



**EFEK *EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE* (EGCG) TOPIKAL
TERHADAP EKSPRESI SIKLOOKSIGENASE-2
KONJUNGTIVITIS ALERGI PADA MODEL TIKUS WISTAR**

Laporan Akhir Penelitian

Karya Tulis Ilmiah

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi
persyaratan dalam menempuh Program Pendidikan Sarjana

Fakultas Kedokteran

Disusun oleh :

DANIEL HADINOTO

NIM : G2A005046

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2009

HALAMAN PENGESAHAN

**Laporan Akhir Penelitian
Karya Tulis Ilmiah**

**EFEK *EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE* (EGCG) TOPIKAL
TERHADAP EKSPRESI SIKLOOKSIGENASE-2
KONJUNGTIVITIS ALERGI PADA MODEL TIKUS WISTAR**

Telah diuji dan dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada tanggal 15 Agustus 2009 dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan.

Semarang, 24 Agustus 2009

Ketua Penguji

Penguji

dr. Ika Pawitra Miranti, M.Kes, Sp.PA
NIP. 131 875 465

dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL
NIP. 132 163 893

Pembimbing

dr. Trilaksana Nugroho, M.Kes, Sp.M
NIP. 132 233 165

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
ABSTRAK.....	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Anatomi dan Fungsi Konjungtiva Tikus.....	7
2.2. Reaksi Hipersensitivitas	8
2.3. Alergi	10
2.4. Mekanisme Efektor pada Reaksi Alergi	13
2.5. Enzim Siklooksigenase-2	16
2.6. Peran Compound 48/80 dalam Induksi Alergi	18

2.7.	Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Teh Hijau	19
2.8.	Efek EGCG terhadap Sistem Imun	21
2.9.	Kerangka Teori	25
2.10.	Kerangka Konsep	26
2.11.	Hipotesis	26
2.11.1.	Hipotesis Mayor	26
2.11.2.	Hipotesis Minor	26
BAB 3	METODE PENELITIAN	27
3.1.	Ruang Lingkup	27
3.2.	Waktu dan Tempat Penelitian	27
3.3.	Jenis Penelitian	27
3.4.	Sampel Penelitian	29
3.4.1.	Sampel	29
3.4.2.	Cara Pengambilan Sampel	29
3.4.3.	Besar Sampel	30
3.5.	Variabel Penelitian	30
3.5.1.	Variabel Bebas	30
3.5.2.	Variabel Terikat	30
3.6.	Definisi Operasional	30
3.7.	Alat dan Bahan Penelitian	32
3.7.1.	Alat	32
3.7.2.	Bahan dan Materi	33
3.8.	Cara Kerja	33

3.9.	Alur Penelitian	35
3.10.	Analisis Data	36
BAB 4	HASIL PENELITIAN	37
4.1.	Analisis Sampel	37
4.2.	Analisis Deskriptif	37
4.3.	Analisis Inferensial	38
BAB 5	PEMBAHASAN	40
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN	43
6.1.	Kesimpulan	43
6.2.	Saran	44
	DAFTAR PUSTAKA	45
	LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Grafik *Box-Plot* ekspresi COX-2/LPB antara empat kelompok.....38

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Ekspresi COX-2/LPB pada setiap kelompok.....	37
---	----

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 : Ekspresi COX-2/LPB pada setiap kelompok
- Lampiran 2 : Hasil Uji Statistik
- Lampiran 3 : Foto Hasil Pengecatan Imunohistokimia pada Preparat
Konjungtivitis Alergi

Efek *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) Topikal terhadap Ekspresi Siklooksigenase-2 Konjungtivitis Alergi pada Model Tikus *Wistar*

Daniel Hadinoto¹, Trilaksana Nugroho²

Abstrak

Latar Belakang : *Epigallocatechin-3 Gallate* (EGCG), suatu polifenol (flavonoid) alami yang banyak terdapat pada tumbuhan teh (*Camellia sinensis*) terutama teh hijau, merupakan suatu bahan alami yang telah banyak diteliti dan terbukti mempunyai efek anti inflamasi.

Tujuan : Membuktikan bahwa *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) topikal dapat menekan ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar*.

Metode : Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan pendekatan *post-test only control group design*. 24 ekor tikus *Wistar* dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan masing-masing kelompok 6 ekor tikus. K mendapatkan tetes mata air mata artifisial 1 tetes/mata setiap 10 menit selama 1 jam, P1 mendapatkan EGCG 5×10^{-2} mg/ml, P2 mendapatkan EGCG 5×10^{-1} mg/ml, dan P3 mendapatkan EGCG 5×10^0 mg/ml. EGCG diberikan 1 tetes/mata setiap 10 menit selama 1 jam. Kemudian tiap tikus mendapatkan 1 tetes mata *Compound 48/80* 250 μ g/mata segera setelahnya. Selanjutnya tikus diterminasi dan dilakukan eksenterasi pada bola mata tikus untuk dibuat preparat dengan pengecatan imunohistokimia. Data yang diperoleh dianalisa dengan program komputer *SPSS*, di mana dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*.

Hasil : Rata-rata ekspresi siklooksigenase-2 pada P1 (3.50) lebih rendah dibandingkan K (5.17), P2 (5.67) lebih tinggi dibandingkan K (5.17), dan P3 (5.50) lebih tinggi dibandingkan K (5.17). Hasil rata-rata ekspresi siklooksigenase-2 ini tidak berbeda secara statistik.

Kesimpulan : *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) topikal tidak berefek terhadap ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar*.

Kata Kunci : *Epigallocatechin-3 Gallate* (EGCG) topikal, ekspresi siklooksigenase-2, konjungtivitis alergi, tikus *Wistar*.

- 1) Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- 2) Staf Pengajar Bagian Farmakologi & Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

***The Effect of Topical Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) on
Cyclooxygenase-2 Expression in Allergic Conjunctivitis Model of Wistar Rat***

Daniel Hadinoto¹, Trilaksana Nugroho²

Abstract

Background : *Epigallocatechin-3 Gallate (EGCG), a natural polyphenol (flavonoid), which contains lot in tea (Camellia sinensis) especially green tea, is a natural substance that has anti inflammation effect.*

Objectives : *Proving the effect of topical Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in reducing cyclooxygenase-2 expression in allergic conjunctivitis model of Wistar rat.*

Methods : *This study was an experimental research with post-test only control group design. A total of 24 Wistar rats were divided into 4 groups, including 6 rats each groups. K was given artificial tears 1 drop/eye every 10 minutes for 1 hour, P1 was given EGCG 5×10^{-2} mg/ml, P2 was given EGCG 5×10^{-1} mg/ml, and P3 was given EGCG 5×10^0 mg/ml. EGCG were given 1 drop/eye every 10 minutes for 1 hour. Then all rats were given 1 drop Compound 48/80 250 μ g/eye soon after. Every rats were terminated for eyeball removal. These eyeballs were stained using immunohistochemical staining. All data were analyzed using SPSS computer program. The data were processed using Kolmogorov-Smirnov test, for normality test, and continued using One-Way ANOVA test.*

Results : *The mean of cyclooxygenase-2 expression at P1 (3.50) was lower than K (5.17), P2 (5.67) was higher than K (5.17), and P3 (5.50) was higher than K (5.17). These results had no statistics meaning.*

Conclusion : *Topical Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) had no effect on cyclooxygenase-2 expression in allergic conjunctivitis model of Wistar rat.*

Key Words : *Topical Epigallocatechin-3 Gallate (EGCG), cyclooxygenase-2 expression, allergic conjunctivitis, model of Wistar rat.*

- 1) *Student of Medical Faculty, Diponegoro University*
- 2) *Lecturer Staff of Pharmacology & Therapy Section, Medical Faculty, Diponegoro University*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit alergi sering ditemukan. Sekitar 15-20% dari populasi pernah mengalami beberapa bentuk alergi dan keadaan ini mempengaruhi status fisik dan keadaan ekonomi dari individu maupun masyarakat secara umum. Prevalensi penyakit alergi meningkat. Di Amerika, Inggris Raya, dan banyak negara Eropa, prevalensi asma pada anak-anak meningkat sekitar 5% per tahun. Banyak faktor risiko yang berpengaruh terhadap timbulnya suatu alergi, tetapi faktor genetik dan kebiasaan merokok adalah faktor resiko yang saat ini sedang meningkat prevalensinya.¹ Sekitar 6 juta dolar Amerika diperkirakan telah dibelanjakan secara langsung untuk mengatasi penyakit rinokonjungtivitis alergika.² Penelitian-penelitian yang telah banyak dilakukan pada umumnya berfokus pada patofisiologi rhinitis alergi dan asma, walaupun penyakit alergi pada mata juga sering ditemukan,³ sehingga kajian yang lebih mendalam secara seluler atau bahkan molekuler khususnya tentang imunopatogenesis dan patofisiologi penyakit alergi pada mata masih sangat diperlukan.

Konjungtivitis alergi menggambarkan suatu respon imun spesifik sekunder pada antigen yang disebut sebagai alergen, yang menginduksi respon efektor IgE-sel mast secara akut. Ketika respon primer berlangsung, alergen spesifik sel-sel B disebarkan ke area tertentu di berbagai lokasi MALT (*Mucosal-Associated Lymphoid Tissue*). Di lokasi tersebut, sel B dengan bantuan sel T mengubah produksi

antialergen-IgM menjadi antialergen-IgE. IgE selanjutnya dilepaskan pada tempat itu dan berikatan dengan reseptor Fc di permukaan sel mast, sehingga sel mast menjadi dipersenjatai dengan suatu reseptor alergen spesifik. Paparan alergen berikutnya terjadi di tempat yang berbeda dari paparan awalnya, yang menyebabkan alergen bisa menembus melewati epitel konjungtiva superfisial menuju daerah subepitel, lalu antigen akan mengikat spesifik alergen IgE tersebut pada permukaan sel mast. Selanjutnya dalam 60 menit akan terjadi degranulasi, diawali dengan pelepasan mediator-mediator yang dapat menyebabkan *chemosis* dan rasa gatal di konjungtiva. Pada reaksi fase lambat, yaitu terjadi antara 4-24 jam berikutnya, ditandai dengan pengerahan sel-sel limfosit, eosinofil dan neutrofil.⁴

Berkaitan dengan terjadinya reaksi hipersensitivitas tipe I di mana terjadi degranulasi sel mast yang menyebabkan pelepasan mediator-mediator inflamasi seperti histamin, prostaglandin, leukotrien dan faktor kemotaktor eosinofil, maka untuk penatalaksanaan konjungtivitis alergi dapat diberikan obat-obat seperti kortikosteroid, antiinflamasi non-steroid (AINS), vasokonstriktor, antihistamin, dan stabilisator sel mast.⁵ Beberapa efek samping mungkin berbahaya bagi pasien, seperti gangguan pada lambung (intoleransi), tukak lambung, ulkus duodenum, tinitus, penurunan pendengaran, dan vertigo.⁶ Selain itu harga obat yang relatif mahal sering menjadi kendala dalam pemilihan obat-obat tersebut.

Sebenarnya masyarakat kita sudah tidak asing lagi dengan senyawa polifenol / *catechin* (EGCG) dalam teh dan biasa digunakan sehari-hari untuk meredakan radang, untuk kumur-kumur, menyembuhkan sariawan dan faringitis.⁶

Tradisi di Jepang untuk minum teh hijau berguna pula sebagai antioksidan dan antirematik.

