

**AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK TEH
HIJAU (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) TERHADAP *Staphylococcus
aureus* SECARA *IN VIVO* MENGGUNAKAN MODEL
*Drosophila melanogaster***

IMMUNOSTIMULANTS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF GREEN
TEA (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) EXTRACT AGAINST
Staphylococcus aureus *IN VIVO* USING THE
Drosophila melanogaster MODELS

SUHENRO

N012201012



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK TEH
HIJAU (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) TERHADAP *Staphylococcus
aureus* SECARA *IN VIVO* MENGGUNAKAN MODEL
*Drosophila melanogaster***

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

S U H E N R O

N012201012

kepada

PROGRAM MAGISTER ILMU FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN
AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN DAN ANTIBAKTERI
EKSTRAK TEH HIJAU (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze)
Terhadap *Staphylococcus aureus* SECARA IN VIVO
MENGGUNAKAN MODEL *Drosophila melanogaster*

Disusun dan diajukan oleh

SUHENDRO
N012201012

telah dipertahankan di hadapan panitia ujian yang dibentuk dalam rangka penyelesaian program studi magister farmasi sains fakultas farmasi Universitas Hasanuddin

pada tanggal 09 Februari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



Firzan Nainu, M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820610 2008011012



Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt
NIP. 19611111198703 2 001

Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi,

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin,



Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt
NIP. 198001012003121004



Prof. Dr. fer. nat. Marianti A Manggau, Apt.
NIP. 196702191992032002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : SUHENRO
NIM : N012201012
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S2

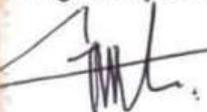
Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

"AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK TEH HIJAU (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) TERHADAP *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VIVO* MENGGUNAKAN MODEL *Drosophila melanogaster*"

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Januari 2023

Yang Menyatakan

SUHENRO



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wa ta'ala atas berkat, rahmat, dan petunjuk-Nya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Dalam pembuatan Tesis penulis tidak terlepas bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Untuk itu, penulis akan menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama dan dosen penasehat akademik yang telah membimbing, memberikan arahan dan motivasi, serta telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan masa studinya selama di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Prof. Dr. Sartini., M.Si., Apt selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan masukan serta saran dan telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan Tesis ini.
3. Ibu Prof. Dr. Latifah Rahman, DESS., Apt, Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt dan Bapak Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, M.Si, Apt selaku tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan saran dan masukan yang membangun kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan Tesis ini.
4. Dekan, Wakil Dekan, seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu, bantuan, dan fasilitas yang

diberikan kepada penulis selama menempuh studi hingga menyelesaikan Tesis ini.

5. Kedua orang tua penulis, Ibu Hj. Hasnawaty dan Bapak Hasan Sada, serta kakak tercinta Suherna Hasan, Suparman Hasan, dan Suherni Hasan atas doa, perhatian, kasih sayang, dukungan baik secara moril maupun materil, dan selalu sabar dalam menghadapi penulis untuk mencapai kesuksesannya.
6. Teman-teman UFRG, terutama Muh. Fadil As'ad, Asbah, Mukarram, Ica, kia, yang selalu memberikan ilmu, bantuan, dan selalu kompak dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Sri Puji Astuti, S.Pd., M.Pd sebagai support sistem sehingga penulis selalu semangat dalam penyelesaian penelitian dan penulisan Tesis ini
8. Teman-teman pascasarjana angkatan 2020, yang telah memberikan banyak kenangan, dukungan, dan pengalaman yang tidak terlupakan selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
9. Semua pihak yang telah membantu dan tidak sempat disebutkan namanya satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penyusunan Tesis masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran.

Makassar, Januari 2023

SUHENRO

ABSTRAK

SUHENRO. AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN IMUNOSTIMULAN EKSTRAK TEH HIJAU (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) TERHADAP *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VIVO* MENGGUNAKAN MODEL INFEKSI LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster*) (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Sartini)

Tanaman teh hijau memiliki kandungan metabolit sekunder salah satunya polifenol. Polifenol, terutama epigalokatekin galat (EGCG), memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan imunostimulan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak teh hijau memiliki aktivitas antibakteri dan imunostimulan menggunakan *D. melanogaster*. Dalam studi ini, skrining *in vivo* pada level fenotip dan analisis molekuler untuk menyelidiki aktivitas antibakteri dan imunostimulan. Analisis kelangsungan hidup menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau aman pada konsentrasi yang diuji. Untuk melihat aktivitas antibakteri dan imunostimulan, ekstrak teh hijau diberikan secara oral pasca infeksi pada larva Oregon R dan mutan imunodefisien *psh[1];;modSP[KO]*. Hasil menunjukkan terjadi peningkatan kelangsungan hidup pada larva Oregon R dan mutan imunodefisien *psh[1];;modSP[KO]* pasca infeksi. Hasil fenotipe ini didukung oleh ekspresi gen *drosomycin* yang mengalami peningkatan setelah pemberian ekstrak teh hijau pasca infeksi yang menunjukkan adanya aktivitas imunostimulan. Aktivitas antibakteri terlihat pada mutan imunodefisien *psh[1];;modSP[KO]* pasca infeksi dan dapat bertahan hidup. Kesimpulannya, ekstrak teh hijau memiliki aktivitas antibakteri dan imunostimulan menggunakan organisme model *D. melanogaster* dalam penyelidikan awal, sehingga dapat dilakukan pengujian lebih lanjut pada mamalia.

