

**PENGUJIAN EFEK EKSTRAK
DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*)
TERHADAP EKSPRESI GEN SISTEM IMUN HUMORAL
LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster*)**

**THE EFFECT OF GREEN TEA (*Camellia sinensis*) EXTRACT
ON GENE EXPRESSION OF FRUIT FLY (*Drosophila
melanogaster*) HUMORAL IMMUNE SYSTEM**

**FADHIL ADAM DZAKY
N111 16 503**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**PENGUJIAN EFEK EKSTRAK
DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*)
TERHADAP EKSPRESI GEN SISTEM IMUN HUMORAL
LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster*)**

**THE EFFECT OF GREEN TEA (*Camellia sinensis*) EXTRACT
ON GENE EXPRESSION OF FRUIT FLY (*Drosophila
melanogaster*) HUMORAL IMMUNE SYSTEM**

SKRIPSI

Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**FADHIL ADAM DZAKY
N111 16 503**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**PENGUJIAN EFEK EKSTRAK
DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*)
TERHADAP EKSPRESI GEN SISTEM IMUN HUMORAL
LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster*)**

FADHIL ADAM DZAKY

N111 16 503

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Firzan Nainu, M.Biomed.Sc., Ph.D. Apt.
NIP. 19820610 200801 1 012


Dr. Sartini M. Si., Apt.
NIP. 19611111 198703 2 001

Pada tanggal : 27 Agustus 2020

SKRIPSI

**PENGUJIAN EFEK EKSTRAK
DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*)
TERHADAP EKSPRESI GEN SISTEM IMUN HUMORAL
LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster*)**

**THE EFFECT OF GREEN TEA (*Camellia sinensis*) EXTRACT ON
GENE EXPRESSION OF FRUIT FLY (*Drosophila melanogaster*)
HUMORAL IMMUNE SYSTEM**

Disusun dan diajukan oleh:

**FADHIL ADAM DZAKY
N111 16 503**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal: 12-8-2020
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua : Firzan Nainu, M.Biomed.Sc., Ph.D, Apt.
2. Sekretaris : Dr. Sartini, M.Si., Apt.
3. Anggota : Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si
4. Anggota : Nur Indahyanti, S.Si., M.Si



Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin



Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed., Ph.D. Apt
NIP. 19820610-200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar - benar adalah hasil karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 27 Agustus 2020

Yang menyatakan,



Fadhil Adam Dzaky
N111 16 503

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabiil „alamiin, segala puji bagi Allah Subhanahu Wa Ta'ala yang telah memberikan rahmat dan ridho-Nya, berupa kesehatan, kekuatan ilmu yang sempurna dan waktu yang begitu berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan dan merampungkan skripsi dengan judul “Pengujian Efek Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Terhadap Ekspresi Gen Sistem Imun Humoral Lalat Buah (*Drosophila melanogaster*)” sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak tantangan yang dihadapi. Peneliti banyak menerima bimbingan, petunjuk dan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak baik yang bersifat moral maupun material. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Bapak apt Firzan Nainu M.Biomed.Sc.,Ph.D, selaku Pembimbing Utama dan Ibu apt Dr. Sartini M.Si., selaku Pembimbing Pendamping atas keikhlasan dan kesabaran dalam meluangkan waktu dan pikirannya dalam memberikan pengarahan, bimbingan, saran, nasehat serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu apt Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., dan Ibu Nur Indahyanti, S.Si., M.Si., selaku penguji yang telah memberikan banyak saran dan nasehat dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Dekan dan Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
4. Ibu Aisyah Fatmawati M.Si., Apt. selaku penasehat akademik penulis yang telah memberikan banyak nasehat selama mengikuti perkuliahan.
5. Orang tua tercinta penulis, Ayah Abdul Haris dan Ibu Irmawati yang telah membesarkan dan mendidik penulis dengan kasih sayang yang begitu tulus serta senantiasa mengirimkan do’a serta saudara-saudara penulis Fauzan Ahmad Tsaqib dan Fatin Fatimah Lathifah yang senantiasa memberi semangat dan mendoakan penulis

6. Staf dosen, pegawai dan laboran Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas bantuan serta motivasi-motivasi yang diberikan selama perkuliahan hingga penelitian selesai.
7. Laboran Biofarmasi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Ibu Syamsiah, S.Si. dan Korps. Asisten Laboratorium Biofarmasi dan Toksikologi Fakultas Farmasi atas segala bantuan dalam pelaksanaan penelitian skripsi ini.
8. Bapak Ismail S.Si., M.Si., Apt. dan bapak Nur Amir, M.Si., Apt., atas segala bantuan, motivasi serta didikan selama masa perkuliahan penulis.
9. Sahabat terdekat, teman seperjuangan dalam penelitian dan mengikuti lomba Kak Tita, kak Tian, kak Putu, Adila, Nisa, Cesy, Dewi, Meli, Hany, Daus, Afdha, Mita, Ata dan Rahmat, serta teman Farmasi Angkatan 2016 (NEOST16MINE) atas segala bantuan, dukungan, semangat, kebahagiaan, waktu, dan menjadi rekan berbagi serta diskusi penulis.
10. Pengurus BEM Kabinet Reaktif dan UKM PSC FF-UH sebagai keluarga, tempat belajar, berorganisasi, manajemen diri, manajemen waktu dan menggali ilmu yang sangat luas penulis selama menjalani perkuliahan di Universitas Hasanuddin.
11. Sahabat Neos Boys Army (NBA) atas segala dukungan, semangat, teman diskusi meja makan, teman sahur dan berbuka di Bulan Ramadhan, serta tempat berbagi motivasi penulis untuk mewujudkan mimpi-mimpi secarik kertas.
12. Pihak yang tidak sempat disebut namanya satu persatu, penulis menghaturkan terima kasih secara tulus.

Penulis menyadari akan segala keterbatasan yang penulis miliki sehingga skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan dan masih banyak terdapat kekurangan dan kesalahan di dalamnya. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak demi

kesempurnaan skripsi ini dan untuk menciptakan karya yang lebih baik kedepannya.

Dengan demikian penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Aamiin yaa Rabbal,alaamiin.

