

MANFAAT EKSTRAK AIR *GREEN TEA* (*Camellia sinensis*) TERHADAP JUMLAH SEL NEUTROFIL DAN *FOAM CELL* MAKROFAG PADA TIKUS WISTAR MODEL DIABETES MELLITUS TIPE-2 DENGAN *ORAL CANDIDIASIS*

SKRIPSI



Oleh:

JEVELINE AMELIA

NIM: 021611133054

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

MANFAAT EKSTRAK AIR *GREEN TEA* (*Camellia sinensis*) TERHADAP JUMLAH SEL NEUTROFIL DAN *FOAM CELL* MAKROFAG PADA TIKUS WISTAR MODEL DIABETES MELLITUS TIPE-2 DENGAN *ORAL CANDIDIASIS*

SKRIPSI



Oleh:
JEVELINE AMELIA
NIM: 021611133054

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

LEMBAR PENGESAHAN

MANFAAT EKSTRAK AIR *GREEN TEA* (*Camellia sinensis*) TERHADAP JUMLAH SEL NEUTROFIL DAN *FOAM CELL* MAKROFAG PADA TIKUS WISTAR MODEL DIABETES MELLITUS TIPE-2 DENGAN *ORAL CANDIDIASIS*

SKRIPSI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan Pendidikan Dokter Gigi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya

Oleh:

JEVELINE AMELIA

021611133054

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta



Dr. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes

Edhi Jularso, drg., MS

NIP. 195911141986032002

NIP. 195607291981031004

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

PENETAPAN PANITIA PENGUJI SKRIPSI

Skripsi ini telah diuji pada tanggal 28 Oktober 2019

PANITIA PENGUJI SKRIPSI

- 1. Bambang Sumaryono, drg., M.Kes (Ketua Penguji)**
- 2. Dr. Theresia Indah Budhy, drg., M.Kes (Sekretaris Penguji)**
- 3. Prof. Dr. Istiati, drg., SU (Anggota Penguji)**
- 4. Dr. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes (Anggota Penguji /
Pembimbing Utama)**
- 5. Edhi Jularso, drg., MS (Anggota Penguji / Pembimbing
Serta)**

SURAT PERNYATAAN ORISINILITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Jeveline Amelia
NIM : 021611133054
Program Studi : Pendidikan Dokter Gigi
Fakultas : Kedokteran Gigi
Jenjang : S1

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

MANFAAT EKSTRAK AIR *GREEN TEA* (*Camellia sinensis*) TERHADAP JUMLAH SEL NEUTROFIL DAN *FOAM CELL* MAKROFAG PADA TIKUS WISTAR MODEL DIABETES MELLITUS TIPE-2 DENGAN *ORAL CANDIDIASIS*

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, Oktober 2019



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Yang Maha Esa karena atas segala berkat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Manfaat Ekstrak Air *Green Tea (Camellia sinensis)* Terhadap Jumlah Sel Neutrofil dan *Foam Cell* Makrofag Pada Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *Oral Candidiasis*”** sebagai salah satu syarat kelulusan Program Studi Pendidikan Kedokteran Gigi Strata 1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. Skripsi ini tidak lepas dari bantuan, dukungan, dan bimbingan berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. R. Darmawan Setijanto, drg., M. Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
2. Edhi Jularso, drg., MS selaku ketua Departemen Patologi Mulut dan Maksilofasial dan sebagai pembimbing serta yang telah memberikan ijin dalam pembuatan skripsi dan senantiasa memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi selama penyusunan skripsi.
3. Dr. Retno Pudji Rahayu, drg., M. Kes selaku pembimbing utama yang selalu sabar dan meluangkan waktu untuk memberikan saran, bimbingan, arahan dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Prof. Dr. Istiati, drg., SU., Dr. Theresa Indah Budhy, drg., M. Kes, Bambang Sumaryono, drg., M. Kes, selaku staf dosen dan Mbak Levi selaku sekretaris departemen Patologi Mulut dan Maksilofasial yang telah memberikan motivasi dan saran membangun dalam menyelesaikan skripsi ini.

5. Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto., M.si, Apt., dan Dr. Bambang Purwanto, dr. M. Kes yang telah membantu dalam penghitungan dosis obat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini.
6. Staf Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, staf *Research Center* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, staf Laboratorium Farmasi Klinis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan arahan dan bantuan selama proses penelitian.
7. Orang tua tercinta, Mama Theresia yang selalu memberikan semangat, doa, dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Aisyah Ekasari, Michael Owen, Maidel Salsabila, Andro Pramana Witarto, Kenneth Kartono, dan juga rekan-rekan skripsi di departemen Patologi Mulut, yang selalu memberikan semangat dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih membutuhkan penyempurnaan, oleh sebab itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukan.

Surabaya,
Oktober 2019

Penulis

UTILIZATION OF GREEN TEA (CAMELLIA SINENSIS) EXTRACT ON THE NUMBER OF NEUTROPHIL CELLS AND MACROPHAGE FOAM CELLS IN WISTAR RAT MODELS OF TYPE-2 DIABETES MELLITUS WITH ORAL CANDIDIASIS

ABSTRACT

Background: Oral candidiasis is an opportunistic infection in the oral cavity that caused by *Candida albicans* as the primary agent and can be found when the host is in immunocompromised condition such as diabetes mellitus. In this condition, there is an immune system defect causing a failure in adhesion elimination of *Candida albicans*. In addition, hyperglycemic condition can cause atheroma formation. Flavonoid and Caffeine contents in Green tea carry important anti-fungal and anti-inflammatory effects which may affect this immunocompromised state. **Aim:** to show the advantage of green tea (*Camellia sinensis*) extract on the number of neutrophil cells and macrophage foam cells in wistar rat models of type-2 diabetes mellitus with oral candidiasis. **Methods:** The sample consisted of 36 Wistar rats which were divided into 6 groups, namely control group (K), negative control group {K(-)}, positive control group treated with 8.6% Meditea for 5 days {K1(+)} and 7 days {K2(+)}, and the treatment group treated with 2.5% green tea extract for 5 days (P1) and 7 days (P2). All experimental animals were made under diabetic condition induced by 50 mg/KgBW STZ and then inoculated with 6×10^8 CFU/ml of *C. albicans*. The result of the study was collected and analyzed with HE staining to observe the neutrophil cells and macrophage foam cells. Data were analyzed using independent t-test, analysis of variance test and Tukey honest significant differences test. **Results:** Neutrophil and macrophage foam cells counts were significantly increased and decreased, respectively ($p=0.000$) after 7 days of green tea leaves extract administration. However, there were no significant change of both cells counts in 7 days of Meditea administration ($p>0.005$). **Conclusion:** Green tea extract (*Camellia sinensis*) with a percentage of 2.5% has the potential to increase the number of neutrophil cells and reduce the number of macrophage foam cells in wistar rat models of type-2 diabetes mellitus with oral candidiasis.

Keywords: Oral Candidiasis, Diabetes Mellitus, Neutrophil Cells, Macrophage Foam Cell, Green Tea

**MANFAAT EKSTRAK AIR GREEN TEA (*Camellia sinensis*) TERHADAP
JUMLAH SEL NEUTROFIL DAN FOAM CELL MAKROFAG PADA
TIKUS WISTAR MODEL DIABETES MELLITUS TIPE-2 DENGAN
ORAL CANDIDIASIS**

ABSTRAK

Latar Belakang: *Oral candidiasis* adalah infeksi oportunistik dalam rongga mulut yang disebabkan oleh agen primer yaitu *Candida albicans* dan dapat dijumpai pada kondisi *immunocompromised* seperti diabetes mellitus. Pada kondisi ini terjadi defek pada sistem imun sehingga imunitas dari mukosa tidak dapat mengeliminasi adhesi dari *C. Albicans*. Selain itu, kondisi hiperglikemia menyebabkan pembentukan atheroma. *Green tea (Camellia sinensis)* mengandung flavonoid dan kafein yang berperan sebagai antifungal dan antiinflamasi. **Tujuan:** Menunjukkan manfaat dari ekstrak air *green tea (Camellia sinensis)* terhadap jumlah sel neutrofil dan *foam cell* makrofag pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis*. **Metode:** Sampel terdiri dari 36 ekor tikus Wistar yang dibagi ke dalam 6 kelompok, yaitu kelompok normal (K), kontrol negatif (K-), kontrol positif dengan pemberian Meditea 8,6% selama 5 hari {K1(+)} dan 7 hari {K2(+)}, dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak air *green tea* 2,5% selama 5 hari (P1) dan 7 hari (P2). Seluruh hewan coba dibuat dalam kondisi diabetes dengan induksi STZ dosis 50 mg/kg BB dan dilakukan inokulasi *C. albicans* 6×10^8 CFU/ml. Hasil penelitian diperoleh dan dianalisis dengan pengecatan HE untuk mengamati jumlah sel neutrofil dan *foam cell* makrofag. Analisis data dengan independent t-test, ANOVA dan Tukey Hsd. **Hasil:** Neutrofil meningkat secara signifikan ($p=0.000$) dan *foam cell* makrofag menurun secara signifikan setelah pemberian ekstrak *green tea* selama 7 hari, namun tidak terdapat perbedaan signifikan pada neutrofil dan *foam cell* makrofag setelah pemberian meditea selama 7 hari ($p>0.05$) **Simpulan:** Ekstrak air *green tea (Camellia sinensis)* 2,5% bermanfaat dalam meningkatkan jumlah sel neutrofil dan menurunkan *foam cell* makrofag pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis*.

Kata kunci: *Oral Candidiasis*, Diabetes Mellitus, Sel Neutrofil, *Foam Cell* Makrofag, *Green Tea*

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Lembar Pengesahan	iii
Penetapan Panitia Penguji Skripsi.....	iv
Surat Pernyataan Orisinalitas.....	vi
Ucapan Terima Kasih	vii
<i>Abstract</i>	viii
Abstrak	ix
Daftar Isi	xii
Daftar Tabel	xiii
Daftar Gambar	xv
Daftar Lampiran	xvi
Daftar Singkatan.....	1
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	4
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 <i>Oral Candidiasis</i>	6
2.2 Diabetes Mellitus	9
2.3 Makrofag.....	10
2.4 TNF- α dan IL-1 β	11
2.5 Limfosit	12
2.5.1 Limfosit T.....	13
2.5.1.1 T Helper 17 (Th ₁₇).....	15
2.6 Interleukin-17 (IL-17)	17
2.6.1 Interleukin-17A (IL-17A).....	19
2.7 Human Beta Defensin-2 (HBD-2).....	19
2.8 Neutrofil.....	19
2.9 IL-18 dan CD36	22
2.10 CD68	23
2.11 <i>Foam Cell</i> Makrofag.....	23
2.12 Pembentukan <i>Foam Cell</i> Makrofag	24
2.13 <i>Green Tea</i> atau Teh Hijau	25
2.13.1 Morfologi dan Klasifikasi <i>Green tea</i> (<i>Camellia sinensis</i>)	26
2.13.2 Kandungan Kimia dan Efek Farmakologis <i>Green tea</i> (<i>Camellia sinensis</i>).....	27

2.13.3 Kandungan Flavonoid pada <i>Green tea (Camellia sinensis)</i>	29
2.13.4 Kandungan Kafein pada <i>Green tea (Camellia sinensis)</i>	31
2.13.5 Manfaat <i>Green tea (Camellia sinensis)</i>	31
2.14 Tikus Wistar	31
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	33
3.1 Kerangka Konseptual	33
3.2 Analisis Kerangka Konseptual	34
3.3 Hipotesis Penelitian	35
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	36
4.1 Jenis Penelitian	36
4.2 Rancangan Penelitian	36
4.3 Populasi Penelitian	38
4.4 Sampel dan Besar Sampel Penelitian	38
4.4.1 Sampel Penelitian	38
4.4.2 Besar Sampel Penelitian	38
4.5 Variabel Penelitian	40
4.6 Definisi Operasional Variabel	41
4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian	42
4.7.1 Lokasi Penelitian	42
4.7.2 Waktu Penelitian	43
4.8 Instrumen Penelitian	43
4.8.1 Alat Penelitian	43
4.8.2 Bahan Penelitian	43
4.9 Cara Kerja	44
4.9.1 Pembuatan Ekstrak Air <i>Green Tea</i>	44
4.9.2 Pembuatan Larutan Meditea	44
4.9.3 Persiapan Hewan Coba	45
4.9.4 Prosedur Pembuatan Model DM pada Tikus Wistar	45
4.9.5 Prosedur Inokulasi <i>C. albicans</i> Pada Tikus Wistar	47
4.9.6 Prosedur Pemberian Ekstrak Air <i>Green Tea (Camellia sinensis)</i>	47
4.9.7 Prosedur Pemberian Larutan Meditea	47
4.9.8 Prosedur Euthanasia Pada Tikus Wistar	48
4.9.9 Pembuatan Preparat Sediaan Histopatologi	48
4.9.10 Pembuatan Sediaan Parafin Blok Mukosa Rongga Mulut Tikus Wistar ...	48
4.9.11 Pewarnaan Hematoxilen-Eosin (HE) untuk Pemeriksaan Jumlah Sel Neutrofil dan <i>Foam Cell</i> Makrofag	49
4.9.12 Pengamatan dan Penghitungan Jumlah Sel Neutrofil dan <i>Foam Cell</i> Makrofag	50
4.9.13 Analisis Data	50
4.9.14 Alur Penelitian	52
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	53
5.1 Hasil Penelitian	53

5.1.1 Jumlah Sel Neutrofil	53
5.1.2 Jumlah <i>Foam Cell</i> Makrofag	57
5.2 Analisis Data Penelitian.....	60
5.2.1 Analisis Data Jumlah Sel Neutrofil.....	60
5.2.2 Analisis Data Jumlah <i>Foam Cell</i> Makrofag.....	62
BAB VI PEMBAHASAN.....	65
BAB VII PENUTUP.....	71
7.1 Kesimpulan.....	71
7.2 Saran	71
DAFTAR PUSTAKA.....	72
LAMPIRAN.....	80

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Polifenol Teh Hijau Dari Jepang (mg/g) 28

Tabel 5.1 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Neutrofil Antar
Kelompok K dan K-
.....
54

Tabel 5.2 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Neutrofil Antar
Kelompok (K-, K1(+), K2(+), P1, dan
P2)
54

Tabel 5.3 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada
Kelompok K dan K-57

Tabel 5.4 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada
Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1, dan
P2.....
57

Tabel 5.5 Hasil Uji Homogenitas Jumlah Sel Neutrofil 61

Tabel 5.6 Hasil Uji *One Way ANOVA* Jumlah Sel Neutrofil..... 61

Tabel 5.7 Hasil Uji *Tukey HSD* Jumlah Sel Neutrofil..... 62

Tabel 5.8 Hasil Uji Homogenitas Jumlah *Foam Cell* Makrofag 63

Tabel 5.9 Hasil Uji *One Way ANOVA* Jumlah *Foam Cell* Makrofag 63

Tabel 5.10 Hasil Uji *Tukey HSD* Jumlah *Foam Cell* Makrofag 63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 *Oral candidiasis*..... 6

Gambar 2.2 Bentuk Dimorfik *C. albicans* 7

Gambar 2.3 Patogenesis *Candida albicans* 8

Gambar 2.4 Prevalensi Diabetes di Indonesia Tahun 2007 dan 2013..... 9

Gambar 2.5 Limfosit..... 13

Gambar 2.6 Differensiasi CD4+ Sel T Efektor 15

Gambar 2.7 Differensiasi CD4+ Sel T Menjadi Sel Th₁₇ 17

Gambar 2.8 Fungsi Sel Th₁₇..... 18

Gambar 2.9 Neutrofil..... 21

Gambar 2.10 Pembentukan *Foam cell* 25

Gambar 2.11 Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*)..... 27

Gambar 2.12 Struktur Kimia Catechin..... 30

Gambar 4.2 Skema Penelitian..... 35

Gambar 5.1 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Neutrofil Pada
Kelompok K dan K- 54

Gambar 5.2 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Neutrofil Pada
Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1, dan P2 55

Gambar 5.3 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran Sel Neutrofil Pada
Kelompok K dan K- 56

Gambar 5.4 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran Sel Neutrofil Pada
Kelompok K1 (+) dan K2(+) 59

Gambar 5.5 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran Sel Neutrofil Pada
Kelompok P1 dan P2 57

Gambar 5.6 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Jumlah <i>Foam Cell</i> Makrofag Pada Kelompok K dan K-	58
Gambar 5.7 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Jumlah <i>Foam Cell</i> Makrofag Pada Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1, dan P2	58
Gambar 5.8 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran <i>Foam Cell</i> Makrofag Pada Kelompok K dan K-	59
Gambar 5.9 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran <i>Foam Cell</i> Makrofag Pada Kelompok K1 (+) dan K2(+)	60
Gambar 5.10 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran <i>Foam Cell</i> Makrofag Pada Kelompok P1 dan P2	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Laik Etik Penelitian	80
Lampiran 2. Hasil Uji Statistika	81
Lampiran 3. Laporan Hasil Uji Ekstrak <i>Green Tea</i>	89
Lampiran 4. Laporan Hasil Uji Meditea	93
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	94

DAFTAR SINGKATAN

<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
DM	: Diabetes Mellitus
EGCG	: Epigallocatechin gallate
ECG	: Epicatechin gallate
EGC	: Epigallocatechin
EC	: Epicatechin
GCG	: Gallocatechin gallate
GC	: Gallocatechin
C	: Catechin
HE	: Hematoxilen-Eosin
Th ₁₇	: T-helper tipe 17
Th ₁	: T-helper tipe 1
Th ₂	: T-helper tipe 2
IL-17	: Interleukin-17
IL-18	: Interleukin-18
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor- α</i>
NF- κ B	: Nuclear factor-kappa B
LDL-ox	: <i>Low Density Lipoprotein-oxidation</i>
HBD-2	: Human β -Defensin 2
VCAM-1	: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
ICAM-1	: <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
STZ	: Streptozotocin
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>
NBF	: <i>Neutral Buffered Formalin</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Oral candidiasis adalah infeksi oportunistik dalam rongga mulut yang disebabkan oleh agen primer yaitu *Candida albicans* (Nur'aeny *et al*, 2017). Dikatakan infeksi oportunistik karena *Candida* merupakan flora normal atau mikroorganisme komensal dalam rongga mulut, tetapi berpotensi menjadi patogen apabila daya tahan tubuh (*host*) menurun (Duhring *et al*, 2015). *Candida albicans* dapat dijumpai diantaranya pada pengguna antimikroba spektrum luas (seperti, tetrasiklin), pemakai protesa gigi, perokok, dan juga pada kondisi *immunocompromised* yang salah satunya adalah diabetes mellitus (Nur'aeny *et al*, 2017). Pada kondisi *immunocompromised* terjadi defek pada sistem imun sehingga imunitas dari mukosa tidak dapat mengeleminasi adhesi dari *C. albicans* (Rahayu *et al*, 2018).

Menurut *World Health Organization* (2018), Diabetes Mellitus merupakan suatu penyakit kronis yang disebabkan karena pankreas tidak memproduksi insulin yang cukup atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin secara efektif sehingga terjadi peningkatan glukosa dalam darah (hiperglikemia) (WHO, 2018). Peningkatan kadar glukosa dalam darah menyebabkan peningkatan kadar glukosa pada saliva, hal ini mengakibatkan ketidakseimbangan pada flora normal rongga mulut karena glukosa adalah media pertumbuhan yang baik bagi pertumbuhan *C. albicans* (Sumintarti dan Rahman, 2015). Keadaan hiperglikemia juga

menyebabkan akumulasi lipid dan pembentukan *foam cell* yang mengarah pada aterosklerosis (Chait dan Bornfeldt, 2009).

Prevalensi *oral candidiasis* akibat infeksi oleh *C. albicans* mengalami peningkatan hingga 80% pada penderita Diabetes Mellitus (Minasari, 2008). Dari 38 penderita Diabetes Mellitus, 18 orang diantaranya mengalami *oral candidiasis*, yaitu enam orang pada DM terkontrol dan 12 orang pada DM tidak terkontrol. Prevalensi *oral candidiasis* lebih tinggi pada penderita Diabetes Mellitus tidak terkontrol (Karimah, 2018). WHO memperkirakan bahwa jumlah penderita DM pada masyarakat dengan usia lebih dari 20 tahun mencapai 150 juta orang pada tahun 2000 dan dalam 25 tahun kemudian diperkirakan akan terus meningkat dan mencapai 300 juta orang (Saskia dan Mutiara, 2015). Di Indonesia, Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) menyatakan bahwa proporsi Diabetes Mellitus pada penderita dengan usia lebih dari 15 tahun meningkat dua kali lipat pada tahun 2013 dibandingkan pada tahun 2007 (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, 2014).

Kondisi Diabetes Mellitus menyebabkan gangguan efek fagositosis dari sel PMN (Rahayu *et al*, 2018). Infeksi *C. albicans* memicu differensiasi CD4+ sel T menjadi Th₁₇ yang mensekresi sitokin yaitu Interleukin 17 (IL-17) melalui aktivasi IL-23 yang diproduksi oleh sel dendritik (Valeri dan Raffatellu, 2016). Interleukin-17A berperan penting dalam meregulasi peptida antimikroba dan mobilisasi, serta aktivitas fungisid dari neutrofil, untuk melawan patogen ekstraseluler (Huppler *et al*, 2014). Interleukin-17A berikatan dengan reseptor IL-17R pada epitel menginduksi sekresi human beta-defensin 2 (HBD-2) (Rahayu *et al*, 2018). HBD-2 merupakan bagian dari imunitas alami yang berperan penting dalam merekrut

dan mengaktivasi neutrofil untuk memfagosit *C. albicans* (Duhring *et al*, 2015; Rahayu *et al*, 2018). Selain itu, infeksi *C. albicans* juga memicu pelepasan IL-18 oleh makrofag yang selanjutnya mengaktifkan jalur NF-kB yang menyandi CD36 (Bhat *et al*, 2015; Carneiro *et al*, 2015; Kaplanski, 2018).