Kata kunci: Ekstrak teh hijau, lalat buah, antibakteri, imunostimulan

ABSTRACT

SUHENRO. ANTIBACTERIAL AND IMMUNOSTIMULATORY ACTIVITY OF GREEN TEA (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) EXTRACT UPON *Staphylococcus aureus* IN VIVO USE OF THE FRUIT FLY (*Drosophila melanogaster*) INFECTION MODEL (supervised by Firzan Nainu and Sartini)

Plants as green tea contain secondary metabolites, one of which is polyphenols. Polyphenols, specifically epigallocatechin gallate (EGCG), has antibacterial and immunostimulatory activity. This study was conducted to determine whether green tea extract has antibacterial and immunostimulatory activity using *D. melanogaster*. In this study, *in vivo* screening tests at the phenotypic level and molecular analysis were performed to investigate the antibacterial and immunostimulatory activity. Survival analysis showed that green tea extract was safe at the concentrations tested. To evaluate antibacterial and immunostimulatory activity, green tea extract was administered orally after infecting Oregon R larvae and *psh[1];;modSP[KO]* immunodeficient mutants. The results showed increased survival in Oregon R larvae and post-infection *psh[1];;modSP[KO]* immunodeficient mutants. The results of this phenotype were supported by the expression of the drosomycin gene which increased after post-infection administration of green tea extract, indicating immunostimulatory activity. Antibacterial activity and survival were observed in *psh[1];;modSP[KO]* immunodeficient mutants. In conclusion, green tea extract has antibacterial and immunostimulatory activity using the model organism *D. melanogaster* in preliminary investigations, therefore further testing can be carried out in mammals

Keywords: Green tea extract, fruit fly, antibacterial, immunostimulatory

DAFTAR ISI

	halaman
Judul Tesis	ii
Keaslian Tesis	iii
Ucapan Terima Kasih	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Lampiran	xiv
Daftar Singkatan	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Uraian Tanaman	6
1. Klasifikasi Tanaman	6
2. Deskripsi Tanaman	7
3. Jenis Teh	7

4. Kandungan Senyawa	9
5. Manfaat Tanaman	10
B. Uraian Mikroba Uji	11
1. Klasifikasi	11
2. Morfologi	12
C. <i>Drosophila Melanogaster</i>	13
1. Deskripsi	13
2. Siklus Hidup	14
3. Model uji	15
4. Metode Infeksi	17
5. Rute pemberian obat	19
D. Kerangka Teori	21
E. Hipotesis	22
BAB III METODE PENELITIAN	23
A. Rancangan dan lokasi penelitian	23
B. Alat dan Bahan	23
C. Metode Kerja	24
D. Pengumpulan dan Analisis Data	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
A. Hasil Ekstraksi	32
B. Fenolik Total	32
C. Uji Keamanan Ekstrak	33
D. Uji Survival	35

E. Uji Immunostimulan dan Antibakteri	36
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	44
A. Kesimpulan	44
B. Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
Table 1. Sekuens primer gen	30
Table 3. Hasil one-way anova Uji Keamanan ETH pada pupa Oregon R	48
Table 4. Hasil one-way anova uji keamanan ETH lalat Oregon R	50
Table 5. Hasil one-way anova uji keamanan ETH pupa PSh Mod Sp	51
Table 6. Hasil one-way anova uji keamanan ETH lalat PSh Mod Sp	53
Table 7. Hasil one-way anova pasca infeksi pada Oregon R	55
Table 8. Hasil one-way anova pasca infeksi PSh Mod Sp	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Tanaman Teh Hijau	7
Gambar 2. <i>Drosophila melanogaster</i>	14
Gambar 3. Siklus Hidup <i>D. melanogaster</i>	15
Gambar 4. Metode needle pricking	18
Gambar 5. Rute Pemberian Obat pada <i>D. melanogaster</i>	20
Gambar 6. Ekstrak Kental Teh Hijau	32
Gambar 7. Grafik uji toksisitas larva <i>D. melanogaster wildtype oregon-R33</i>	
Gambar 10. Jumlah larva Oregon R pasca infeksi yang bertahan hidup	35
Gambar 14. Grafik Ekspresi gen drs antara kontrol dengan dan tanpa <i>S. aureus</i>	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Ekstraksi sampel	48
2. Pengujian fenolik total ETH	48
3. Preparasi ETH	49
4. Penyiapan hewan uji	49
5. Pembuatan pakan	49
6. Penyiapan pakan pengujian	50
7. Uji Keamanan ETH	50
8. Uji Survival sebelum infeksi	51
9. Model Infeksi <i>Staphylococcus aureus</i> secara <i>in vivo</i>	51
10. Penyiapan Sampel RNA	52
11. Analisis Ekspresi Gen	52
12. Perhitungan	53
13. Data Statistik	54

DAFTAR SINGKATAN

AMP (Antimicrobial peptide)

ETH (Ekstrak teh hijau)

CO₂ (Karbondioksida)

D. melanogaster (*Drosophila melanogaster*)

DNA (Deoxyribonucleic Acid)

Drs (*Drosomycin*)

FDA (Food and Drug Administration)

G (Gram)

JAK/STAT (Janus Kinase/ Signal Transducer Activator of Transcription)

mg (Miligram)

mL (Mililiter)

NF-κB (Nuclear factor Kappa B)

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Psh (Persephone)

Protease serin modular (modSP)

RNA (Ribonucleic Acid)