Makassar, Agustus 2020

Yang menyatakan,

Fadhil Adam Dzaky
N111 16 503

ABSTRAK

Fadhil Adam Dzaky. PENGUJIAN EFEK EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*) TERHADAP EKSPRESI GEN SISTEM IMUN HUMORAL LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster*)
(dibimbing oleh Firzan Nainu dan Sartini)

Imunostimulan merupakan senyawa kimia yang dapat mengaktivasi sistem pertahanan tubuh pada manusia dan hewan secara in vivo dengan cara meningkatkan efek dari respon imun termasuk proses pelepasan sitokin, fagositosis, aktivasi sel T, dan produksi antibodi sebagai bentuk perlawanan terhadap infeksi. *Drosophila melanogaster* sebagai salah satu organisme alternatif yang memiliki homologi dengan sistem imun manusia, dapat digunakan dalam pengujian ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang telah dilaporkan memiliki khasiat sebagai imunostimulan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak daun teh hijau (*C.sinensis*) dengan konsentrasi 1%, 0,1%, 0,01% dan 0,001% terhadap ekspresi gen sistem imun humoral *D. melanogaster* berdasarkan parameter level ekspresi gen *drosomycin* dan *dipterizin* dengan metode *real time quantitative* PCR. Hasil penelitian level ekspresi mRNA menunjukkan bahwa pada perlakuan ekstrak *C. sinensis* konsentrasi 1% meningkat signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol dan konsentrasi lainnya, serta mampu menstimulasi *D. melanogaster* untuk mensekresikan *Antimicrobial Peptide* (AMP) *Drosomycin* pada *Toll signaling pathway*. Sedangkan pada konsentrasi ekstrak *C. sinensis* 0,1% meningkat signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol dan secara optimum mampu menstimulasi ekspresi mRNA gen *Dpt* pada *Imd signaling pathway*.

Keywords : Imunostimulan, *Drosophila melanogaster*, *Camellia sinensis*, Ekspresi gen

ABSTRACT

Fadhil Adam Dzaky. THE EFFECT OF GREEN TEA (*Camellia sinensis*) EXTRACT ON GENE EXPRESSION OF FRUIT FLY (*Drosophila melanogaster*) HUMORAL IMMUNE SYSTEM
(Supervised by Firzan Nainu and Sartini)

Immunostimulants are chemical compounds that can activate biologically defense system body in human and animal's in vivo by increasing the effects of immune responses such as the cytokine release process, phagocytosis, T cell activation, and antibody production as a form of resistance to infection. *Drosophila melanogaster* as an alternative organism that has homology with the human immune system, it can be used in green tea extract test (*Camellia sinensis*) which has been reported to have immunostimulant effect. Therefore, this study was conducted to determine the effect of giving the green tea leaf extract (*C.sinensis*) with concentrations of 1%, 0.1%, 0.01% and 0.001% on the expression of the humoral immune system gene *D. melanogaster* based on the level of expression parameters drosomycin and dipterocin genes by real-time quantitative PCR methods. The results of mRNA expression levels showed that in the treatment of *C. sinensis* extract 1% concentration increased significantly ($p < 0.05$) by control and other concentrations, and it was able to stimulate *D. melanogaster* to release Antimicrobial Peptide (AMP) Drosomycin in the toll signaling pathway. While, at the concentration of *C. sinensis* 0.1% increased significantly ($p < 0.05$) by control and was able to optimally stimulate the expression of mRNA genes in the IMD signaling pathway.

Keywords: Immunostimulant, *Drosophila melanogaster*, *Camellia sinensis*, Gene expression

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Penyakit Infeksi	4
II.2 Imunostimulan	5
II.3 Klasifikasi Daun Teh Hijau (<i>C. sinensis</i>)	5
II.4 Pengolahan Teh Hijau (<i>C. sinensis</i>)	6
II.5 Kandungan Kimia <i>C. sinensis</i>	7
II.6 <i>Epigallocatechin-3-gallate</i> Pada Teh Hijau (<i>C. sinensis</i>)	8
II.7 <i>Drosophila melanogaster</i>	9
II.8 Klasifikasi <i>D. melanogaster</i>	10
II.9 Sistem Imun <i>Drosophila melanogaster</i>	11
II.9.1 Jalur Toll (<i>Toll Pathway</i>)	12
II.9.2 Jalur Imd (<i>Imd Pathway</i>)	14
II.10 Ekstraksi Asam Nukleat	15
II.10.1 <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i> (DNA)	16
II.10.2 <i>Ribose Nucleic Acid</i> (RNA)	17
II.11 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	18
II.12 <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (RT-qPCR)	19
II.12.1 Denaturasi	20
II.12.2 <i>Annealing</i>	21
II.12.3 Ekstensi	21
BAB III METODE PENELITIAN	23
III.1 Alat dan Bahan	23
III.2 Penyiapan Hewan Uji	23
III.3 Pembuatan Pakan Kontrol <i>D. melanogaster</i> Oregon R Wild Type	23

III.4	Pembuatan Pakan yang Disuplementasi dengan Ekstrak Daun Teh Hijau (<i>C. sinensis</i>) 1 %, 0,1%, 0,01%, dan 0,001% (Pakan Perlakuan)	24
III.5	Orientasi Pakan Perlakuan Terhadap Lifespan Lalat Buah <i>D. melanogaster</i> Oregon R Wild Type	24
III.6	Ekspresi Gen <i>D. melanogaster</i> Oregon R Wild Type yang Mengkonsumsi Ekstrak Daun Teh Hijau (<i>C. sinensis</i>)	25
III.6.1	Sampel <i>D. melanogaster</i>	25
III.6.2	Isolasi RNA	25
III.6.3	Desain Primer	26
III.6.4	Analisis PCR	27
III.7	Analisis Data	27
III.8	Kesimpulan	27
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	28
IV.1	Kelangsungan Hidup (<i>Survival Rate</i>) <i>D. melanogaster</i> yang Mengkonsumsi Pakan yang Disuplementasi dengan Ekstrak Daun Teh Hijau (<i>C. sinensis</i>)	28
IV.2	Ekspresi mRNA Gen Drs dan Gen Dpt <i>D. melanogaster</i>	31
IV.2.1	Ekspresi mRNA Gen Drs	31
IV.2.2	Ekspresi mRNA Gen Dpt	33
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	35
V.1	Kesimpulan	35
V.2	Saran	35
	DAFTAR PUSTAKA	36
	LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1 Sekuens Primer	26

