

HIBAH BERSAING



Laporan Hasil Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing

EFEK POLIFENOL TEH HIJAU
SEBAGAI IMUNOMODULATOR PADA INFEKSI

Oleh :

Neni Susilaningih, dr, MSi

Andrew Johan, dr, MSi

Gunardi, Drs-Apt, MS

Winarto, dr, DMM, MSc, SpMK, SpM

Biaya dari Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia,
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
Tahun Anggaran 2003

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
Nopember, 2003

UPT-PUSTAK-UNDIP

No. Dat. 573/KI/FK/Cg

10 Maret 2004

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
Laporan Hasil Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing

A. Judul Penelitian : Efek Polifenol Teh Hijau Sebagai Imunomodulator Pada Infeksi

B. Ketua Peneliti

- a. Nama lengkap dengan gelar : Neni Susilaningsih, dr, M.Si.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata/IIIc/ 131 832 243
- d. Bidang Keahlian : Histologi, Imunologi
- e. Fakultas : Fakultas Kedokteran
- f. Universitas : Universitas Diponegoro

C. Tim Peneliti

No	NAMA DAN GELAR AKADEMIK	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
	Neni Susilaningsih, dr, M.Si	Histologi, Imunologi	Bag. Histologi Fak. Kedokteran	UNDIP
	Andrew Johan, dr, M.Si	Biokimia, Imunologi	Bag. Biokimia Fak. Kedokteran	UNDIP
	Gunardi, Drs, Apt, MS	Kimia Kedokteran, Farmasi	Bag. Kimia Medis Fak. Kedokteran	UNDIP
	Winarto, dr, SpMK, SpM(K)	Mikrobiologi	Bag. Mikrobiologi Fak Kedokteran	UNDIP

D. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- Jangka Waktu Penelitian : 3 tahun
- Biaya 2002 – 2004 yang diusulkan : Rp. 120.000.000,-
- Biaya yang disetujui tahun 2003 : Rp. 35.000.000,-



Mengetahui
 Dekan Fak. Kedokteran UNDIP

Prof. dr. Kabalrachman, SpKK(K)
 NIP : 130 354 867

Semarang, 20 Nopember 2003
 Ketua Peneliti,

dr. Neni Susilaningsih, M.Si.
 NIP 131 832 243



Menyetujui
 Ketua Lembaga Penelitian, UNDIP

Prof. Dr. dr. I. Riyanto, SpBD
 NIP : 130 529 454

**EFEK POLIFENOL TEH HIJAU
SEBAGAI IMUNOMODULATOR PADA INFEKSI**

Neni Susilaningsih*, Andrew Johan*, Gunardi*, Winarto*

*Fakultas Kedokteran UNDIP
Tahun 2003, 21 halaman

Teh hijau diperoleh dari daun tanaman teh (*Camelia sinensis*) yang diproses tanpa teroksidasi, memiliki kandungan senyawa polifenol 15 sampai 30% yang didalamnya mengandung senyawa aktif yaitu *catechin* antara lain terdiri dari *Epigallocatechin gallate (EGCg)* dan *Epigallocatechin (EGC)*. Polifenol teh hijau telah dilaporkan dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi.

Permasalahan dalam penelitian tahun ke dua ini adalah : 1). Bagaimana efek toksisitas akut dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit sehat, dinilai dari gambaran mikroskopis hepar dan ginjal serta kematian hewan coba. 2). Barapakah dosis LD₅₀ dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit sehat, dinilai dengan kematian 50% hewan coba pada pemberian polifenol dosis tunggal secara bertingkat. 3). Bagaimanakah efektifitas imunomodulator dari polifenol teh hijau pada mencit yang diinfeksi dengan *L.monocytogenes*, dengan menilai *survival* mencit dan aktifitas makrofag dalam fagositosis latex serta produksi ROI & NO.