CD68 berperan sebagai marker proliferasi yang diekspresikan oleh makrofag. Peningkatan risiko makrofag menjadi *foam cell* karena peningkatan reseptor yang mengikat LDL-ox yaitu CD36 (Chistiakov *et al*, 2017).

Infeksi jamur meningkat karena tingginya penderita *immunocompromised* seperti diabetes mellitus. Hal ini mengakibatkan peningkatan penggunaan obat-obatan antifungi yang mengarah pada perkembangan resistensi terhadap obat-obatan tersebut (Arif *et al*, 2009). Dilaporkan bahwa resistensi *C. albicans* terhadap flukonazol sekitar 34,07%, resisten terhadap vorikonazol 10,99%, resisten terhadap ketokonazol 7,69%, resisten terhadap itrakonazol 6,59%, resisten terhadap klotrimazol 2,19% dan 1,09% resisten terhadap amfoterisin B (Bahri dan Setiabudy, 2011). Oleh karena itu, dibutuhkan inovasi baru untuk menyembuhkan *oral candidiasis* pada penderita DM yaitu dengan obat berbahan dasar herbal, karena selain natural dan aman, obat herbal juga mengandung berbagai bahan bioaktif yang memiliki komponen antifungi (Arif *et al*, 2009).

Teh telah dikonsumsi oleh sebagian besar populasi dunia (Kopaei *et al*, 2014). Menurut Statistik Teh 2014, produksi teh perkebunan di Indonesia baik perkebunan rakyat, swasta maupun negara, masing-masing mencapai kurang lebih 50.000 ton di akhir tahun 2014 (Syaipulloh, 2014). *Green tea (Camellia sinensis)* adalah tanaman tradisional yang berasal dari Cina dan terkenal sebagai antioksidan (Noriko, 2013). Berdasarkan penelitian sebelumnya, *Camellia sinensis* juga dapat

mengobati berbagai penyakit seperti kanker, penyakit jantung, antifungal, antivirus, antidiabetes dan ini dikarenakan adanya kandungan *catechin* dalam teh hijau (Chacko *et al*, 2010). Kadar *catechin* yang terbanyak dalam teh hijau adalah epigallocatechingallate (EGCG) (Allapat, Sarna, dan Truong, 2015). Ekstrak *green tea* dikatakan dapat meningkatkan proliferasi limfosit yang dapat mempengaruhi CD4+ sel T untuk mengaktifkan Th17 (Rahayu *et al*, 2018). Pemberian ekstrak *green tea* dikatakan dapat memperbaiki terjadinya stress oksidatif dan mengurangi progresivitas pembentukan atheroma atau aterogenesis pada tikus dengan diet yang bersifat aterogenik (Yusmiati *et al*, 2012).

Oleh karena itu, perlu dibuktikan secara empiris manfaat dari ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) terhadap jumlah sel neutrofil dan *foam cell* makrofag pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah manfaat dari ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) terhadap jumlah sel neutrofil pada tikus Wistar model DM dengan *oral candidiasis*?
2. Apakah manfaat dari ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) terhadap jumlah *foam cell* makrofag pada tikus Wistar model DM dengan *oral candidiasis*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan manfaat ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) terhadap jumlah sel neutrofil dan *foam cell* makrofag pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis peningkatan jumlah sel neutrofil pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis* setelah pemberian ekstrak air *green tea (Camellia sinensis)* dosis 2,5%
2. Menganalisis penurunan jumlah *foam cell* makrofag pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis* setelah pemberian ekstrak air *green tea (Camellia sinensis)* dosis 2,5%

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Memberikan informasi ilmiah dalam membuktikan manfaat ekstrak air *green tea (Camellia sinensis)* terhadap jumlah sel neutrofil pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis*.
2. Memberikan informasi ilmiah dalam membuktikan manfaat ekstrak air *green tea (Camellia sinensis)* terhadap jumlah *foam cell* makrofag pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis*.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Sebagai acuan dalam pemberian obat alternatif pada *oral candidiasis* penderita DM.
2. Sebagai acuan dalam terapi aterosklerosis pada penderita DM dengan *oral candidiasis*

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

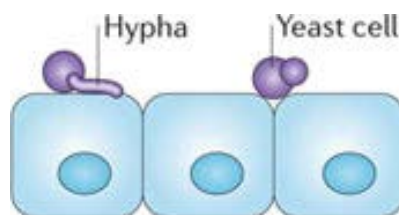
2.1 *Oral candidiasis*

Oral candidiasis adalah infeksi oleh jamur yang mengenai mukosa rongga mulut dan ditandai dengan bercak berwarna putih yang konfluen serta melekat pada mukosa oral dan faring (Hakim dan Ramadhian, 2015). *Oral candidiasis* merupakan infeksi oportunistik dalam rongga mulut yang disebabkan oleh agen primer yaitu *Candida albicans*. Dikatakan infeksi oportunistik karena *Candida* merupakan flora normal atau mikroorganisme komensal dalam rongga mulut, tetapi berpotensi menjadi patogen apabila daya tahan tubuh (*host*) menurun (Duhring *et al*, 2015; Nur'aeny *et al*, 2017).



Gambar 2.1 *Oral candidiasis* (Khrisnan, 2012)

Candida albicans merupakan organisme dimorfik karena yang pertama berbentuk *yeast-like state* (non-invasif dan *sugar fermenting organism*) dan yang kedua berbentuk *fungus form* yang memproduksi *root-like structure* atau struktur seperti akar yang sangat panjang dan bersifat invasif karena menembus mukosa (Mutiawati, 2016).

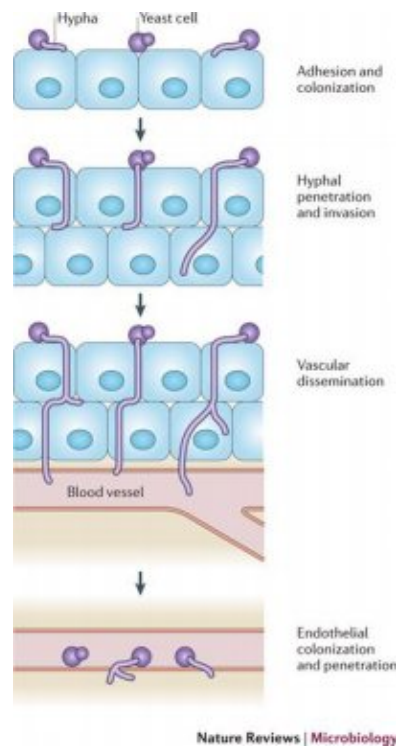


Gambar 2.2 Bentuk Dimorfik *C. albicans* (Gow, 2011).

Persentase *Candida* sebagai flora normal atau mikroorganisme komensal dalam rongga mulut sebanyak 20 – 75% tanpa menimbulkan adanya gejala atau disebut *Candida carriers*. Selain *C. albicans*, *oral candidiasis* juga bisa disebabkan oleh spesies *Candida* lain, antara lain *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, dan *Candida guilliermondi*, namun yang paling sering ditemukan pada rongga mulut adalah *Candida albicans* (Scully, 2008; Hakim dan Ramadhian, 2015).

Patogenesis *C. Albicans* dimulai ketika kondisi lingkungan dari rongga mulut memungkinkan *C. albicans* untuk menjadi patogen, dan terjadi peningkatan jumlah spesies dari *Candida* (Brooks *et al*, 2007). Tahap pertama adalah adhesi, yaitu perlekatan *Candida* pada dinding sel epitel mukosa rongga mulut. Dinding sel *Candida* terdiri atas karbohidrat sebanyak 80-90%, protein 6-25% dan lemak sebanyak 1-7%. Dinding sel *Candida* tersusun atas enam lapisan, dimulai dari lapisan paling luar yaitu fibrillar layer, kemudian mannoprotein, β -glucan, β -glucan-chitin, mannoprotein dan membran plasma. Struktur dinding sel ini berfungsi untuk melindungi *Candida* dari lingkungan yang kurang menguntungkan (Sabila, Ismail, dan Mujayanto, 2017). Perlekatan *Candida* pada mukosa dibantu oleh enzim Als1p, Als5p, Int1p dan Hwp1p. Glikoprotein tersebut berikatan dengan matriks ekstra selular dinding *host* (fibrinogen, laminin dan kolagen). Setelah tahap adhesi, *Candida* akan melakukan kolonisasi dan kemudian

dilanjutkan oleh tahap kedua yaitu invasi. *Candida* spp melakukan penetrasi ke dalam epitel dengan merusak permukaan epitel, hifa *Candida* spp memiliki enzim aspartyl proteinase, enzim ini dapat melisiskan lapisan epitel rongga mulut sehingga epitel rusak dan *Candida* dapat menginvasi lapisan epitel lebih dalam, kemudian *Candida* spp akan melekat pada complement receptor 3 (CR3) pada permukaan endotel. Jika infeksi *Candida* terus berlanjut, maka *Candida* akan menyebar ke jantung, ginjal, dan ke bagian tubuh lain melalui pembuluh darah (Nur'aeny *et al*, 2017; Gow, 2011).



Gambar 2.3 Patogenesis *Candida albicans* (Gow, 2011).

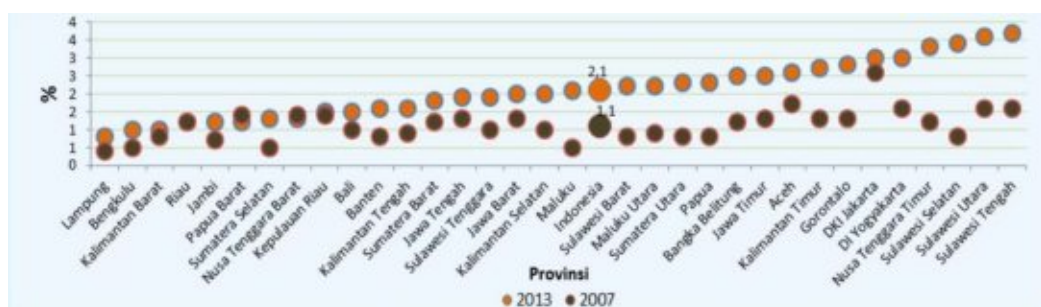
Faktor predisposisi *oral candidiasis* diantaranya dapat dijumpai pada pengguna obat-obatan antimikroba spektrum luas (seperti, tetrasiklin), gangguan imunitas, gangguan hematologi, xerostomia, pemakai protesa gigi, perokok, dan juga pada kondisi *immunocompromised* seperti HIV/aids, malnutrisi, *down syndrome*, diabetes mellitus, dan pasien rawat inap rumah sakit. Prevalensi *oral*

candidiasis akibat infeksi oleh *C. albicans* mengalami peningkatan hingga 80% pada penderita Diabetes Mellitus (Minasari, 2008; Nur'aeny *et al*, 2017; Stasya, Nurmansyah, dan Ramadhani, 2018).

2.2 Diabetes Mellitus

Menurut *World Health Organization* (2018), Diabetes Mellitus merupakan suatu penyakit kronis yang disebabkan karena pankreas tidak memproduksi insulin yang cukup atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin secara efektif sehingga terjadi peningkatan glukosa dalam darah (hiperglikemia) (WHO, 2018).

WHO memperkirakan bahwa jumlah penderita DM pada masyarakat dengan usia lebih dari 20 tahun mencapai 150 juta orang pada tahun 2000 dan dalam 25 tahun kemudian diperkirakan akan terus meningkat dan mencapai 300 juta orang (Saskia dan Mutiara, 2015). Di Indonesia, Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) menyatakan bahwa proporsi Diabetes Mellitus pada penderita dengan usia lebih dari 15 tahun meningkat dua kali lipat pada tahun 2013 dibandingkan pada tahun 2007 (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, 2014).



Gambar 2.4 Prevalensi Diabetes di Indonesia Tahun 2007 dan 2013 (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, 2014).

Diabetes Mellitus menimbulkan komplikasi baik dalam bentuk akut maupun kronis pada berbagai organ tubuh seperti mata, kulit, ginjal, pembuluh darah, serta struktur dalam rongga mulut. Komplikasi Diabetes pada rongga mulut,

diantaranya melibatkan gigi, jaringan penyangga gigi, mukosa rongga mulut dan juga pada lidah (Tumilisar, 2014).

Komplikasi Diabetes mellitus pada rongga mulut berupa xerostomia, infeksi bakteri, virus, jamur dan perlambatan proses penyembuhan luka. Selain itu juga terdapat peningkatan insidensi karies, gingivitis, dan penyakit periodontal. Infeksi jamur pada rongga mulut disebut Candidiasis yang disebabkan oleh *Candida albicans* (Marwati, 2011; Nur'aeny *et al*, 2017).

Peningkatan kadar glukosa dalam darah menyebabkan peningkatan kadar glukosa pada saliva, hal ini mengakibatkan ketidakseimbangan pada flora normal rongga mulut karena glukosa adalah media pertumbuhan yang baik bagi pertumbuhan *C. albicans* (Sumintarti dan Rahman, 2015).

Prevalensi *oral candidiasis* akibat infeksi oleh *C. albicans* mengalami peningkatan hingga 80% pada penderita Diabetes Mellitus. Pada kondisi *immunocompromised* seperti Diabetes Mellitus terjadi defek pada sistem imun sehingga sel imunokompeten imunitas mukosa pada rongga mulut tidak dapat mengeleminasi adhesi dari *C. albicans*, bahkan terjadi gangguan fagosit dari PMN (Minasari, 2008; Rahayu *et al*, 2018).

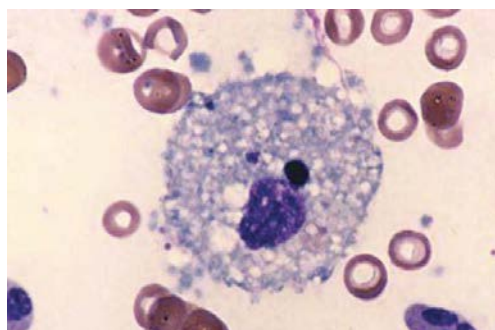
2.3 Makrofag

Makrofag adalah sel fagosit yang hampir dapat ditemui pada setiap organ tubuh, terutama pada jaringan ikat longgar. Makrofag termasuk sistem fagosit mononuklear yang diproduksi di sumsum tulang dan merupakan suatu sistem yang dahulu disebut dengan Retikulo Endotelial System (RES) yang tidak hanya terbentuk oleh monosit, makrofag, dan histiosit, tetapi juga fibroblast, endothelial, sel retikular (Harjana, 2011; Duque dan Descoteaux, 2014).

Ukuran makrofag sekitar 10-30 μ m dan memiliki inti yang terletak eksentrik, terdapat lisosom yang tersebar dalam sitoplasmanya. Ketika makrofag teraktivasi, terjadi perubahan morfologi pada makrofag, yaitu terjadi pembesaran ukuran sitoplasma dan meningkatnya jumlah lisosom, kemudian makrofag teraktivasi sendiri dapat digolongkan menjadi M1 dan M2 untuk menjalankan fungsi yang berbeda (Martinez dan Gordon, 2014; Novoselov *et al*, 2015)

Makrofag berfungsi untuk fagositosis, menghasilkan sitokin, perbaikan jaringan (*fibroblast stimulating factor*, fibronectin, kolagenase), memproduksi hormon pertumbuhan (*growth factor*), dan sebagai *antigen presenting cell* (APC) (Kurnia, Ardhiyanto, dan Suhartini, 2015; Kashem, Kaplan, dan Haniffa, 2017).

Ketika terjadi inflamasi, makrofag mensekresi sitokin-sitokin seperti tumor necrosis factor (TNF), IL-1, IL-6, IL-8, and IL-12 (Duque dan Descoteaux, 2014).



Gambar 2.5 Makrofag (Kaushansky *et al*, 2015)

2.4 TNF- α dan IL-1 β

Tumor necrosis factor (yang dikenal sebagai TNF- α) adalah 185-aminoacid glycoprotein yang memiliki kemampuan untuk menginduksi nekrosis pada tumor tertentu. TNF- α menginduksi vasodilatasi dan mengurangi permeabilitas pembuluh darah yang berperan untuk infiltrasi limfosit, neutrofil, dan monosit, sedangkan IL-1 β adalah salah satu famili dari IL-1 yang merupakan

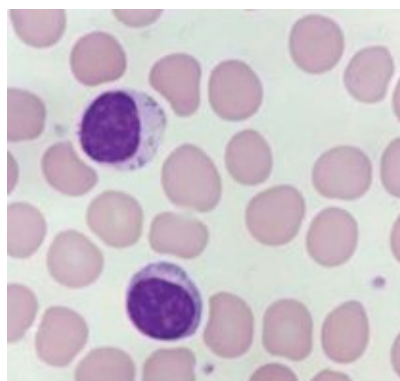
sitokin pro inflamatori poten dalam respons pertahanan tubuh terhadap infeksi dan luka. IL-1 β juga merupakan chemoattractant untuk granulosit, meningkatkan differensiasi dari CD4 sel T, dan meningkatkan ekspresi sel yang beradhesi dengan molekul leukosit dan sel endotel (Castejon dan Brough, 2011; Duque dan Descoteaux, 2014). TNF- α dan IL-1 β berperan penting untuk differensiasi sel Th₁₇ (Lasiglie *et al*, 2011; Zheng *et al*, 2014).

2.5 Limfosit

Limfosit adalah 25-30 persen dari populasi sel darah putih yang bentuknya seragam tetapi bervariasi dalam fungsi, dan termasuk sel T, sel B, dan sel NK (*Natural Killer*) (Orange dan LaRosa, 2008). Limfosit terbentuk dari limfoblas yang berasal dari stem sel yang pluripotent di dalam sumsum tulang (*bone marrow*) dan berkembang melalui proses hematopoiesis serta diproduksi di berbagai jaringan limfogen-khususnya di kelenjar limfe, limpa, timus, tonsil, sumsum tulang dan plak Peyer di bawah epitel dinding usus (Guyton dan Hall, 2011). Limfoblas merupakan progenitor sel limfoid pertama pada sumsum tulang. Bentuk limfoblas bulat dengan ukuran 15-20 μ , sitoplasma berwarna biru dan tidak mengandung granula. Inti sel limfoblas berbentuk bulat dengan kromatin relatif lebih kasar serta *difusse* dan memiliki nukleoli 1-2. Limfoblas akan membelah dua sampai tiga kali menjadi sel prolimfosit yang pada tahap berikutnya akan menjadi sellimfosit (Budiwiyono, 2009).

Fungsi dari sel limfosit adalah bertanggung jawab untuk produksi antibodi, pembunuhan langsung sel yang terinfeksi virus dan sel tumor, regulasi atau pengaturan respon imun (Orange dan LaRosa, 2008). Secara histologi, bentuk limfosit adalah bulat atau oval, memiliki inti yang relatif besar, kromatin inti padat,

sitoplasma basofilik (Harjana, 2011). Masa hidup limfosit berminggu-minggu atau berbulan-bulan tergantung pada kebutuhan tubuh akan sel-sel tersebut (Guyton dan Hall, 2011). Limfosit pada tikus yang diinduksi diabetes akan cenderung mengalami gangguan dalam regulasi limfosit dalam darah yang digambarkan dengan peningkatan jumlah limfosit yang terapoptosis (Arya *et al*, 2011).



Gambar 2.6 Limfosit (Litchman *et al*, 2010).

2.5.1 Limfosit T

Limfosit T migrasi dari sumsum tulang ke timus sebelum maturasi, dan mengalami maturasi pada timus. Timus dan sumsum tulang merupakan organ limfoid primer, sedangkan limpa, lymph node, plak peyer, appendix, adenoid dan tonsil merupakan organ limfoid sekunder (Rifai, 2013).

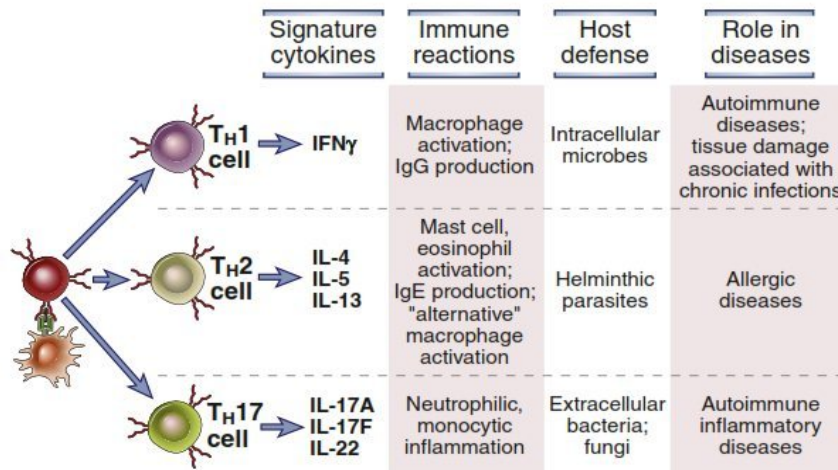
Limfosit T berperan dalam imunitas seluler dan dapat dibagi menjadi tiga jenis limfosit T, yaitu limfosit T pembantu (sel T helper), limfosit T pembunuh (sel T killer atau disebut juga sel T sitotoksik) dan limfosit T suppressor. Sel T helper berfungsi untuk mengatur sistem imun, sel T sitotoksik berfungsi untuk menyerang sel tubuh yang terkena patogen, sedangkan sel T suppressor berperan dalam menurunkan dan menghentikan respon imun setelah infeksi berhasil diatasi

(Hikmah dan Prihaningtyas, 2018). Aktivasi sel T memerlukan sinyal pengenalan yaitu pengenalan antigen oleh reseptor antigen pada permukaan sel T yang dinamakan reseptor sel T (TCR = *T-cell receptors*). TCR dapat mengenali suatu fragmen antigen yang telah diproses dan disajikan oleh MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kelas II (Sudiono, 2014).