RNAi (RNA Interference)

rp49 (*Ribosomal Protein 49*)

RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*)

Upd (Unpaired)

μL (Mikroliter)

S. Aureus (*Staphylococcus aureus*)

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Teh hijau merupakan salah satu tanaman yang banyak digunakan karena memiliki kandungan senyawa kimia yang berpotensi untuk farmakologis (Cabrera dkk., 2006). Teh hijau mengandung berbagai jenis metabolit sekunder seperti, saponin, alkaloid, dan polifenol (Archana dan Abraham, 2011). Senyawa polifenol Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) dapat meningkatkan potensi atau kerja dari sistem imun dengan cara menstimulasi kerja sistem imun bawaan untuk meningkatkan fungsi kekebalan tubuh pada tikus (Li et al. 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Farahat ekstrak *C. sinensis* dapat menginduksi sistem imun pada ayam broiler. Ekstrak teh hijau dapat mengaktivasi dan menginduksi komponen-konponen sistem imun (Jantan et al. 2015), dengan cara memperbesar efek dari respon imun termasuk proses fagositosis, sehingga sistem imun dapat melawan infeksi.

Kandungan polifenol pada teh *hijau ini juga dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme, seperti Helicobacter pylori, methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Salmonella typhi, Shigella dysentery, Shigella flexneri, Vibrio cholera, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans, dan*

Pseudomonas aeruginosa (Araghizadeh dkk., 2013; Archana dan Abraham, 2011). Mekanisme aktivitas antibakteri dari polifenol epigalokatekin galat (EGCG), epikatekin galat (ECG) dan epikatekin (EC) pada teh hijau dengan berikatan langsung pada lapisan peptidoglikan mengganggu sintesis dinding sel, sehingga merusak lapisan pelindung bakteri dan dapat mengubah struktur asam teikoat pada dinding sel (Shimamura dkk., 2007). Teh hijau memiliki aktivitas antimikroba dalam melawan berbagai bakteri patogen (Taylor dkk., 2015).

Menurut Jahani dkk. (2016), efek teh hijau menunjukkan kadar hambat minimum sebesar 0,3 mg/mL atau setara dengan konsentrasi 0,03% terhadap bakteri *S. aureus*. Kemudian pada penelitian yang telah dilakukan oleh Mehta dkk menunjukkan, bahwa ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 200 mg/mL memiliki diameter zona hambat sebesar 20 mm dalam menghambat bakteri *S. aureus*. Kadar hambat minimum (KHM) ekstrak etanol teh hijau dalam menghambat bakteri *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, dan *S. mutans* berturut-turut yakni 0,084 mg/mL; 0,292 mg/mL; 0,092 mg/mL; dan 0,132 mg/mL (Kaur dkk., 2015). Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau-amoksisilin berpotensi meningkatkan aktivitas antibakteri dengan nilai FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) sebesar 0,28 (Sartini et al, 2020).

Secara umum, penelusuran aktivitas senyawa kandidat baru masih terkonsentrasi pada metode skrining *in vitro* yang belum dapat memberikan gambaran komprehensif. Banyak senyawa kandidat yang

berhasil memberikan hasil menjanjikan dalam skrining *in vitro* namun gagal lolos pada pengujian *in vivo* menggunakan hewan coba seperti mencit dan tikus. Kegagalan tersebut telah memberikan efek buruk dari segi biaya dan waktu yang digunakan oleh peneliti. Untuk mencegah hal tersebut, *D. melanogaster* diperkenalkan sebagai model alternatif dalam skrining *in vivo* kandidat obat. (Tzelepis et al., 2013; Ugur et al., 2016).

D. melanogaster memiliki kemiripan susunan genetik dengan manusia yaitu sekitar 65%-75%, ketersediaan mutan uji, biaya pemeliharaan dan pengujian tidak membutuhkan biaya yang besar serta tidak memerlukan etik dalam penelitian (Pandey & Nichols, 2011; Tzelepis et al., 2013). *D. melanogaster* memiliki sistem imun alamiah yang sangat mirip dengan manusia (Buchon et al., 2014; J.A. Hoffmann, 2003), oleh karena itu organisme model ini digunakan untuk mempelajari mekanisme sistem imun manusia pada tingkat yang lebih tinggi, tingkat seluler dan molekuler. *D. melanogaster* dapat diinfeksi oleh patogen manusia dan telah digunakan untuk menguji keefektifan antibiotik (Panayidou et al., 2014; Apidianakis & Rahme, 2009; Ben-Ami et al., 2013; Needham et al., 2004). *D. melanogaster* kini telah digunakan sebagai organisme model untuk menguji aktivitas antivirus dari senyawa dari tumbuhan (Ekowati et al., 2017). Ke depannya, dengan ketersediaan banyak mutan *D. melanogaster* yang memiliki sistem imun yang lemah atau bahkan tidak ada lagi, peluang untuk menguji aktivitas kandidat antimikroba pada organisme model imunodefisien (immunodeficient model

organism) sangat memungkinkan untuk dilakukan secara cepat, mudah, dan ekonomis.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka dilakukan pengujian aktivitas imunostimulan dan antibakteri pada ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) secara *in vivo* menggunakan *D. melanogaster*.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) memiliki aktivitas imunostimulan terhadap *S.aureus* secara *in vivo* menggunakan model infeksi *D. melanogaster* ?
2. Apakah ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* secara *in vivo* menggunakan model infeksi *D. melanogaster* ?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas imunostimulan ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) secara *in vivo* menggunakan model infeksi *D. melanogaster* Oregon R dan mutan *psh[1];;modSP[KO]*.
2. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) secara *in vivo* menggunakan model infeksi *D. melanogaster* Oregon R dan mutan *psh[1];;modSP[KO]*.