Tujuan penelitiaan tahun ke dua ini adalah untuk : 1). menentukan uji efek toksisitas akut dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit sehat, dinilai dari gambaran mikroskopis hepar dan ginjal serta kematian hewan coba, 2). menentukan dosis LD₅₀ dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit sehat, dinilai dengan kematian 50% hewan coba pada pemberian polifenol dosis tunggal secara bertingkat, serta 3). menentukan uji klinis pada hewan coba yang diinfeksi, untuk menilai efektifitas imunomodulator dari polifenol teh hijau pada mencit yang diinfeksi dengan *L. monocytogenes*, dengan menilai *survival* mencit dan aktifitas makrofag dalam fagositosis latex serta produksi ROI & NO.

Jenis penelitian adalah eksperimental sesungguhnya untuk menentukan uji efek toksik serta LD⁵⁰ dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit galur Balb/c yang diperoleh dari PAU UGM Yogyakarta. Kriteria mencit yang digunakan adalah mencit betina

umur 8-10 minggu, sehat, tidak ada kelainan anatomis dan telah menjalani adaptasi selama 1 minggu.

Untuk uji toksisitas akut diberikan sekali minum, dengan dosis bertingkat secara teratur pada mencit yang dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok perlakuan masing-masing 10 ekor.

Polifenol teh hijau disiapkan dalam 4 besaran dosis kelipatan 10 untuk tiap kelompok. Besarnya dosis ditentukan dari hasil penelitian tahun pertama yang mengacu pada penelitian Chow HH²³, yang menunjukkan efek paling baik pada pemberian *polyphenon-60* dosis 3 mg (BB mencit \pm 20 g) setara dengan 1,8 mg polifenol murni.

Kelompok I diberi dosis 1 = 0,3 mg *polyphenon-60*

Kelompok II diberi dosis 2 = 3 mg *polyphenon-60*

Kelompok III diberi dosis 3 = 30 mg *polyphenon-60*

Kelompok IV diberi dosis 4 = 300 mg *polyphenon-60*

Kelompok V diberi dosis 5 = 150 mg *polyphenon-60*, merupakan kelipatan 5 dari dosis 3. Kelompok ini ditambahkan untuk memperkecil selisih antara dosis 3 dan 4.

Pengamatan dilakukan terhadap tiap kelompok hewan coba dalam 24 jam. Selama itu diamati gejala yang timbul tiap 15 menit selama 3 jam pertama dan dihitung jumlah mencit yang mati setelah 24 jam. Pada hewan coba yang mati diambil organ hati & ginjalnya untuk diperiksa secara mikroskopis, sedangkan pada hewan yang masih hidup diamati sampai hari ke 7, dimatikan dan diambil organ hati dan ginjalnya. LD₅₀ adalah merupakan dosis tunggal yang menimbulkan kematian pada 50% hewan coba.

Uji efektifitas bahan aktif dilakukan terhadap 30 ekor mencit yang diinfeksi dengan 10⁶ *L.monocytogenes*, yang dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok I diinfeksi dengan *L.monocytogenes* saja. Kelompok II diberi polifenol teh hijau (*polyphenon-60*) dosis 3 mg dan diinfeksi *L.monocytogenes*. Pada ke dua kelompok tersebut diamati timbulnya gejala sakit, perubahan ke arah sembuh atau bahkan kematian. Mencit yang hidup, dimatikan pada hari ke 14 untuk melihat aktifitas makrofag dalam fagositosis latex serta *bacterial killing* dengan memeriksa ROI & NO. Uji toksisitas juga dilakukan pada 30 ekor mencit yang diinfeksi dengan 8x10⁶ *L.monocytogenes*, yang dibagi menjadi 2 kelompok, dengan dan tanpa diberi *polyphenon-60* dosis 3 m untuk diamati sampai hari ke 14.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa : LD₅₀ untuk *Poliphenon-60* adalah sebesar 150 mg / mencit 20 gram atau setara dengan 7500 mg/kgBB, yang berarti tingkat toksisitasnya ringan. Uji toksisitas akut pada hepar dan ginjal tidak menunjukkan adanya kerusakan hepar maupun ginjal, hanya pada dosis 150 mg dan 300 mg tampak adanya jejas berupa pembengkakan sel hepar dan sel tubulus ginjal. *Poliphenon-60* dosis 3 mg/hr cenderung memberi efek protektif pada mencit yang diinfeksi *L. monocytogenes*, meskipun perbedaannya tidak nyata. Aktifitas fagositosis makrofag tampak lebih tinggi secara bermakna pada kelompok yang diberi *Poliphenon-60* dosis 3 mg/hr. Produksi NO serta ROI makrofag juga nampak cenderung lebih tinggi pada kelompok yang diberi *Poliphenon-60* dosis 3 mg/hr