Berbagai upaya penelitian dilakukan untuk menggali potensi bahan alami yang dapat digunakan sebagai bahan antiinflamasi. *Epigallocatechin-3 Gallate* (EGCG), suatu polifenol (flavonoid) alami yang banyak terdapat pada tumbuhan teh (*Camellia sinensis*) terutama teh hijau, merupakan suatu bahan alami yang telah banyak diteliti dan terbukti mempunyai efek antiinflamasi.⁷⁻¹² Selain antiinflamasi EGCG juga mempunyai khasiat antioksidan, antiproliferatif, dan antialergi,^{12,13} sehingga EGCG menarik untuk diteliti khususnya dalam hal efek antialergi dan antiinflamasi pada mata, khususnya pada konjungtiva.

Bukti-bukti ilmiah tentang efikasi penggunaan bahan EGCG secara topikal pada mata khususnya sebagai bahan antialergi belum banyak didapatkan, maka untuk itu dirancang suatu penelitian model konjungtivitis alergi pada tikus *Wistar* yang diinduksi dengan *compound 48/80*, yang sebelumnya telah diberikan EGCG *pretreatment* dalam berbagai dosis secara topikal (tetes mata) untuk mengetahui efek antialergi EGCG pada konjungtivitis alergi.

Perubahan secara klinik maupun histologi pada aplikasi *compound 48/80* sebanyak 250µg secara topikal pada tikus, sebagai model yang berbasis reaksi anafilaksis, tampak menyerupai kondisi konjungtivitis alergi pada manusia.¹⁴⁻¹⁶ Pertama *compound 48/80* menyebabkan pelepasan histamin oleh sel mast. Selain itu *compound 48/80* mengaktivasi enzim lipoksigenase dan siklooksigenase, sehingga dihasilkan leukotrien dan prostaglandin. Mediator-mediator ini berpengaruh terhadap timbulnya gejala klinis pada konjungtivitis alergi.¹⁷ Itulah

sebabnya aplikasi *compound 48/80* dipilih sebagai model stimulus konjungtivitis alergi pada penelitian ini.

Enzim siklooksigenase-2 diinduksi oleh bermacam-macam reaksi inflamasi, akan tetapi tidak ditemukan dalam jaringan tubuh yang normal. Sebaliknya, enzim siklooksigenase-1 diproduksi dan diekspresikan ke berbagai jaringan tubuh. Perbedaan inilah yang membuat enzim siklooksigenase-1 bertanggung jawab terhadap produksi prostaglandin yang berperan dalam proses homeostasis (sebagai contoh, keseimbangan cairan dan elektrolit dalam ginjal, sitoproteksi dalam traktus gastrointestinal). Sebaliknya, enzim siklooksigenase-2 mengkatalisis produksi prostaglandin yang berperan dalam proses inflamasi.¹⁸

EGCG dalam penelitian ini akan digunakan untuk menghambat aktivasi enzim siklooksigenase-2, sehingga akan menghambat sintesis prostaglandin. Hambatan terhadap sintesis prostaglandin dengan cara menghambat aktivitas enzim siklooksigenase dapat menekan reaksi alergi pada mata. Anti Inflamasi Non Steroidal (AINS) dapat menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-2 yang berperan pada proses inflamasi alergi. Karena efek hambatan inilah, beberapa jenis AINS dapat digunakan sebagai terapi penyakit alergi pada mata, terutama konjungtivitis alergi. Hal ini membuktikan bahwa enzim siklooksigenase-2 berperan pada proses konjungtivitis alergi.

Desain penelitian ini memungkinkan mengamati perubahan akibat pemaparan suatu bahan (EGCG) di tingkat subseluler (molekuler) suatu jaringan, pada keadaan model patologis yang dikehendaki (reaksi alergi).

1.2. Perumusan Masalah

Apakah *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) topikal dapat menekan ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan bahwa *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) topikal dapat menekan ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menghitung ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar* yang mendapat tetes mata air mata artifisial.
2. Menghitung ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar* yang mendapat tetes mata EGCG 5×10^{-2} mg/ml.
3. Menghitung ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar* yang mendapat tetes mata EGCG 5×10^{-1} mg/ml.
4. Menghitung ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar* yang mendapat tetes mata EGCG 5×10^0 mg/ml.
5. Membandingkan perlakuan pada kelompok (1) dan (2).
6. Membandingkan perlakuan pada kelompok (1) dan (3).
7. Membandingkan perlakuan pada kelompok (1) dan (4).
8. Membandingkan perlakuan pada kelompok (2) dan (3).
9. Membandingkan perlakuan pada kelompok (2) dan (4).

10. Membandingkan perlakuan pada kelompok (3) dan (4).

1.4. Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat :

- Melengkapi informasi ilmiah mengenai efek antialergi EGCG topikal pada konjungtivitis alergi.
- Memberikan landasan ilmiah untuk pengembangan dan pemanfaatan EGCG di bidang kesehatan mata, terutama penanganan penyakit konjungtivitis alergi, maupun penyakit mata lain dengan keterlibatan siklooksigenase-2.
- Memberikan landasan ilmiah untuk pengembangan dan pemanfaatan EGCG di bidang kesehatan secara umum, terutama dalam penanganan penyakit-penyakit alergi, maupun penyakit mata lain dengan keterlibatan siklooksigenase-2.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Anatomi dan Fungsi Konjungtiva Tikus

Setzer PY, Nichols BA, dan Dawson CR pada 1987 meneliti struktur spesifik pada epitel konjungtiva tikus strain *Sprague-Dawley* menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop elektron. Secara mikroskopis, mereka menemukan bahwa konjungtiva tikus dilapisi oleh sel epitel skuamus (sel gepeng) berlapis pada permukaannya. Pada daerah-daerah tertentu, terdapat cekungan yang dibentuk oleh gugusan sel goblet yang terdapat pada lapisan epitel tersebut. Lapisan epitel skuamus tersebut terdiri dari tiga lapisan, yaitu lapisan sel basal, lapisan sel intermedia yang tersusun dari sel-sel sayap (*wing cells*), dan beberapa lapis sel skuamus pada permukaannya. Pada lapisan sel basal terdapat pusat pembelahan sel epitel dan sel-sel leukosit mononuklear. Selain pada lapisan sel basal, sel-sel mononuklear juga terdapat pada lapisan intermedia. Ada dua perbedaan utama struktur konjungtiva tikus dibandingkan dengan konjungtiva mamalia lainnya. Pertama, sel-sel superfisial epitel konjungtiva tikus adalah sel skuamus (sel gepeng), dan kedua, sel-sel goblet konjungtiva tikus berkelompok membentuk *cluster* (gugus). Pada manusia, epitel skuamus permukaan konjungtiva hanya terdapat pada daerah limbal, sedangkan di daerah konjungtiva lainnya terdapat variasi bentuk sel epitel kuboid dan kolumnar. Sementara itu sel-sel goblet tikus yang ukurannya lebih kecil dibandingkan tebal lapisan epitel skuamusnya membentuk cekungan (depresi) pada permukaan lapisan epitel

skuamus di sekitarnya. Bentuk *cluster* sel goblet tersebut juga dapat dijumpai pada konjungtiva manusia di daerah lipatan semilunar dan forniks inferior yang dikenal sebagai kripte mukosa dari *Henle* (Kripte *Henle*). Selain di kedua daerah tersebut, sel-sel goblet konjungtiva manusia tersebar secara soliter.^{19,20}

Pada lapisan basal dan intermedia epitel skuamus konjungtiva tikus, selain sel-sel leukosit mononuklear, terdapat pula sel-sel limfosit dan makrofag yang berperan dalam imunitas seluler. Namun tidak seperti halnya pada manusia, sel-sel yang berperan dalam imunitas humoral, seperti sel-sel plasma (basofil), tidak ditemukan pada konjungtiva tikus sehingga tidak mengherankan bahwa konjungtiva tikus pernah dilaporkan kurang aktif secara imunologi.²⁰ Namun pada kenyataannya, berbagai penelitian di bidang imunologi menggunakan model konjungtivitis alergi dan konjungtivitis akut pada tikus pernah dilakukan pada strain *Sprague-Dawley*, *Wistar*, *Lewis*, dan *Brown Norway* dan hasilnya menunjukkan bahwa strain-strain tersebut mempunyai respon imunologis yang adekuat.^{14,21,22} Perbedaan mikroskopik konjungtiva antar strain belum dapat dijelaskan secara pasti karena fokus masing-masing penelitian yang berbeda dan kemungkinan adanya variasi antar strain.^{20,23}

2.2. Reaksi Hipersensitivitas

Imunitas spesifik merupakan mekanisme yang ampuh untuk menyingkirkan patogen dan antigen asing. Mekanisme efektor sistem imun, seperti komplemen, fagosit, sitokin dan lain-lain tidak spesifik untuk antigen asing. Karena itu respons imun dan reaksi inflamasi yang menyertai respons imun

kadang-kadang disertai kerusakan jaringan tubuh sendiri, baik lokal maupun sistemik. Pada umumnya efek samping demikian dapat dikendalikan dan membatasi diri (*self-limited*) dan berhenti sendiri dengan hilangnya antigen asing. Di samping itu, dalam keadaan normal ada toleransi terhadap antigen *self* sehingga tidak terjadi respons imun terhadap jaringan tubuh sendiri. Namun ada kalanya respons atau reaksi imun itu berlebihan atau tidak terkontrol dan reaksi demikian disebut reaksi hipersensitivitas.²⁴

Reaksi hipersensitivitas dapat terjadi bila jumlah antigen yang masuk relatif banyak atau bila status imunologik seseorang, baik selular maupun humoral, meningkat. Reaksi itu tidak pernah timbul pada pemaparan pertama dan merupakan ciri khas individu bersangkutan. Reaksi hipersensitivitas menimbulkan manifestasi klinik dan patologik yang sangat heterogen, dan heterogenitas itu ditentukan oleh : 1) jenis respons imun yang mengakibatkan kerusakan jaringan, dan 2) sifat dan lokasi antigen yang menginduksi atau yang merupakan sasaran dari respons imun tersebut.

Berdasarkan mekanisme reaksi imunologik yang terjadi, Gell dan Coombs membagi reaksi hipersensitivitas menjadi 4 golongan, yaitu reaksi hipersensitivitas tipe I, II, III dan IV.²⁴

1. Hipersensitivitas tipe I biasa disebut hipersensitivitas tipe cepat (*immediate hypersensitivity*) yaitu reaksi hipersensitivitas yang terjadi apabila alergen atau antigen bereaksi dengan antibodi kelas tertentu yang terikat pada bagian Fc sel mast atau sel-sel basofil yang beredar. Hal ini

menyebabkan degranulasi sel mast dan keluarnya zat-zat mediator inflamasi.

2. Hipersensitivitas tipe II biasa disebut reaksi sitotoksik (*cytotoxic reaction*) yaitu reaksi hipersensitivitas yang terjadi apabila antibodi bereaksi antigen atau haptan di permukaan sel yang menyebabkan terjadinya fagositosis sel dengan cara opsonisasi. Proses sitotoksik di atas melibatkan komplemen yang biasanya menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan.
3. Hipersensitivitas tipe III atau reaksi kompleks imun (*immune-complex reaction*) yaitu hipersensitivitas yang terjadi akibat pembentukan kompleks-kompleks imun antara antigen dan antibodi humoral yang menyebabkan pengaktifan komplemen.
4. Hipersensitivitas tipe IV atau hipersensitivitas tipe lambat dengan perantaraan sel (*delayed hypersensitivity*) yaitu reaksi hipersensitivitas yang melibatkan limfosit T yang tersensitisasi oleh antigen akan mengeluarkan sitokin.