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> Betina dan Jantan	9
Gambar 2.2 Metamorfosis <i>Drosophila melanogaster</i>	10
Gambar 2.3 Jalur Mekanisme Aktivasi <i>Toll Signaling Pathway</i>	13
Gambar 2.4 Jalur Sinyal Sistem Imun <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Imd Pathway</i> dan <i>Toll Pathway</i>	15
Gambar 2.5 Plot amplifikasi jumlah produk yang terbentuk pada proses PCR	19
Gambar 2.6 Siklus suhu PCR	20
Gambar 4.1 Kelangsungan hidup (<i>survival rate</i>) <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon R wild type yang mengkonsumsi pakan tanpa ekstrak daun teh hijau (<i>Camellia sinensis</i>) (kontrol) dan Oregon R wild type yang mengkonsumsi pakan yang disuplementasi ekstrak daun teh hijau 1%, 0,1%, 0,01% dan 0,001%	29
Gambar 4.2 Level Ekspresi mRNA gen <i>Drs Drosophila melanogaster</i> yang mengkonsumsi pakan yang disuplementasi dengan ekstrak daun teh hijau (<i>Camelia sinensis</i>) pada dosis 1%, 0.1%, 0,01% dan 0,001% dibandingkan dengan pakan kontrol	31
Gambar 4.3 Level Ekspresi mRNA gen <i>Dpt Drosophila melanogaster</i> yang mengkonsumsi pakan yang disuplementasi dengan ekstrak daun teh hijau (<i>Camelia sinensis</i>) pada dosis 1%, 0.1%, 0,01% dan 0,001% dibandingkan dengan pakan kontrol	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Uji Survival	40
Lampiran 2. Skema Kerja	41
Lampiran 3. Komposisi Pakan dan Skema Kerja Pembuatan Pakan	42
Lampiran 4. Pembuatan Pakan Yang Mengandung Ekstrak Daun Teh Hijau (<i>Camellia sinensis</i>) 1 %, 0,1 %, 0,01 % dan 0,001 %	43
Lampiran 5. Gambar Hasil PCR	44
Lampiran 6. One Way ANNOVA Test Gen Drs	45
Lampiran 7. One Way ANNOVA Test Gen Dpt	46
Lampiran 8. Dokumentasi Alat-Alat Penelitian	47

BAB I

PENDAHULUAN

I. 1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab kematian di dunia. Berdasarkan data WHO, dari tahun ke tahun penyakit mengenai infeksi bakteri maupun cenderung menurun, namun penurunan tersebut masih sangat kecil. Salah satu cara untuk menurunkan resiko terkena penyakit infeksi adalah penggunaan imunostimulan (Dye and Dye, 2015). Imunostimulan dapat mengaktivasi atau menginduksi komponen-komponen sistem imun (Jantan *et al.* 2015) dengan cara memperbesar efek dari respon imun termasuk proses produksi antibodi, pelepasan sitokin dan fagositosis sebagai bentuk perlawanan terhadap infeksi (Hadden, 1993)

Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) merupakan salah satu bahan alam yang telah dilaporkan memiliki khasiat sebagai imunostimulan (Li *et al.* 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Farahat *et al.* (2016) didapatkan hasil bahwa ekstrak *C. sinensis* dapat menginduksi sistem imun pada ayam broiler. Selain itu, dilaporkan bahwa *C. sinensis* memiliki kandungan senyawa *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) yang 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).

Sistem imun merupakan sistem pertahanan tubuh yang berfungsi melawan patogen yang dapat menginfeksi tubuh (Murphy *et al.* 2008). Salah satu respon pertahanan dari sistem imun bawaan yaitu sekresi enzim antimikroba (Bilak *et al.* 2003). Peptida antimikroba umumnya dibentuk dalam bentuk proprotein yang membutuhkan tahap proteolitik agar dapat diaktivasi. Peptida antimikroba bekerja dengan cara mengikat glikan/karbohidrat pada struktur mikroorganisme kemudian merusak selnya (Lindsay, 2015) .

Secara umum, terdapat tiga jalur respon sistem imun pada *Drosophila melanogaster* yang memiliki homologi dengan sistem imun pada mamalia, termasuk manusia, yaitu *Toll pathway*, *Immune deficiency pathway* (IMD) dan *JAK/STAT pathway*. Dari ketiga jalur tersebut, dua di antaranya yaitu *Toll pathway* dan *IMD pathway* merupakan jalur utama dari sistem imun humoral *D. melanogaster*. *Toll pathway* dan *IMD pathway* pada *D. melanogaster* masing-masing memiliki kemiripan (homolog) secara genetik dengan *Toll-like pathway* dan *TNF- α* pada sistem imun mamalia (Buchon *et al.* 2014). Salah satu target gen pada *Toll pathway* adalah gen *drs* yang mengekspresikan *Antimicrobial peptide* (AMP) *Drosomycin* yang berfungsi dalam membunuh bakteri gram positif. Sedangkan pada *IMD pathway* menghasilkan *Diptericin* yang berfungsi dalam membunuh bakteri gram negatif (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Drosophila melanogaster merupakan organisme model alternatif yang memiliki homologi dengan sistem imun pada manusia, mudah untuk

dipelihara, murah dan efisien. Oleh demikian, *D. melanogaster* merupakan salah satu model yang dapat digunakan untuk mempelajari sistem imun melalui identifikasi jalur ekspresi gen AMP dan respon imun secara humoral (Kim and Kim, 2005). Berdasarkan hal tersebut, lalat buah *D. melanogaster* berpotensi untuk dijadikan sebagai organisme model dalam penemuan kandidat imunomodulator beserta penelusuran mekanisme aksinya.

I. 2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) dapat mempengaruhi ekspresi gen sistem imun *Drs* dan *Dpt* pada *D. melanogaster*?

I. 3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) terhadap ekspresi gen sistem imun *D. melanogaster* berdasarkan parameter level ekspresi gen *Drs* (*Toll Pathway*) dan *Dpt* (*IMD Pathway*) .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II. 1 Penyakit Infeksi

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen seperti virus, bakteri, parasit, dan fungi. Penyakit infeksi dikategorikan atas penyakit infeksi ekstraseluler dan penyakit infeksi intraseluler. Penyakit infeksi yang sering di derita adalah penyakit diare, demam tifoid, demam berdarah, dan radang paru-paru. Penyakit infeksi merupakan penyakit menular yang mudah menyerang anak, karena anak belum mempunyai sistem imun yang baik.