D. Manfaat Penelitian

Memberikan informasi mengenai potensi penggunaan lalat buah (*D. melanogaster*) sebagai *platform* uji *in vivo* kandidat antibakteri dari bahan alam maupun kimiawi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Uraian Tumbuhan

1. Klasifikasi tanaman

Teh merupakan minuman yang berasal dari China, merupakan minuman yang sangat terkenal dan banyak diketahui di seluruh dunia. Selama ribuan tahun lamanya, teh telah terbukti memberikan efek yang baik terhadap kesehatan. Salah satu jenis teh yang diketahui yaitu teh hijau yang berasal dari tanaman *Camellia sinensis* L. (Reygaert, 2014).

Kingdom : Plantae
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Subkelas : Dilleniidae
Ordo : Theales
Familia : Theaceae
Genus : *Camellia*
Spesies : *Camellia sinensis* L.

(Mahmood dkk., 2017).



Gambar 1. Tanaman Teh Hijau

2. Deskripsi tanaman

Tanaman teh hijau adalah tanaman perdu dan semak yang merupakan famili dari *theacea*. Tanaman ini mampu tumbuh setinggi 10-15 m di alam liar, dan 0,6-1,5 m pada tanaman budidaya. Daunnya bertangkai pendek, berwarna hijau muda, dengan panjang 5-30 cm dan lebar sekitar 4 cm. Bunga dari tanaman ini berwarna putih dan wangi, berdiameter 2,5-4 cm yang biasanya soliter ataupun berkelompok terdiri atas dua hingga empat bunga. Bunga tersebut memiliki banyak benang sari dengan kepalasari berwarna kuning (Ross, 2005). Buahnya berbentuk pipih, halus, bulat dan terdapat biji sebesar kacang di dalamnya (Mahmood dkk., 2010).

3. Jenis-jenis teh

Teh dapat diklasifikasikan dengan melihat warna daunnya ataupun presentase oksidasi selama pemrosesan. Jenis teh ada bermacam-macam, namun semua jenis teh dihasilkan dari tanaman yang sama yaitu dari daun teh segar (*Camellia sinensis* L). Secara garis besar teh terdiri

atas teh tanpa difermentasi (teh putih dan teh hijau), teh semi fermentasi (teh oolong), dan teh terfermentasi (teh hitam).

Teh hijau diproses tanpa menggunakan proses oksidasi, agar warna hijau yang dimiliki oleh teh dapat dipertahankan dan tetap memiliki rasa yang lembut. Sebelum daun digulung, enzim polifenol oksidase diinaktivasi untuk mencegah terjadinya oksidasi secara enzimatik (oksimatis) yang mengubah polifenol menjadi senyawa oksidasinya berupa teafavin dan tearubigin. Metode pembuatan teh hijau Jepang menggunakan *steamer*. Daun teh segar dikukus dengan suhu tinggi (100°C) untuk menginaktivasi enzim oksidasinya, kemudian daun digulung dan dikeringkan, sedangkan pada metode teh hijau China menggunakan *rotary panner* dengan sistem panning pada suhu tinggi (300-350°C) untuk mencegah terjadinya fermentasi. Inaktivasi enzim tidak akan menguraikan klorofil sehingga warnanya tetap hijau. Secara umum, proses pengolahan teh hijau memiliki prinsip inaktivasi enzim polifenol oksidase (Rohdiana, 2015; Hilal, 2017).

Proses pengolahan teh putih cenderung sederhana jika dibandingkan dengan proses pengolahan jenis teh yang lainnya. Proses pengolahannya hanya melalui proses pelayuan dan pengeringan. Teh putih ini sedikit berbeda, karena dalam proses pengolahannya tidak difermentasikan maupun inaktivasi enzim. Proses pelayuan dapat menggunakan sinar matahari, dan setelah layu daun dikeringkan menggunakan mesin pengering. Teh oolong dapat diperoleh dengan

melewati berbagai proses mulai dari proses pelayuan, penggulungan, semi oksimatis, dan pengeringan. Proses pelayuan yang berlangsung kurang lebih 12 hingga 17 jam ini akan menghasilkan daun yang tipis dan lembut sehingga mudah untuk digulung. Daun dapat digulung halus untuk mengoksidasi sebagian polifenol yang terdapat pada teh (proses semi oksimatis). Setelah itu, daun dikeringkan menggunakan mesin pengering (Rohdiana, 2015; Hilal, 2017).

Jenis teh terakhir yaitu teh hitam yang proses pengolahannya cukup rumit dibandingkan dengan jenis teh lainnya. Teh hitam dilayukan selama kurang lebih 12-17 jam dan digulung menggunakan mesin penggulung. Setelah itu daun dioksidasi agar memberikan warna dan rasa dari teh yang akan dihasilkan. Warna teh akan berubah dari hijau menjadi coklat terang lalu coklat gelap. Kemudian daun digiling dan untuk memperoleh teh hitam yang sepenuhnya difermentasi, daun teh dioksimatis agar memperbesar konversi enzim flavanol. Proses ini membutuhkan waktu 1,5 hingga 2 jam. Proses terakhir yaitu tahap pengeringan untuk menghentikan proses oksimatis dan menurunkan kadar air (Rohdiana, 2015; Hilal, 2017).