2.3. Alergi

Istilah alergi dikemukakan pertama kali oleh von Pirquet pada tahun 1906, yang pada dasarnya mencakup baik respons imun berlebihan yang menguntungkan seperti yang terjadi pada vaksinasi, maupun mekanisme yang merugikan dan menimbulkan penyakit. Dewasa ini alergi diartikan sebagai reaksi imunologik terhadap antigen secara tidak wajar atau tidak tepat pada seseorang yang sebelumnya pernah tersensitisasi dengan antigen bersangkutan dan sebagian

besar para pakar lebih suka menggunakan istilah alergi dalam kaitannya dengan respons imun berlebihan yang menimbulkan penyakit atau yang disebut reaksi hipersensitivitas tipe I.²⁵ Antigen yang menyebabkan reaksi ini disebut alergen. Alergen tersebut dapat berupa makanan, obat-obatan, *pollen* dan lain-lain.^{26,27}

Reaksi alergi melibatkan antibodi spesifik IgE. Bila alergen berikatan dengan molekul IgE yang sebelumnya telah melekat pada permukaan mastosit atau basofil, maka hal itu akan menyebabkan dilepaskannya berbagai mediator oleh mastosit atau basofil. Keadaan ini menyebabkan manifestasi klinik seperti mata berair, peningkatan sekresi hidung dan bersin pada *hay fever*, sesak dan batuk pada asma, kulit kemerahan dan gatal pada urtikaria, bahkan bisa juga mengakibatkan kematian. Reaksi alergi ini biasanya membutuhkan waktu 15-30 menit setelah pemaparan antigen, namun bisa berlanjut sampai 10 atau 12 jam. Alergi ini diperantarai oleh IgE namun komponen selular yang terlibat adalah sel mast dan basofil yang dibantu oleh platelet, neutrofil dan eosinofil. Pada biopsi jaringan biasanya yang nampak adalah sel mast dan eosinofil.²⁸

Dalam 20-30 tahun terakhir telah terjadi peningkatan dalam angka kejadian alergi, bahkan di negara berkembang alergi atopik dapat dijumpai pada 20% populasi yang mencakup berbagai jenis kelainan yang dikaitkan dengan IgE, misalnya asma, rhinitis alergi, dermatitis atopik, alergi makanan dan lain-lain. Peningkatan prevalensi alergi diduga disebabkan berbagai faktor, diantaranya perubahan gaya hidup, misalnya penggunaan sistem pengatur suhu ruangan di dalam rumah disertai ventilasi yang kurang, penggunaan antibiotik spektrum luas, infeksi virus, diet dan lain-lain.^{29,30} Walaupun pada umumnya jarang

menimbulkan kematian, alergi menyebabkan penderita merasa tidak nyaman. Perkembangan IPTEK akhir-akhir ini dapat mengidentifikasi berbagai faktor genetik dan lingkungan dan mendukung pernyataan bahwa kedua faktor tersebut sangat mempengaruhi terjadinya atopi.³¹⁻³⁵

Konsep patogenesis alergi yang dianut saat ini adalah bahwa timbulnya alergi dan perjalanan penyakitnya ditentukan oleh interaksi antara gen dengan lingkungan; seseorang menderita alergi kalau ia memang peka (*susceptible*) sekaligus terpapar pada rangsangan yang sesuai atau tepat. Ada beberapa konsep mengenai interaksi gen-lingkungan ini. Yang pertama adalah bahwa baik genotip kepekaan maupun paparan terhadap faktor lingkungan, keduanya diperlukan untuk menimbulkan resiko alergi. Yang kedua adalah bahwa paparan terhadap alergen lingkungan meningkatkan resiko terjadinya alergi pada semua individu, tetapi pada individu dengan genotip kepekaan, resikonya lebih besar. Kemungkinan ketiga adalah paparan alergen lingkungan hanya meningkatkan resiko pada mereka yang peka, dan kemungkinan keempat adalah baik lingkungan maupun genotip meningkatkan resiko.³⁴

Faktor genetik berperan dalam mengatur berbagai aspek timbulnya gejala alergi, diantaranya mengatur pembentukan IgE, respons imun spesifik terhadap alergen tertentu dan respons imun berlebihan.²⁵ Upaya pencegahan timbulnya alergi saat ini terutama ditujukan untuk mengidentifikasi sedini mungkin individu beresiko tinggi dan memberikan terapi profilaktik untuk mencegah terjadinya penyakit kronik. Berbagai metode untuk mengidentifikasi faktor eksogen dan endogen telah dikembangkan dalam rangka memperoleh biomarker yang dapat

digunakan sebagai pedoman untuk memberikan terapi yang tepat. Selain IgE yang sudah lama diketahui sebagai faktor yang merupakan mediator terjadinya alergi bahkan digunakan untuk menunjang diagnosis etiologi, berbagai substansi biologis lain saat ini telah diketahui sangat erat kaitannya dengan patofisiologi alergi, misalnya berbagai jenis sitokin,³⁶ dan berbagai jenis substansi biokimiawi lain yang dihasilkan oleh sel-sel tubuh^{33,37} serta berbagai molekul permukaan dan reseptor seluler.^{29,31}

Meskipun faktor genetik diketahui berperan dalam penyakit alergi yang diperantarai IgE, namun faktor lingkungan ternyata lebih berperan pada proses terjadinya alergi. Hal tersebut dibuktikan melalui observasi pada wilayah-wilayah dengan keadaan ekonomi yang semakin meningkat, di mana pada wilayah-wilayah tersebut angka kejadian alergi meningkat pesat. Faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap terjadinya alergi tersebut adalah perubahan terhadap paparan penyakit infeksi pada masa kanak-kanak, polusi pada lingkungan, tingkat alergen dan perubahan pola makan.³⁸

2.4. Mekanisme Efektor pada Reaksi Alergi

Sel mast merupakan mediator yang berperan penting dalam respon imun, seperti pada reaksi alergi. Reaksi alergi terpacu pada saat alergen berikatan dengan IgE yang terikat pada FcεRI di sel mast. Sel mast ini akan berada di permukaan tubuh dan berfungsi untuk memberikan sinyal / tanda terhadap sistem imun adanya suatu infeksi lokal. Sekali teraktivasi, sel mast akan menginduksi reaksi inflamasi dengan cara mensekresi mediator kimia yang disimpan di dalam

granulanya serta akan mensintesa leukotrien dan sitokin setelah terjadinya aktivasi.^{38,39}

Reaksi alergi fase cepat yang disebabkan oleh degranulasi sel mast biasanya diikuti oleh inflamasi yang berlarut-larut atau biasa disebut respon fase lambat. Respon fase lambat ini akan melibatkan rekrutmen sel efektor yang lain, antara lain limfosit T_H2 , eosinofil, dan basofil yang secara signifikan menyumbang terjadinya respon alergi.³⁸

Selama proses inflamasi berlangsung beberapa substansi dilepaskan dari sel mast, diantaranya adalah histamin yang merupakan vasoaktif mediator implikasi yang paling potensial pada fase akut reaksi hipersensitivitas.^{40,41} Aktivasi sel mast tersebut juga menyebabkan fosforilasi *tyrosine kinase* dan mobilisasi internal ion Ca^{2+} . Hal ini selanjutnya akan diikuti oleh aktivasi protein kinase C, peningkatan *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) dan *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), serta pelepasan sitokin-sitokin inflamasi. Pelepasan histamin dari sel mast ini juga diakibatkan oleh penurunan kadar siklik AMP (cAMP).^{42,43}

Pada saat teraktivasi, sel mast ini akan mensintesa dan melepaskan kemokin, mediator lipid seperti leukotrien, *platelet activating factor* (PAF) dan sitokin yaitu IL-4 dan IL-13 yang akan mengekalkan respon T_H2 . Mediator-mediator ini akan berperan pada respon inflamasi akut dan kronik. Mediator lipid umumnya menyebabkan kontraksi otot polos, peningkatan permeabilitas vaskuler, sekresi mukus dan menginduksi aktivasi leukosit yang berperan pada respon fase lambat. Leukotrien berfungsi untuk mempertahankan respon inflamasi di jaringan.³⁸

Pada reaksi alergi, degranulasi sel mast dan aktivasi sel T_H2 selain menyebabkan terakumulasinya eosinofil dalam jumlah besar pada tempat terjadinya alergi juga didapatkan basofil meski tidak sebanyak eosinofil.³⁸

Seperti halnya eosinofil, basofil akan mengekspresikan FcεRI pada permukaan selnya. Akibat dari aktivasi sitokin ataupun antigen tersebut, basofil akan melepaskan histamin dan IL-4 dari granula basofiliknya.³⁸

Sel basofil mempunyai granula sekretorik seperti pada sel mast. Sel basofil dan sel mast mengandung berbagai mediator baik yang ada sebelumnya (*preformed*) misalnya histamin, *serine protease*, heparin, maupun yang baru dibentuk sebagai respons terhadap rangsangan, misalnya prostaglandin (PGD₂), leukotrien, *platelet activating factor* (PAF) dan berbagai jenis sitokin. Mediator-mediator ini menarik sel-sel inflamasi lain sehingga menimbulkan manifestasi klinik alergi seperti inflamasi, bronkospasme, sekresi lendir berlebihan, peningkatan permeabilitas vaskuler yang berakibat edema.^{44,45}

Eosinofil merupakan leukosit bergranula yang berasal dari sumsum tulang. Dinamakan eosinofil oleh karena granulanya mengandung arginin yang kaya akan protein, yang akan berwarna merah apabila diberi pewarnaan *acidic eosin*. Normalnya eosinofil ini hanya ada sedikit di sirkulasi darah, dan kebanyakan ditemukan di jaringan terutama di jaringan ikat seperti saluran nafas, usus, epitel urogenital.³⁸

Eosinofil ini mempunyai 2 fungsi efektor. Pertama, pada saat teraktivasi ia akan melepaskan granula protein beracun (toksik) dan radikal bebas, yang selain dapat membunuh mikroorganisme dan parasit juga dapat menyebabkan kerusakan

jaringan akibat reaksi alergi. Kedua, aktivasi eosinofil akan menginduksi disintesis mediator kimia seperti prostaglandin, leukotrien dan sitokin yang dapat memperbesar respon inflamasi dengan cara mengaktifkan sel epitel, merekrut dan mengaktifkan lebih banyak sel-sel eosinofil dan leukosit.³⁸

Pada reaksi alergi lokal, degranulasi sel mast dan aktivasi T_H2 menyebabkan eosinofil terakumulasi dalam jumlah besar dan siap untuk diaktifkan. Kehadiran eosinofil tersebut menandakan terjadinya inflamasi alergi kronik dan menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan.^{38,46} Eosinofil tersebut akan mengekspresikan FcεRI pada permukaan selnya dan akan diaktivasi oleh sitokin ataupun antigen untuk melepaskan histamin dan IL-4 dari granulanya.³⁸