Berdasarkan data dari WHO, penyakit infeksi merupakan salah satu penyakit yang memiliki prevalensi kasus terbanyak di dunia, terkhusus di negara berkembang, termasuk Indonesia. Hal ini disebabkan mekanisme penyebaran mikroba patogen yang rentan kepada manusia (*host*), baik secara langsung dengan adanya interaksi terhadap sumber patogen maupun secara tidak langsung melalui media perantara seperti air, makanan dan udara (Dye and Dye, 2015).

Tahapan terjadinya penyakit infeksi dimulai dari kondisi inang (*host*) yang rentan atau sensitif terhadap suatu patogen. Selanjutnya melalui paparan secara langsung patogen terhadap *host* maupun faktor lingkungan, patogen akan memperbanyak diri dan kemudian menyebar di dalam tubuh, sehingga menimbulkan gejala umum seperti demam, sakit

kepala, mual dan kelelahan. Ketika hal itu terjadi, sistem imun pada *host* akan menjadi lini pertama dalam mempertahankan kondisi homeostasis tubuh. Apabila kondisi *host* dalam keadaan membaik, maka berarti sistem imun di dalam tubuh berhasil menekan dan mengeliminasi patogen. Sebaliknya jika keadaan *host* semakin memburuk, hal tersebut menandakan sistem imun tidak dapat menekan penyebaran patogen di dalam tubuh, dan memungkinkan keadaan *host* menjadi lebih buruk atau bahkan meninggal. Kemampuan sistem imun pada *host* sangat dipengaruhi oleh asupan gizi dan kesehatan (Pogge, 2005).

II. 2 Imunostimulan

Imunostimulan adalah senyawa yang berasal dari bahan alam atau hasil sintesis yang dapat mengaktifkan sistem kekebalan tubuh manusia dan hewan untuk mencegah terjadinya penyakit dan meningkatkan daya tahan tubuh terhadap berbagai infeksi virus dan bakteri (Shahbazi and Azam, 2016). Selain itu, imunostimulan dapat meningkatkan pelepasan mediator endogen seperti sitokin sebagai terapi untuk mengatasi imunodefisiensi, infeksi kronik ataupun kanker. Imunostimulan menginduksi aktivasi sistem imun spesifik maupun nonspesifik serta memperbesar efek dari sistem imun termasuk fagositosis, *Antigen Presenting Cell* (APC), aktivitas anti viral dan sitotoksik, pelepasan sitokin, serta produksi antibodi (Felippe *et al.* 2014).

II. 3 Klasifikasi Daun Teh Hijau (*C. sinensis*)

Klasifikasi dari *Camellia sinensis* (Putra, 2015) sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Subkingdom	:	Tracheobinta
Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Ordo	:	Theales
Famili	:	Theaceae
Genus	:	Camellia
Spesies	:	<i>Camellia sinensis</i>

Teh hijau merupakan salah satu tanaman yang banyak dikonsumsi di seluruh dunia. Teh hijau yang merupakan anggota dari famili Theaceae. Teh hijau digunakan pada suku Cina tradisional dan ayurveda sebagai stimulan, diuretik, astringent dan untuk kesehatan jantung. Sebagai obat herbal, daun *C. sinensis* yang ditambahkan ke makanan untuk memberikan nutrisi dan juga digunakan sebagai penangkal untuk racun (Tran, 2013).

II. 4 Pengolahan Teh Hijau (*C. sinensis*)

Perbedaan utama pada proses pengolahan teh hijau dengan teh hitam adalah terletak pada proses oksidasi enzimatik atau biasa dikenal dengan fermentasi. Teh hijau merupakan hasil olahan teh yang diproses tanpa menggunakan proses oksidasi enzimatik. Proses pengolahan teh hijau merupakan serangkaian proses fisik dan mekanik tanpa proses atau minimal oksidasi enzimatik. Proses pengolahan teh hijau yang dikenal di dunia ada dua macam, yaitu : *panning* (sangrai) dan *steamed*

(pengukusan). Proses pengolahan teh hijau di Indonesia biasanya memakai *panning* (Anggraini, 2017).

Untuk menjaga kandungan senyawa kimia bermanfaat tersebut, maka proses pengolahan teh hijau harus dilaksanakan dengan penuh ketelitian dan hati-hati. Proses menjaga kualitas pucuk segar harus dimulai sejak panen, yaitu dengan meminimalisir memarnya pucuk sejak pemetikan, pengangkutan sampai proses pelayuan. Berbeda dengan proses pengolahan teh hitam yang didahului dengan proses pelayuan pucuk segar dilakukan di WT (*whithering trough*), tetapi pada proses pengolahan teh hijau pucuk segar harus segera dilayukan secepatnya di mesin *Rotary Panner*. Tujuan dari pelayuan cepat di mesin *Rotary Panner* adalah inaktivasi enzim polifenol sehingga proses oksidasi enzimatik dapat dihindari atau diminimalisir. Dengan demikian diharapkan senyawa-senyawa yang bermanfaat dalam teh hijau tetap dapat dipertahankan dan dapat dinikmati pada saat disajikan (Anggraini, 2017).

II. 5 Kandungan Kimia Teh Hijau (*C. sinensis*)

Teh telah dilaporkan memiliki lebih dari 4000 campuran bioaktif dimana sepertiganya merupakan senyawa-senyawa polifenol. Polifenol merupakan cincin benzen yang terikat pada gugus-gugus hidroksil. Polifenol dapat berupa senyawa flavonoid ataupun non-flavonoid. Namun, polifenol yang ditemukan dalam teh hampir semuanya merupakan senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid tersebut merupakan hasil metabolisme sekunder dari tanaman yang berasal dari reaksi kondensasi *cinnamic acid*

bersama tiga gugus *malonyl-CoA*. Banyak jenis-jenis flavonoid yang ada di dalam teh, tetapi yang memiliki kandungan tertinggi adalah jenis katekin. (Mahmood *et al.* 2010).

II. 6 *Epigallocatechin-3-gallate* Pada Teh Hijau (*C. sinensis*)

Katekin adalah senyawa hasil metabolisme sekunder yang secara alami dihasilkan oleh teh hijau (*C. sinensis*) dan termasuk golongan flavonoid. Pada teh hijau, katekin adalah komponen yang paling banyak ditemukan dan memiliki senyawa sangat kompleks yang tersusun atas *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC) (Rahmasia dkk. 2019). Keempat jenis katekin tersebut memiliki kemampuan yang berbeda apabila ditinjau dari efek biologi. Senyawa-senyawa tersebut yang menentukan kualitas dari suatu teh hijau (Anjarsari, 2016).