Berdasarkan protein membran sel, CD4⁺ merupakan molekul yang diekspresikan pada sel T helper dan mengikat antigen peptida yang disajikan oleh MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kelas II dan diekspresikan pada permukaan sel APC (*Antigen Presenting Cell*). APC adalah sel yang mengambil antigen dan mempresentasikannya ke sel T, APC utama untuk ekspresi MHC kelas II adalah sel dendritik, makrofag, dan sel imun lain seperti sel *Natural Killer* (NK dan basofil atau sel mast) pada organ limfoid, tempat respon imun terinisiasi. Sedangkan CD8⁺ merupakan molekul yang diekspresikan pada sel T sitotoksik dan mengikat antigen peptida yang disajikan oleh MHC kelas I (Sudiono, 2014; Abbas, Litchman dan Pillai, 2015; Coico, Richard dan Sunshine, 2015).

CD4⁺ sel T efektor akan berdiferensiasi menjadi tiga subset utama yaitu sel Th₁, Th₂, dan Th₁₇, tergantung dari faktor transkripsinya yaitu T-bet, GATA-3, and ROR γ T. Diferensiasi CD4⁺ sel T dengan T-bet *transcription factor* menjadi Th₁ dengan diinduksi oleh sitokin IL-12 dan IFN- γ (Interferon- Gamma), Th₁ memproduksi IFN- γ . Interferon- Gamma (IFN- γ) mengaktivasi makrofag untuk menfagosit mikroba (bakteri intraseluler) dan produksi IgG. Diferensiasi CD4⁺ sel T dengan GATA-3 *transcription factor* menjadi Th₂ dengan diinduksi oleh sitokin IL-4, Th₂ memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-13 yang berperan pada sel B untuk produksi antibodi yang berperan pada respons terhadap parasit dan allergen.

Sedangkan Th_{17} akan memproduksi IL-17, IL-17F, dan IL-22. IL-17 berperan untuk merekrut neutrofil, meningkatkan respon inflamasi dan anti fungi (Abbas, Litchman dan Pillai, 2015; Hikmah dan Prihaningtyas, 2018).



Gambar 2.7 Differensiasi CD4+ Sel T Efektor (Abbas, Litchman dan Pillai, 2015).

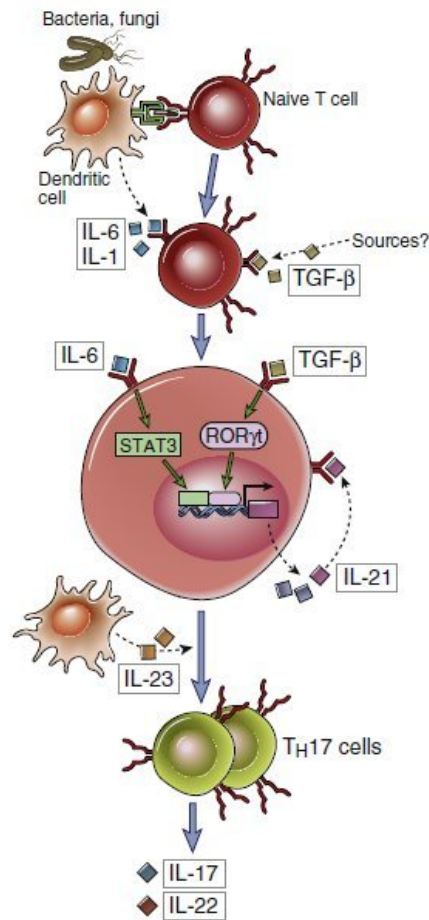
Subset lain dari differensiasi CD4+ sel T adalah T regulator (T_{reg}) atau sel T suppressor dengan Foxp3 sebagai faktor transkripsi dan diinduksi oleh TGF-beta yang berfungsi untuk menurunkan dan menjaga keseimbangan respon imun sel T (Actor, 2012). Foxp3+ sel Treg berperan penting pada toleransi kekebalan dan membatasi respon imun dan respon inflamasi yang berlebihan oleh sel T helper (Zheng, 2013).

2.5.1.1 T Helper 17 (Th_{17})

Salah satu differensiasi dari CD4+ sel T adalah menjadi sel T helper 17 (Th_{17}). Sel T helper 17 (Th_{17}) melawan mikroba dengan merekrut neutrofil pada tempat infeksi karena neutrofil merupakan mekanisme pertahanan utama terhadap bakteri ekstraseluler dan jamur. Sel T helper 17 terbanyak pada jaringan mukosa, terutama traktus gastrointestinal. Beberapa bakteri dan fungi mengalami apoptosis

dan diingesti oleh sel dendritik (APC) yang menstimulasi produksi sitokin yaitu IL-6, IL-1, IL-23, sedangkan TGF- β (*transforming growth factor- β*) dihasilkan oleh berbagai macam sel, sebagai sitokin antiinflamasi. Pro-inflamatori sitokin tersebut akan memicu differensiasi CD4⁺ sel T menjadi Th₁₇ dengan mengaktivasi faktor transkripsi ROR γ t dan STAT3. ROR γ t adalah protein sel T yang disandikan oleh gen RORc, sehingga terkadang disebut RORc. Interleukin-23 berperan penting khususnya respons terhadap fungi, proliferasi dan menjaga stabilisasi sel Th₁₇, sedangkan IL-21 diproduksi oleh Th₁₇ untuk amplifikasi respons. Differensiasi Th₁₇ dihambat oleh IFN- γ dan IL-4 (Abbas, Litchman dan Pillai, 2015), dan TGF- β mensupresi differensiasi dari Th₁, Th₂ (Zheng, 2013).

Populasi fenotip Th₁₇ dikarakterisasi oleh sekresi IL-17 dan IL-22. Interleukin 22 diproduksi pada jaringan epitel, khususnya kulit dan traktus gastrointestinal, dan berfungsi untuk memelihara integritas epitel terutama dengan mengaktifkan fungsi barrier, merangsang reaksi perbaikan, dengan menginduksi produksi peptida anti-mikroba (Actor, 2012; Abbas, Litchman dan Pillai, 2015).



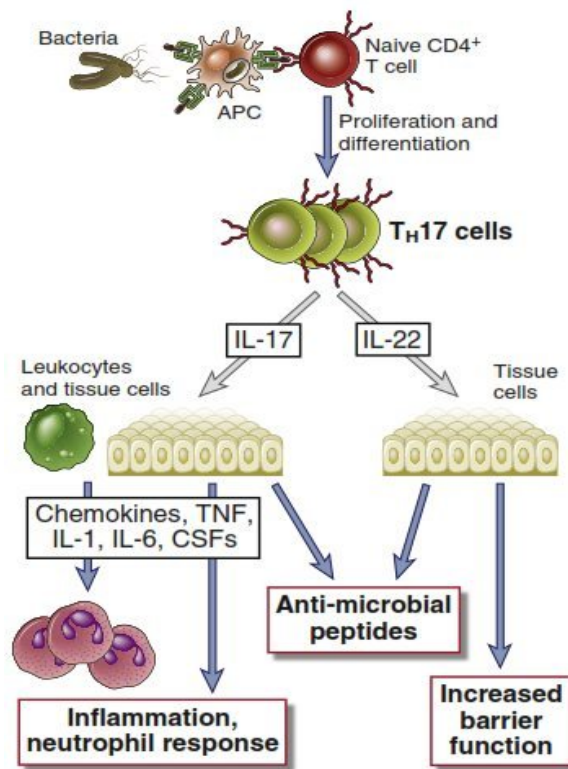
Gambar 2.8 Differensiasi CD4⁺ Sel T Menjadi Sel Th₁₇ (Abbas, Litchman dan Pillai, 2015).

2.6 Interleukin-17 (IL-17)

Interleukin-17 (IL-17) adalah sitokin pro-inflamasi yang diproduksi oleh CD4⁺ sel T helper. Interleukin-17 mengaktifasi signal melalui reseptor IL-17, yang menginduksi sitokin pro-inflamasi yang lain, peptide antimikroba (AMP, termasuk defensin) dan kemokin neutrofil yang berperan penting sebagai aktivitas antifungi. IL-17 menginduksi neutrofil dalam inflamasi, menstimulasi produksi kemokin dan sitokin lainnya (seperti TNF) yang juga merekrut neutrofil, juga monosit ke daerah aktivasi sel T. Selain itu, juga meningkatkan generasi neutrofil dengan meningkatkan produksi G-CSF dan ekspresi reseptornya. Neutrofil yang

terekrut mengingesti dan merusak bakteri dan fungi. Studi terbaru pada manusia dan hewan model telah menjelaskan peran yang luar biasa dari Th₁₇ / IL-17 dalam proteksi terhadap kandidiasis superfisial, yang terutama disebabkan oleh *Candida albicans* (Abbas, Litchman dan Pillai, 2015; Mengesha dan Conti, 2017).

Famili IL-17 termasuk enam protein yang terkait secara struktural, yaitu IL-17A – IL-17F dan lima reseptor yaitu IL-17RA - IL-17RE. Interleukin-17A dan Interleukin-17F adalah yang paling mirip dan fungsi imunologi famili dari sitokin ini tampaknya dimediasi terutama oleh IL-17A (Abbas, Litchman dan Pillai, 2015).



Gambar 2.9 Fungsi Sel Th₁₇ (Abbas, Litchman dan Pillai, 2015)

Mekanisme *feedback inhibition* IL-17 adalah IL-17 juga akan menstimulasi sel Th₂ untuk memproduksi IL-4 dan IL-13 untuk menghambat produksi IL-17 secara berlebihan dan neutrofilia (Allen, Sutherland, dan Ruckerl, 2015).

2.6.1 Interleukin-17A (IL-17A)

Interleukin-17A (IL-17A) termasuk salah satu famili dari IL-17. Fungsi imunologi famili dari IL-17 ini tampaknya dimediasi terutama oleh IL-17A. IL-17A (IL-17) dan IL-17F diproduksi oleh sel Th₁₇, sedangkan anggota famili lainnya diproduksi oleh beragam tipe sel lain (Song *et al*, 2016). Interleukin-17A berikatan dengan reseptor IL-17R pada epitel menginduksi sekresi human beta defensin-2 (HBD-2) (Rahayu *et al*, 2018).

2.7 Human Beta Defensin-2 (HBD-2)

Human defensins adalah subfamili kationik peptida antimikroba dan berperan sebagai lini pertahanan pertama dalam melawan mikroba (Jarva *et al*, 2018). HBD-2 merupakan bagian dari imunitas alami yang berperan penting dalam merekrut dan mengaktivasi neutrofil untuk memfagosit *C. albicans* (Duhring *et al*, 2015; Rahayu *et al*, 2018). Ketidacukupan atau kekurangan HBD-2 mengarah pada pengurangan rekrutmen dan aktivasi neutrofil sehingga mempengaruhi kemampuan fagositiknya terhadap *C. albicans* (Miramon, Kasper, dan Hube, 2013).

2.8 Neutrofil

Neutrofil adalah salah satu sel darah putih granulosit yang berfungsi sebagai sel fagositik dan merupakan sel pertahanan pertama tubuh terhadap invasi

benda asing atau infeksi akut. Neutrofil pada radang akut bergerak ke daerah inflamasi sebagai respons terhadap agen kemotaktik, selain itu neutrofil juga dapat direkrut melalui jalur limfosit (Chapel *et al*, 2014; Nugraha, 2014; Rahayu *et al*, 2018). Persentase neutrofil polimorfonuklear normal sekitar 62% dari total sel darah putih (Guyton dan Hall, 2011). Neutrofil adalah sel yang berumur pendek dengan waktu paruh 6 hingga 8 jam dalam darah dan rentang hidup 1 sampai 4 hari di jaringan ikat sebelum mati karena apoptosis (Mescher, 2013).

Ukuran diameter neutrofil sekitar 10-12 mikrometer pada hapusan darah dan lebih besar dari eritrosit. Neutrofil juga memiliki nukleus multilobul, pada neutrofil matang, ada sekitar 2-4 lobul dan disebut sebagai polimorfonuklear neutrofil. Menurut Pawlina (2016), sitoplasma neutrofil mengandung tiga tipe granula, berdasarkan fungsinya sebagai sel fagositik, yaitu:

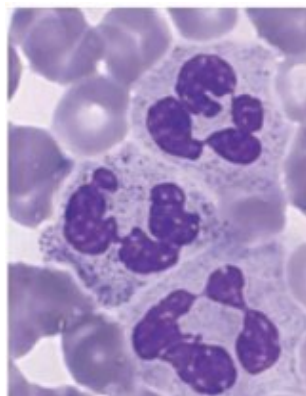
1. Granula azurofilik (granul primer) yang lebih besar dan lebih sedikit daripada granula spesifik. Granula azurofilik merupakan lisosom dari neutrofil dan mengandung myeloperoksidase. Myeloperoksidase membantu untuk menghasilkan bakterisidal hipoklorit dan kloramin yang sangat reaktif. Granula azurofilik juga mengandung protein kationik yang disebut defensin, yang fungsinya analog terhadap antibodi dan katelikidin peptida antimikroba untuk membunuh patogen.
2. Granula spesifik (granul sekunder) yang merupakan granula terkecil, hampir tidak terlihat dalam mikroskop cahaya, tetapi dalam mikrograf elektron, terlihat berbentuk ellips. Granula spesifik mengandung berbagai enzim (yaitu, collagenase tipe IV, gelatinase, phospholipase) sama seperti

aktivator komplemen dan peptida antimikroba lainnya (yaitu lisozim, laktoferin).

3. Granula tersier yang terbagi menjadi dua tipe, yang pertama mengandung phosphatase (enzim yang mengeluarkan gugus fosfat dari substrat) dan kadang-kadang disebut phosphasome. Jenis lain mengandung metalloproteinase, seperti gelatinase dan collagenases, yang memfasilitasi migrasi neutrofil melalui jaringan ikat

Neutrofil dianggap sebagai pedang bermata dua, karena disamping mempunyai kemampuan fagosit, dari penelitian pada binatang diketahui bahwa neutrofil melepaskan oksigen radikal bebas berlebihan dan enzim proteolitik yang menyebabkan kerusakan jaringan, inflamasi, dan gagal organ (*organ failure*) (Andyk, 2017).

Neutrofil juga berperan dalam pembentukan plak aterosklerosis, adanya enzim myeloperoksidase pada granula primer neutrofil berkontribusi pada formasi radikal dan LDL-ox. Studi pada pasien aterosklerosis menunjukkan korelasi positif antara level myeloperoksidase plasma dengan risiko penyakit arteri koroner. Sama halnya dengan MMP-2 dan MMP-9 pada granula sekunder dan tersier, meningkat pada pasien dengan sindrom koroner akut (Soehnlein, 2012).



Gambar 2.10 Neutrofil (Mescher, 2013)

2.9 IL-18 dan CD36

Interleukin-18 (IL-18) adalah salah satu anggota dari famili sitokin proinflamasi IL-1 (Martinez, Nurieva, dan Dong, 2008). Interleukin-18 berhubungan erat dengan NF-kB. NF-kB translokasi ke inti dan menyebabkan translokasi gen proinflamasi seperti IL-1, IL-18, IL-16 dan TNF- α . IL-18 dapat meningkatkan molekul adesi sel (seperti VCAM-1 dan ICAM-1) melalui aktivasi NF-kB, sintesis oksida nitrat, dan produksi kemokin (Bhat, 2015; Diamond *et al*, 2015; Kaplanski, 2018). Interleukin-18 menginduksi IFN- γ yang dapat mempercepat penyakit vaskular sehingga memperburuk aterosklerosis (Kaplanski, 2018). Berdasarkan penelitian sebelumnya pada penderita dengan Diabetes Mellitus, terdapat korelasi antara percepatan aterosklerosis dan tingkat IL-18 plasma yang tinggi. Interleukin-18 meningkatkan produksi sitokin inflamasi dan molekul adhesi sel yang dapat mempercepat pembentukan plak aterosklerosis pada penderita DM (Durpes *et al*, 2015).

CD36 merupakan reseptor glikoprotein transmembran yang diekspresikan oleh beberapa tipe sel, yang diantaranya adalah monosit, makrofag, trombosit, endotel mikrovaskuler, adiposit, sel epitel ginjal, sel otot jantung (Park, 2014). Fungsi CD36 pada patogenesis aterosklerosis adalah sebagai reseptor LDL-ox dengan afinitas tinggi. Ketika teroksidasi, partikel LDL (*Low Density Lipoprotein*) akan kehilangan afinitasnya terhadap reseptor LDL tetapi memperoleh afinitas baru pada CD36 sehingga LDL dapat masuk ke dalam sitoplasma makrofag. Sitoplasma makrofag yang penuh dengan LDL-ox disebut dengan *foam cell*. *Uptake* LDL oleh reseptor LDL berbeda dengan *uptake* LDL oleh reseptor CD36 karena *uptake* oleh reseptor CD36 tidak memiliki mekanisme penghambatan

umpan balik. Hal ini mengakibatkan LDL-ox menumpuk dalam sitoplasma makrofag. Pada aterosklerosis, peran LDL-ox bergantung pada CD36. Peningkatan signifikan ekspresi CD36 pada monosit terlihat pada pasien dengan sindrom koroner akut (Yu *et al*, 2013).

Ekspresi CD 36 dimodulasi oleh ikatan IL-18 dengan reseptornya melalui jalur NF-kB. Aktivasi NF-kB oleh IL-18 memicu ekspresi sitokin IL-18ra, MMPs (Matrix MetalloProteinases), MMP-9/MMP-2 dan CD36. MMP-9 berperan dalam instabilitas dan ruptur plak dalam progres lesi aterosklerosis. IL-18 dapat dilihat sebagai proaterogenik dan sitokin proinflamasi karena meningkatkan regulasi gen proinflamasi dan perkembangan lesi aterosklerosis (Bhat dan Dhawan, 2015).

2.10 CD68

CD68 adalah marker proliferasi yang diekspresikan secara luas oleh makrofag dan garis keturunan makrofag, termasuk monosit, histiosit, *multinucleated giant cell*, sel kupfer dan osteoklas. Sejak dahulu, CD68 digunakan sebagai penanda sitokimia untuk imunostain monosit/makrofag dalam analisis histokimia jaringan yang meradang, jaringan tumor, dan aplikasi imunohistopatologi lainnya (Chistiakov *et al*, 2017).

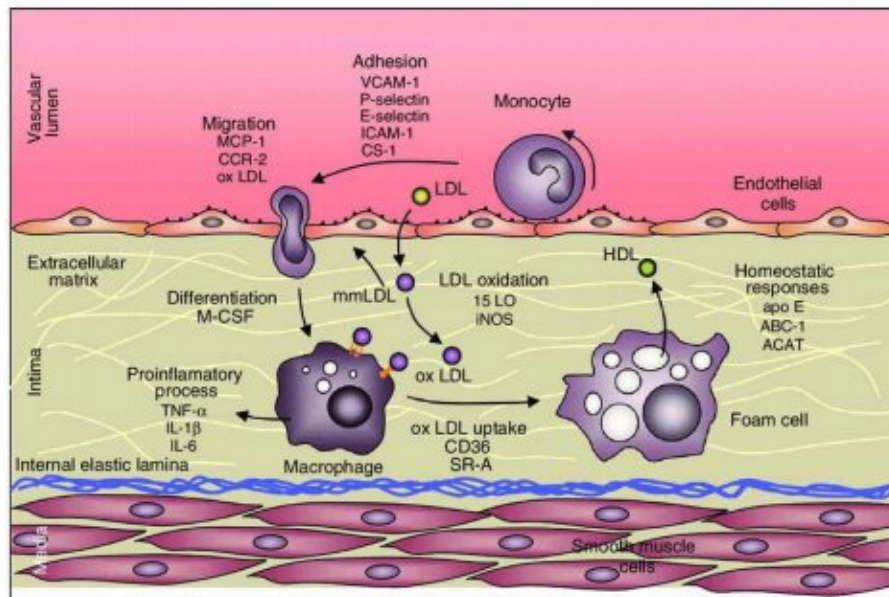
2.11 Foam Cell Makrofag

Foam cell makrofag adalah makrofag dengan deposit lemak yang lokasinya pada dinding pembuluh darah, dimana makrofag menyingesti LDL dan menyebabkan akumulasi lipid sehingga memberikan gambaran '*foamy appearance*' (Nature 2019).

Pembentukan *foam cell* makrofag mengarah pada terjadinya aterosklerosis. Ketika makrofag penuh dengan lipid (*foam cell*) menjadi suatu tanda, baik pada *early* maupun *late* aterosklerosis. Dengan berlanjutnya suplai lipoprotein aterogenik, makrofag memakan lipid hingga mengalami kematian, berbeda halnya dengan reseptor LDL naïve, *scavenger receptor* seperti CD36 tidak mengalami *down regulation* oleh akumulasi kolesterol di dalam sel. Kematian makrofag melalui apoptosis dan nekrosis menyebabkan terakumulasinya lipid dalam intima (Falk, 2006).