2.5. Enzim Siklooksigenase-2

Prostaglandin diklasifikasikan sebagai mediator lipid pada inflamasi, yang merupakan derivat dari asam arakidonat. Prostaglandin terdapat di seluruh jaringan / organ. Prostaglandin bekerja secara lokal dan cepat dimetabolisme oleh tubuh. Prostaglandin diproduksi setelah terjadi aktivasi sel mast, basofil, dan makrofag. Prostaglandin juga dapat disintesis oleh neutrofil dan eosinofil.⁴⁷ *Prostaglandin D₂* (PGD₂) adalah mediator utama, yang kadarnya meningkat oleh siklooksigenase-2 pada reaksi inflamasi. Prostaglandin memberikan efek yang mirip dengan histamin, diantaranya vasodilatasi, bronkokonstriksi, dan kemotaksis neutrofil. Produksi prostaglandin dikatalisis oleh 2 enzim yang berbeda, yaitu siklooksigenase-1 dan siklooksigenase-2. Siklooksigenase-1 terlibat dalam fungsi fisiologi tubuh yang normal, diantaranya memproduksi

mukosa lambung, ekskresi air dari ginjal, dan formasi platelet. Sedangkan siklooksigenase-2 terlibat dalam respon inflamasi, termasuk reaksi alergi.^{18,48}

Respon alergi sering dikaitkan dengan peningkatan produksi prostaglandin. *Prostaglandin D₂* (PGD₂) adalah prostaglandin utama yang dihasilkan oleh sel mast, saat induksi oleh alergen dan diproduksi secara adekuat pada penyakit alergi, seperti asma, dermatitis alergi, dan konjungtivitis alergi. Peran dari *Prostaglandin D₂* (PGD₂) dalam penyakit alergi sebenarnya masih belum jelas.⁴⁹ Pada beberapa penelitian, ada beberapa bukti yang menunjukkan bahwa *Prostaglandin D₂* (PGD₂) memberikan peran dalam penyakit alergi seperti bronkokonstriksi pada penyakit asma, vasodilatasi dan memperkuat edema jaringan yang mengalami respon alergi. Selain itu *Prostaglandin D₂* (PGD₂) juga berperan dalam kemotaksis neutrofil pada penyakit alergi.⁵⁰

Hambatan terhadap sintesis prostaglandin dengan cara menghambat aktivitas siklooksigenase dapat menekan reaksi alergi pada mata. Anti Inflamasi Non Steroidal (AINS) dapat menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-1 maupun enzim siklooksigenase-2 yang berperan pada proses inflamasi alergi. Karena efek hambatan inilah, beberapa jenis AINS dapat digunakan sebagai terapi penyakit alergi pada mata, terutama konjungtivitis alergi. Pada beberapa studi lingkungan menunjukkan bahwa *ketorolac tromethamine* 0,5% lebih signifikan daripada *placebo* dalam menekan inflamasi pada konjungtiva, rasa gatal pada mata, pembengkakan pada mata, *discharge*, lakrimasi, sensasi benda asing, dan kemerahan pada konjungtiva. Walaupun tidak direkomendasikan oleh *Food and Drugs Association* (FDA), AINS yang lain seperti *diclofenac sodium* 0,1%,

flurbiprofen, aspirin, piroxicam, dan indomethacin, telah menunjukkan hasil yang efektif untuk menangani konjungtivitis alergi pada beberapa studi / penelitian terhadap manusia dan hewan.⁵¹ Hanya *ketorolac tromethamine* 0,5% yang direkomendasikan oleh *Food and Drugs Association (FDA)* untuk digunakan sebagai peringan / penekan gejala konjungtivitis alergi terutama gejala gatal.

Siklooksigenase-2 terbukti secara aktif berperan pada *allergic nasal inflammation* pada tikus yang telah disensitisasi. Hal ini dibuktikan dengan penggunaan *etodolac (selective COX-2 inhibitor)* dapat menurunkan reaksi alergi pada tikus tersebut, sedangkan *indomethacin (non-selective COX inhibitor)*, *ramatroban (thromboxane A₂ receptor antagonist)*, dan *zafirlukast (cys-leukotriene receptor antagonist)* tidak mengakibatkan penurunan reaksi alergi.⁵² Semua hal di atas diasumsikan bahwa hambatan terhadap aktivitas siklooksigenase, terutama siklooksigenase-2 dapat menekan gejala-gejala penyakit konjungtivitis alergi.

2.6. Peran Compound 48/80 dalam Induksi Alergi

Compound 48/80 merupakan produk kondensasi dari N-methyl-p-methoxyphenethylamine dengan formaldehid, yang dapat larut dalam air.⁵³ *Compound 48/80* ini dapat menginduksi sel mast menjadi degranulasi dan melepaskan mediator histamin.⁵⁴

Mekanisme kerja *Compound 48/80* tersebut secara umum adalah menginisiasi pembentukan *superoxide anion* dengan inaktivasi *A-kinase* melalui penurunan konsentrasi cAMP intraseluler di sel mast. Pembentukan *superoxide*

anion tersebut akan menghasilkan peningkatan kadar kalsium intraseluler, di mana hal ini akan menyebabkan pelepasan histamin dari sel mast.⁵⁵ *Compound 48/80* mengaktivasi enzim lipooksigenase dan siklooksigenase, sehingga dihasilkan leukotrien dan prostaglandin.¹⁷

Pada aplikasi secara topikal pada mata tikus dalam dosis 50-1.000 µg, didapatkan hasil gambaran udem konjungtiva dan pembengkakan palpebra dengan derajat yang berbeda pada hasil pengamatan. Pada pemeriksaan histologi, didapatkan peningkatan degranulasi sel mast dan infiltrasi neutrofil pada dosis yang semakin tinggi. Penurunan jumlah sel mast yang degranulasi didapat setelah 6 jam aplikasi *Compound 48/80*, dan tidak didapatkan perubahan jumlah lagi setelah 72 jam aplikasi.¹⁴ Hal ini menunjukkan adanya hubungan dosis dengan reaksi alergi yang ditimbulkan (*dose-related*) dan hubungan antara durasi dengan reaksi alergi yang ditimbulkan (*time-related*). Dari beberapa percobaan sebelumnya dapat disimpulkan bahwa aplikasi *Compound 48/80* secara topikal pada tikus dengan dosis 250 µg akan menghasilkan gambaran yang sangat mirip konjungtivitis alergi pada manusia, secara klinis maupun histopatologis, sehingga hal ini dapat dijadikan sebagai model reaksi alergi dan anafilaksis okuler yang relevan dan praktis.^{14,55}

2.7. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Teh Hijau

Teh (*Camellia sinensis*) telah dipakai sebagai minuman sehari-hari sejak ribuan tahun yang lalu di Cina. Dan sekarang teh merupakan minuman kedua yang paling banyak dikonsumsi manusia setelah air. Secara tradisional teh banyak

diketahui memiliki efek yang menguntungkan bagi kesehatan, meskipun efek tersebut belum banyak dibuktikan di laboratorium sebelum tahun 1970-an. Efek yang menguntungkan tersebut antara lain teh merupakan antioksidan kuat, teh dapat membantu mempertahankan kolesterol plasma pada level yang menyehatkan sehingga dapat menurunkan resiko terjadinya penyakit kardiovaskuler dan menurunkan hipertensi, teh dapat mencegah dan menurunkan infeksi, dan dapat dipakai sebagai antitumor.⁵⁶ Kombinasi EGCG dengan vitamin C dapat menurunkan kadar kolesterol darah.⁷

Komponen aktif teh yang bertanggung jawab terhadap efek biologi teh dikenal sebagai *catechin* (juga dikenal sebagai polifenol). Senyawa polifenol tersebut merupakan kandungan aktif teh hijau yang memiliki efek terhadap sistem imun. Daun teh hijau kering memiliki kandungan 15-30% senyawa polifenol yang terdiri dari *Epigallocatechin gallate* (EGCG) (59,04%), *Epigallocatechin* (EGC) (19,28%), *Epicatechingallate* (ECG) (13,69%), *Epicatechin* (EC) (6,39%) dan *Gallocatechin* (GC) (1,60%). Kelima jenis *catechin* tersebut memiliki kemampuan yang berbeda apabila ditinjau dari efek biologinya sebagai antimikroba dan antikanker. *Catechin* teh hijau dapat membantu dalam proses fagositosis dengan cara menghambat kerja enzim hialuronidase. Enzim tersebut dibutuhkan bakteri untuk masuk ke dalam sel tubuh.^{57,58}

EGCG merupakan *catechin* utama yang terdapat di ekstrak teh dan merupakan bentuk yang paling aktif di antara semua jenis *catechin* serta memiliki efek biologi yang paling besar dibanding *catechin* yang lain. EGCG memiliki efek antikanker,⁵⁹ antimikroba,^{60,61} antioksidan^{59,62} dan anti alergi.^{56,63} EGCG dikenal

memiliki efek imunomodulator setelah diketahui bioavailabilitasnya di plasma sangat tinggi setelah seseorang minum teh.⁶⁴ Nakagawa K. dkk (1997) melaporkan tentang orang sehat dengan kadar EGCG dan EGC dalam plasma sebelum perlakuan di bawah kadar yang terdeteksi (<2 pmol/ml), kemudian diberikan kapsul ekstrak teh hijau yang memiliki kandungan 225, 375, 525 mg EGCG dan 7,5, 12,5, 17,5 mg EGC. 90 menit sesudah perlakuan tersebut, kadar EGCG dan EGC dalam plasma mencapai 657, 4300, 4410 pmol EGCG/ml, dan 35, 144, 255 pmol EGC/ml (0,2-2,0% dari dosis yang diberikan).⁶⁴

EGCG juga sering disebut sebagai tea catechin; (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-(3,4,5-trihydroxybenzoate); atau 3,4-Dihydro-5,7-dihydroxy-2R-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2H-1-benzopyran-3R-yl-3,4,5-trihydroxy-benzoate. Secara fisik, EGCG merupakan suatu ekstrak yang berbentuk serbuk berwarna putih sampai merah muda dengan titik luluh 218°C yang larut dalam air dan pelarut organik seperti ethanol dan dimethyl formamide. EGCG stabil di dalam suhu kamar biasa namun bersifat higroskopik dan sensitif terhadap cahaya.^{7,8,11,65}

2.8. Efek EGCG terhadap Sistem Imun

Catechin teh hijau diketahui memiliki efek terhadap sistem imun.^{57,58} *Catechin* tersebut dapat membantu dalam proses fagositosis dengan cara menghambat kerja enzim hialuronidase. Enzim tersebut dibutuhkan bakteri untuk masuk ke dalam sel tubuh.⁶⁶ *Catechin* teh hijau dapat meningkatkan ketahanan limfosit dari penderita diabetes terhadap kerusakan DNA akibat *standard*

oxidative challenge dengan hidrogen peroksida apabila penderita tersebut telah meminum teh hijau selama 2 minggu. Efek tersebut dibutuhkan sistem imun sebab pada penderita yang terinfeksi bakteri terjadi peningkatan produksi senyawa oksigen reaktif.⁵⁸

Pada penelitian Johan A. dkk, di mana mencit diberikan minuman tambahan 70 mg teh hijau setiap hari selama 4 minggu kemudian diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* intraperitoneal didapatkan peningkatan kemampuan fagositosis makrofag dan peningkatan respons proliferasi limfosit.⁶⁷

EGCG juga terbukti dapat menstimulasi produksi *interleukin-1 alpha* (IL-1 α), *interleukin-1 beta* (IL-1 β), dan *tumour necrosis factor alpha* (TNF α) oleh kultur sel mononuklear perifer.⁶⁸ Pemberian *Epigallocatechin gallate in vitro* (EGCG *in vitro*) dapat meningkatkan produksi *interleukin-12* dan *interferon-gamma* (IFN- γ) serta menurunkan produksi *interleukin-10* pada kultur makrofag.⁶⁹ Pemberian EGCG 0,5 $\mu\text{g/ml}$ dapat menghambat pertumbuhan *Legionella pneumophila* dalam kultur makrofag. Efek tersebut hilang apabila dilakukan penambahan antibodi anti-IFN- γ dan anti-TNF α . EGCG juga memiliki efek proteksi terhadap radiasi ultraviolet yang menyebabkan immunosupresi dan immunotoleransi, di mana EGCG akan menyebabkan berkurangnya produksi IL-10 dan meningkatnya produksi IL-12 di sel epidermal dan dermal.^{59,69}