4. Kandungan senyawa

Kandungan senyawa kimia dari teh hijau sangat beragam. Sebanyak sepertiga bagian dari teh hijau terkandung senyawa polifenol. Senyawa polifenol terdiri atas flavonoid dan non-flavonoid, namun pada teh mengandung lebih banyak flavonoid seperti katekin, katekin galat, dan

proantosianidin. Teh hijau memiliki kandungan katekin terbesar jika dibandingkan dengan teh hitam ataupun teh oolong. Daun yang segar mengandung kafein (kurang lebih 3,5% berat kering), teobromin (0,15-0,2%), teofilin (0,02-0,04%) dan metilxantin lainnya, lignin (6,5%), asam organik (1,5%), klorofil (0,5%), dan asam amino bebas (1-5,5%). Sebanyak 30% berat kering dari teh hijau mengandung katekin, yang terdiri atas epigalokatekin galat (EGCG) 50%, epigalokatekin (EGC) 20%, epikatekin galat (ECG) 13% dan epikatekin (EC) 6% (Taylor dkk., 2005).

5. Manfaat tanaman

Teh hijau (*Camellia sinensis* L.) memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Beberapa manfaat yang dimiliki yaitu sebagai antioksidan, dapat memodulasi aktivitas antibiotika, dan merupakan antimikroba yang kuat karena kandungan senyawa polifenol yang dimiliki oleh teh hijau. Kandungan senyawa yang memberikan kontribusi terbesar terhadap kesehatan yaitu senyawa polifenol pada teh hijau, khususnya katekin. Katekin pada daun teh hijau telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri, dan EGC, EGCG serta ECG merupakan agen antibakteri yang paling penting yang dimiliki daun teh hijau (Taylor dkk., 2005). Kandungan polifenol dari teh hijau mampu menghambat pertumbuhan berbagai macam bakteri patogen seperti *Helicobacter pylori*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysentery*, *Shigella flexneri*, dan *Vibrio cholera* (Araghizadeh dkk., 2013).

Mekanisme penghambatan EGCG dan ECG terhadap pertumbuhan bakteri yaitu dengan berikatan langsung pada lapisan peptidoglikan mengganggu sintesis dinding sel, sehingga merusak lapisan pelindung bakteri, dan mengubah struktur asam teikoat pada dinding sel bakteri. Peptidoglikan merupakan kompleks *cross-link* antara polisakarida dan peptida. Dinding sel bakteri *Staphylococcus* tersusun atas 30-50 lapis peptidoglikan, yang memberikan perlindungan osmotik, membantu pembelahan sel, dan berperan dalam biosintesis peptidoglikan selanjutnya. EGCG dapat berikatan langsung dengan peptidoglikan dan menyebabkan presipitasi, hal ini menunjukkan bahwa EGCG dapat merusak dinding sel bakteri (Shimamura dkk., 2007).

B. Uraian Mikroba Uji

1. Klasifikasi

Menurut *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* edisi kedua, bakteri *Staphylococcus aureus* diklasifikasikan sebagai berikut (Vos, *et al.*, 2009):

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

Famili : Staphylococcaceae

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus*

2. Morfologi

S. aureus memiliki koloni yang berwarna emas ketika tumbuh di medium padat, sehingga spesiesnya diberi nama *aureus*. Pada pemeriksaan mikroskopis, organisme berbentuk gram positif cocci dalam kelompok. *S. aureus* mempunyai dinding sel yang tebal yaitu sekitar 20-40 nm tebal. Di bawah dinding sel terdapat sitoplasma yang tertutup oleh membran sitoplasma. Peptidoglikan adalah komponen dasar dari dinding sel dengan jumlah lebih 50 % dari massa dinding sel. Peptidoglikan ini yang akan membentuk jaringan dinding sel berlapis - lapis, sehingga *S. aureus* mampu menahan tekanan osmotik internal yang tinggi. Penyusun lain dinding sel adalah kelompok polimer yang mengandung fosfat yang disebut asam teikoat dengan jumlah sekitar 40% dari massa dinding sel. Ada dua jenis asam teikoat yaitu *Wall Teichoic Acid* (WTA) yang berikatan dengan peptidoglikan melalui ikatan kovalen dan membran sel yang berikatan dengan *lipoteichoic acid* (LTA) yang dimasukkan dalam membran lipid dari bakteri. Asam teikoat memberikan muatan negatif pada permukaan sel *S. aureus* dan berperan dalam akuisisi dan lokalisasi ion logam, terutama kation divalen, dan aktivitas enzim autolitik. Peptidoglikan dan asam teikoat, jumlah keduanya hanya mencapai sekitar 90% dari berat dinding sel, sisanya terdiri dari protein permukaan, eksoprotein dan hidrolase peptidoglikan (Harris *et al.*, 2002).