2.12 Pembentukan *Foam cell* Makrofag

Pada keadaan diabetes mellitus dengan infeksi *C. albicans* terjadi disfungsi endotel (Sargowo, 2015). Ketika terjadi disfungsi endotel, endotel akan meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada permukaannya seperti selektin, VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) dan ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1). Makrofag mengeluarkan LDL-ox dan MCP-1 sebagai kemoatraktan untuk monosit. Molekul adhesi dan kemoatraktan tersebut menarik monosit untuk menempel pada endotel. Monosit akan bergerak ke ruang sub endothelial dan berubah menjadi makrofag. Selanjutnya, terjadi uptake LDL teroksidasi oleh reseptor CD36. Akumulasi LDL-ox dalam makrofag mengakibatkan pembentukan *foam cell* makrofag (Valledor, Lloberas, dan Celada, 2015).



Gambar 2.11 Pembentukan *Foam cell* (Valledor, Lloberas, dan Celada, 2015).

2.13 Green Tea atau Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

Teh (*Camellia sinensis*) telah dikonsumsi oleh sebagian besar populasi dunia. Teh putih, teh hijau, teh oolong dan teh hitam semuanya dipanen dari spesies ini, tetapi diproses secara berbeda (Kopaei *et al*, 2014). *Green tea* atau teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah tanaman tradisional yang berasal dari Cina dan terkenal sebagai antioksidan (Noriko, 2013). *Chinese Camellia sinensis* berasal dari daratan Cina, Asia Selatan dan Tenggara, tetapi saat ini dibudidayakan di seluruh dunia di daerah tropis dan subtropis. *Green tea* adalah teh non fermentasi dan mengandung *catechin* yang lebih banyak dari teh hitam atau teh oolong. *Catechins* secara *in vitro* dan *in vivo* adalah antioksidan yang kuat. Sebagai tambahan, juga mengandung banyak mineral dan vitamin untuk meningkatkan potensi antioksidan teh tipe ini (Namita, Mukesh, dan Vijay, 2012).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, *Camellia sinensis* juga dapat mengobati berbagai penyakit seperti kanker, penyakit jantung, antifungal,

antivirus, antidiabetes dan ini dikarenakan adanya kandungan *catechin* dalam teh hijau (Chacko *et al*, 2010). Kadar *catechin* yang terbanyak dalam teh hijau adalah epigallocatechingallate (EGCG) (Allapat, Sarna, dan Truong, 2015). Ekstrak *green tea* dikatakan dapat meningkatkan proliferasi limfosit yang dapat mempengaruhi CD4+ sel T untuk mengaktifkan Th17 (Rahayu *et al*, 2018).

2.13.1 Morfologi dan Klasifikasi *Green tea (Camellia sinensis)*

Green tea (Camellia sinensis) adalah pohon kecil yang biasanya dipangkas hingga di bawah dua meter (enam kaki) untuk pengambilan daunnya. *Green tea* memiliki akar tunggang yang kuat. Bunganya berwarna kuning-putih, diameter 2,5-4 cm, dengan 7 hingga 8 kelopak. Benih *Camellia sinensis* dapat ditekan dan menghasilkan minyak teh, bumbu pemanis dan minyak untuk memasak. Panjang daunnya sekitar 4-15 cm dan lebarnya 2-5 cm. Daun yang muda, berwarna hijau muda lebih sering dipanen untuk produksi teh. Daun yang berumur lebih tua berwarna hijau lebih gelap. Umur daun yang berbeda menghasilkan kualitas teh yang berbeda, karena komposisi kimianya berbeda. Biasanya, ujung (kuncup) dan dua hingga tiga daun pertama dipanen untuk diproses. Pemetikan ini diulang setiap satu hingga dua minggu (Namita, Mukesh, dan Vijay, 2012).

Taksonomi teh hijau (Integrated Taxonomic Information System, 2018):

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Tracheophyta*
Sub divisi : *Spermatophyta*
Klas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Ericales*
Famili : *Theaceae*

Genus : *Camellia* L.

Spesies : *Camellia sinensis* (L.) Kuntzea



Gambar 2.12 Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) (Namita, Mukesh, dan Vijay, 2012).

2.13.2 Kandungan Kimia dan Efek Farmakologis *Green tea* (*Camellia sinensis*)

Komposisi kimia dari teh hijau bermacam-macam tergantung dari iklim, cuaca, praktek hortikultura dan usia daun. Kandungan aktif dari teh hijau yang merupakan antioksidan kuat adalah polifenol. Di antara polifenol dalam teh, ada famili senyawa yang disebut dengan flavonoid. Flavonoid (dan fraksinya, *catechin*) adalah komponen fenolik dasar pada teh hijau yang bertanggung jawab pada aktivitas antioksidan seperti menetralsir radikal bebas yang terbentuk setelah proses metabolisme. Flavonoid mengandung zat yang disebut dengan *catechin*. Empat *catechin* utama dalam *green tea* adalah epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechins (EGC), dan epicatechin gallate (ECG) (Jigisha *et al*, 2012).

No.	Polyphenols	Green tea	
		Gyokuro	Sencha
1	Catechin	8.72	2.78
2	Gallocatechin	2.27	14.60
3	Catechin gallate	0.32	-
4	Gallocatechin gallate	4.47	3.75
5	Epicatechin	23.60	58.00
6	Epigallocatechin	80.60	179.00
7	Epicatechin gallate	14.00	23.50
8	Epigallocatechin gallate	91.70	149.00
9	Theaflavin	-	-
10	Theaflavin-3-gallate	-	-
11	Theaflavin-3'-gallate and theaflavin-3,3'-gallate	-	-
12	Kaempferol 3-O-glucoside	2.68	1.82
13	Kaempferol 3-O-rutinoside	0.12	-
14	Kaempferol glycoside	2.50	2.59
15	Quercetin-3-O-rhamnoside	0.30	1.16
16	Quercetin glycoside	1.50	7.69
17	Myricetin-3-O-rutinoside	0.98	5.17
18	Gallic acid	1.54	2.54
	Total content of all polyphenols	235.30	451.60
	Total content of catechins	225.68	430.63

Tabel 2.1 Kandungan Polifenol Teh Hijau Dari Jepang (mg/g) (Yashin *et al*, 2015).

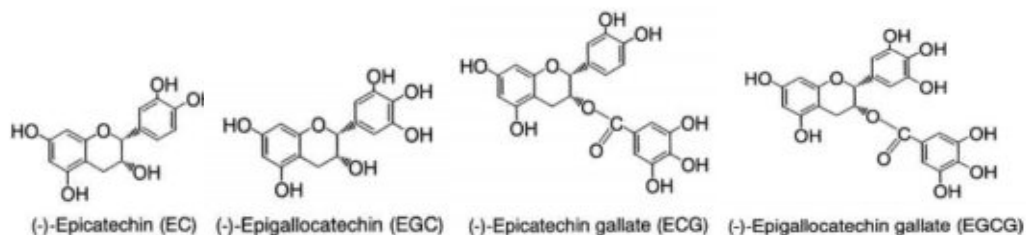
Pada penelitian Hirasawa dan Takada (2004), mengevaluasi aktivitas antifungal teh hijau (*catechin*) terhadap strain *C. Albicans* yang berbeda pada berbagai macam pH dan disimpulkan bahwa aktivitas EGCG teh hijau lemah pada pH asam, juga menunjukkan adanya kesinergisan antara ECGC jika dikombinasikan dengan antimikotik sebagai antifungi. Pada penelitian Mollashahi *et al* (2015), mengevaluasi efek antifungi dari ekstrak teh hijau terhadap biofilm

Candida albicans yang terbentuk pada substrat gigi dan disimpulkan bahwa rata-rata jumlah mikroorganisme secara signifikan menurun setelah 5, 10, dan 15 menit terpapar ekstrak teh hijau 1% dan sodium hipoklorit 5%. Pada studi Fiorino *et al* (2012), pada tikus yang diinduksi diabetes mengalami penurunan level glukosa darah setelah konsumsi teh hijau selama 12 minggu.

Selain polifenol, *green tea* juga mengandung alkaloid (teobromin, teofilin dan kafein), dan theanin, yang tidak hanya berkontribusi terhadap kualitas teh tetapi juga memiliki manfaat kesehatan yang penting bagi manusia (Li *et al.*, 2015). Kandungan polifenol dan kafein dalam teh menunjukkan aktivitas antidiabet (Fu *et al*, 2017).

2.13.3 Kandungan Flavonoid pada *Green tea* (*Camellia sinensis*)

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol terbesar. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan, antimikrobial, antiviral, antiinflamasi, antihepatotoksik, antitumor, dan lain-lain. Flavonoid adalah kandungan khas yang dimiliki oleh tumbuhan hijau karena flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan, terutama daun (Kusnadi dan Devi, 2017). Flavonoid adalah komponen fenolik dasar pada teh hijau dan mengandung zat yang disebut dengan catechin. Empat catechin utama dalam *green tea* adalah epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechins (EGC), dan epicatechin gallate (ECG) (Jigisha *et al*, 2012).



Gambar 2.13 Struktur Kimia Catechin (Jigisha *et al*, 2012)

Kadar catechin yang terbanyak dalam teh hijau adalah epigallocatechingallate (EGCG) (Allapat, Sarna, dan Truong, 2015). Menurut Kuo *et al* (2014), kandungan fraksi EGCG (flavonoid) memiliki efek imunomodulator pada respon imun alami dan adaptif via sel T regulator pada murine model. Flavonoid sebagai immunomodulator dapat meningkatkan produksi IL-2. Interleukin-2 merangsang proliferasi dan differensiasi sel T menjadi Th₁ yang akan mensekresi IFN- γ yang dapat mengaktivasi makrofag (Kurnia, Ardhiyanto, dan Suhartini, 2015). Menurut buku *Polyphenols in Human Health and Disease* (2014) bahwa ekstrak *green tea* atau kandungan polifenolnya dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi secara signifikan, termasuk TNF- α . *Green tea* khususnya kandungan EGCG terbukti sebagai inhibitor IL-1 β yang poten (Wheeler *et al*, 2004). Kandungan flavonoid ekstrak *green tea* dapat meningkatkan proliferasi limfosit yang dapat mempengaruhi CD4⁺ sel T untuk mengaktifkan Th₁₇ untuk menghasilkan IL-17A (Rahayu *et al*, 2018).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak *green tea* dan *red tea* dapat memperbaiki terjadinya stress oksidatif dan mengurangi progresivitas pembentukan atheroma atau aterogenesis pada tikus dengan diet yang bersifat aterogenik (Yusmiati *et al*, 2012). Menurut Landberg *et al* (2011), kandungan teh yang paling banyak digunakan adalah flavonoid dan kandungan flavonoid pada citrus menurunkan konsentrasi IL-18 plasma secara signifikan. Jika dibandingkan, penggunaan teh adalah 53%, sedangkan citrus hanya 12% sehingga penggunaan citrus mungkin dapat digantikan oleh teh.

2.13.4 Kandungan Kafein pada *Green tea (Camellia sinensis)*

Sifat menyegarkan seduhan teh berasal dari senyawa alkaloid. Alkaloid utama yang terkandung dalam daun teh adalah senyawa kafein, theobromin, dan theofilin. Kandungan alkaloid kurang lebih 3-4% dari berat kering daun teh (Towaha, 2013).

Kafein merupakan derivat dari methylsantine dan kandungan kafein dalam teh dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti area produksi, ketinggian wilayah, kondisi cuaca, dan variasi dari tanaman teh. Kafein dikatakan memiliki sifat antioksidan dan efek antiinflamasi (Hilal, 2017; Hussain *et al*, 2018). Pada penelitian oleh Senchina *et al* (2014) melaporkan bahwa kafein dapat menurunkan kadar TNF- α dan juga meningkatkan IL-10 pada batas level fisiologis. Kombinasi antara katekin dan kafein memiliki efek sinergis anti-obesitas yang berperan menghambat pembentukan aterosklerosis (Liu *et al*, 2017). Kafein sendiri memiliki efek fungisidal dengan merusak membran sitoplasma dari *budding yeast* (Nasrollahi dan Yadegari, 2016).

2.13.5 Manfaat *Green tea (Camellia sinensis)*

Berdasarkan penelitian sebelumnya, *Camellia sinensis* dapat mengobati berbagai penyakit seperti kanker, penyakit jantung, antifungal, antivirus, antidiabetes dan ini dikarenakan adanya kandungan *catechin* dalam teh hijau (Chacko *et al*, 2010).

2.14 Tikus Wistar (*Rattus novergicus*)

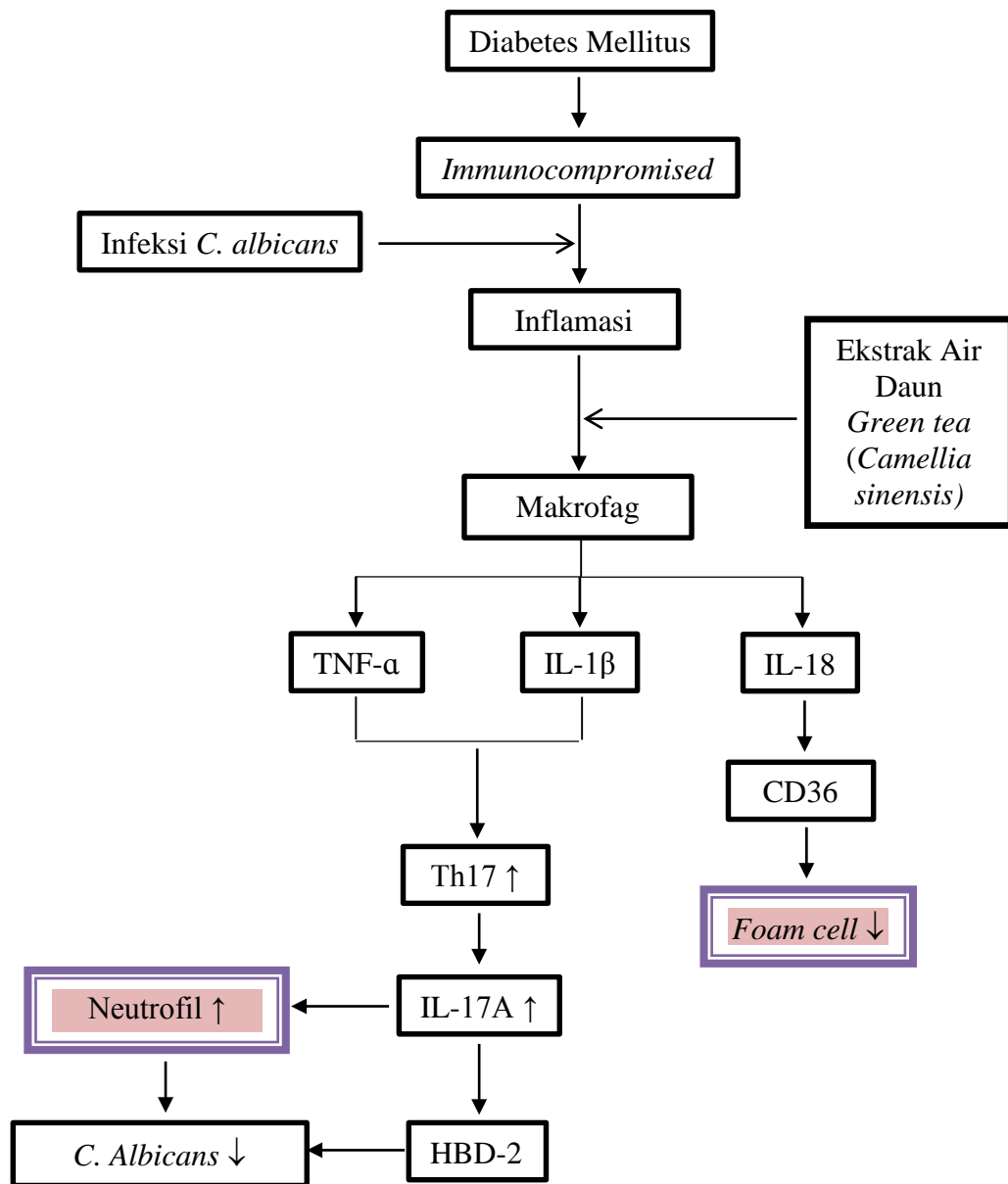
Tikus Wistar (*Rattus novergicus*) adalah hewan yang sering digunakan untuk percobaan dengan perlakuan secara konvensional. Tikus wistar dapat digunakan untuk mewakili mamalia termasuk manusia karena mempunyai



kebutuhan nutrisi, alat pencernaan dan homeostatis serupa manusia. Tikus putih telah digunakan secara efektif sebagai hewan coba untuk mempelajari keadaan biologi dan patologi dari jaringan rongga mulut. Spesies ini berguna dalam penelitian dokter gigi untuk menjelaskan informasi biologi, seperti pembuktian tentang mekanisme dasar suatu penyakit, untuk eksperimen secara klinik dan epidemiologi untuk mendapatkan informasi yang dapat diaplikasikan secara langsung pada manusia (Baker, 1980).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :
 : Variabel yang diteliti
 : Mempengaruhi/menyebabkan

3.2 Analisis Kerangka Konseptual

Pada kondisi Diabetes Mellitus, terjadi peningkatan kadar glukosa dalam darah yang menyebabkan peningkatan kadar glukosa pada saliva, hal ini mengakibatkan ketidakseimbangan pada flora normal rongga mulut karena glukosa adalah media pertumbuhan yang baik bagi pertumbuhan *C. albicans* sehingga menyebabkan komplikasi yaitu *oral candidiasis*. Pada kondisi *immunocompromised* seperti Diabetes Mellitus terjadi defek pada sistem imun sehingga imunitas dari mukosa tidak dapat mengeleminasi adhesi dari *C. albicans*, bahkan menyebabkan gangguan efek fagosit dari PMN. Keadaan hiperglikemia juga menyebabkan akumulasi lipid dan pembentukan *foam cell* yang mengarah pada aterosklerosis.

Oral candidiasis merupakan infeksi oleh *Candida albicans*. Kondisi Diabetes Mellitus dengan infeksi *C. Albicans* menyebabkan terjadinya inflamasi. Pemberian ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) dapat mempengaruhi proses inflamasi tersebut. Ketika terjadi inflamasi, makrofag berperan sebagai APC (Antigen Presenting Cell) dan mensekresi sitokin-sitokin seperti TNF- α dan IL-1 β . TNF- α dan IL-1 β akan meningkatkan differensiasi dari Th₁₇, namun jumlah limfosit pada diabetes rendah akibat peningkatan jumlah limfosit yang terapoptosis. Ekstrak air *green tea* dapat meningkatkan proliferasi limfosit yang dapat mempengaruhi CD4⁺ sel T untuk mengaktifkan Th₁₇. Selanjutnya, Th₁₇ mensekresi sitokin-sitokin yaitu IL-17.

Interleukin-17 (IL-17A) menginduksi neutrofil sehingga menstimulasi produksi kemokin dan sitokin lainnya yang juga merekrut neutrofil, juga monosit ke daerah aktivasi sel T. Selain itu, juga meningkatkan generasi neutrofil dengan

meningkatkan produksi G-CSF dan ekspresi reseptornya. Neutrofil yang terekrut mengingesti dan merusak bakteri dan fungi. Interleukin-17 (IL-17A) juga menstimulasi produksi dari substansi antimikroba (termasuk defensin).

Interleukin-17A (IL-17A) berikatan dengan reseptor IL-17R pada epitel menginduksi sekresi human beta-defensin 2 (HBD-2). HBD-2 merupakan bagian dari imunitas alami pada sel epitel yang berperan penting dalam merekrut dan mengaktifasi neutrofil untuk memfagosit *C. albicans*. Neutrofil melalui jalur ini berbeda dengan neutrofil pada radang akut. Neutrofil pada radang akut langsung bergerak ke daerah inflamasi, sedangkan pada jalur ini, neutrofil direkrut melalui limfosit. Selain TNF- α dan IL-1 β , infeksi *C. albicans* juga memicu pelepasan IL-18 oleh makrofag. IL-18 dapat meningkatkan molekul adesi sel (seperti VCAM-1 dan ICAM-1) melalui aktivasi NF- κ B. Aktivasi NF- κ B oleh IL-18 memicu ekspresi CD36. Selanjutnya, terjadi uptake LDL teroksidasi oleh reseptor CD36. Akumulasi LDL-ox dalam makrofag mengakibatkan pembentukan *foam cell* dan CD68 berperan sebagai marker proliferasi yang diekspresikan oleh makrofag. Pemberian ekstrak air *green tea* dapat menurunkan konsentrasi IL-18 plasma secara signifikan sehingga jumlah *foam cell* akan menurun.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Terjadi peningkatan jumlah sel neutrofil pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis* setelah pemberian ekstrak air *green tea (Camellia sinensis)* 2,5%.

