse</i> CD3 dan CD28.....	49
Grafik 4.3	Perbandingan Rata-Rata Jumlah Sel Limfosit T Perlakuan EGCG dengan Pemberian <i>Anti-mouse</i> CD3 dan CD28	50
Grafik 4.4	Perbandingan Rata-Rata Jumlah Sel Leukosit Non-T Perlakuan EGC dengan dan Tanpa Pemberian LPS	56
Grafik 4.5	Perbandingan Rata-Rata Jumlah Sel Limfosit T Perlakuan EGC dengan dan Tanpa Pemberian <i>Anti-mouse</i> CD3 dan CD28	59

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGCG Terhadap Proliferasi Sel Leukosit non-T Tanpa Menggunakan LPS	70
Lampiran 2	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGCG Terhadap Proliferasi Sel Leukosit non-T Menggunakan LPS 0,1 µg/ml.....	71
Lampiran 3	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGCG Terhadap Proliferasi Sel Leukosit non-T Menggunakan LPS 1 µg/ml	72
Lampiran 4	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGCG Terhadap Proliferasi Sel Leukosit non-T Menggunakan LPS 10 µg/ml	73
Lampiran 5	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGCG Terhadap Proliferasi Limfosit T Tanpa Menggunakan <i>anti-mouse</i> CD3 dan CD28	74
Lampiran 6	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGCG Terhadap Proliferasi Limfosit T Menggunakan <i>anti-mouse</i> CD3 dan CD28	75
Lampiran 7	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGC Terhadap Proliferasi Sel Leukosit non-T Tanpa Menggunakan LPS	76
Lampiran 8	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGC Terhadap Proliferasi Sel Leukosit non-T Menggunakan LPS 0,1 µg/ml.....	77
Lampiran 9	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGC Terhadap Proliferasi Sel Leukosit non-T Menggunakan LPS 1 µg/ml	78

Lampiran 10	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGC Terhadap Proliferasi Sel Leukosit non-T Menggunakan LPS 10 µg/ml	79
Lampiran 11	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGC Terhadap Proliferasi Limfosit T Tanpa Menggunakan <i>Anti-mouse</i> CD3 dan CD28.....	80
Lampiran 12	Penghitungan Statistik SPSS 13.0 untuk Pengujian Pengaruh EGC Terhadap Proliferasi Limfosit T Menggunakan <i>Anti-mouse</i> CD3 dan <i>Anti-mouse</i> CD28	81
Lampiran 13	Penghitungan Dosis.....	82
Lampiran 14	Foto Alat, Bahan, dan Foto Penelitian	83