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan agar sebelum diaplikasikan penggunaannya pada manusia sebagai imunomodulator pada infeksi, terlebih dahulu dilakukan uji efektifitas dan tingkat keamanannya pada manusia sekarelawan sehat.

PRAKATA

Puji dan syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa, karena atas berkah rahmat dan karunia Nya maka penelitian dengan judul “Efek Polifenol Teh Hijau Sebagai Imunomodulator Pada Infeksi” tahun ke dua ini dapat terlaksana dan selesai pada waktunya.

Penelitian ini mendapat dana dari Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Tahun Anggaran 2003. Oleh karenanya pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih kepada :

1. Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
2. Pimpinan beserta staf Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro Semarang
3. Dekan Fakultas Kedokteran UNDIP
4. Direktur Eksekutif dan Direktur Utama Laboratorium Bioteknologi Kedokteran FK UNDIP
5. Ketua Bagian : Histologi, Biokimia, Kimia Kedokteran dan Mikrobiologi di Fakultas Kedokteran UNDIP
6. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Demi kesempurnaan dari hasil penelitian ini kami mengharap kritik serta saran dari berbagai pihak.

Kami berharap semoga hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang berkepentingan.

Semarang, Oktober 2003

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I	3
III. TINJAUAN PUSTAKA	4
IV. METODE PENELITIAN	9
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	11
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	18
VII. RENCANA PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA	19
A. TUJUAN KHUSUS	19
B. METODE	19
C. JADWAL KERJA	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	23

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Aktivasi system imun terhadap benda asing	5
Gambar 2. Skema mekanisme pertahanan tubuh terhadap bakteri intraseluler.....	6
Gambar 3. Kurva survival Kaplan-Meier	14
Gambar 3. Diagram boxplot fagositosis makrofag	15
Gambar 4. Diagram boxplot produksi NO makrofag	16
Gambar 5. Grafik data produksi ROI makrofag	17

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Justifikasi Anggaran	23
Lampiran 2. Personalia Peneliti	24
Lampiran 3. Gambar mikroskopis hepar dari berbagai kelompok	25
Lampiran 4. Gambar mikroskopis ginjal dari berbagai kelompok	26
Lampiran 5. Gambar fagositosis makrofag	27
Lampiran 6. Gambar produksi ROI makrofag	28
Lampiran 7. Hasil analisis statistik	29

Listeria monocytogenes. Bakteria intraseluler menstimulasi makrofag mensekresikan IL-12 yang mengaktifkan sel NK dan juga menstimulasi perkembangan sel T_H1 dan mengaktifkan sel T CD8⁺. Ke tiga jenis sel yang teraktifkan tersebut mensekresikan *interferon gamma* (IFN- γ) yang akan mengaktifkan makrofag sehingga makrofag tersebut dapat membunuh bakteria intraseluler.¹⁴ Senyawa polifenol dilaporkan mempunyai efek meningkatkan proliferasi limfosit, meningkatkan produksi IL-12 dan meningkatkan fagositosis,^{10,11,12} maka diperkirakan bahwa senyawa polifenol akan memberikan efek yang menguntungkan kepada rangkaian imunitas seluler seperti yang disebutkan diatas. Sehingga *bacterial killing* juga akan meningkat dan efeknya sebagai imunomodulator.