C. Lalat Buah (*Drosophila melanogaster*)

1. Deskripsi *Drosophila melanogaster*

Menurut kunci determinasi serangga, *D. melanogaster* diklasifikasikan sebagai berikut (Lilies, 2014):

Kingdom : Animalia

Filum : Arthropoda

Kelas : Insecta

Ordo : Diptera

Famili : Drosophilidae

Genus : *Drosophila*

Species : *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster termasuk ke dalam jenis hewan tidak bertulang belakang (invertebrata) dan merupakan spesies pertama di dunia yang susunan genomnya dikarakterisasi (Adams *et al.*, 2000). Setelah selesai sekuensing genom manusia beberapa tahun kemudian, diketahui bahwa ada kesamaan antara genom *D. melanogaster* dan manusia, sehingga memperkuat peran *D. melanogaster* sebagai model untuk mempelajari proses biologi dan penyakit manusia. Dalam 100 tahun terakhir, penelitian *Drosophila* telah sangat penting dalam analisis mekanisme molekuler. Sekitar 65% dari gen penyebab penyakit manusia

diyakini memiliki homolog fungsional pada lalat dan bagian yang signifikan dari homolognya ini diekspresikan dalam jaringan *Drosophila* yang melakukan fungsi setara dengan jaringan manusia. Selain itu, penemuan-penemuan yang terkait dengan genetik dan fungsi biologis sering ditemukan pertama kali pada lalat buah (*D. melanogaster*) dan kemudian diterjemahkan ke sistem mamalia (Pandey & Nichols, 2011; Ugur *et al.*, 2016).

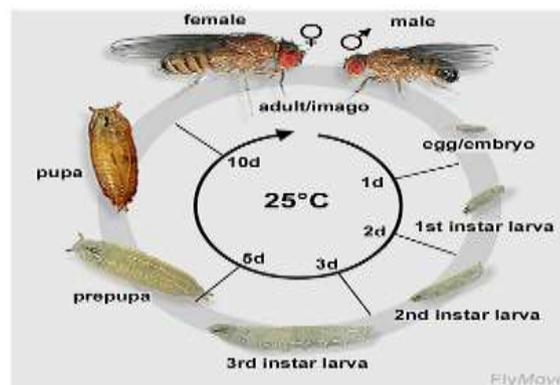


Gambar 2. *Drosophila melanogaster* (Dahman, 2008; Reaume & Sokolowski, 2006)

2. Siklus Hidup *Drosophila melanogaster*

Lalat-lalat betina yang telah dibuahi menyimpan sperma di dalam *receptaculum seminis* untuk fertilisasi dari ratusan telur yang akan dikeluarkan setelah beberapa hari. Pada suhu 25°C perkembangan embrionik berlangsung selama sekitar 21 jam. Larva yang ditetaskan (instar pertama) membutuhkan 2 hari untuk mengelupas menjadi larva instar kedua lalu menjadi larva instar ketiga. Larva instar ketiga akan terus makan selama satu hari sebelum larva tersebut meninggalkan sumber makanan mereka dan bermigrasi dan akhirnya membentuk prepupa lalu

menjadi pupa. Selama stadium pupa, semua organ akan berdegenerasi dan dibentuk kembali menjadi bentuk serangga dewasa (metamorfosis). Sekitar 10 hari setelah bertelur, lalat-lalat dewasa akan keluar dari selubung pupa. Lalat-lalat jantan muda yang baru saja keluar dari pupa membutuhkan 8 jam untuk dewasa, sehingga memungkinkan pengumpulan lalat-lalat betina perawan (Markow, 2015; Roote & Prokop, 2013).



Gambar 3. Siklus Hidup *D. melanogaster* (Roote & Prokop, 2013).

3. *Drosophila melanogaster* Sebagai Model Uji

Drosophila melanogaster banyak digunakan sebagai model hewan untuk pengujian kandidat obat baru secara *in vivo*. Hal ini dikarenakan *D. melanogaster* memiliki siklus hidup singkat, sejumlah besar lalat dapat diperbanyak dengan cepat dan memiliki ukuran yang kecil sehingga ribuan lalat dapat hidup dalam kandang dengan ukuran yang sama dengan yang ditempati 10 ekor tikus. Selain itu biaya pemeliharaan *D. melanogaster* cukup rendah dan tidak ada kekhawatiran etik untuk digunakan dalam penelitian (Pandey & Nichols, 2011; Tzelepis *et al.*, 2013).

Beberapa penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa *D. melanogaster* dapat diinfeksi oleh bakteri atau virus patogen manusia, seperti *S. aureus* (Needham *et al.*, 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Apidianakis & Rahme, 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (Kim, *et al.*, 2012) dan beberapa virus manusia (Hughes, *et al.*, 2012). Khusus untuk *S. aureus*, *wild type D. melanogaster* yang terinfeksi hanya bertahan hidup selama beberapa hari (Needham *et al.*, 2004). Selain itu, sistem imun *D. melanogaster* diaktifkan oleh *S. aureus* yang berujung pada produksi *Antimicrobial Peptide* (AMP) dan aktivasi fagositosis (Panayidou, 2014; Shiratsuchi, 2012). Hilangnya perlindungan akibat ketiadaan sistem imun meningkatkan kerentanan *D. melanogaster* terhadap bakteri termasuk *S. aureus* (Lemaitre & Hoffman, 2007).

Drosophila melanogaster memiliki keuntungan dibandingkan dengan model host invertebrata yang lain (misalnya *Caenorhabditis elegans*) yaitu obat tidak hanya dapat dicampur dalam makanan tetapi juga dapat diberikan melalui injeksi. Dosis 2-200 nl larutan obat dapat disuntikkan di setiap lalat dan kurang dari 200 ml pada kertas cakram cukup untuk memberi makan 20 ekor lalat selama 24 jam. Oleh karena itu, obat diperlukan hanya dalam jumlah kecil selama penelitian, sehingga pengujian kandidat obat pada lalat tidak membutuhkan biaya yang besar. Selain itu, *Drosophila* dapat digunakan untuk studi toksikologi karena toksisitas relatif bahan kimia pada lalat berkorelasi baik dengan yang di mamalia (Tzelepis *et al.*, 2013).