EGCG teh hijau sebagai anti alergi juga sudah banyak dibuktikan. Pada penelitian Shiozaki dkk (1997), dibuktikan bahwa polifenol dari ekstrak teh hijau, teh hitam dan teh oolong dapat menghambat reaksi *passive cutaneous anaphylaxis* (PCA) pada mencit. Dari penelitian tersebut terbukti semua komponen polifenol

yang dicobakan antara lain *Epigallocatechin gallate* (EGCG), *Epicatechin gallate* (ECG) dan *Epigallocatechin* (EGC), EGCG memiliki efek penghambat paling besar dibanding ECG dan EGC. Penelitian Shiozaki tersebut membuktikan bahwa EGCG secara signifikan dapat mencegah terjadinya reaksi alergi tipe I.⁶³ EGCG sebagai anti alergi dibuktikan juga oleh Tachibana H. dkk (2000), di mana EGCG mampu menghambat produksi histamin dengan jalan menghambat kerja enzim *histidin decarboxylase* dan menghambat proses degranulasi basofil pada basofil manusia.⁷⁰ Pada penelitian yang lain, Sano M. dkk. (1999), juga membuktikan bahwa pemberian secara oral dua derivat *catechin* yaitu *Epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate* dan *Epigallocatechin 3-O-(4-O-methyl) gallate* dari teh oolong secara signifikan dapat menghambat reaksi alergi tipe I pada mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin dan *incomplete Freund's adjuvant*.⁷¹

EGCG *pretreatment* dapat mengaktivasi kuat *AMP-activated protein kinase* (AMPK) dan menginhibisi / menurunkan ekspresi siklooksigenase-2.⁷² Pada penelitian baru-baru ini, EGCG *pretreatment* dapat menghambat ekspresi siklooksigenase-2 pada kulit mencit yang diinduksi oleh *12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA). EGCG juga mensupresi ekspresi siklooksigenase-2 pada kultur *human mammary epithelial cells* (MCF-10A) yang distimulasi oleh *12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA).⁷³ *Green Tea Polyphenols* (GTP) dapat menurunkan ekspresi mediator inflamasi seperti siklooksigenase-2, *interferon-gamma* (IFN- γ), dan *tumour necrosis factor alpha* (TNF α) pada mencit dengan arthritis.⁷⁴ EGCG teh hijau menghambat aktivitas dan ekspresi siklooksigenase-2 dan nitric oxide synthase-2 pada kondrosit manusia

yang diinduksi oleh IL-1 beta (IL-1 β).⁷⁵ EGCG teh hijau secara selektif menghambat ekspresi siklooksigenase-2 tanpa mempengaruhi ekspresi siklooksigenase-1 pada sel kanker prostat manusia.⁷⁶

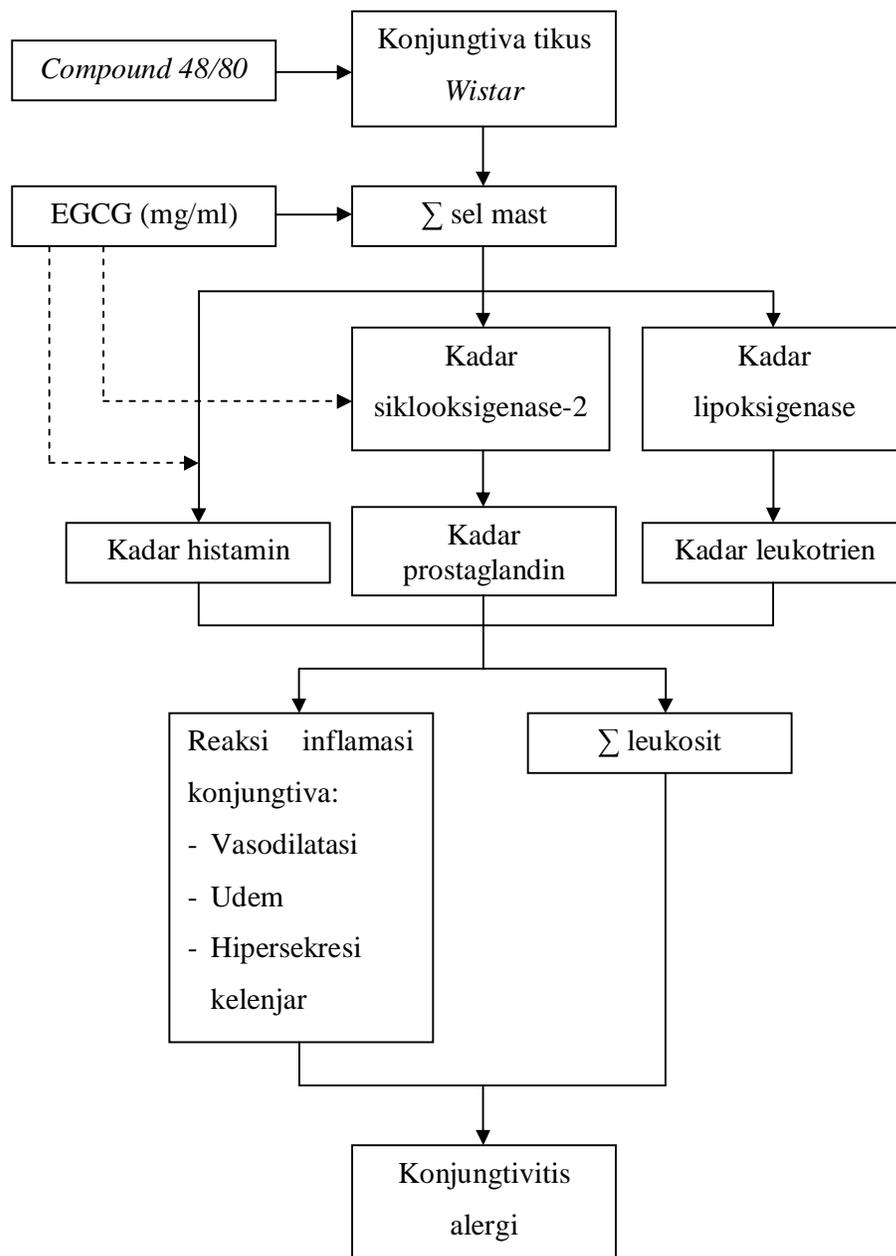
Penghambatan EGCG terhadap aktivasi proses inflamasi secara *ex vivo* maupun *in vivo* sudah mulai terjadi dalam waktu 1 sampai 2 jam pemaparan.^{9,11} Beberapa laporan menyebutkan bahwa potensi penghambatan proses inflamasi EGCG bersifat *dose-dependet* secara *in vitro*, namun secara *in vivo* belum pernah dilaporkan. Kisaran dosis *in vitro* yang pernah dilaporkan dapat menimbulkan penghambatan proses inflamasi adalah 10⁻³ mg/ml sampai dengan 10⁻¹ mg/ml atau 10⁻¹ μ M sampai dengan 2 x 10⁻² μ M.⁹⁻¹²

Sejauh ini, penggunaan EGCG sebagai antiinflamasi masih sebatas ajuvan / penunjang terapi utama. Selain sebagai antioksidan, pemakaian EGCG sebagai terapi pada tingkat klinis masih terus diteliti baik sebagai antiinflamasi, antialergi, antiviral / antibakteri, dan antiproliferatif / antikanker. Di bidang oftalmologi, belum ada hasil penelitian yang menjelaskan efek EGCG pada fisiologi atau patologi mata. Meskipun demikian, hasil penelitian efek EGCG yang menyangkut patologi alergi dan anafilaksis secara umum juga dapat menggambarkan patofisiologi alergi pada mata.

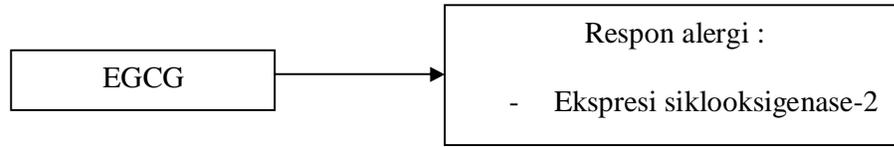
Beberapa laporan mengemukakan efek toksik EGCG baik secara lokal maupun sistemik. Stratton SP dkk, 2000, tidak menemukan efek toksik lokal pada kulit mencit strain *BALB/c* dan *SKH1* yang diolesi salep EGCG dengan berbagai tingkat dosis.⁶⁵ Sedangkan menurut Pisters KM dkk, 2001, terdapat efek samping sistemik EGCG oral yang mirip efek *caffeine* pada dosis tertentu.⁷⁷ Schmidt M

dkk, 2005, melaporkan bahwa EGCG dosis tinggi (>3 mg/ml) bersifat sitotoksik terhadap sel hepatosit tikus.⁷⁸

2.9. Kerangka Teori



2.10. Kerangka Konsep



2.11. Hipotesis

2.11.1. Hipotesis Mayor

Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) topikal dapat menekan ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada jaringan konjungtiva model tikus *Wistar*.

2.11.2. Hipotesis Minor

1. Ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada jaringan konjungtiva tikus *Wistar* yang mendapat EGCG topikal berbagai tingkat dosis lebih rendah dibandingkan dengan yang mendapatkan tetes mata air mata buatan.
2. Ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada jaringan konjungtiva tikus *Wistar* yang mendapat EGCG topikal dosis yang lebih tinggi lebih rendah dibandingkan dengan yang mendapatkan EGCG topikal dosis lebih rendah.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Ruang Lingkup

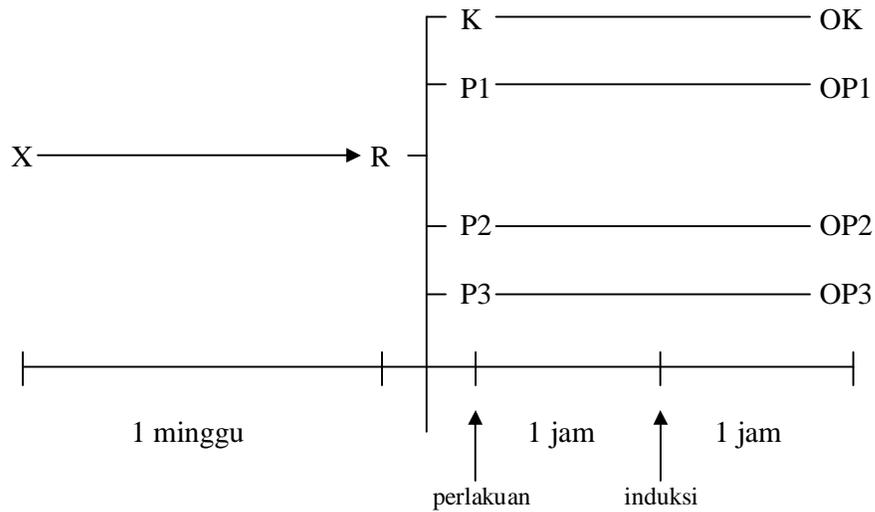
Ruang lingkup penelitian ini adalah Farmakologi, Ilmu Kesehatan Mata, Patologi Anatomi dan Biologi Molekuler.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Unit Pemeliharaan Hewan Penelitian (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Pelaksanaan penelitian adalah bulan Maret sampai Juli 2009.