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) merupakan senyawa yang memiliki konsentrasi paling tinggi dan bioktivitas antioksidan yang kuat pada teh hijau (*C. sinensis*) (Sartini dkk. 2019). EGCG merupakan senyawa polifenol yang tersusun dalam konfigurasi C8-C3-C6 yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin dan memiliki efek antioksidan 200 kali lebih kuat dibanding vitamin E dalam melawan radikal bebas (Rahmanisa dan Rika, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* (2016) kandungan senyawa EGCG pada teh hijau (*C. sinensis*) dapat meningkatkan kerja dari sistem imun dengan cara menstimulasi kerja

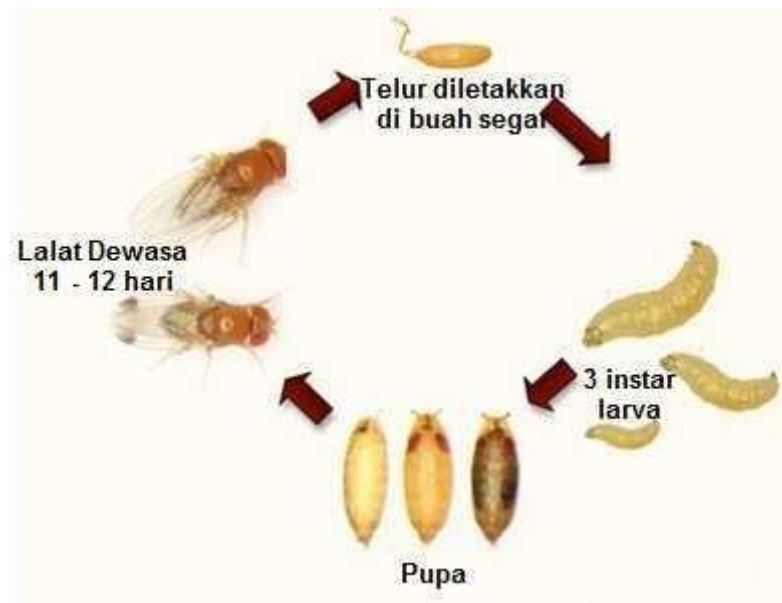
sistem imun bawaan untuk meningkatkan fungsi kekebalan tubuh pada hewan uji.

II. 7 *Drosophila melanogaster*



Gambar 2.1 *Drosophila melanogaster* Betina dan Jantan

Drosophila melanogaster merupakan lalat yang berukuran kecil yang banyak ditemukan pada buah-buahan. Thomas Hunt Morgan adalah ahli biologi yang menjadi perintis dari penggunaan *D. melanogaster* di awal tahun 1900 sebagai bagian penting dalam penelitian genetika. Hewan ini telah banyak digunakan untuk penelitian mengenai genetika dan model umum organisme pada perkembangan biologi. *D. melanogaster* memiliki ukuran yang sangat kecil, yaitu 3 mm. *Wildtype* dari *Drosophila* memiliki ciri-ciri mata berwarna merah dengan badan berwarna kuning kecoklatan dengan garis-garis hitam pada bagian abdomen untuk betina, sedangkan yang jantan berwarna gelap penuh. *Drosophila* memerlukan waktu selama 11-12 hari untuk menjadi lalat dewasa. *Drosophila* disimpan pada rentang suhu sekitar 20°C - 25°C (Mahdieh and Rabbani, 2013).



Gambar 2.2 Metamorfosis *Drosophila melanogaster*

Hewan ini telah dikembangkan untuk dapat digunakan sebagai hewan model pada proses penemuan obat baru karena memiliki beberapa keunggulan seperti banyaknya variasi genetik termasuk jenis mutan dan transgenik yang tersedia, mudah untuk dipelihara, tidak memerlukan kode etik, biaya pemeliharaan yang relatif murah, dan dapat dikirimkan kepada para peneliti di seluruh belahan dunia (Hughes *et al.* 2012).

II. 8 Klasifikasi *D. melanogaster*

Klasifikasi dari *Drosophila melanogaster* (Lilies, 2014) sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Diptera
Famili	: Drosophildae

Genus : *Drosophila*
Spesies : *Drosophila melanogaster*

II. 9 Sistem Imun *D. melanogaster*

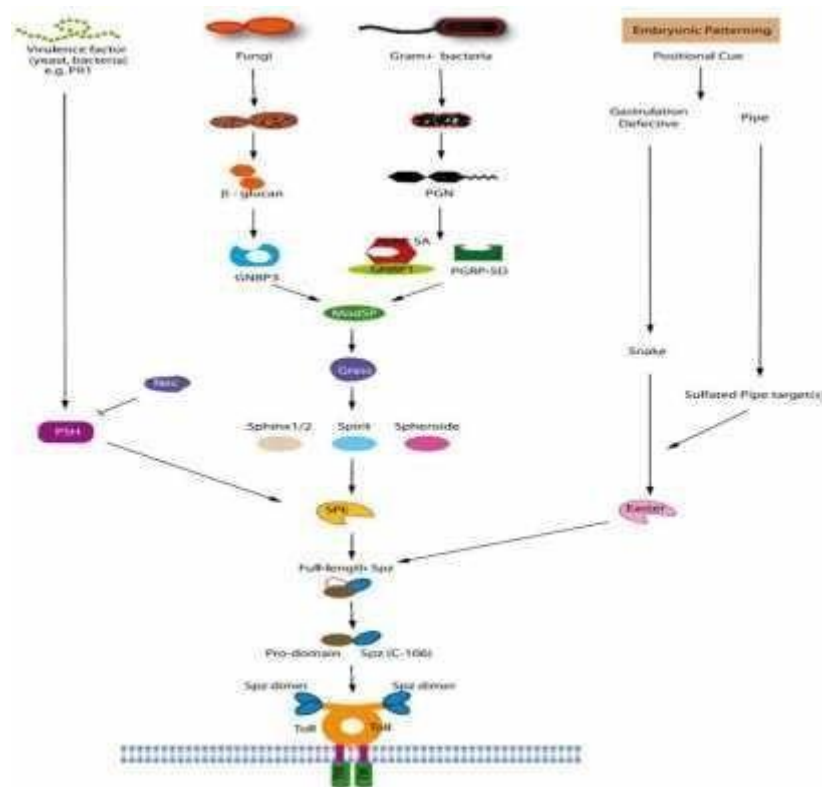
Respon pertahanan tubuh *Drosophila melanogaster* terdiri dari respon seluler dan respon humoral. Respon seluler meliputi fagositosis, enkapsulasi, pembentukan nodul/kapsul dan koagulasi sedangkan respon humoral meliputi sintesis peptida antimikroba, enzim prophenoloksidase dan sintesis protein lektin. Kedua bentuk respon pertahanan ini akan diaktifkan ketika ada benda asing yang masuk ke dalam tubuh.