Dari hasil Penelitian Hibah Bersaing tahun pertama didapatkan bahwa polifenol teh hijau, EGCg serta EGC pada dosis tertentu memiliki efek sebagai imunomodulator pada mencit yang diimunisasi dengan *Listeria monocytogenes*, dinilai dari peningkatan aktifitas fagositosis makrofag, peningkatan produk NO dan ROI dari makrofag serta penurunan jumlah kuman dari kultur jaringan hepar. Dari beberapa dosis yang diteliti pada tahun pertama terhadap ketiga jenis bahan tersebut menunjukkan bahwa efek terbaik sebagai imunomodulator tampak pada polifenol teh hijau yaitu *polyphenon-60* dosis 3 mg.¹⁵

Kalau efek polifenol teh hijau serta komponen aktifnya yaitu EGCg dan EGC terhadap mekanisme pertahanan tubuh untuk melawan infeksi bakteria sudah diketahui, maka akan dilanjutkan dengan penelitian uji toksisitas dan uji klinis pada hewan coba. Uji toksisitas akut merupakan prasyarat formal keamanan obat tradisional untuk pemakaian pada manusia. Uji ini menyangkut pemberian beberapa dosis tunggal yang meningkat secara teratur pada beberapa kelompok hewan coba dari jenis yang sama. Uji klinis pada hewan coba merupakan uji klinis tahap awal, untuk melihat efektifitas bahan yang dicobakan pada hewan yang diinfeksi, untuk melihat efek imunomodulatornya berdasar survival dan efek selulernya. Dengan demikian maka efek imunomodulator dapat dibuktikan dan proyeksi pemakaian pada manusia dengan infeksi kuman intra seluler akan sangat besar, karena manfaatnya juga besar, namun sebelumnya perlu diberikan pada manusia sehat sebagai sukarelawan.

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah : **Penemuan baru** tentang substansi didalam polifenol teh hijau yang berfungsi sebagai **imunomodulator** pada penyakit infeksi, khususnya penyakit infeksi karena kuman intra seluler.

Rumusan Masalah Tahun Ke Dua :

1. Bagaimana efek toksisitas akut dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit sehat, dinilai dari gambaran mikroskopis hepar dan ginjal serta kematian hewan coba.
2. Barapakah dosis LD₅₀ dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit sehat, dinilai dengan kematian 50% hewan coba pada pemberian polifenol dosis tunggal secara bertingkat.
3. Bagaimanakah efektifitas imunomodulator dari polifenol teh hijau pada mencit yang diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes*, dengan menilai *survival* mencit dan aktifitas makrofag dalam fagositosis latex serta produksi ROI & NO.

II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE II

Tujuan khusus penelitian ini ialah untuk mendapatkan **pengetahuan baru** tentang **bahan aktif polifenol** yang mempunyai efek **imunomodulator** pada penyakit infeksi. Teh hijau sudah banyak dipakai sebagai pengobatan tradisional, tetapi belum ada bukti ilmiah sampai tingkat seluler apalagi subseluler dalam hal efek imunomodulator pada penyakit infeksi. Tujuan tersebut akan dicapai dengan beberapa tahapan, antara lain tahap pertama yang telah diteliti pada tahun pertama dan dilanjutkan pada tahun ke dua dengan tujuan sebagai berikut :

1. Melakukan uji efek toksisitas akut dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit sehat, dinilai dari gambaran mikroskopis hepar dan ginjal serta kematian hewan coba.
2. Menentukan dosis LD₅₀ dari polifenol teh hijau pada hewan coba mencit sehat, dinilai dengan kematian 50% hewan coba pada pemberian polifenol dosis tunggal secara bertingkat.
3. Melakukan uji klinis pada hewan coba yang diinfeksi, untuk menilai efektifitas imunomodulator dari polifenol teh hijau pada mencit yang diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes*, dengan menilai *survival* mencit dan aktifitas makrofag dalam fagositosis latex serta produksi ROI & NO.

Manfaat Penelitian tahun ke II adalah sebagai lanjutan dari penelitian di tahun pertama yang didapatkan bahwa polifenol teh hijau (*polyphenon-60*) 3 mg /hari menunjukkan efek imunomodulator paling baik dalam meningkatkan kemampuan