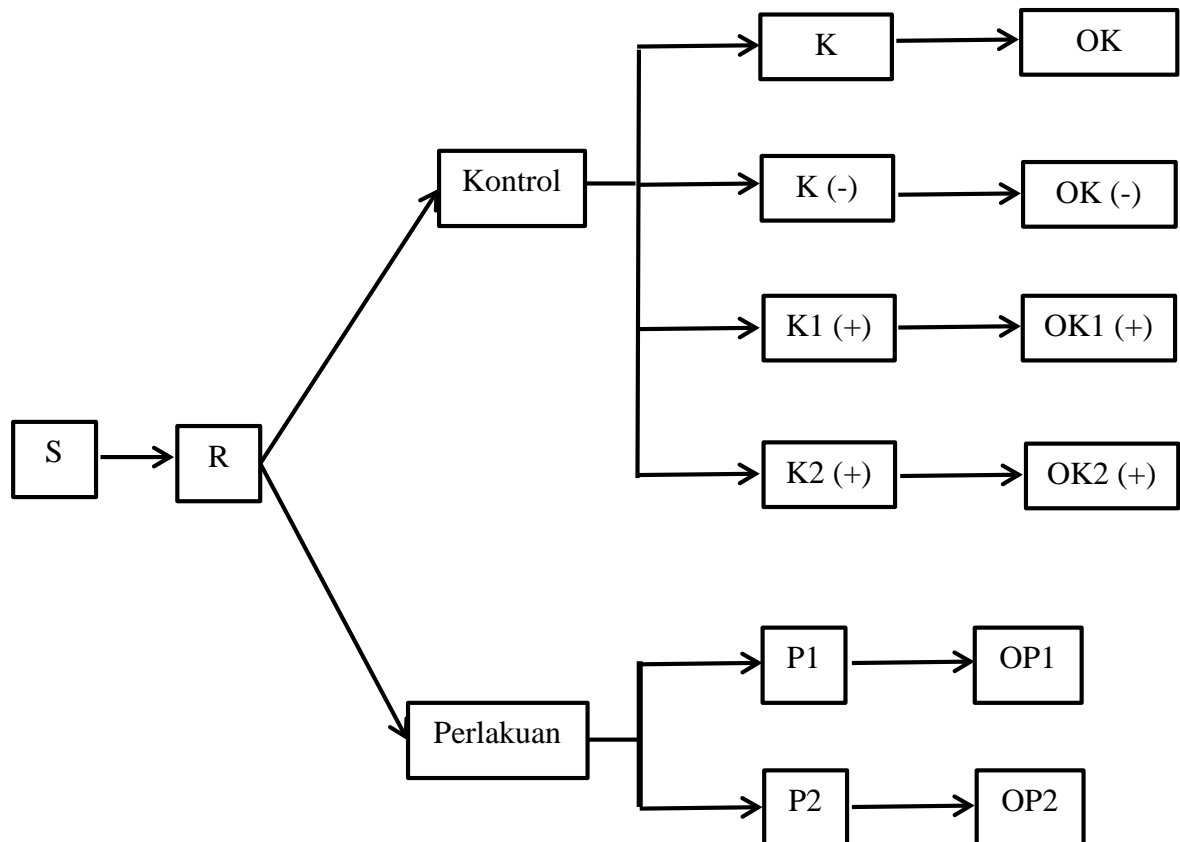
2. Terjadi penurunan jumlah *foam cell makrofag* pada tikus wistar model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *oral candidiasis* setelah pemberian ekstrak air *green tea (Camellia sinensis)* 2,5%.

BAB 4**METODOLOGI PENELITIAN****4.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris.

4.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan sampel yang dipilih secara rancangan acak lengkap dengan *post test only control group design*. Skema rancangan penelitian tersebut digambarkan sebagai berikut:



Gambar 4.2 Skema Penelitian

KETERANGAN:

- S : Sampel Tikus Wistar
- R : Sampel pada setiap kelompok dipilih secara acak (randomisasi)
- K : Kelompok kontrol normal, tikus Wistar tidak model DM dan tidak terinfeksi *C. albicans*.
- K (-) : Kelompok kontrol negatif, tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans*.
- K1 (+) : Kelompok kontrol positif, tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans* yang selanjutnya diberi Meditea 8,6% p.o selama 5 hari.
- K2 (+) : Kelompok kontrol positif, tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans* yang selanjutnya diberi Meditea 8,6% p.o selama 7 hari.
- P1 : Kelompok perlakuan tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans* yang selanjutnya diberi ekstrak air *green tea* konsentrasi 2,5% p.o selama 5 hari.
- P2 : Kelompok perlakuan tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans* yang selanjutnya diberi ekstrak air *green tea* konsentrasi 2,5% p.o selama 7 hari.
- OK : Observasi kelompok kontrol normal, tikus Wistar tidak model DM dan tidak terinfeksi *C. albicans*.
- OK (-) : Observasi kelompok kontrol negatif, tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans*.
- OK1 (+) : Observasi kelompok kontrol positif, tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans* yang selanjutnya diberi Meditea 8,6% p.o selama 5 hari.
- OK2 (+) : Observasi kelompok kontrol positif, tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans* yang selanjutnya diberi Meditea 8,6% p.o selama 7 hari.
- OP1 : Observasi kelompok percobaan tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans* yang selanjutnya diberi ekstrak air *green tea* konsentrasi 2,5% p.o selama 5 hari.
- OP2 : Observasi kelompok percobaan tikus Wistar model DM dan terinfeksi *C. albicans* yang selanjutnya diberi ekstrak air *green tea* konsentrasi 2,5% p.o selama 7 hari.

4.3 Populasi Penelitian

Populasi yang diamati pada penelitian ini adalah populasi tikus Wistar di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.4 Sampel dan Besar Sampel Penelitian

4.4.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar umur sekitar 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram, sehat yang diperoleh dari Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Tikus Wistar dipilih dengan pertimbangan bahwa tikus Wistar merupakan hewan yang cocok untuk model penelitian ini dan memiliki kriteria murah, mudah didapat, dan mudah dipelihara. Pada penelitian ini dipilih tikus dengan jenis kelamin jantan untuk menghindari pengaruh hormonal yang dapat terjadi pada jenis kelamin betina.

4.4.2 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel penelitian ditentukan dengan menggunakan rumus Lemeshow (Purnomo dan Bramantoro, 2018):

$$n = \frac{2\sigma^2 \cdot (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Keterangan:

- n = Besar sampel
- σ = Standar deviasi respon kelompok kontrol
- Z_{α} = *Adjusted standar deviation* untuk $\alpha = 1.96$
- Z_{β} = *Adjusted standar deviation* untuk $\beta = 1.285$
- μ_1 = Rerata respons kelompok 1 yang diharapkan
- μ_2 = Rerata respons kelompok 2 yang diharapkan

Setelah dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus diatas didapatkan jumlah replikasi minimal per kelompok adalah 4 ekor tikus Wistar untuk setiap kelompok. Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen maka dilakukan koreksi dengan:

$$N = n / (1-f)$$

Keterangan:

- N = Besar sampel koreksi
- n = Besar sampel awal
- f = Perkiraan proporsi *drop out* sebesar 25%

Jadi nilai N adalah:

$$N = n / (1-f)$$

$$N = 4 / (1-25\%)$$

$$N = 4 / 0,75$$

$$N = 5.33333$$

$$N = 6$$

Jadi, sampel tikus Wistar yang digunakan pada setiap kelompok yang diamati yaitu sebanyak 6 ekor. Sehingga besar sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 36 ekor tikus Wistar.

4.5 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

- a. Ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 2,5%.
- b. Larutan Meditea konsentrasi 8,6%.

2. Variabel terikat

- a. Sel neutrofil
- b. *Foam cell* makrofag

3. Variabel kendali

a. Sterilisasi alat dan bahan

b. Perlakuan hewan coba (tikus Wistar)

1. Jenis Kelamin tikus Wistar : Jantan

2. Berat badan tikus Wistar : 150-200 gram

3. Usia tikus Wistar : sekitar 2-3 bulan
 4. Makan, minum, suhu (25°C) dan lingkungan kandang tikus Wistar
- c. Cara pemberian ekstrak daun *green tea* (*Camellia sinensis*)
 - d. Teknik pembuatan kondisi DM
 - e. Metode biopsi jaringan rongga mulut

4.6 Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) merupakan teh hijau yang diekstrak dengan konsentrasi 2,5%. Ekstrak air *green tea* diperoleh dengan cara mencampurkan air mendidih dengan daun teh yang sudah dikeringkan, dilakukan penyaringan, *freeze drying* dan kembali dilarutkan ke dalam aquades.
2. Larutan Meditea merupakan ekstrak teh hijau dengan kandungan epigallocatechin-gallate yang tinggi dalam sediaan bubuk yang kemudian dilarutkan kedalam aquadest dengan konsentrasi 8,6%.
3. Sel neutrofil adalah sel darah putih dengan nukleus multilobul dengan granula halus yang diamati dan dihitung dari sediaan preparat biopsi mukosa rongga mulut tikus Wistar dengan pemeriksaan histopatologi anatomi (HPA) menggunakan pengecatan *Hematoksilin Eosin* (HE), dilihat dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada delapan lapang pandang.
4. *Foam cell* makrofag adalah makrofag dengan akumulasi LDL-ox pada sitoplasmanya yang diamati dan dihitung dari sediaan preparat biopsi mukosa rongga mulut tikus Wistar dengan pemeriksaan histopatologi anatomi (HPA)

menggunakan pengecatan *Hematoksilin Eosin* (HE), dilihat dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada delapan lapang pandang.

5. Hewan coba kondisi DM dengan infeksi *C. albicans* adalah tikus (*Rattus novergicus*) strain Wistar yang diinjeksi streptozotozin (STZ) 50mg/kgBB sehingga terjadi hiperglikemia pada tikus, setelah diukur dengan alat uji gula darah menunjukkan gula darah acak pada tikus Wistar mencapai ≥ 150 mg/dl (Saputra, Suartha, dan Dharmayudha, 2018). Selanjutnya tikus diinokulasikan *C. albicans* sehingga mengalami kandidiasis.
6. Biopsi jaringan mukosa rongga mulut tikus Wistar adalah pengambilan jaringan mukosa rongga mulut tikus Wistar yang secara klinis telah menunjukkan tumbuhnya jamur *C. albicans*, yaitu adanya pseudomembran atau plak putih dan menunjukkan hasil positif adanya *C. albicans* pada tes *papaniculou*. Pada penelitian ini diambil mukosa lidah tikus Wistar karena kecenderungan terjadinya oral kandidiasis pada lidah.

4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.7.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat, antara lain:

- a. Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, untuk perlakuan terhadap tikus Wistar.
- b. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga untuk melakukan pembuatan ekstrak air *green tea* konsentrasi 2,5% serta menganalisis kandungan pada ekstrak air *green tea*.

- c. *Research Center* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, untuk pemrosesan jaringan, pembuatan sediaan preparat HPA, pengecatan HE serta pembacaan hasil penelitian.

4.7.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April – Juni 2019.

4.8 Instrumen Penelitian

4.8.1 Alat

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain glukometer (*accu check instant*), mikroskop cahaya, *cotton bud*, neraca analitik, kertas timbang, *beaker glass*, corong, batang pengaduk, kertas saring, tabung erlenmeyer, spuit 0,1 cc (*turbuline*), spuit 3 cc, spuit 1 ml, alat bedah, rotary microtom, selang pediatrik, tissue prosesor, label penomoran spesimen, *objek glass* dan *cover glass*, tisu, masker, *gloves*.

4.8.2 Bahan

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain pakan pellet (untuk pakan dari tikus Wistar), Streptozotosin 50mg/kg bb, *Saboroud Dextrose Broth* (SDB) yang mengandung *C. albicans* 6×10^8 CFU/ml, daun kering teh hijau (*Camelia sinensis*), alkohol 30%, 50%, 70%, 80%, 96%, *Netral Buffer Formalin* (NBF) 10% untuk fiksasi, povidon iodine 10%, xylol dengan konsentrasi absolut, larutan anestesi (ketamin 100mg/kg bb), parafin histosec, *dH₂O*, kapas steril, larutan sukrosa, pewarna Hematoxilen Eosin (HE), dan *PBS* ph 7,4.

4.9 Cara Kerja

Untuk mencapai sasaran yang diinginkan pada penelitian ini maka dilakukan langkah-langkah penelitian sebagai berikut :

4.9.1 Pembuatan Ekstrak Air *Green Tea*

Pembuatan ekstrak air *green tea* konsentrasi 2,5% dibuat dengan cara menimbang terlebih dahulu 2,5 gram daun kering teh hijau (*Camelia sinensis*) menggunakan neraca analitik. Kemudian 100 ml air disiapkan dan dipanaskan hingga mendidih. Daun kering teh hijau yang telah ditimbang diseduh dengan air yang telah mendidih tersebut, kemudian diaduk dengan menggunakan batang pengaduk dan didiamkan pada suhu ruangan selama 30 menit hingga suhu turun. Setelah 30 menit, larutan tersebut disaring menggunakan kertas whatman 45 dan kemudian ditampung ke dalam *beaker glass*. Pada hasil akhir akan didapatkan larutan ekstrak air daun *green tea* berwarna kuning bening kecoklatan dan dilakukan *freeze drying*. *Freeze drying* bertujuan untuk mengetahui kandungan dalam ekstrak air *green tea*. Setelah dilakukan *freeze drying*, 2,5 gram bubuk *green tea* dilarutkan dalam 100 ml air dan didapatkan larutan ekstrak air daun *green tea*.

4.9.2 Pembuatan Larutan Meditea

Pembuatan Larutan Meditea konsentrasi 8,6% dilakukan dengan menimbang bubuk meditea sebanyak 8.6 g dengan neraca analitik dan mengukur aquadest sebanyak 100 ml dengan gelas ukur. Selanjutnya, bubuk meditea dan aquadest dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Untuk melarutkan meditea, *beaker glass* dimasukkan ke dalam alat ultrasonik sambil di aduk dengan batang pengaduk selama 15 menit.

4.9.3 Persiapan Hewan Coba

Tikus Wistar ditempatkan di dalam kandang plastik berukuran 30x20x17 cm untuk 6 ekor tikus dan dilengkapi dengan kawat penutup pada bagian atas. Tikus Wistar kemudian diadaptasikan selama satu minggu dan ditempatkan di dalam ruangan yang cukup aliran udara, cahaya, jauh dari kebisingan, tempat yang kering serta dibebaskan dari pengaruh angin kencang secara langsung, hujan maupun sengatan matahari yang terik. Pembersihan kandang tikus dilakukan setiap hari untuk mencegah infeksi yang dapat terjadi. Setiap kandang diberi label berupa nama kelompok, alas kandang diberi sekam dan diganti setiap 3 hari, diberi tempat makanan, dan botol yang ujungnya terdapat pipa untuk sedotan sebagai tempat minum tikus. Tikus wistar diberi makan dengan merek Pellet Par G.

4.9.4 Prosedur Pembuatan Model DM pada Tikus Wistar

- a. Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 4 jam sebelum induksi dimulai untuk mengosongkan lambung dan mengurangi resiko aspirasi.
- b. Mempersiapkan dan menimbang *Streptozotocin* dengan dosis 50 mg/kgBb yang dilarutkan dalam buffer sitrat (pH 4,5).
- c. Spuit 1 ml diisi dengan larutan *Streptozotocin* sebanyak 0.3ml.
- d. Tikus dipegang untuk mengurangi stres. Bagian yang akan disuntik diolesi dengan alkohol 70%.
- e. *Streptozotocin* diinjeksikan secara *intraperitoneal*. Regio *intraperitoneal* berada di samping garis tengah antara dua puting susu paling belakang atau di umbilikasi kanan/kiri tikus. Jarum ditusukkan tegak lurus pada umbilikalis

kanan/kiri sampai masuk rongga *peritoneal*, kemudian bahan perlakuan disuntikkan secara perlahan.

- f. Induksi hanya dilakukan satu kali saja.
- g. Tikus diberikan larutan sukrosa 10% atau dekstrosa 10% sepanjang malam pertama setelah induksi untuk menghindari *sudden hypoglycemic post injection* (Purwanto dan Liben, 2014).
- h. Pengukuran gula darah dilakukan pada hari ke 3, 4, 5 pasca injeksi STZ. Tikus Wistar dinyatakan kondisi DM apabila pada hari ke 3 setelah pemberian *Streptozotocin* kadar glukosa darah acak/sewaktu ≥ 150 mg/dl.
- i. Pengambilan darah melalui ujung ekor (*vena lateralis*), dengan menempatkan tikus Wistar pada kotak yang hanya muat untuk kapasitas 1 ekor tikus, kemudian ekor diletakkan diluar kotak. Ekor dibasahi dengan air hangat yang bertujuan untuk vasodilatasi pembuluh darah sehingga memudahkan proses pengambilan darah. Darah diambil menggunakan *blood lancet* sebanyak 0.1-0.2 μ l per ekor.
- j. Pengukuran glukosa darah menggunakan Glukometer (*Accu check instant*). Alat diset kodenya sesuai dengan petunjuk pemakaian *Accu check*, kemudian darah dari ekor tikus diteteskan pada strip yang terhubung dengan Glukometer dan didiamkan hingga hasil dapat terbaca pada layar, dengan skala pengukuran mg/dl.

4.9.5 Prosedur Inokulasi *C. albicans* Pada Tikus Wistar

Tikus Wistar yang dalam keadaan DM kemudian diinokulasi dengan *C. albicans*. Inokulasi dengan 6×10^8 viable cells *C. albicans* pada larutan *Saboroud Dextrose Broth* (SDB) dilakukan dengan menggunakan *cotton bud* dengan cara *swab* pada mukosa rongga mulut tikus Wistar sebanyak 2 kali setiap harinya, selama 3 hari. Gambaran klinis pertumbuhan jamur *C. albicans* berupa pseudomembran atau plak putih pada mukosa rongga mulut tikus Wistar dan untuk memastikan bahwa telah terjadi *oral candidiasis* dilakukan *swab* pada daerah tersebut kemudian dilakukan pengecatan *papanicolou*.

4.9.6 Prosedur Pemberian Ekstrak Air *Green Tea* (*Camellia sinensis*)

Tikus Wistar yang telah dalam keadaan DM dan terdapat tanda klinis tumbuhnya jamur *C. albicans* di lidah atau mukosa bukal, selanjutnya diberi ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) pada masing-masing kelompok. Kelompok P1 diberi ekstrak air *green tea* 2.5% selama 5 hari, kelompok P2 diberi ekstrak air *green tea* 2.5% selama 7 hari. Ekstrak *green tea* diberikan peroral 2ml/hari menggunakan selang pediatrik.

4.9.7 Prosedur Pemberian Larutan *Meditea*

Tikus Wistar yang telah dalam keadaan DM dan terdapat tanda klinis tumbuhnya jamur *C. albicans* di lidah atau mukosa bukal, selanjutnya diberi larutan *meditea* pada masing-masing kelompok. Kelompok K1(+) diberi *meditea* 8,6% selama 5 hari, kelompok K2(+) diberi *meditea* 8,6% selama 7 hari. *Meditea* diberikan peroral 2ml/hari menggunakan selang pediatrik.

4.9.8 Prosedur Euthanasia pada Tikus Wistar

Tikus Wistar pada kelompok K dikorbankan pada hari ke-8, kelompok K(-) dikorbankan pada hari ke-16 sedangkan untuk kelompok K1(+) dan P1 hari ke-21, dan untuk kelompok K2(+) dan P2 dikorbankan pada hari ke-23. Euthanasia pada tikus menggunakan agen inhalasi kloroform. Tikus diletakkan pada kotak kaca kemudian diberi zat kloroform cair yang akan menguap dan ditunggu hingga tikus mati. Prosedur euthanasia menggunakan kloroform dipilih karena jumlah sampel yang dimatikan banyak dan tidak mempengaruhi variabel yang akan diamati.

4.9.9 Pembuatan Preparat Sediaan Histopatologi

Preparat sediaan diperoleh dari biopsi mukosa rongga mulut tikus Wistar yang terlihat ada pseudomembran putih. Selanjutnya jaringan segar difiksasi dengan dimasukkan ke dalam kontainer berisi buffer formalin 10% dengan volume 10x dari volume jaringan selama 1 hari. Kontainer diberi label bertuliskan tanggal pengambilan jaringan, jenis jaringan, lokasi pengambilan jaringan, spesies hewan coba, dan bahan pengawet yang digunakan.

4.9.10 Pembuatan Sediaan Parafin Blok Mukosa Rongga Mulut Tikus Wistar (Brancroft and Gamble 2008).

- a. Jaringan dicuci dengan PBS 3-5x untuk membersihkan dari kontaminan.
- b. Fiksasi jaringan dengan *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10%, bertujuan untuk mencegah perubahan jaringan post mortem agar tidak membusuk. Perendaman minimal selama 1x24 jam dengan volume larutan 10 kali dari besar spesimen.

- c. *Dehidrasi* yaitu penarikan air dari jaringan dengan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit.
- d. *Clearing* yaitu menjernihkan jaringan sehingga tampak transparan dengan cara memasukkan jaringan ke dalam larutan *xylol* 2 kali masing-masing 60 menit.
- e. *Impregnasi* yaitu proses infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48⁰C.
- f. Dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari.
- g. Parafin blok ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4 - 6µm dengan *rotary microtome*.

4.9.11 Pewarnaan Hematoxilen-Eosin (HE) untuk Pemeriksaan Jumlah Sel Neutrofil dan *Foam Cell* Makrofag

- a. Mencuci slide dengan PBS ph 7,4 selama 5 menit
- b. Mewarnai dengan hematoxilen selama 10 menit
- c. Merendam dalam *tap water* selama 10 menit
- d. Membilas dengan dH₂O
- e. Melakukan dehidrasi dengan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit
- f. Mewarnai dengan Eosin selama 3 menit
- g. Dibilas dengan alkohol 30%

- h. Melakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat mulai 50%-100% masing-masing 10 menit
- i. Membilas dengan xylol 2x masing-masing 15 menit dan melakukan mounting dengan entelan serta ditutup dengan cover glass. Preparat siap dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya.

4.9.12 Pengamatan dan Penghitungan Jumlah Sel Neutrofil dan *Foam Cell* Makrofag

- a. Menggunakan pembesaran mikroskopis 400x yang dengan 8 lapang pandang
- b. Teknik counting menggunakan beta *counter* seluas lapangan pandang.
- c. Daerah yang telah ditentukan yaitu permukaan lidah dengan cara-cara sebagai berikut:
 - i) Jumlah sel neutrofil/*foam cell* makrofag yang dihitung adalah regio yang diberi perlakuan.
 - ii) Sebelum dilakukan pemindahan lokasi, sel terakhir pada lokasi sebelumnya diamati supaya sel tersebut tidak terhitung kembali.