Sistem imun *D. melanogaster* terdiri atas dua yaitu sistem imun seluler dan sistem imun humoral. Komponen sistem imun seluler *D. melanogaster* terdiri atas lamellatosit, plasmatosit, dan sel-sel kristal. Jumlah sel hemosit terbesar pada *D. melanogaster* adalah plasmatosit dengan total 90-95% dari jumlah hemosit, lebih tinggi dibandingkan dengan lamellatosit dan sel-sel kristal. Plasmatosit merupakan tipe sel yang penting dalam reaksi pertahanan seluler *Drosophila*. Sel ini memiliki fungsi dalam memfagositosis sel-sel mati serta mikroba patogen. Lamellatosit berukuran relatif lebih besar serta pipih dan memiliki fungsi utama dalam membungkus dan menetralkan benda asing yang terlalu besar untuk di fagositosis. Sekitar 5% dari hemosit adalah sel kristal. Dimana sel ini tidak memiliki fungsi fagositosis dan berperan dalam proses melanisasi (Lemaitre and Hoffman, 2007).

Sistem imun humoral *D. melanogaster* memiliki banyak jalur sistem imun, dimana beberapa diantaranya memiliki homologi dengan sistem imun pada manusia. Adapun jalur tersebut sebagai berikut :

II.9.1 Toll Pathway

Toll pathway merupakan salah satu jalur imunitas penting pada *Drosophila melanogaster* terutama pada fase embrionik. Terdapat sembilan total *Toll* reseptor yang di kode dalam genom *D. melanogaster*, termasuk salah satunya *Toll pathway*. Induksi reseptor *Toll* oleh bakteri gram positif maupun fungi akan mengakibatkan aktivasi sistem imun seluler serta produksi *antimicrobial peptide* (AMP) seperti *Drosomycin*. Reseptor *Toll* akan teraktivasi ketika ligan *Spatzle* yang terbelah terikat pada reseptor yang kemudian akan mengaktifkan faktor NF-kB *Dorsal-related immunity factor* atau *Dorsal* (Valanne *et al.* 2011).



Gambar 2.3 Jalur Mekanisme Aktivasi *Toll Signaling Pathway*

Drosomycin merupakan target utama dari respon humoral *Toll*. *Toll pathway* juga memiliki peran dalam respon imun seluler termasuk pada proses fagositosis mikroba, enkapsulasi, dan membunuh parasit. Aktivasi *Toll pathway* dimulai dari pengenalan ekstraseluler yang kemudian menginisiasi kaskade protease yang mengarah ke aktivasi reseptor *Toll*. Dalam kondisi non-signaling, prodomain dari *Spatzle* menutupi daerah C-terminal *Spatzle* yang sebagian besar bersifat hidrofobik. Aktivasi untuk menginduksi *proteolysis* mengakibatkan perubahan konformasi *Spatzle*. Prodomain tetap terkait dengan terminal C dan hanya dilepaskan ketika domain ekstraseluler *Toll* berikatan dengan kompleks. Ada dua model molekul *Spatzle* terikat dengan reseptornya, yang pertama adalah satu

dimer *Spatzle* berikatan dengan dua reseptor *Toll* dan kedua adalah setiap molekul dimer *Spatzle* akan terikat pada satu dari dua reseptor *Toll*, sehingga akan memicu perubahan konformasi dan mengaktifasi persinyalan intraseluler (Valanne *et al.* 2011).

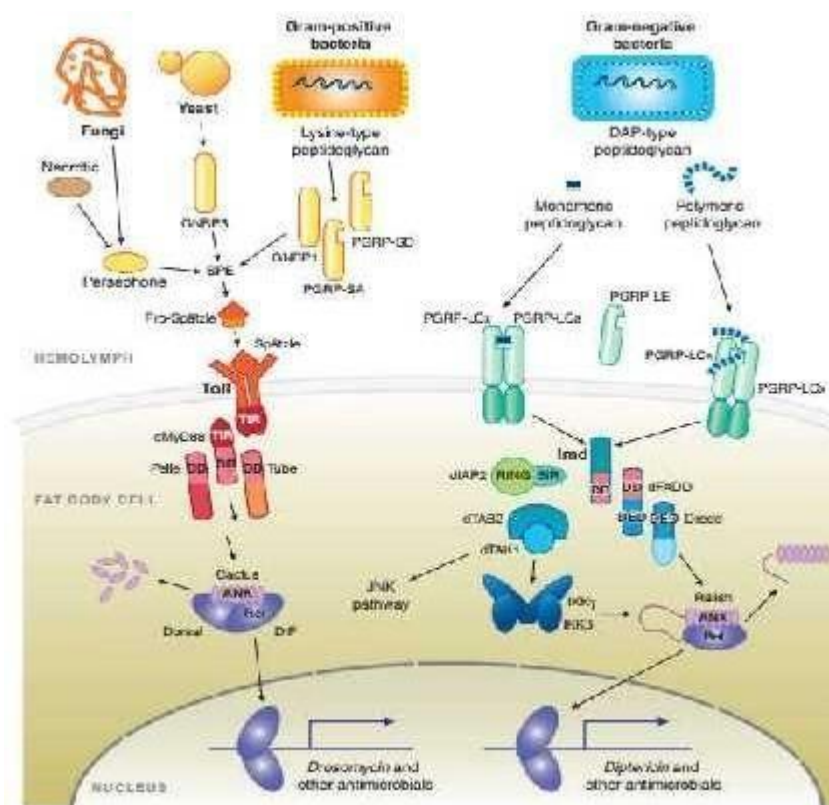
Setelah molekul *Spaetzle* terikat pada reseptor *Toll*, reseptor *Toll* akan terikat ke protein adaptor *MyD88* secara intraseluler pada domain TIR. Selama proses ini berlangsung *MyD88*, *Tube*, kinase *Pelle*, dan sebuah protein adaptor akan bergabung dan membentuk kompleks heterotrimerik *MyD88-Tube-Pelle* melalui interaksi death domain (*DD*)-mediated. Dari kompleks oligomeric *MyD88-Tube-Pelle*, sinyal berlanjut ke fosforilasi dan degradasi faktor I κ B *Cactus* *Drosophila* (Valanne *et al.* 2011).