3.3. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratories dengan pendekatan *post-test only controlled group design*. Sebagai objek pada penelitian ini adalah tikus *Wistar* dengan konjungtivitis alergi.



Keterangan :

X → R = Masa adaptasi (aklimatisasi) selama 1 minggu

R = Randomisasi

K = Kontrol, sebagai pembanding, tikus mendapatkan perlakuan tetes mata air mata artifisial (Cendo Lyteers[®]) dan *Compound 48/80* 250 µg/tetes/mata → Kelompok Kontrol (K)

P1 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5×10^{-2} mg/ml dan *Compound 48/80* 250 µg/tetes/mata → Kelompok EGCG Dosis 1 (EGCG1)

P2 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5×10^{-1} mg/ml dan *Compound 48/80* 250 µg/tetes/mata → Kelompok EGCG Dosis 2 (EGCG2)

P3 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5×10^0 mg/ml dan *Compound 48/80* 250 µg/tetes/mata → Kelompok EGCG Dosis 3 (EGCG3)

OK = Pengamatan kelompok kontrol K

OP1 = Pengamatan kelompok perlakuan P1

OP2 = Pengamatan kelompok perlakuan P2

OP3 = Pengamatan kelompok perlakuan P3

3.4. Sampel Penelitian

3.4.1. Sampel

Sampel penelitian adalah tikus strain *Wistar* galur murni

3.4.2. Cara Pengambilan Sampel

Kriteria inklusi, meliputi :

- a. Tikus betina
- b. Umur 2 – 3 bulan
- c. Berat badan 200 – 300 gram
- d. Tikus tampak aktif
- e. Pada pemeriksaan luar tidak tampak adanya kelainan anatomik khususnya kelainan bola mata

Sedangkan kriteria eksklusi adalah tikus mati sebelum waktu terminasi.

3.4.3. Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO yaitu minimal adalah 5 tikus per kelompok. *Drop out* sebanyak 10-20% (2 tikus). Sehingga jumlah sampel total untuk kelompok penelitian adalah 24 ekor tikus (24 bola mata).

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah jenis perlakuan yang diberikan : EGCG dalam berbagai dosis (dosis 1, 2, dan 3).

3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah respons alergi berupa ekspresi siklooksigenase-2 pada jaringan konjungtiva.

3.6. Definisi Operasional

3.6.1. Hal yang dilakukan :

3.6.1.1. Perlakuan

Diberikan tetes mata EGCG (*Epigallocatechin-3 Gallate* dari *Sigma Aldrich*, nomor produk E4268), yang terdiri dari beberapa sediaan tetes mata EGCG dengan berbagai tingkat dosis, yaitu 5×10^{-2} mg/ml, 5×10^{-1} mg/ml, dan 5×10^0 mg/ml. Pelarut EGCG adalah air mata artifisial Cendo Lyteers[®] dan pembuatannya dilakukan di *PT. CENDO Pharmaceuticals*, Bandung. Tetes mata

EGCG diberikan sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam, yang diberikan sebelum induksi alergen dengan *Compound 48/80* (EGCG sebagai *pretreatment*). Tetes mata diberikan pada mata kanan dan kiri.

3.6.1.2. Induksi alergen

Diberikan tetes mata alergen (*Compound 48/80* dari *Sigma Aldrich*, nomor produk C2313) dengan dosis 250 µg/tetes. Pelarut *Compound 48/80* adalah air mata artifisial Cendo Lyteers® dan pembuatannya dilakukan di *PT. CENDO Pharmaceuticals*, Bandung. Tetes mata *Compound 48/80* diberikan sebanyak 1 tetes pada mata kanan dan kiri 1 jam setelah EGCG *pretreatment* yang pertama diberikan.

3.6.1.3. Kontrol

Diberikan tetes mata air mata artifisial Cendo Lyteers® dan pembuatannya dilakukan di *PT. CENDO Pharmaceuticals*, Bandung.

3.6.2. Ekspresi siklooksigenase-2 jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi dinilai dengan pemeriksaan imunohistokimia. Ekspresi siklooksigenase-2 dinilai dengan cara menghitung jumlah sel yang sitoplasmanya mengekspresikan siklooksigenase-2 yang tampak pada pemeriksaan mikroskop perbesaran 400 x. Tiap bola mata dibuat menjadi 1 preparat. Tiap preparat diamati dalam 10 lapangan pandang, yaitu 5 lapangan pandang pada konjungtiva

superior dan konjungtiva inferior. 5 lapangan pandang tersebut terdiri dari 2 lapangan pandang pada konjungtiva bulbi, 2 lapangan pandang pada konjungtiva palpebra, dan 1 lapangan pandang pada fornix konjungtiva. Hasil yang telah didapat kemudian dihitung rata-rata ekspresi siklooksigenase-2 tiap lapangan pandang tiap bola mata.

3.7. Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1. Alat

- a. 4 buah kandang kelompok hewan coba dan perlengkapan pemeliharaannya di UPHP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
- b. Timbangan dengan skala gram
- c. Jam dengan penanda waktu menit dan alarm
- d. Speculum mata ukuran terkecil
- e. *Loop S + 3D*
- f. Senter
- g. *Spuit* 1 ml dengan 27G
- h. Set eksenterasi ukuran kecil
- i. Set pemeriksaan dan pengecatan imunohistokimia
- j. Mikroskop dengan fasilitas kamera digital
- k. Mikrometer untuk lensa okuler pada mikroskop

3.7.2. Bahan dan Materi

- a. Tikus strain *Wistar* berkelamin betina usia 2 – 3 bulan atau mempunyai berat badan 200 – 300 gram yang dikembangbiakkan dan dipelihara di UPHP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
- b. Tetes mata EGCG (*Sigma Aldrich*, nomor produk E4268) dengan berbagai tingkat dosis, yaitu 5×10^{-2} mg/ml, 5×10^{-1} mg/ml, dan 5×10^0 mg/ml
- c. Tetes mata Compound 48/80 (*Sigma Aldrich*, nomor produk C2313) dengan dosis 250 µg/tetes
- d. Tetes mata air mata artifisial Cendo Lyteers[®]
- e. *Buffer* formalin 10%

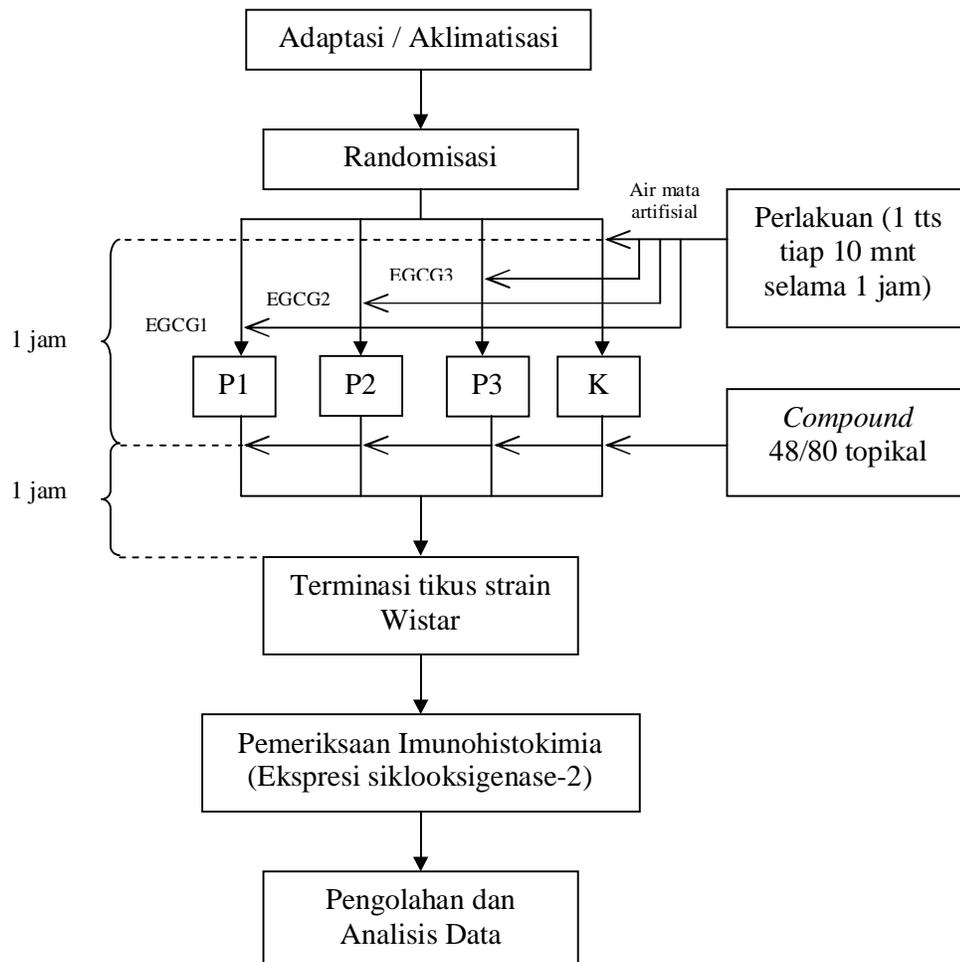
3.8. Cara Kerja

1. Sebanyak total 24 ekor tikus strain *Wistar* sesuai kriteria sampel diaklimatisasi di dalam 4 kelompok kandang dan lingkungan yang sama, diberi pakan standar yang sama secara *ad libitum* selama satu minggu.
2. Kemudian 24 ekor tikus tersebut dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan masing-masing kelompok 6 ekor tikus.
 - a. Kelompok 1, yaitu Kelompok Kontrol (K), mendapatkan perlakuan tetes mata air mata artifisial 1 tetes/mata setiap 10 menit selama 1 jam dan tetes mata *Compound 48/80* 250 µg/mata 1 tetes segera setelahnya.

- b. Kelompok 2, yaitu Kelompok EGCG Dosis 1 (P1), mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5×10^{-2} mg/ml 1 tetes setiap 10 menit selama 1 jam dan tetes mata *Compound 48/80* 250 μ g/mata 1 tetes segera setelahnya.
 - c. Kelompok 3, yaitu Kelompok EGCG Dosis 2 (P2), mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5×10^{-1} mg/ml 1 tetes setiap 10 menit selama 1 jam dan tetes mata *Compound 48/80* 250 μ g/mata 1 tetes segera setelahnya.
 - d. Kelompok 4, yaitu Kelompok EGCG Dosis 3 (P3), mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5×10^0 mg/ml 1 tetes setiap 10 menit selama 1 jam dan tetes mata *Compound 48/80* 250 μ g/mata 1 tetes segera setelahnya.
- 1) Prosedur pengambilan jaringan konjungtiva adalah sebagai berikut :
 - a. Tikus akan diterminasi.
 - b. Dilakukan eksenterasi pada mata tikus sesaat setelah dislokasi leher.
 - c. Bola mata yang sudah terlepas dimasukkan ke dalam cairan fiksasi yaitu *buffer* formalin 10%.
 - 2) Kualitas data penelitian juga dikontrol melalui perawatan hewan coba sebagai berikut :
 - a. Tikus akan ditempatkan pada kandang khusus, di mana setiap kandang berisi maksimal 10 ekor tikus.
 - b. Kandang hewan coba akan dibersihkan secara teratur dengan frekuensi serta kebersihan yang sama.