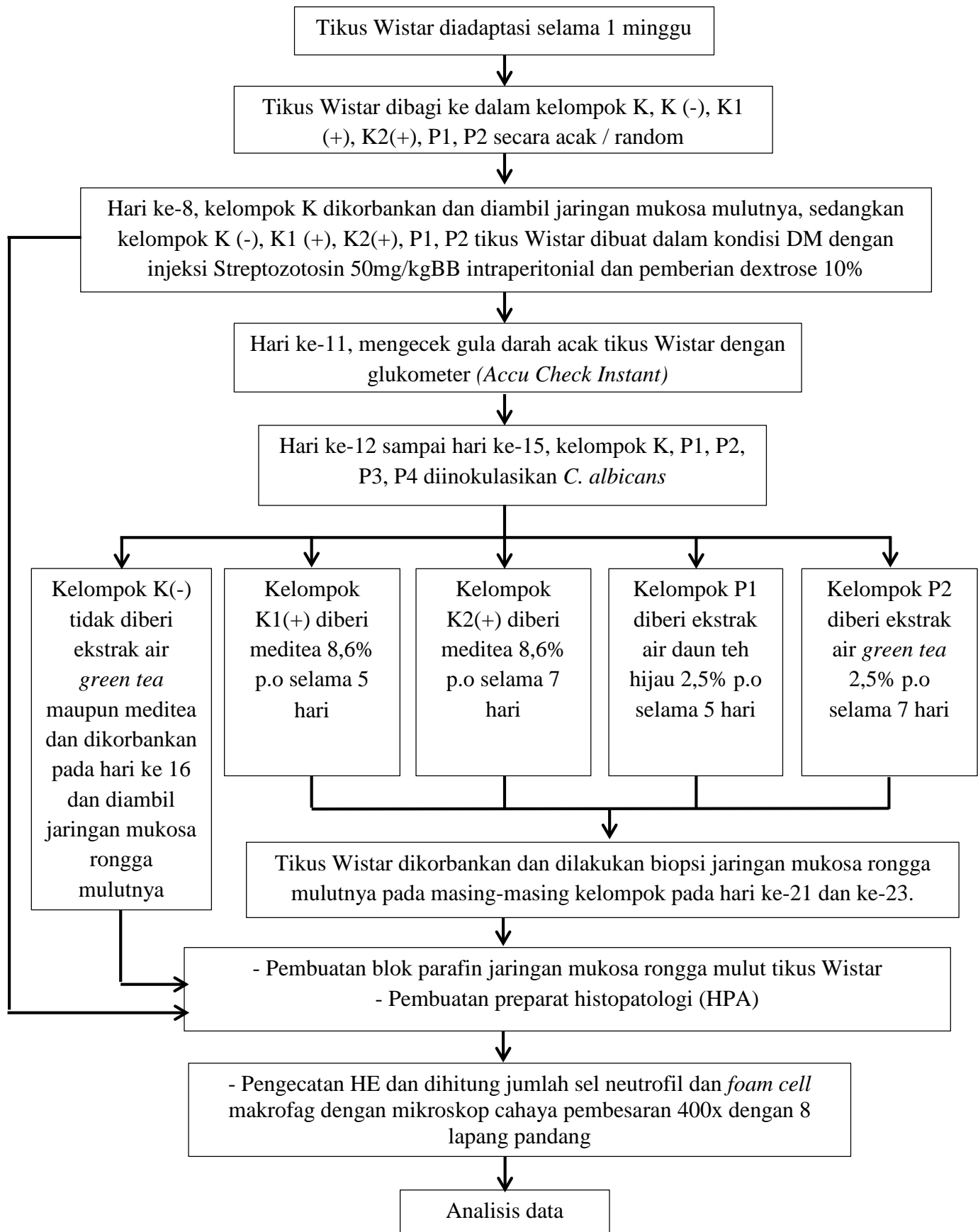
4.13 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini dilakukan uji *Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui normalitas data. Apabila data normal, maka dilakukan uji *Independent T-test* untuk mengetahui perbedaan antara kelompok normal (K) dan kelompok DM dengan *oral candidiasis* (K-).

Data yang diperoleh pada penelitian ini juga dilakukan uji *Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui normalitas data. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Levene's Test*

untuk mengetahui homogenitas data. Apabila data normal dan homogen, maka dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antarkelompok DM dengan *oral candidiasis* (K-) dan kelompok dengan pemberian meditea/*green tea* (K1(+), K2(+), P1, P2). Selanjutnya, untuk mengetahui perbedaan signifikan antar kelompok dilakukan uji *Tukey HSD*.

4.11 Alur Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian yang berjudul “Manfaat Ekstrak Air *Green Tea (Camellia sinensis)* Terhadap Jumlah Sel Neutrofil dan *Foam Cell* Makrofag Pada Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe-2 dengan *Oral Candidiasis*” telah mendapatkan *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dengan nomer 203/HRECC.FODM/V/2019. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) model DM dengan *Oral Candidiasis* yang berjumlah 36 ekor, dibagi menjadi 6 kelompok berdasarkan perbedaan pemberian jenis terapi dan durasi pemberian terapi.

Hasil penelitian yang diperoleh adalah rerata dari jumlah sel neutrofil dan jumlah *foam cell* makrofag pada masing-masing kelompok. Penelitian dilakukan dengan metode histopatologi menggunakan pengecatan HE untuk melihat jumlah sel neutrofil dan *foam cell* makrofag. Penghitungan sel menggunakan pembesaran mikroskopis 400x dengan 8 lapang pandang.

5.1.1 Jumlah Sel Neutrofil

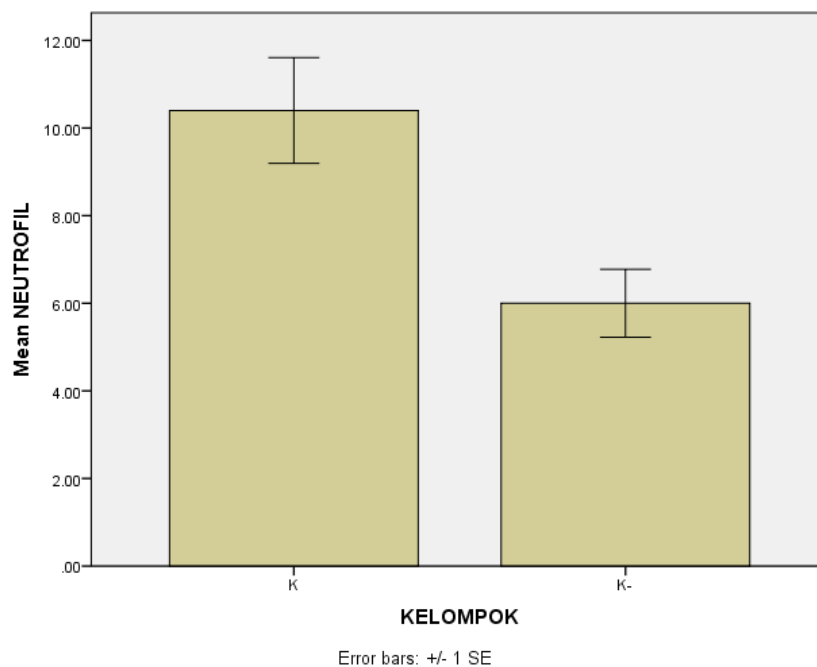
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil rerata jumlah sel neutrofil pada setiap kelompok sebagai berikut:

Tabel 5.1 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Neutrofil Antar Kelompok (K dan K-)

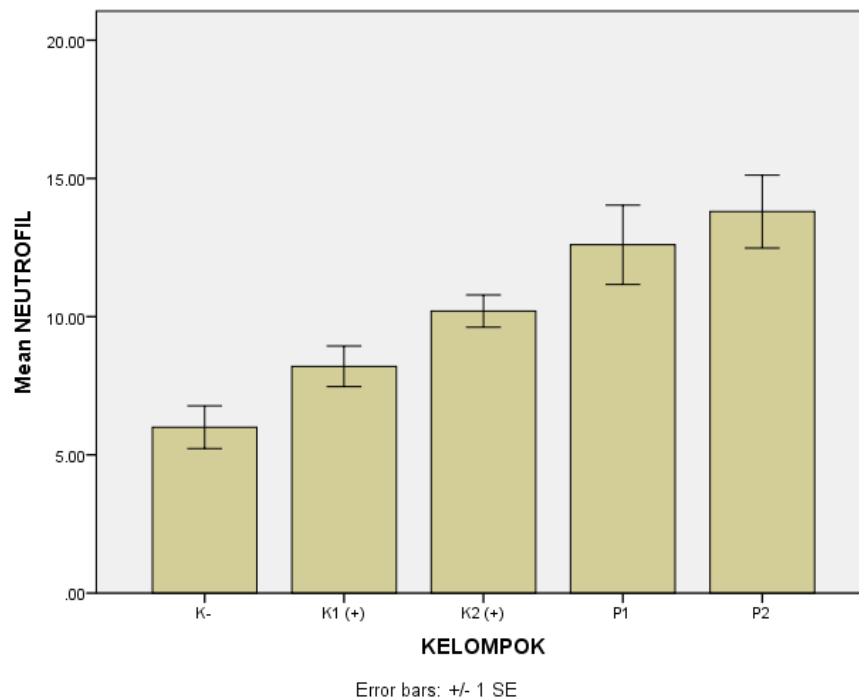
Kelompok	Jumlah Sampel	Rerata	Standar Deviasi
K	5	10.4000	2.70185
K-	5	6.0000	1.73205

Tabel 5.2 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Neutrofil Antar Kelompok (K-, K1(+), K2(+), P1, dan P2)

Kelompok	Jumlah Sampel	Rerata	Standar Deviasi
K (-)	5	6.0000	1.73205
K1(+)	5	8.2000	1.64317
K2(+)	5	10.2000	1.30384
P1	5	12.6000	3.20936
P2	5	13.8000	2.94958
Total	25	10.1600	3.57864



Gambar 5.1 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Neutrofil Pada Kelompok K dan K-



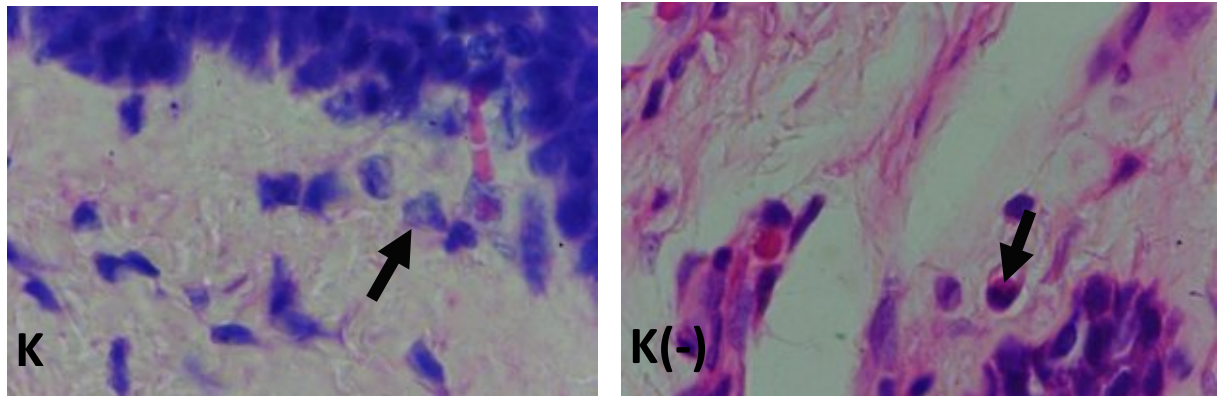
Gambar 5.2 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Neutrofil Antar Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1, dan P2

Keterangan Tabel dan Grafik:

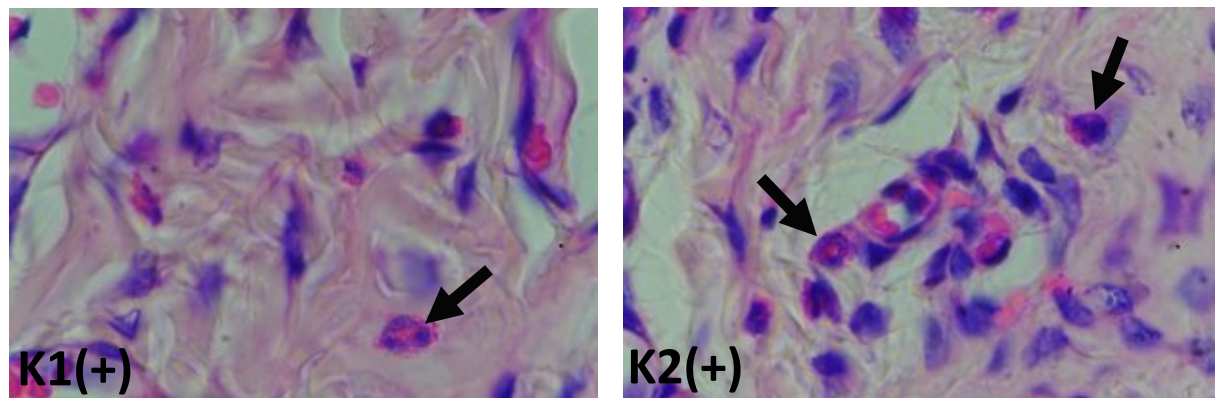
- K: Kelompok normal
- K (-): Kelompok kontrol negatif
- K1 (+): Kelompok kontrol Positif, pemberian Meditea 8,6% selama 5 Hari
- K2 (+): Kelompok kontrol Positif, pemberian Meditea 8,6% selama 7 Hari
- P1: Kelompok perlakuan, pemberian ekstrak air *green tea* 2,5% selama 5 Hari
- P2: Kelompok perlakuan, pemberian ekstrak air *green tea* 2,5% selama 7 Hari

Hasil penelitian pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa nilai rerata jumlah sel neutrofil pada kelompok K sebesar 10.4000 dan menurun pada kelompok K(-) menjadi 6.0000. Hasil penelitian pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa nilai rerata jumlah sel neutrofil pada kelompok K(-) sebesar 6.0000, kelompok K1(+) sebesar 8.2000, kelompok K2(+) sebesar 10.2000, kelompok P1 sebesar 12.6000, dan

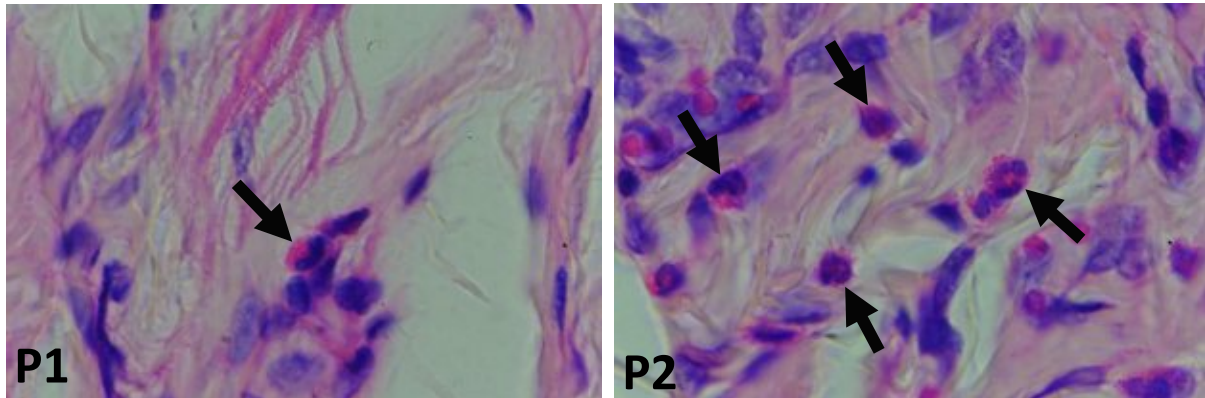
kelompok P2 sebesar 13.8000. Grafik 5.1 dan 5.2 menunjukkan grafik nilai rerata jumlah sel neutrofil tertinggi yaitu pada kelompok P2 dan yang terendah pada kelompok K-.



Gambar 5.3 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran Sel Neutrofil Pada Kelompok K dan K(-)



Gambar 5.4 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran Sel Neutrofil Pada Kelompok K1(+) dan K2(+)



Gambar 5.5 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran Sel Neutrofil Pada Kelompok P1 dan P2

Gambar 5.3-5.5 merupakan gambaran sel neutrofil pada setiap kelompok yang ditunjukkan dengan anak panah (↑).

5.1.2 Jumlah *Foam Cell* Makrofag

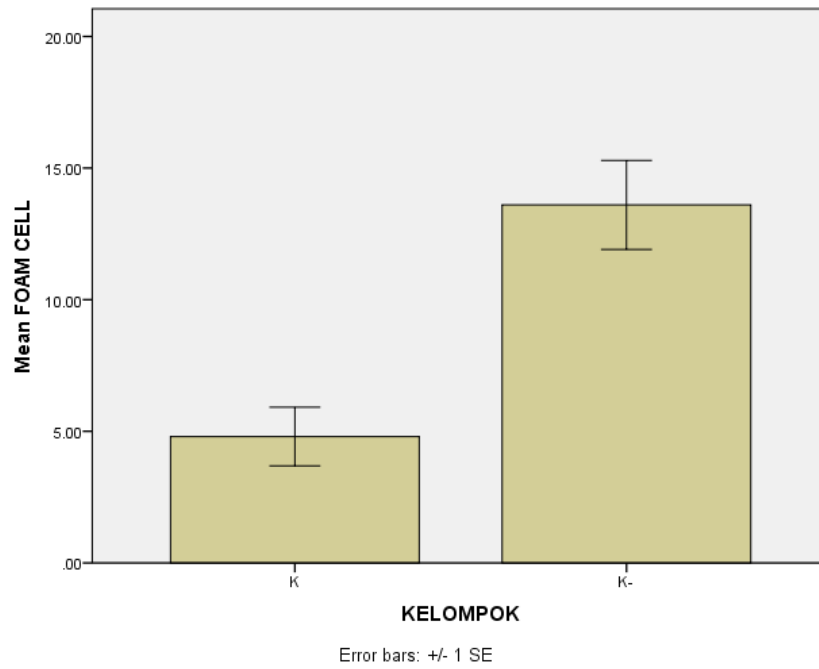
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil rerata jumlah *foam cell* makrofag pada setiap kelompok sebagai berikut:

Tabel 5.3 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K dan K-

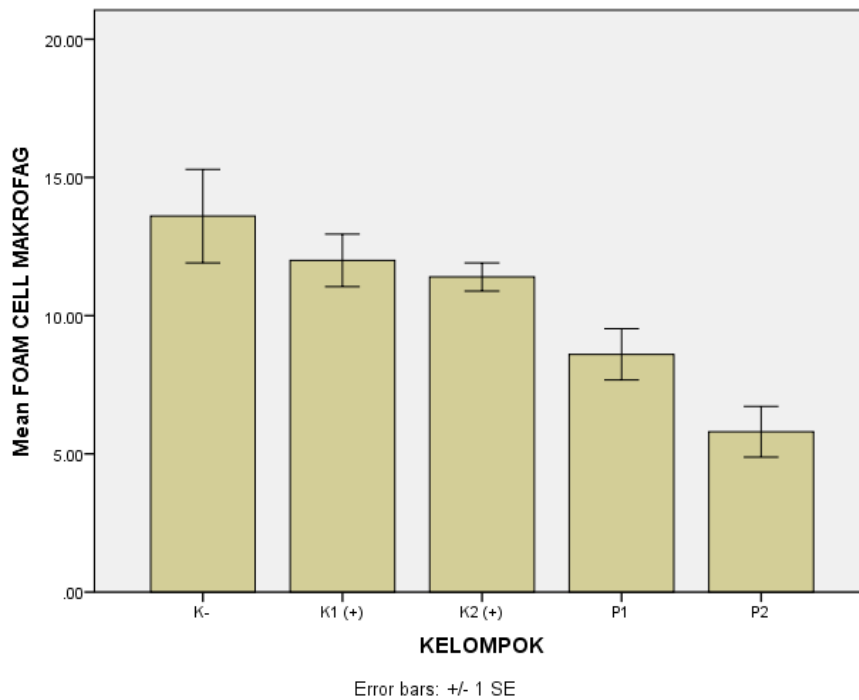
Kelompok	Jumlah Sampel	Rerata	Standar Deviasi
K	5	4.8000	2.48998
K-	5	13.6000	3.78153

Tabel 5.4 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2

Kelompok	Jumlah Sampel	Rerata	Standar Deviasi
K (-)	5	13.6000	3.78153
K1(+)	5	12.0000	2.12132
K2(+)	5	11.4000	1.14018
P1	5	8.6000	2.07364
P2	5	5.8000	2.04939
Total	25	10.2800	3.56511