Pada kondisi normal, *Cactus* akan terikat pada faktor transkripsi NF- κ B *Dorsal* atau *Dif* kemudian menghambat aktivitasnya sehingga *nuclear translocation Dorsal* dan *Dif* membutuhkan degradasi molekul *Cactus*. Untuk dapat terdegradasi, molekul *Cactus* harus difosforilasi. Setelah proses fosforilasi, *nuclear translocation Dorsal/Dif* akan mengaktifasi proses transkripsi beberapa target gen (Valanne *et al.* 2011).

II.9.2 IMD pathway

IMD pathway adalah salah satu jalur imunitas pada *Drosophila melanogaster* yang memiliki peranan yang sangat penting untuk melawan bakteri. *Imd pathway* memiliki fungsi untuk melawan bakteri Gram negatif. Jalur *Imd* akan diaktivasi oleh tipe peptidoglikan DAP (*meso-diaminopimelic acid*) yang umumnya terdapat pada dinding sel bakteri Gram negatif.

Terdapat dua reseptor penting yang berperan pada jalur Imd, PGRP-LC pada membran plasma dan PGRP-LE terdapat pada bagian intraseluler. Ketika peptidoglikan DAP terikat pada reseptor maka jalur NF- κ B akan diinisiasi dan menginduksi untuk mensekresikan peptide AMP (Kleino and Silverman, 2015).



Gambar 2.4 Jalur Sinyal Sistem Imun *Drosophila melanogaster* Toll Pathway dan IMD Pathway

II. 10 Ekstraksi Asam Nukleat

Proses pengeluaran DNA dari nukleus, mitokondria maupun organel lain biasanya dilakukan dengan homogenasi dengan penambahan buffer ekstraksi. Selanjutnya dilakukan pemisahan DNA dari komponen sel yang

lain atau kontaminan yang tidak diinginkan. Pemisahan DNA dari komponen sel yang lain, termasuk debris sel, dilakukan dengan sentrifugasi. Kontaminan yang umum ditemukan adalah polisakarida yang dapat mengganggu proses lanjutan seperti PCR, dimana terjadi hambatan aktivitas taq polymerase atau kontaminan lainnya yaitu polifenol yang dalam bentuk teroksidasi akan mengikat jaringan yang digunakan dijaga tetap dingin sebelum dan selama proses ekstraksi. Setelah dilakukan ekstraksi, maka proses dilanjutkan dengan presipitasi DNA dengan menggunakan isopropanol. Selain DNA, semua bahan yang lain akan larut dalam etanol dingin. Dengan demikian, saat dilakukan sentrifugasi, maka DNA akan mengendap dan terpisah dari senyawa-senyawa atau bahan lainnya (Fatchiyah dkk, 2011).

Di sisi lain, RNA merupakan molekul tidak stabil dan mudah rusak setelah diekstrak dari sel atau jaringan. Ada beberapa jenis RNA termasuk ribosom RNA (rRNA) (80%-90%), messenger RNA (mRNA) (2,5%-5%) dan transfer RNA (tRNA). RNA sangat tidak stabil karena kehadiran RNase dalam darah, semua jaringan, serta sebagian besar ada pada bakteri dan jamur di lingkungan (Tan and Yiap, 2009).

II.10.1 *Deoxyribosa Nucleic Acid (DNA)*

DNA adalah dimer anti-paralel dari untai asam nukleat. DNA tersusun atas nukleotida yang mengandung gula deoxyribosa. Setiap nukleotida tersusun atas tiga komponen, yaitu molekul gula pentosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen. Komponen gula pentosa dan fosfat terdapat di semua

nukleotida dengan susunan dan bentuk yang identik, sedangkan basa nitrogen memiliki susunan dan bentuk yang berbeda dalam satu nukleotida dengan nukleotida lainnya. Berdasarkan bentuk molekulnya, basa nitrogen dibedakan menjadi dua, yaitu purin dan pirimidin. Basa purin terdiri atas guanin dan adenin. Sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin dan timin. Untuk basa pirimidin pada RNA adalah Urasil dan sitosin (Muladno, 2002).

Struktur molekul DNA terdiri atas dua rangkaian nukleotida yang tersusun secara linear. Kedua rangkaian yang saling berikatan itu terbentuk seperti tali berpilin, sehingga molekul DNA disebut sebagai *double helix*. Satu rangkaian nukleotida merupakan susunan dari banyak nukleotida yang diikat satu sama lain oleh ikatan fosfodiester, sedangkan kedua rangkaian nukleotida tersebut direkatkan oleh ikatan hidrogen (Muladno, 2002).

II.10.2 Ribosa Nucleic Acid (RNA)

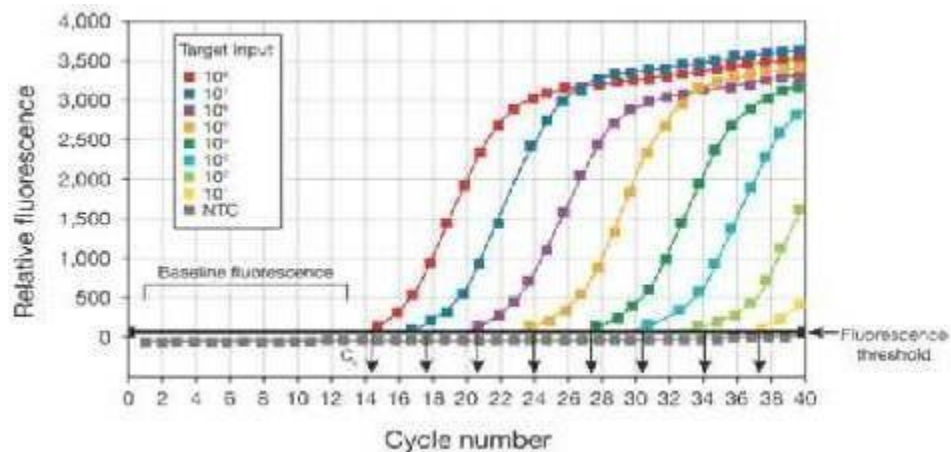
RNA dihasilkan melalui proses transkripsi, yaitu penyalinan kode-kode genetik yang ada pada urutan DNA yang kemudian diubah menjadi RNA. Transkripsi adalah proses yang mengawali ekspresi sifat-sifat genetik yang nantinya akan muncul sebagai fenotip. Urutan nukleotida pada salah satu untaian molekul DNA digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk sintesis molekul RNA yang komplementer. Molekul RNA yang disintesis dalam proses transkripsi pada garis besarnya dapat dibedakan menjadi tiga kelompok molekul RNA, yaitu: mRNA (*Messenger RNA*), tRNA