- c. Kandang hewan coba akan mendapat ventilasi dan pencahayaan yang memadai dan kualitasnya sama untuk setiap kandang.
 - d. Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Jenis pakan adalah pakan standar tikus berupa pelet.
- 3) Dijumpai tikus yang luka pada bola mata oleh karena trauma gigitan atau cakaran ataupun mati maka tikus tersebut dikeluarkan dari penelitian dan diganti dengan tikus baru. Perlakuan untuk tikus pengganti dilakukan sama seperti kelompok yang sesuai.

3.9. Alur Penelitian



3.10. Analisis Data

Data hasil penelitian akan diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Akan dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Bila distribusi datanya normal, maka untuk menguji perbedaan gambaran klinis dan histopatologis derajat konjungtivitis alergi pada seluruh kelompok perlakuan digunakan uji *One-Way ANOVA* dan untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok perlakuan digunakan uji *Post Hoc Bonferroni*.

Sedangkan bila distribusi datanya tidak normal, maka untuk menguji perbedaan gambaran klinis dan histopatologis derajat konjungtivitis alergi pada seluruh kelompok perlakuan digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok perlakuan digunakan uji *Mann-Whitney U*.

Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS*. Nilai signifikansi penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

BAB 4

HASIL PENELITIAN

4.1. Analisis Sampel

Sampel penelitian tiap kelompok perlakuan tidak mengalami pengurangan jumlah. Sampel penelitian tiap kelompok perlakuan tetap berjumlah 6 ekor tikus *Wistar*, sehingga besar sampel keseluruhan tetap berjumlah 24 ekor tikus (24 bola mata).

4.2. Analisis Deskriptif

Hasil pemeriksaan sampel preparat ekspresi siklooksigenase-2 jaringan konjungtiva tikus yang mengalami konjungtivitis alergi adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Ekspresi COX-2/LPB pada setiap kelompok

KELOMPOK	N	MINIMUM	MAKSIMUM	RATA-RATA
K	6	1	12	5.17
P1	6	1	7	3.50
P2	6	3	10	5.67
P3	6	4	7	5.50

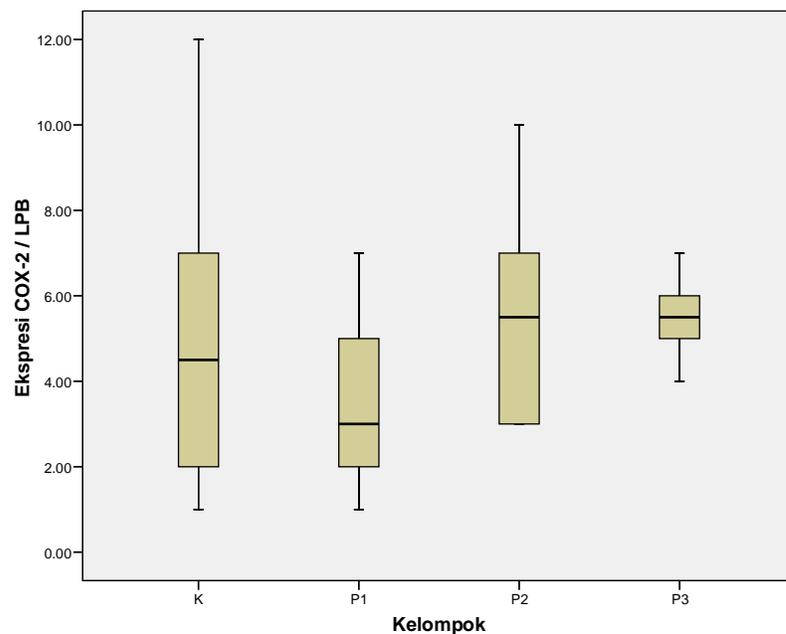
Tabel 1 memperlihatkan data rata-rata ekspresi siklooksigenase-2/LPB pada kelompok K yaitu 5.17, pada kelompok P1 yaitu 3.50, pada kelompok P2

yaitu 5.67, pada kelompok P3 yaitu 5.50. Rata-rata ekspresi siklooksigenase-2/LPB tertinggi pada kelompok P2.

Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi siklooksigenase-2 pada kelompok P1 lebih rendah dibandingkan kelompok K, rata-rata ekspresi siklooksigenase-2 pada kelompok P2 lebih tinggi dibandingkan kelompok K, dan rata-rata ekspresi siklooksigenase-2 pada kelompok P3 lebih tinggi dibandingkan kelompok K.

4.3. Analisis Inferensial

Hasil pemeriksaan ekspresi siklooksigenase-2 jaringan konjungtiva tikus yang mengalami konjungtivitis alergi dapat digambarkan dalam grafik *Box-Plot* sebagai berikut :



Gambar 1. Grafik *Box-Plot* ekspresi COX-2/LPB antara empat kelompok

Data ekspresi siklooksigenase-2/LPB diuji menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan diperoleh hasil data seluruh kelompok perlakuan berdistribusi normal. Sehingga dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*. Hasil pengolahan data rata-rata ekspresi siklooksigenase-2 lebih lanjut tidak didapatkan perbedaan yang bermakna secara statistik antar keempat kelompok, dengan nilai $p = 0,614$

BAB 5

PEMBAHASAN

EGCG teh hijau sebagai anti alergi juga sudah banyak dibuktikan. Pada penelitian Shiozaki dkk (1997), telah dibuktikan bahwa polifenol dari ekstrak teh hijau, teh hitam dan teh oolong dapat menghambat reaksi *passive cutaneous anaphylaxis* (PCA) pada mencit. Penelitian tersebut membuktikan bahwa EGCG secara signifikan dapat mencegah terjadinya reaksi alergi tipe I.⁶³ EGCG sebagai anti alergi dibuktikan juga oleh Tachibana H. dkk (2000), di mana EGCG mampu menghambat produksi histamin dengan jalan menghambat kerja enzim *histidin decarboxylase* dan menghambat proses degranulasi basofil pada basofil manusia.⁷⁰ Pada penelitian Sano M. dkk (1999), juga membuktikan bahwa pemberian secara oral dua derivat *catechin* yaitu *Epigallocatechin 3-0-(3-0-methyl) gallate* dan *Epigallocatechin 3-0-(4-0-methyl) gallate* dari teh oolong secara signifikan dapat menghambat reaksi alergi tipe I pada mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin dan *incomplete Freund's adjuvant*.⁷¹

Penelitian yang telah dilakukan Jin-Taek H. dkk (2007), membuktikan bahwa EGCG *pretreatment* dapat mengaktivasi kuat *AMP-activated protein kinase* (AMPK) dan menginhibisi / menurunkan ekspresi siklooksigenase-2 pada sel-sel kanker kolon.⁷² Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Kundu JK. dkk (2003), membuktikan EGCG *pretreatment* dapat menghambat ekspresi siklooksigenase-2 pada kulit mencit yang diinduksi oleh *12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA). EGCG juga mensupresi ekspresi

siklooksigenase-2 pada kultur *human mammary epithelial cells* (MCF-10A) yang distimulasi oleh *12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA).⁷³ Pada penelitian Haqqi TM. dkk (1999), membuktikan *Green Tea Polyphenols* (GTP) dapat menurunkan ekspresi mediator inflamasi seperti siklooksigenase-2, *interferon-gamma* (IFN- γ), dan *tumour necrosis factor alpha* (TNF α) pada mencit dengan arthritis.⁷⁴ Penelitian Ahmed S. dkk (2002), membuktikan EGCG teh hijau menghambat aktivitas dan ekspresi siklooksigenase-2 dan nitric oxide synthase-2 pada kondrosit manusia yang diinduksi oleh IL-1 beta (IL-1 β), sehingga hasil ini mengindikasikan bahwa EGCG kemungkinan besar dapat digunakan dalam penanganan osteoarthritis.⁷⁵ Penelitian Hussain T. dkk (2005), membuktikan bahwa EGCG teh hijau secara selektif menghambat ekspresi siklooksigenase-2 tanpa mempengaruhi ekspresi siklooksigenase-1 pada sel kanker prostat manusia.⁷⁶

Penelitian-penelitian mengenai efek EGCG terhadap siklooksigenase-2 yang pernah dilakukan sebelumnya sebagian besar menggunakan metode *in vitro* dan sebagian lagi dilakukan pada mencit. Selain itu, penelitian-penelitian tersebut banyak dilakukan pada kanker dan inflamasi, akan tetapi belum pernah dilakukan penelitian tentang efek EGCG terhadap ekspresi siklooksigenase-2 pada alergi. Sedangkan, pada penelitian ini menggunakan tikus *Wistar* dan dilakukan pada salah satu penyakit alergi, yaitu konjungtivitis alergi, sehingga pada penelitian ini sangat memungkinkan terjadinya perbedaan hasil dengan penelitian-penelitian sebelumnya, dikarenakan perbedaan metode dan hewan percobaan. Pada penelitian ini ditemukan bahwa EGCG tidak berpengaruh terhadap ekspresi

siklooksigenase-2. Namun, hasil ini tidak menutup kemungkinan bahwa EGCG mampu untuk menekan konjungtivitis alergi, karena EGCG masih mempunyai mekanisme atau jalur yang lain dalam menghambat alergi.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) topikal tidak berefek terhadap ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar*.

Ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada tikus *Wistar* yang mendapat EGCG topikal berbagai tingkat dosis, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna secara statistik dengan yang mendapatkan tetes mata air mata buatan. Demikian pula dengan ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada tikus *Wistar* yang mendapat EGCG topikal dosis yang lebih tinggi, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna secara statistik dengan yang mendapatkan EGCG topikal dosis lebih rendah.

Ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada kelompok K adalah 5.17. Ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada kelompok P1 adalah 3.50. Ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada kelompok P2 adalah 5.67. Ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada kelompok P3 adalah 5.50.

Hasil ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada kelompok K lebih tinggi dari kelompok P1, akan tetapi lebih rendah dari kelompok P2 dan P3. Hasil ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada kelompok P1 lebih rendah dari kelompok P2 dan P3. Hasil ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada kelompok P2 lebih tinggi dari kelompok P3.

6.2. Saran

Penelitian mengenai pemberian EGCG melalui jalur lain selain topikal yang dapat mempengaruhi ekspresi siklooksigenase-2 konjungtivitis alergi pada model tikus *Wistar* sebaiknya juga perlu dilakukan. Selain itu, perlu penelitian mengenai efek EGCG terhadap jalur lain selain jalur siklooksigenase-2 yang berperan pada patogenesis konjungtivitis alergi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chapel H, Hayney M, Misbah S, Snowden N. Anaphylaxis and allergy. In: Essentials of clinical immunology. 4th edition. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1999: 79.
2. Ray NF, Baraniuk JN, Thamer M, Rinehart CS, Gergen PJ, Kaliner M, et al. Direct expenditures for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis in 1996, including the contributions of related airway illnesses. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 401-407.
3. Dinowitz M, Rescigno R, Bielory L. Ocular allergic diseases: differential diagnosis, examination techniques, and testing. *Clin Allergy Immunol* 2000; 15: 127-150.
4. Liesegang TJ, Deutsch TA, Grand MG eds. Basic and clinical science course, Intraocular inflammation and uveitis, Section 9, 2001-2002. The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. San Francisco, 2001: 72.
5. Bartlett JD, Fiscella RG, Bennett E, et al, eds. Ophthalmic drug facts 2002. Facts and Comparisons. St.Louis, Missouri, 2002: 57-84.
6. Guyton AD, Hall JE. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 9. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 1997.
7. (-)-Epigallocatechin gallate. (on line): URL.
[http://www.chemicaland21.com/lifescience/foco/\(-\)-EPIGALLOCATECHIN%20GALLATE.htm](http://www.chemicaland21.com/lifescience/foco/(-)-EPIGALLOCATECHIN%20GALLATE.htm)

8. Ben B. Phytochemicals as nutraceuticals. (on line): URL. <http://www.benbest.com/nutrceut/phytochemicals.html#contents>
9. Katsuhiko T, Keiko N, Makoto N, Futoshi S, Hideo N. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin 3-gallate, a polyphenol of green tea, on neutrophil chemotaxis in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 2004; 52(14): 4571-4576.
10. Xiu-zu S, Zhi-gang BI, Ai-e X. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the expression of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide induced by ultraviolet B in HaCaT cells. *Chinese Medical Journal* 2006; 119(4): 282-287.
11. Yang F, Helieh SO, Shirish B, Willem JS, Craig JM, Gary WV. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor- κ B activation by inhibiting I κ B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol* 2001; 60(3): 528-533.
12. Kim SH, Jun CD, Suk K, Choi BJ, Lim H, Park S, et al. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *ToxSci Advance Access*, Published by Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology 2005.
13. Fujimura Y, Tachibana H, Yamamoto MM, Miyase T, Sano M, Yamada K. Antiallergic tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate, suppresses Fc ϵ RI expression in human basophilic KU812 cells. *J Agric Food Chem* 2002; 50(20): 5729-5734.