Gambar 5.6 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K dan K-

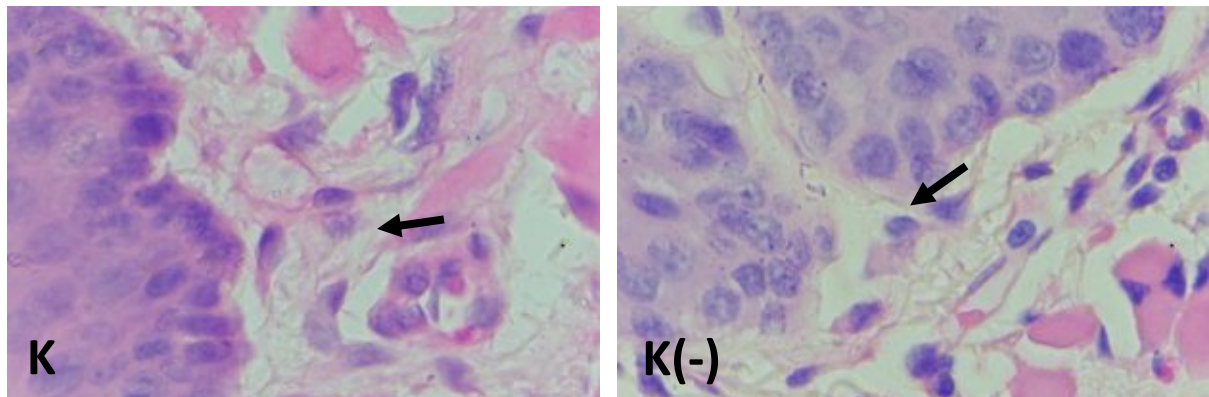


Gambar 5.7 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2

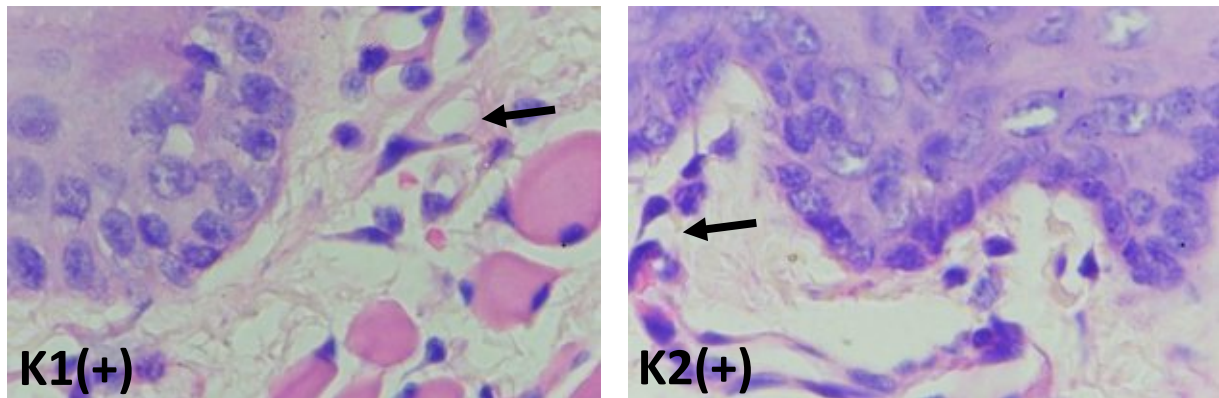
Keterangan Tabel dan Grafik:

- K: Kelompok normal
- K (-): Kelompok kontrol negatif
- K1 (+): Kelompok kontrol Positif, pemberian Meditea 8,6% selama 5 Hari
- K2 (+): Kelompok kontrol Positif, pemberian Meditea 8,6% selama 7 Hari
- P1: Kelompok perlakuan, pemberian ekstrak air *green tea* 2,5% selama 5 Hari
- P2: Kelompok perlakuan, pemberian ekstrak air *green tea* 2,5% selama 7 Hari

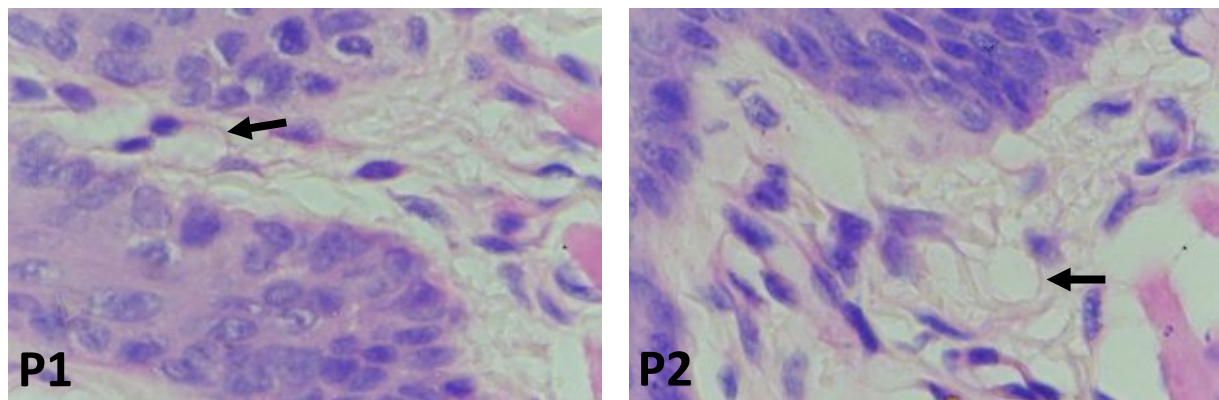
Hasil penelitian pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa nilai rerata jumlah *foam cell* makrofag pada kelompok K sebesar 4.8000, dan meningkat pada kelompok K(-) menjadi 13.6000. Hasil penelitian pada tabel 5.4 menunjukkan bahwa nilai rerata jumlah *foam cell* makrofag pada kelompok K(-) sebesar 13.6000, K1(+) sebesar 12.0000, kelompok K2(+) sebesar 11.4000, kelompok P1 sebesar 8.6000, dan kelompok P2 sebesar 5.8000. Gambar 5.6 dan 5.7 menunjukkan grafik nilai rerata jumlah *foam cell* makrofag tertinggi yaitu pada kelompok K- dan yang terendah pada kelompok P2.



Gambar 5.8 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K dan K(-)



Gambar 5.9 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K1 (+) dan K2 (+)



Gambar 5.10 Anak Panah (↑) Menunjukkan Gambaran *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok P1 dan P2

Gambar 5.8-5.10 merupakan gambaran sel *foam cell* makrofag pada setiap kelompok yang ditunjukkan dengan anak panah (↑).

5.2 Analisis Data Penelitian

5.2.1 Analisis Data Jumlah Sel Neutrofil

Berdasarkan data jumlah sel neutrofil yang diperoleh, dilakukan perhitungan statistika. Uji normalitas data jumlah sel neutrofil menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Hasil yang diperoleh dari uji *Kolmogorov-Smirnov* pada keseluruhan kelompok menunjukkan nilai signifikansi (p) $>0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa semua kelompok berdistribusi normal. Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas data

yaitu menggunakan uji *Levene*. Hasil uji *Levene* dapat dilihat pada tabel 5.5. Hasil dari uji *Levene* menunjukkan nilai signifikansi ($p > 0,05$ ($p = 0,107$), yang berarti jumlah sel neutrofil pada keseluruhan kelompok (K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2) adalah homogen.

Tabel 5.5 Hasil Uji Homogenitas Jumlah Sel Neutrofil Pada Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2

<i>Levene Statistic</i>	Sig. (p)
2.191	.107*

Keterangan: *Data signifikan pada $p > 0,05$

Setelah didapatkan data yang berdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji perbedaan seluruh kelompok terhadap jumlah sel neutrofil menggunakan uji *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* dapat dilihat pada tabel 5.6. Nilai signifikansi (p) pada uji *One Way ANOVA* adalah $p < 0,05$ ($p = 0,000$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan pada seluruh kelompok. Selanjutnya dilakukan uji *Tukey HSD* untuk melihat perbedaan antar kelompok penelitian terhadap jumlah sel neutrofil yang dapat dilihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.6 Hasil Uji *One Way ANOVA* Jumlah Sel Neutrofil Pada Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2

	Sig. (p)
Antar Kelompok	.000*

Keterangan: *Data signifikan pada $p < 0,05$

Tabel 5.7 Hasil Uji *Tukey HSD* Jumlah Sel Neutrofil

Kelompok	K-	K1 (+)	K2 (+)	P1	P2
K-		.566	.062	.002*	.000*
K1 (+)	.566		.649	.047*	.008*
K2 (+)	.062	.649		.484	.136
P1	.002*	.047*	.484		.920
P2	.000*	.008*	.136	.920	

Keterangan: * terdapat perbedaan bermakna $p < 0,05$

Hasil uji *Tukey HSD* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok K(-) dengan kelompok P1 dan P2; kelompok K1 (+) dengan kelompok P1 dan P2; kelompok P1 dengan kelompok K(-) dan K1(+); kelompok P2 dengan kelompok K(-) dan K1(+).

5.2.2 Analisis Data Jumlah *Foam Cell* Makrofag

Berdasarkan data jumlah *foam cell* makrofag yang diperoleh, dilakukan perhitungan statistika. Uji normalitas data jumlah *foam cell* makrofag menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Hasil yang diperoleh dari uji *Kolmogorov-Smirnov* pada keseluruhan kelompok menunjukkan nilai signifikansi ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa semua kelompok (K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2) berdistribusi normal. Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas data yaitu menggunakan uji *Levene*. Hasil uji *Levene* dapat dilihat pada tabel 5.8. Hasil dari uji *Levene* menunjukkan nilai signifikansi ($p > 0,05$) ($p = 0,053$), yang berarti jumlah *foam cell* makrofag pada keseluruhan kelompok (K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2) adalah homogen.

Tabel 5.8 Hasil Uji Homogenitas Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2

<i>Levene Statistic</i>	Sig. (p)
2.805	.053*

Keterangan: *Data signifikan pada $p > 0,05$

Setelah didapatkan data yang berdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji perbedaan seluruh kelompok terhadap jumlah *foam cell* makrofag menggunakan uji *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* dapat dilihat pada tabel 5.9. Nilai signifikansi (p) pada uji *One Way ANOVA* adalah $p < 0,05$ ($p = 0,000$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan pada seluruh kelompok. Selanjutnya dilakukan uji *Tukey HSD* untuk melihat perbedaan antar kelompok penelitian terhadap jumlah *foam cell* makrofag yang dapat dilihat pada tabel 5.10.

Tabel 5.9 Hasil Uji *One Way ANOVA* Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2

	Sig. (p)
Antar Kelompok	.000*

Keterangan: *Data signifikan pada $p < 0,05$ Tabel 5.10 Hasil Uji *Tukey HSD* Jumlah *Foam Cell* Makrofag Pada Kelompok K-, K1(+), K2(+), P1 dan P2

Kelompok	K-	K1 (+)	K2 (+)	P1	P2
K-		.825	.602	.026*	.000*
K1 (+)	.825		.994	.203	.005*
K2 (+)	.602	.994		.374	.011*
P1	.026*	.203	.374		.374
P2	.000*	.005*	.011*	.374	

Keterangan: * terdapat perbedaan bermakna $p < 0,05$

Hasil uji *Tukey HSD* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok K(-) dengan kelompok P1 dan P2; kelompok K1 (+) dengan kelompok P2; kelompok K2 (+) dengan kelompok P2; kelompok P1 dengan kelompok K(-); kelompok P2 dengan kelompok K(-), K1(+) dan K2(+).

BAB 6

PEMBAHASAN

Pada penelitian mengenai “Manfaat Ekstrak Air *Green Tea (Camellia sinensis)* Terhadap Jumlah Sel Neutrofil dan *Foam Cell* Makrofag Pada Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe-2 Dengan *Oral Candidiasis*”, dilakukan dengan mengevaluasi gambaran histopatologi (HPA) pada mikroskop. Sampel yang dievaluasi berasal dari biopsi mukosa lidah tikus Wistar, karena kecenderungan terjadinya *oral candidiasis* adalah pada lidah. Seluruh hewan coba dibuat dalam model DM dengan menginduksi *streptozotocin* (STZ) dosis 50mg/KgBB secara intraperitoneal (Anjani *et al*, 2018). STZ dilarutkan dalam 0,01M buffer sitrat, pH 4,5 segera sebelum digunakan.

Diabetes Mellitus (DM) meningkatkan risiko terjadinya infeksi, salah satunya yaitu *oral candidiasis*. Peningkatan kadar glukosa darah berkaitan dengan peningkatan kadar glukosa pada saliva, dimana glukosa memberikan nutrisi yang baik untuk pertumbuhan *C. albicans* (Sumintarti dan Rahman, 2015). Pada kondisi *immunocompromised* seperti Diabetes Mellitus terjadi defek pada sistem imun sehingga sel imunokompeten imunitas mukosa pada rongga mulut tidak dapat mengeleminasi adhesi dari *C. albicans* (Rahayu *et al*, 2018).

Infeksi jamur *C. albicans* pada hewan coba terjadi setelah tikus Wistar diinokulasi dengan *C. albicans* 6×10^8 CFU/ml. Secara klinis, terdapat adanya pseudomembran atau plak putih pada mukosa lidah tikus Wistar dan untuk memastikan *oral candidiasis* dilakukan pengecatan papanicolou dari *swab* pada daerah tersebut.

6.1 Hasil Peningkatan Neutrofil

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rerata jumlah sel neutrofil pada kelompok K sebesar 10.4000 dan menurun pada K(-) yaitu sebesar 6.0000. Hal ini sesuai dengan teori bahwa limfosit pada tikus yang diinduksi diabetes akan cenderung mengalami gangguan dalam regulasi limfosit dalam darah yang digambarkan dengan peningkatan jumlah limfosit yang terapoptosis, yang akhirnya berdampak pada penurunan jumlah neutrofil (Arya *et al*, 2011). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rerata jumlah sel neutrofil pada kelompok K(-) sebesar 6.0000, kelompok K1(+) sebesar 8.2000, kelompok K2(+) sebesar 10.2000, kelompok P1 sebesar 12.6000, dan kelompok P2 sebesar 13.8000, yang berarti bahwa jumlah sel neutrofil meningkat pada seluruh kelompok dengan pemberian ekstrak air *green tea* dan Meditea. Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa ekstrak *green tea* dapat mengaktivasi rekrutmen neutrofil ke jaringan dan melakukan fagositosis terhadap *C. albicans* melalui peningkatan proliferasi limfosit yang dapat mempengaruhi CD4+ sel T untuk mengaktifkan Th₁₇ untuk menghasilkan IL-17A yang selanjutnya merekrut neutrofil (Rahayu *et al*, 2018).

Uji *Tukey HSD* yang membandingkan antar kelompok menunjukkan bahwa sel neutrofil mengalami peningkatan yang signifikan pada kelompok pemberian ekstrak air *green tea* 2,5% dan kelompok meditea 8,6% selama 5 hari terhadap ekstrak air *green tea* 2,5%. Setelah melalui pengujian sampel, kadar EGCG dalam *green tea* yang digunakan adalah $2.38 \pm 0,76$ % dan kafein 12.59%, sedangkan kadar EGCG dalam Meditea adalah 2.54% dan kafein hanya 0.491%. Kadar EGCG dalam *green tea* tidak

berbeda jauh dengan kadar EGCG dalam meditea. Meskipun dosis Meditea adalah 8.6%, dan kadar EGCG di dalamnya menjadi lebih tinggi, namun pemberian ekstrak *green tea* 2.5% masih lebih efektif. Hal ini dikarenakan adanya kafein yang jauh lebih besar di dalam ekstrak *green tea*. Kafein dikatakan memiliki sifat antioksidan dan efek antiinflamasi (Hilal, 2017; Hussain *et al*, 2018) dan berdasarkan penelitian oleh Senchina *et al* (2014), dilaporkan bahwa kafein dapat menurunkan kadar TNF- α dan juga meningkatkan IL-10 pada batas level fisiologis. Berdasarkan hal tersebut, efek dari ekstrak air *green tea* juga secara tidak langsung diperkuat oleh tingginya kandungan kafein.

Pemberian ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) pada penelitian ini diharapkan dapat berperan sebagai agen antijamur, yaitu dengan meningkatkan rekrutmen neutrofil ke jaringan untuk fagositosis *C. albicans*. Penelitian Prasetyo, Nasronudin, dan Rahayu (2015) melaporkan bahwa pemberian EGCG *green tea* terbukti secara signifikan dalam meningkatkan jumlah sel neutrofil dan menurunkan jumlah sel yang terinfeksi *C. albicans*. EGCG juga merupakan zat yang paling poten dalam menghambat formasi dan keseimbangan biofilm dari *Candida*. Dosis Meditea ditetapkan berdasarkan konsumsi harian EGCG untuk manusia yang dikonversikan untuk tikus, sehingga diperoleh dosis Meditea sebesar 8,6%.

Green tea mampu mengaktivasi sel fagosit ke jaringan yang terinfeksi *C. albicans*, hal ini terbukti dengan meningkatnya jumlah sel neutrofil setelah pemberian ekstrak. Ekstrak *green tea* mengandung flavonoid sebagai immunomodulator yang dapat meningkatkan produksi IL-2 untuk merangsang proliferasi dan differensiasi sel

T (Kurnia, Ardhiyanto, dan Suhartini, 2015). Ekstrak *green tea* meningkatkan proliferasi limfosit yang dapat mempengaruhi CD4⁺ sel T untuk mengaktifkan Th₁₇ untuk menghasilkan IL-17A (Rahayu *et al*, 2018). Interleukin-17 (IL-17A) menginduksi neutrofil sehingga menstimulasi produksi kemokin dan sitokin lainnya yang juga merekrut neutrofil ke jaringan. Neutrofil yang terekrut mengingesti dan merusak bakteri dan fungi (*C. albicans*) (Abbas, Litchman dan Pillai, 2015; Mengesha dan Conti, 2017). Ekstrak *green tea* dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi secara signifikan, termasuk TNF- α dan khususnya kandungan EGCG terbukti sebagai inhibitor IL-1 β yang poten (Wheeler *et al*, 2004).

6.2 Hasil Penurunan *Foam Cell* Makrofag

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rerata jumlah *foam cell* makrofag pada kelompok K sebesar 4.8000 dan meningkat pada kelompok K(-) yaitu sebesar 13.6000, hal tersebut sesuai dengan teori bahwa keadaan hiperglikemia menyebabkan akumulasi lipid dan terjadi pembentukan *foam cell* (Chait dan Bornfeldt, 2009). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rerata jumlah *foam cell* makrofag pada kelompok K(-) sebesar 13.6000, kelompok K1(+) sebesar 12.0000, kelompok K2(+) sebesar 11.4000, kelompok P1 sebesar 8.6000, dan kelompok P2 sebesar 5.8000. Hasil rerata jumlah *foam cell* makrofag menunjukkan adanya penurunan pada seluruh kelompok dengan pemberian ekstrak air *green tea* 2,5%, maupun Meditea 8,6%. Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa EGCG dapat menghambat atau menekan *uptake* dari LDL-ox dan formasi *foam cell* pada makrofag manusia (Chen *et al*, 2017).

Hasil uji *Tukey HSD* untuk melihat perbedaan antar kelompok menunjukkan bahwa *foam cell* makrofag mengalami penurunan yang signifikan pada kelompok pemberian ekstrak air *green tea* 2,5% dan kelompok meditea 8,6% terhadap ekstrak air *green tea* 2,5% selama 7 hari. Sesuai dengan penjelasan sebelumnya, setelah melalui pengujian sampel, kadar EGCG dalam *green tea* yang digunakan adalah $2.38 \pm 0,76$ % dan kafein 12.59%, sedangkan kadar EGCG dalam Meditea adalah 2.54% dan kafein hanya 0.491%. Kadar EGCG dalam *green tea* tidak berbeda jauh dengan kadar EGCG dalam meditea. Dilaporkan bahwa kombinasi antara katekin dan kafein memiliki efek sinergis anti-obesitas yang berperan menghambat pembentukan aterosklerosis (Liu *et al*, 2017).

Pemberian ekstrak *green tea* dapat memperbaiki terjadinya stress oksidatif dan mengurangi progresivitas pembentukan atheroma atau aterogenesis pada tikus dengan diet yang bersifat aterogenik (Yusmiati *et al*, 2012). Keadaan hiperglikemia menyebabkan akumulasi lipid dan pembentukan *foam cell* yang mengarah pada aterosklerosis (Chait dan Bornfeldt, 2009). Selain disebabkan oleh kondisi hiperglikemia, infeksi *C. albicans* juga memicu pelepasan IL-18 oleh makrofag. IL-18 dapat meningkatkan molekul adesi sel (seperti VCAM-1 dan ICAM-1) melalui aktivasi NF-kB. Aktivasi NF-kB oleh IL-18 memicu ekspresi CD36. Selanjutnya, terjadi uptake LDL teroksidasi oleh reseptor CD36. Akumulasi LDL-ox dalam makrofag mengakibatkan pembentukan *foam cell*. Pemberian ekstrak air *green tea* dapat menurunkan konsentrasi IL-18 plasma secara signifikan sehingga jumlah *foam cell* menurun (Landberg *et al*, 2011) dan pada penelitian oleh Ridwan, Astrian dan Barlian

(2012), pemberian polifenol dapat menurunkan kadar glukosa darah pada mencit dengan diabetes.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Simpulan

1. Pemberian ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) 2,5% meningkatkan jumlah sel neutrofil pada tikus wistar model diabetes mellitus tipe-2 dengan *oral candidiasis*.
2. Pemberian ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) 2,5% menurunkan jumlah *foam cell* makrofag pada tikus wistar model diabetes mellitus tipe-2 dengan *oral candidiasis*.