(Transfer RNA), rRNA (ribosomal RNA). Molekul mRNA adalah RNA yang merupakan Salinan kode-kode genetik pada DNA yang dalam proses selanjutnya (translasi) akan diterjemahkan menjadi urutan asam amino yang menyusun suatu polipeptida atau protein tertentu. Molekul tRNA adalah RNA yang berperan membawa asam amino spesifik yang akan digabungkan dalam proses sintesis protein (translasi). Molekul rRNA adalah RNA yang digunakan untuk menyusun ribosom, yaitu suatu partikel didalam sel yang digunakan sebagai tempat sintesis protein. Molekul tRNA dan rRNA tidak pernah ditranslasi karena molekul yang digunakan adalah RNA-nya itu sendiri (Yuwono, 2005).

II. 11 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu teknologi yang sangat maju pada bidang biologi molekular. Dengan menggunakan PCR, sekuens spesifik DNA atau cDNA dapat digandakan atau diamplifikasi menjadi ribuan atau jutaan dengan sekuens oligo-nukleotida spesifik, DNA *Polymerase*, dan siklus temperatur yang sesuai. Secara teoretis, PCR akan mengamplifikasi DNA secara eksponensial, dengan menggandakan jumlah molekul target setiap pada siklus amplifikasi. Pada *Real-Time PCR* jumlah DNA yang teramplifikasi akan diukur setiap siklus dengan indikator fluoresensi. Perubahan intensitas fluoresensi selama reaksi akan dideteksi oleh detector dalam PCR. Dengan mem-plot intensitas fluoresensi dengan jumlah siklus maka *Real-Time PCR* akan

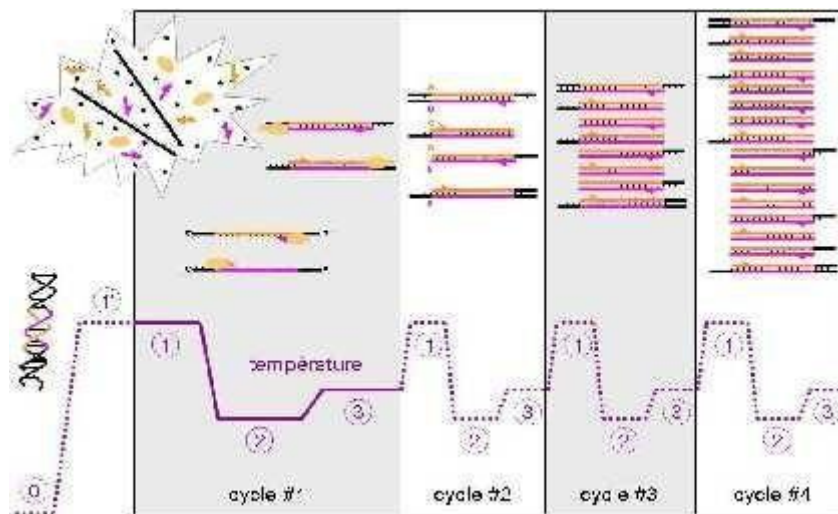
membuat plot amplifikasi jumlah produk dan lamanya waktu reaksi (*Real-time PCR Handbook*, 2014).



Gambar 2.5 Plot amplifikasi jumlah produk yang terbentuk pada proses PCR

II. 12 *Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)*

Salah satu Teknik yang banyak diaplikasikan dan telah berkembang saat ini adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan alat *Thermal Cycler* PCR yang mampu mengamplifikasi fragmen DNA secara *in vitro*. Dalam perkembangannya, telah dikembangkan Teknik *Real Time PCR* yang mampu mengevaluasi dan melakukan kuantifikasi secara langsung. Teknik ini dilakukan dengan mengintegrasikan Teknik PCR dengan komputer dan perangkat lunak.



Gambar 2.6 Siklus suhu PCR

Hasil amplifikasi DNA dengan PCR konvensional, pengamatan keberadaan DNA dilakukan pada akhir reaksi dengan menggunakan gel agarose setelah dilakukan proses elektroforesis. Sedangkan analisa menggunakan *Real Time* PCR memungkinkan untuk dilakukan pengamatan pada saat reaksi berlangsung. Keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari probe (penanda). Pada *Real Time* PCR pengamatan hasil tidak lagi membutuhkan tahap elektroforesis, sehingga tidak lagi dibutuhkan gel agarose dan penggunaan *Ethidium Bromide* (EtBr) yang merupakan senyawa karsinogenik (Kubista *et al.* 2006).

II.11.1 Denaturasi

Dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum *enzim taq polymerase* ditambahkan di dalam tabung reaksi. Ini biasanya berlangsung sekitar tiga menit untuk meyakinkan bahwa molekul DNA target yang ingin dilipatgandakan jumlahnya benar-benar telah terdenaturasi menjadi DNA

untai tunggal. Untuk denaturasi berikutnya, waktu yang diperlukan hanya 30 detik pada suhu 95°C. Apabila DNA target mengandung banyak nukleotida G-C, suhu denaturasi dapat dinaikkan. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk untai DNA kembali) secara cepat, dan mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktivitas enzim *taq polymerase* (Muladno, 2002).

II.11.2 Annealing

Primer sebaiknya memiliki ukuran 18-25 basa, mengandung 50-60% G+C, dan T (°C) terhitung untuk kedua primer sebaiknya sama. Selain itu, sekuens DNA kedua primer tidak saling berkomplemen karena akan memungkinkan terjadinya penempelan antar primer yang kemudian membentuk primer-primer. Sekuens DNA didalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR (Muladno, 2002).

II.11.3 Ekstensi

Selama tahap ini, *taq polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung tiga. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan antara 35 sampai 100 nukleotida per detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian, untuk produk PCR sepanjang 2000 pasang basa, waktu satu menit sudah lebih dari cukup

untuk tahap pemanjangan primer ini. Biasanya, diakhir siklus PCR, waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai lima menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan berbentuk DNA untai ganda (Muladno, 2002).