14. Allansmith MR, Baird RS, Ross RN, Barney NP, Bloch KJ. Ocular anaphylaxis induced in the rat by topical application of compound 48/80. Dose response and time course study. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989; 192: 145-153.
15. Tiligada E, Aslanis D, Delitheos A, Varonos D. Changes in histamine content following pharmacologically induced mast cell degranulation in the rat conjunctiva. *Pharmacol Res* 2000; 41: 667-670.
16. Khosravi E, Elena PP, Hariton C. Allergic conjunctivitis and uveitis models: reappraisal with some marketed drugs. *Inflamm Res* 1995; 44: 47-54.
17. Li GZ, Chai OH, Song CH. Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on compound 48/80-induced mast cell activation and passive cutaneous anaphylaxis. *Exp Mol Med* 2005; 37(4): 290-296.
18. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Acute and chronic inflammation. In: *Pathologic basis of disease*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 53-59, 61.
19. Spencer WH, Zimmerman LE. Conjunctiva. In: Spencer WH, ed. *Ophthalmic Pathology An Atlas and Textbook*. Vol. 1. Third edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1985: 109-116, 128-150.
20. Setzer PY, Nicols BA, Dawson CR. Unusual structure of rat conjunctival epithelium, light and electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 27: 531-537.

21. Oka T, Shearer TR, Azuma M. Involvement of cyclooxygenase-2 in rat models of conjunctivitis. *Curr Eye Res* 2004; 29(1): 27-34.
22. Fischer DA, Bonini S, Wahn U. Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis. *Allergy* 2003; 58: 1101-1113.
23. Iwata T, Ohkawa K, Uyama M. The fine structural localization of peroxidase activity in goblet cells of the conjunctival epithelium of rats. *Invest Ophthalmol* 1976; 15(1): 40-44.
24. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Disease caused by immune response: Hypersensitivity and autoimmunity. In: *Cellular and molecular immunology*, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2000: 404-423.
25. Brostoff J and Hall T. Hypersensitivity type I. In: Roitt I, Brostoff J and Male D. *Immunology* 4th ed. London Mosby Co, 1996: 22.2-22.17.
26. Galli S.J., Lantz C.S. Allergy. In: Paul W.E. *Fundamental immunology*. 4th eds. New York: Lippincott-Raven, 1999: 1127-1166.
27. Roitt I. *Essential immunology*. 8th eds. Oxford. Blackwell Science Ltd. 1994: 312-336.
28. Ewan P.W. ABC of allergies: Anaphylaxis. *BMJ*, 1998; 316: 1442-1445.
29. Mudde GC, Bheekha R and Bruijnzeel-Koomen CAFM. Consequences of IgE/CD23 mediated antigen presentation in allergy. *Immunol Today* 1995; 16: 380-383.
30. Hopkin JM. Mechanism of enhanced prevalence of asthma and atopy in developed countries. *Current opinion in Immunol* 1997; 9: 788-792.
31. Marone G. Asthma: recent advances. *Immunol Today* 1998; 19: 5-9.

32. Romagnani S. Atopic allergy and other hypersensitivities; interactions between genetic susceptibility, innocuous and/or microbial antigens and the immune system. *Current opinion in Immunol* 1997; 9: 773-775.
33. Barnes KC and Marsh DG. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* 1998; 19: 325-332.
34. Howard TD, Meyers DA, Bleecker ER. Mapping susceptibility genes for asthma and allergy. *J Allergy and Clin Immunol* 2000; 105: S477-481.
35. Casolaro V, Georas SN, Song Z, Ono SJ. Biology and genetics of atopic disease. *Current opinion in Immunol* 1996; 8: 796-803.
36. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, et al. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *The Lancet* 1999; 353: 196-200.
37. Gaston B, Sears S, Woods J, et al. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *The Lancet* 1998; 351: 1317-1319.
38. Janeway A.C., Travers P. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5th eds. New York: Churchill Livingstone, 2001: 473-481.
39. Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA. The mast cell. *Crit Rev Immunol* 1981; 3: 23-74.
40. Petersen LJ, Mosbech H, Skov PS. Allergen-induced histamine release in intact human skin in vivo assessed by skin microdialysis technique: characterization of factors influencing histamine releasability. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 672-679.

41. Moon PD, Na HJ, Kim HM. Action of enzyme food, green life enzyme of systemic and local anaphylaxis. *Orient Pharm Exp Med* 2003; 3: 46-50.
42. Alm PE. Modulation of mast cell cAMP levels. A regulatory function of calmodulin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984; 75: 375-378.
43. Botana LM, MacGlashan DW. Differential effects of cAMP-elevating drugs on stimulus-induced cytosolic calcium changes in human basophils. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 798-804.
44. Wheatley LM and Platts-Mills TAE. Perennial allergens and the asthma epidemic. *Science and Medicine*, 1996 May/June: 6-13.
45. Siraganian RP. Allergic Diseases. Introduction. Dalam: Rose NR, deMacaries EC, Fahey JL, et al (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunol* (4th ed). Washington DC. Am Soc Microbiol 1992; 676-677.
46. Foster P.S. Allergic Networks regulating eosinophilia. *J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 451-454.
47. English D. Components, immunity, and hemostasis. In: Rhoades RA, Tanner GA. *Medical Physiology*. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2003: 191-209.
48. Abbas AK. Diseases of immunity. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Pathologic basis of disease*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 194, 208.
49. Curtis-Prior P. *The Eicosanoids*. John Wiley & Sons, Ltd, 2004: 222

50. Wills-Karp M, Hershey GK. Immunological mechanism of allergic disorders. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003: 54.
51. Abelson MB, Chapin MJ, Sandman ER. Ocular allergy. In: Krouse JH, Chadwick SJ, Gordon BR, Derebery MJ. *Allergy and immunology: an otolaryngic approach*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 305.
52. Rahmana MA, Yatsuzukaa R, Jianga S, Uedaa Y, and Kamei C. Involvement of cyclooxygenase-2 in allergic nasal inflammation in rats. *International Immunopharmacology* 2006; 6(11): 1736-1742.
53. Sigma-aldrich. *Biochemicals and reagents for life science research*. Sigma-Aldrich Co. 2002-2003: 534.
54. Koibuchi Y, et al. Histamine release induced from mast cell by active components of compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 1985; 115: 163-170.
55. Choi YH, et al. Inhibition of anaphylaxis-like reaction and mast cell activation by water extract from fruiting body of *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(7): 1360-1365.
56. Weisburger, J.H. Second international scientific symposium on tea and human health: an introduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 220: 193-194.
57. Merken HM, Beecher GR. Measurement of Food Flavonoids by HPLC. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 577-594.

58. Beecher GR, Warden AB, Merken HM. Analysis of Tea Polyphenols. P.S.E.B.M. 1999 Vol 220.
59. Katiyar, S., A. Challa, T., S.. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate may be associated with alternations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2117-2124.
60. Ikigai, H., T. Nakae, Y. Hara, and T. Shimamura. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1147: 132-136.
61. Toda, M., S. Okuba, Y. Hara, and T. Shimamura. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Jpn J Bacteriol* 1991; 46: 839-844.
62. Ho, C. T., Q. Chen, H. Shi, K. Q. Zhang, and R. T. Rosen. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev Med* 1992; 21: 520-523.
63. Shiozaki T, Sugiyama K. Effect of tea extract, catechin, and caffeine against type-I allergic reaction. *Yakugaku Zasshi* 1997 Jul; 112(7): 448-454.
64. Nakagawa, K.S., absorption and distribution of tea catechin, (-) epigallocatechin-3-gallate in the rat. *J nutr Sci vitaminol*; 43: 679-684.
65. Stratton SP, Bangert JL, Alberts DS, Dorr RT. Dermal toxicity of topical (-) epigallocatechin-3-gallate in BALB/c and SKH1 mice. *Cancer Lett* 2000; 158(1): 47-52.

66. Vanderhaege LR, Bouic PJD. The Immune System Cure. Prentice Hall Canada.
67. Johan A, Susilaningsih N, Gunardi. Penelitian in vitro Efek Polifenol Teh Hijau terhadap Mekanisme Pertahanan Tubuh pada Mencit yang Diinokulasi *L. monocytogenes*. Laporan Akhir Penelitian DCRG Proyek URGE 2000/2001.
68. Sakagami, H., M. Takeda. Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin-1 production by human peripheral blood mononuclear cell. *Anticancer Res* 1995; 15: 971-974.
69. Matsunaga K., Klein T. W. Legionelle pneumophila replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokine formation by epigallocatechin gallate, a major form of tea catechin. *J Infection & immunity* 2001; 69: 3947-3953.
70. Tachibana H., Sunada Y. Identification of methylated tea catechin as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells. *J Biosci Biotechnol Biochem* 2000 Feb; 64(2): 452-454.
71. Sano M., Suzuki M. Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea. *J Agric Food Chem* 1999 May; 47(5): 1906-1910.
72. Jin-Taek H, Joohun HA, In-Ja P, Seong-Kyu L, Woon-Baik H, Min-Kim Y, Jin-Park O. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer letters* 2007; 247(1): 115-121.
73. Kundu JK, Hye-Kyung N, Kyung-Soo C, Young-Kyung K, Sang JL, Sang SL, Ok-Sub L, Young-Chul S, and Young-Joon S. Inhibition of Phorbol

- Ester-Induced COX-2 Expression by Epigallocatechin Gallate in Mouse Skin and Cultured Human Mammary Epithelial Cells. American Society for Nutritional Sciences 2003; 133: 3805S-3810S.
74. Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, Ahmad N, Lee MS, Kumar GK, Mukhtar H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. Proc Natl Acad Sci USA 1999 Apr 13; 96(8): 4524-4529.
75. Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. Free Radic Biol Med 2002 Oct 15; 33(8): 1097-1105.
76. Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. Int J Cancer 2005 Feb 10; 113(4): 660-669.
77. Pisters KM, Newman RA, Coldman B, Shin DM, Khuri FR, Hong WK, et al. Phase I trial of oral green tea extract in adult patients with solid tumors. J Clin Oncol 2001; 19(6): 1830-1838.
78. Schmidt M, Schmitz HJ, Baumgart A, Guedon D, Netsch MI, Kreuter MH, et al. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. Food Chem Toxicol 2005; 43(2): 307-314.