Drosophila melanogaster memiliki sejarah panjang sebagai model organisme untuk eksperimen genetika karena gen homolognya memiliki kesamaan yang signifikan dengan manusia. *Drosophila* memiliki gen homolog fungsional sekitar 75% dan gen-gen tersebut umumnya berperan dalam patofisiologis penyakit yang berhubungan dengan gen manusia. Selain itu, genom *D. melanogaster* sepenuhnya telah disekuensing. Dengan demikian, banyak teknologi telah dikembangkan dan teknik yang mudah dan yang umum digunakan, seperti transgenesis, teknologi RNA interference (RNAi) dan microarray (Tzelepis *et al.*, 2013).

4. Metode Infeksi *Drosophila melanogaster*

Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk menginfeksi *D. melanogaster* yaitu sebagai berikut (Apidianakis & Rahme, 2009; Neyen, *et al.*, 2014; Tzou, *et al.*, 2002):

1. Thoracic atau abdominal needle pricking

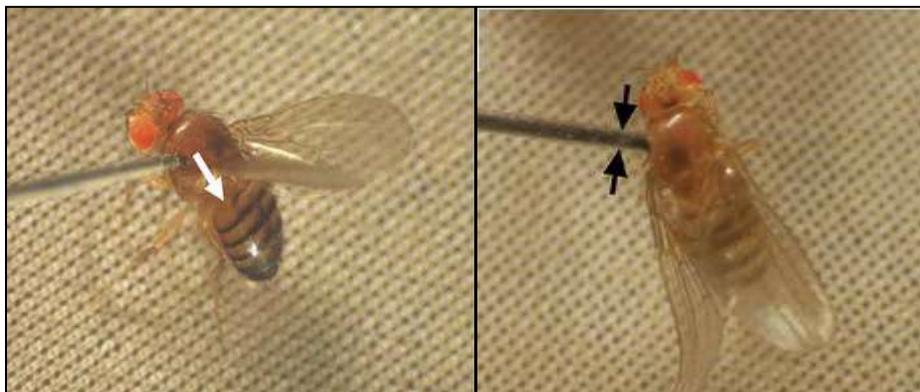
Metode ini menggunakan jarum tungsten yang dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Jarum tersebut ditusukkan pada bagian toraks atau pada bagian epitel abdomen *D. melanogaster*, sehingga akan menimbulkan luka pada bagian tersebut. Bakteri akan berproliferasi pada bagian yang terinfeksi dan menyebar ke seluruh tubuh *D. melanogaster*. Infeksi ini dapat bersifat lokal maupun sistemik.

2. *Injector pumping*

Metode ini menggunakan injektor untuk menginfeksi *D. melanogaster* secara sistemik. Injektor tersebut yang akan memompa patogen masuk ke dalam tubuh *D. melanogaster*. Penyuntikan dilakukan pada bagian thorax dan akan langsung menyebar secara sistemik melalui sistem *hemolymph*. Dosis bakteri dan virus yang disuntikkan dapat diatur. Dosis bakteri yang biasanya digunakan yaitu sekitar 10^5 - 10^7 sel bakteri / lalat.

3. *Feeding assay infection*

Pada metode ini *D. melanogaster* diberi pakan medium Luria-Bertani Broth (LB) yang mengandung bakteri dengan konsentrasi 10^4 - 10^5 sel bakteri / lalat. Metode ini digunakan untuk mempelajari infeksi lokal pada bagian usus *D. melanogaster*. Infeksi tersebut menyebabkan morbiditas hingga kematian *D. melanogaster*, yaitu biasanya sekitar 2-15 hari.

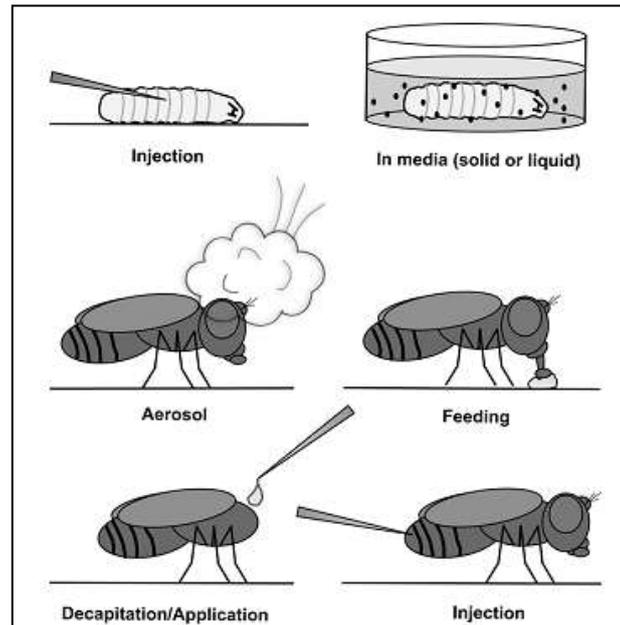


Gambar 4. Metode needle pricking (Apidianakis & Rahme, 2009)

5. Rute Pemberian Obat pada *Drosophila melanogaster*

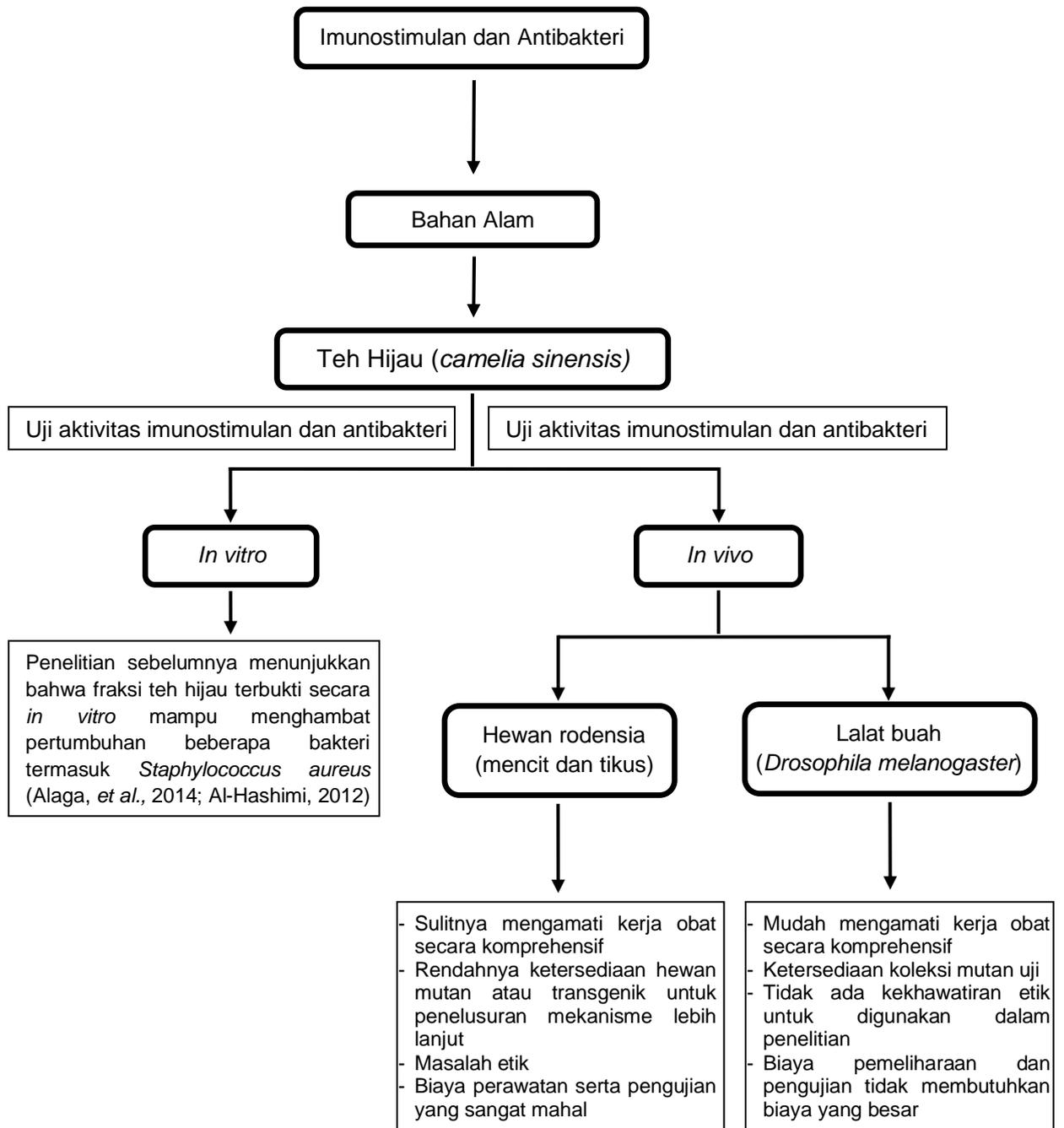
Ada beberapa rute pemberian obat yang dapat digunakan pada *D. melanogaster* yaitu antara lain (Pandey & Nichols, 2011):

1. Pada *D. melanogaster* yang masih dalam bentuk embrio, obat diberikan melalui permeabilisasi
2. Pada *D. melanogaster* yang masih dalam bentuk larva, obat ditambahkan ke dalam media tempat perkembangbiakan larva. Media tersebut dapat berupa media padat untuk pemaparan jangka panjang atau media ragi cair untuk pemaparan jangka pendek. Selain itu, obat juga dapat diinjeksikan langsung pada larva.
3. Pada *D. melanogaster* dewasa, terdapat 4 rute yaitu :1) Obat dibuat dalam bentuk gas atau aerosol misalnya etanol dan kokain. 2) Obat dicampurkan ke dalam pakan *drosophila* atau menggunakan kertas saring yang ditetesi obat. Bahan seperti sukrosa, pisang atau ragi perlu ditambahkan, jika obat yang digunakan memiliki rasa yang tidak enak. 3) Obat diinjeksikan atau diberikan langsung pada bagian tubuh *D. melanogaster* yang sudah dibedah (*decapitation*). 4) Obat diinjeksikan ke bagian abdomen sehingga dengan cepat dapat berdifusi ke dalam tubuh *D. melanogaster*.



Gambar 5. Rute Pemberian Obat pada *D. melanogaster* (Pandey & Nichols, 2011)

D. Kerangka Teori



E. Hipotesis

1. Ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) memiliki aktivitas imunostimulan secara *in vivo* menggunakan *D. melanogaster*
2. Ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze) memiliki aktivitas antibakteri secara *in vivo* menggunakan *D. melanogaster*