7.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai manfaat ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) untuk deteksi ekspresi sitokin yang berperan dalam proses perbaikan jaringan akibat infeksi jamur pada kondisi DM.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A., Litchman, A., dan Pillai, S. 2015. *Cellular and Molecular Immunology, Eight Edition*. Philadelphia: Elsevier, hal. 216-229.
- Actor, J. 2012. Elsevier's *Integrated Review: Immunology and Microbiology, Second Edition*. Philadelphia: Elsevier, hal 31-32.
- Allapat, B., Sarna, J., dan Truong, C. 2015. Anticancer and Antioxidant Properties of Flavored *Green Tea* Extracts. *Journal of Agriculture and Life Sciences* 2(1): 15-24.
- Allen, J., Sutherland, T., dan Ruckerl, D. 2015. IL-17 and Neutrophils: Unexpected Players in the Type 2 Immune Response. *Current Opinion in Immunology* 34: 99-106.
- Andyk, A. 2017. *Problematika Penanganan Sepsis, Ketamin Pemikiran Awal*. Universitas Brawijaya Press, hal. 26.
- Archer, NK., Adappa, ND., Palmer, JN., Cohen, NA., Harro, JM., Lee, SK., Miller, LS., dan Shirliffa, ME. 2016. Interleukin-17A (IL-17A) and IL-17F Are Critical for Antimicrobial Peptide Production and Clearance of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *American Society for Microbiology, Infection and Immunity Journal* 84(12): 3575-82.
- Arif, T., Bhosale, JD., Kumar, N., Mandar, TK., Bendre, RS., Lavekar., GS., dan Dabur R. 2009. Natural Products—Antifungal Agents Derived from Plants. *J Asian Nat Prod Res* 11(7): 621-38.
- Arya, AK., Pokharia, D., Kumar, H., Mishra, M., dan Tripathi, K. 2011. Impact of Lymphocyte Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Asian Journal of Medicine Sciences* 2: 1-6.
- Bahry, B dan Setiabudy, R. 2011. *Obat Jamur, Dalam Farmakologi dan Terapi FKUI, Ed ke- 5*. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.
- Baker, H. 1980. *The Laboratory Rat. Volume 1. Biology and Disease*. London: LTD Academic Press Inc, hal. 154-168.
- Bhat, OM., Kumar, PU., Giridharan, NV., Kaul, D., Kumar. MJ., dan Dhawan, V. 2015. Interleukin-18-Induced Atherosclerosis Involves CD36 And NF-kB Crosstalk In Apo E ^{-/-} Mice. *Journal of Cardiology* 66: 28-35.
- Bhat, OM dan Dhawan, V. 2015. Role of IL-18 and Its Signalling in Atherosclerosis. *Inflammation & Cell Signalling* 2(10): e707.
- Brancroft, JD dan Gamble, M. 2008. Theory and Practice of Histological Techniques, 6th ed. *Churchil Livingstone Elsevier*.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., dan Morse, S. 2007. *Microbiology, 24thed*. New York: Mc Graw Hill.

- Budiwiyono, I. 2009. *Diktat Pegangan Kuliah Patologi Klinik I Jilid I*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Carneiro, NK., Silva, GK., Rocha, FA., Milanezi, CM., Neto, FF., Zamboni, DF., dan Silva, JS. 2015. IL-18 Triggered by The Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in A Pulmonary Model of Fungal Infection. *J Immunol* 194(9): 54507-17.
- Castejon, G dan Brough, D. 201. Understanding the Mechanism of IL-1 β Secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 22(4): 189-195.
- Chacko, SM., Thambi, PT., Kuttan, R., dan Nishigaki, I. 2010. Beneficial Effects of *Green tea*: A Literature Review. *Chinese Medicine* 5: 13.
- Chait, A dan Bornfeldt, K. 2009. Diabetes ad Atherosclerosis: Is There A Role For Hyperglycemia?. *Journal of Lipid Research*: S335-S339.
- Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S., dan Snowden, N. 2014. *Essentials of Clinical Immunology*. UK: John Wiley Ltd, hal 17.
- Chen, SJ., Kao, YH., Jing, L., Chuang, YP., Wu, WL., Liu, ST., Huang, SM., Lai, JH., Ho, LJ., Tsai, MC., dan Lin, CS. 2017. Epigallocatechin-3-gallate Reduces Scavenger Receptor A Expression and Foam Cell Formation in Human Macrophages. *J. Agric. Food Chem* 65: 3141-3150.
- Chistiakov, DA., Killingsworth, MC., Myasoedova, VA., Orekhov, VN., dan Bobryshev, YV. 2017. CD68/Macrosialin: Not Just a Histochemical Marker. *Laboratory Investigation* 97: 4-13.
- Coico, R dan Sunshine, G. 2015. *Immunology A Short Course Seventh Edition*. Premedia Limited: UK.
- Diamond, CE., Khameneh, HJ., Brough, D., dan Morterallo, A. 2015. Novel Perspectives on Non-canonical Inflammasome Activation. *Dovepress* 4: 131-141.
- Duhring, S., Germerodt, S., Skerka, C., Zipfel, PF., Dandekar, T., dan Schuster, S. 2015. Host-pathogen Interactions between the human innate immune system and *Candida albicans*-Understanding and Modeling Defense and Evasion Startegies. *Front. Microbiol* 6: 625.
- Duque, G dan Descoteaux, A. 2014. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front immunol* 5: 491.
- Durpes, MC., Morin, C., Veillet, JP., Beland, R., Pare, M., Guimond, MO., Rekhter, M., King, GL, dan Geraldès, P. 2015. PKC- β Activation Inhibits IL-18-Binding Protein Causing Endothelial Dysfunction and Diabetic Atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 106(2): 303-313.
- Falk, E. 2006. Pathogenesis of Atherosclerosis. *JACC* 47(8): C7-12.

- Fiorino, P., Evangelista, FS., Santos, F., Magri, FM., Delorenzi, JC., Ginoza, M., Farah, V 2012. The Effects of *Green tea* Consumption on Cardiometabolic Alterations Induced by Experimental Diabetes. *Exp Diabetes Res*.
- Furman, B.L. 2015. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 70: 5. 47. 1-5.47.20.
- Gow, N., Veerdonk, F., Brown, A., dan Netea, M. 2011. *Candida albicans* Morphogenesis and Host Defence: Discriminating Invasion from Colonization. *Nature Reviews Microbiology* 10(2): 112-22.
- Gu, C., Wu, L., dan Li, X. 2013. IL-17 Family: Cytokines, Receptors, and Signaling. *Cytokine* 64(2): 1-21.
- Hakim, L dan Ramadhian, M. 2015. Kandidiasis Oral. *Majority* 4(8): 53-57.
- Harjana, T. 2011. *Buku Ajar Histologi*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Hikmah, Z dan Prihaningtyas, R. 2018. *Bersahabat Dengan Lupus*. Elex Media Computindo, hal 5.
- Hilal, Y. 2017. Morphology, Manufacturing, Types, Composition and Medicinal Properties of Tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Basic and Applied Plant Sciences*, 1–10.
- Hirasawa, M dan Takada, K. 2004. Multiple Effects of *Green tea* Catechin on the Antifungal activity of Antimycotics against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 53(2): 225-9.
- Huppler, AR., Conti, HR., Santos, NH., Darville, T., Biswas, PS., dan Gaffen, SL. 2014. Role of Neutrophils in IL-17-Dependent Immunity to Mucosal Candidiasis. *J Immunol* 192: 1745-52.
- Hussain, G., Rasul, A., Anwar, H., Aziz, N., Razzaq, A., Wei, W., Ali, M., Li, J., dan Li, X. 2018. Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Biological Sciences* 14(3): 341-357.
- Integrated Taxonomic Information System. 2018. *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. Available at: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506801#null.
- Jarva, M., Phan, TK., Lay, FT., Caria, S., Kvansakul, M., dan Hullet, M. 2018. Human β -defensing 2 Kills *Candida albicans* Through Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-mediated Membrane Permeabilization. *Science Advances* 4(7).
- Jigisha, A., Nishant, R., Navin, K., dan Pankaj, G. 2012. *Green tea*: A Magical Herb With Miraculous Outcomes. *IRJP* 3(5): 139-148.
- Kaplanski, G. 2018. Interleukin-18: Biological Properties And Role In Disease Pathogenesis. *Immunol Rev* 281(1): 138-153.

- Karimah, Z. 2018. *Prevalensi Oral Candidiasis Pada Penderita Diabetes Mellitus Berdasarkan Nilai A1c di RSUD Haji Surabaya Tahun 2017*. Thesis, Universitas Airlangga.
- Kashem, S., Kaplan, D., dan Haniffa, M. 2017. Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annual Review of Immunology* 35(1).
- Kaushansky, K., Litchman, MA., Prchal, JT., Levi, MM., Press, OW., Burns, LJ., dan Caligiuri, MA. 2015. *William's Hematology, 9th ed.* USA: Mc Graw-Hill, hal 1050.
- Khrisnan, P. 2012. Fungal Infections of the Oral Mucosa. *Indian Journal of Dental Research* 23(5): 650-59.
- Kopaei, MR., Motamedi, P., Vakili, L., Dehghani, N., Kiani, F., Taheri, Z., Torkamaneh, S., Nasri, P., dan Nasri, H. 2014. *Green tea* and Type 2 Diabetes Mellitus. *J Nephroarmacol* 3(1): 21-23.
- Kuo, CCC., Chen, TS, Liou, SY., dan Hsieh, CC. 2014. Immunomodulatory Effects of EGCG Fraction of *Green tea* Extract in Innate and Adaptive Immunity via T Regulatory Cells in Murine Model. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 36(5): 364-70.
- Kurnia, P., Ardhiyanto, H., dan Suhartini, 2015. Potensi Ekstrak Teh Hijau Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Fibroblas Soket Pasca Pencabutan Gigi pada Tikus Wistar. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan* (1): 122-127.
- Kusnadi, K dan Devi, E. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens L.*) dengan Metode Refluks. *PSEJ* 2(1): 56-57.
- Landberg, R., Sun, Qi., Rimm, Eb., Cassidy, Scalbert, A., Mantzoros, CS., Hu, B., dan Dam, R. 2011. Selected Dietary Flavonoids Are Associated with Markers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in U. S. Women. *The Journal of Nutrition* 141: 618-625.
- Lasiglie, D., Traggiai, E., Federeici, S., Alessio, M., Bouncompagni, A., Accogli, A., Chiesa, S., Penco, F., Martini, M., dan Gattorno, M. 2011. Role of IL-1 Beta in the Development of Human Th₁₇ Cells: Lesson from NLPR3 Mutated Patients. *PLoS ONE* 6(5): e20014.
- Li, Q., Li, J., Liu, S., Huang, J., Lin, H., Wang, K., Cheng, X., dan Liu. 2015. A Comparative Proteomic Analysis of the Buds and the Young Expanding Leaves of the Tea Plant (*Camellia Sinensis L.*). *International Journal of Molecular Sciences* 16 (6): 14007–38.
- Litchman, M., Kaushansky, K., Kipps, T., Seligsohn, U., Pirchal, J. 2010. *William's Hematology, 8th ed.* USA: Mc Graw-Hill.

- Liu, L., Nagai, I., Gao, Y., dan Matsushima, Y. 2017. Effects of Catechins and Caffeine on The Development of Atherosclerosis in Mice. *Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 81(10): 1948-1955.
- Loureiro, A., Munhoz, CD., Martins, J.O., Cerchiaro, G.A., Scavone, C., Curi, R., dan Sannomiya, P. 2007. Neutrophil Function and Metabolism in Individuals with Diabetes Mellitus. *Braz J Med Biol Res* 40(8): 1037-44.
- Minasari, N. 2008. Kandidiasis Rongga Mulut dan Diabetes Mellitus. *Majalah Kedokteran Nusantara* 41(3): 200-6.
- Martinez, GJ., Nurieva, RI., Yang, XO., dan Dong, C. 2008. Regulation and Function of Proinflammatory Th17 Cells. *Ann N Y Acad Sci* 1143: 188-211.
- Martinez, F dan Gordon, S. 2014. The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment. *F1000Prime Reports* 6: 13.
- Marwati, E. 2011. *Diabetes Mellitus dan Kesehatan Mulut*. Jakarta: Universitas Trisakti.
- Mengesha, B dan Conti, H. 2017. The Role of IL-17 in Protection against Mucosal Candida Infections. *J Fungi* 3(4): 52.
- Mescher, A 2013. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, 13th Edition*. Indiana: McGraw-Hill Education, hal. 254-255.
- Miramón, P., Kasper, L., dan Hube, B. 2013. Thriving Within the Host: Candida spp. Interactions with Phagocytic Cells. *Medical Microbiology and Immunology* 202(3): 183-195.
- Mollashahi, N., Bokaeian, M., Mollashahi, LF., dan Afrougheh, A. 2015. Antifungal Efficacy of *Green tea* Extract against Candida Albicans Biofilm on Tooth Substrate. *J Dent* 12(8): 592-598.
- Mutiawati, V. 2016. Pemeriksaan Mikrobiologi Pada *Candida albicans*. *JURNAL KEDOKTERAN SYIAH KUALA* 16(1): 53-63.
- Namita, P., Mukesh, R., dan Vijay, K. 2012. Camellia Sinensis (*Green tea*): A review. *Global Journal of Pharmacology* 6 (2): 52-59.
- Nasrollahi, Z dan Yadegari, MH. 2016. Antifungal Activity of Caffeine in Combination with Fluconazole against Candida albicans. *Infect Epidemiol Med* 2(2): 18-21.
- Noriko, N. 2013. Potensi Daun Teh (*Camellia sinensis*) dan Daun Anting-anting *Acalypha indica L.* dalam Menghambat Pertumbuhan Salmonella typhi. *Jurnal AL-AZHAR INDONESIA SERI SAINS DAN TEKNOLOGI* 2(2): 104-110.
- Nature Research. 2019. *Foam Cells*. Available at: <https://www.nature.com/subjects/foam-cells>.
- Novoselov, V., Leuven, KU., Sazonova, M., dan Orekhov, A. 2015. Study of the Activated Macrophage Transcriptome. *Experimental and Molecular Pathology* 99:575-580.

- Nugraha, P., Polii, H., dan Wungouw, H. 2014. Jumlah Neutrofil Pada Petani Terpapar Pestisida di Kelurahan Rurukan Kecamatan Tomohon Timur. *Jurnal e-Biomedik* 2(1).
- Nur'aeny, N., Hidayat, W., Dewi, TS., Herawati, E., dan Wahyuni, IS. 2017. Profil *Oral candidiasis* di Bagian Ilmu Penyakit Mulut RSHS Bandung Periode 2010-2014. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia* 3(1): 23-28.
- Orange, D dan J, LaRosa. 2008. Lymphocytes. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology* 121(2): 364-369.
- Park, YM. 2014. CD36, A Scavenger Receptor Implicated in Atherosclerosis. *Experimental & Molecular Medicine* 46: e99.
- Pawlina, W. 2016. *Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology, Seventh Edition*. China: Wolters Kluwer Health, hal 278-279.
- Prasetyo, RA., Nasronudin., dan Rahayu, RP. 2015. The Effect of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Green Tea on Neutrophil Count and Infected Cells by *Candida albicans* in a Murine Model of Oral Candidiasis. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(6): 89-99.
- Purnomo, W dan Bramantoro, T. 2018. *Pengantar Metodologi Penelitian Bidang Kesehatan*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Purwanto B, & Liben P. 2014. Model Hewan Coba Untuk Penelitian Diabetes. Surabaya: Revka Petra Media.
- Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. 2014. *Situasi dan Analisis Diabetes*. Indonesia: Jakarta Selatan
- Rahayu, RP., Prasetyo, RA., Purwanto, DA., Kresnoadi, U., Iskandar, RP., dan Rubianto, M. 2018. The Immunomodulatory Effect of *Green tea (Camellia sinensis)* Leaves Extract on Immunocompromised Wistar Rats Infected by *Candida albicans*. *Veterinary World* 11(6): 765-770.
- Ridwan, A., Astrian R dan Barlian, A. 2012. Pengukuran Efek Antidiabetes Polifenol (Polyphenon 60) Berdasarkan Kadar Glukosa Darah dan Histologi Pankreas Mencit (*Mus musculus L.*) S.W. Jantan yang Dikondisikan Diabetes Mellitus. *Jurnal Matematika dan Sains* 17(2): 78.
- Rifai, M. 2013. *Imunologi dan Alergi Hipersensitif: Imunologi untuk Biologi Kedokteran*. Malang: Universitas Brawijaya Press, hal 21.
- Sabila, A., Ismail, A., dan R, Mujayanto. 2017. Oral Hygiene Buruk Pasien Rawat Inap Tidak Berkaitan Dengan Pertumbuhan *Oral candidiasis*. *Odonto Dental Journal* 4(1): 56-60.
- Saputra, N., Suartha, I., dan Dharmayudha, A. 2018. Agen Diabetogenik Streptozotocin untuk Membuat Tikus Putih Jantan Diabetes Mellitus. *Buletin Veteriner Udayana* 10(2): 116-121.
- Sargowo, D. 2015. *Disfungsi Endotel*. Malang: Universitas Brawijaya Press.

- Saskia, T dan Mutiara, H. 2015. Infeksi Jamur pada Penderita Diabetes Mellitus. *Majority* 4(8): 69-74.
- Scully, C. 2008. *Oral and Maxillofacial Medicine, the Basis of Diagnosis and Treatment, 2nd ed.* Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier, hal 191 – 204.
- Senchina, DS., Hallam, EJ., Kohut, ML., Nguyen, NA., dan Perera, M. 2014. Alkaloids and Athlete Immune Function: Caffeine, Theophylline, Gingerol, Ephedrine, and Their Congeners. *EIR* 20.
- Soehnlein, O. 2012. Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis. *Circ Res* 110: 875-888.
- Song, X., He, X., Xiaoxia, L., dan Qian, Y. 2016. The Roles and Function Mechanisms of Interleukin-17 Family Cytokines in Mucosal Immunity. *Cell Mol Immunol* 13(4): 418-431.
- Stasya, E., Nurmansyah, D., dan Ramadhani, D. 2018. Candida albicans Infection in Mouth Swab of Diabetes Mellitus Patients at Ratu Zalecha General Hospital Martapura June 2018. *Jurnal Health Analyst Academy of Borneo Lestari Banjar Baru*.
- Sudiono, J. 2014. *Sistem Kekebalan Tubuh*. Jakarta: EGC, hal 16.
- Sumintarti dan Rahman, F. 2015. Korelasi Kadar Glukosa Saliva Dengan Kadar Glukosa Darah Terhadap Terjadinya Kandidiasis Oral Pada Penderita Diabetes Melitus. *Dentofasial* 14(1): 29-31.
- Syaipulloh, M. 2014. *Statistik Teh Indonesia 2014*. Indonesia: Badan Pusat Statistik Republik Indonesia.
- Towaha J. 2013. Kandungan Senyawa Kimia Pada Daun Teh (*Camellia sinensis*). *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 19(3).
- Tumilisar, D. 2014. *Komplikasi Diabetes Mellitus Pada Rongga Mulut*. Jakarta: Ukrida.
- Valeri, M dan Raffatellu, M. 2016. Cytokines IL-17 and IL-22 in the Host Response to Infection. *Pathogens and Disease, FEMS Journals* 74(9).
- Valledor, F., Lloberas, J., dan Celada, A. 2015. *Macrophage Foam cells*. Available at: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0020730.html>.
- Wardani, Y. 2013. Pengaruh Siklofosamid Pada Kemampuan Fagositosis Netrofil Mencit Swiss Terhadap Candida albicans. *Respositori Universitas Riau*.
- Watson, R., Preedy, V., dan Zibadi, S. 2014. *Polyphenols in Human Health and Disease, Vol I*. America: Elsevier Inc, hal 659.
- Wheeler, DS., Catravas, JD., Odoms, K., Denenberg, A., Malhotra, V., dan Wong, HR. 2004. Epigallocatechin-3-Gallate, A Green tea-Derived Polyphenol, Inhibits IL-1 β Dependent Proinflammatory Signal Transduction in Cultured Respiratory Epithelial Cells. *The Journal of Nutrition* 134(5): 1038-1044.

- World Health Organization. 2018. *Diabetes Mellitus*.
Available at:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/.
- Yashin, AY., Nemzer, BV., Combet, E., dan Yashin, YI. 2015. Determination of the Chemical Composition of Tea by Chromatographic Methods: A Review. *Journal of Food Research* 4(3): 56-87.
- Yu, XH., Fu, FC., Zhang, DW., Yin, K., dan Tang CK. 2013. Foam cells in Atherosclerosis; Invited Critical Review. *Cinica Chimica Acta* 42: 245-252.
- Yusmiati, SN., Arbai, A., Tjokroprawiro, A., dan Putra, ST. 2012. Antioxidant Potential of the Extract of *Green tea (Camellia sinensis)* And Red Tea (*Hibiscus sabdariffa*) In Atherogenesis Process in Rats with Atherogenic Diet. *Journal Universitas Airlangga* 14(3): 158-171.
- Zheng, S. 2013. Regulatory T Cells Vs Th17: Differentiation of Th17 Versus Treg, Are The Mutually Exclusive?. *Am J Clin Exp Immunol* 2(1): 94-106.
- Zheng, Y., Sun, L., Jiang, T., Zhang, D., He, D., dan Nie, H. 2014. TNF α Promotes Th17 Cell Differentiation through IL-6 and IL-1 β Produced by Monocytes in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research*: 1-12.

Lampiran 1. Laik Etik Penelitian



**UNIVERSITAS AIRLANGGA FACULTY OF DENTAL MEDICINE
HEALTH RESEARCH ETHICAL CLEARANCE COMMISSION**

ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE
Number : 203/HRECC.FODM/V/2019

Universitas Airlangga Faculty Of Dental Medicine Health Research Ethical Clearance Commission has studied the proposed research design carefully, and therefore, shall herewith certify that the research entitled :

**“PEMANFAATAN EKSTRAK AIR GREEN TEA (*Camellia sinensis*)
TERHADAP JUMLAH SEL NEUTROFIL DAN FOAM CELL
MAKROFAG PADA TIKUS WISTAR MODEL DM DENGAN ORAL
CANDIDIASIS”**

Principal Researcher : JVELINE AMELIA

Unit/Institution/Place of Research : - Laboratorium Biokimia Fakultas
Kedokteran Universitas Airlangga
Surabaya

CERTIFIED TO BE ETHICALLY CLEARED

 Surabaya, May 3, 2019
Chairman,


Prof. Dr. M. Robianto, drg., MS., Sp.Perio(K)
Official No.195009081978021001

Lampiran 2. Hasil Uji Statistika

T-Test

Tests of Normality

KELOMPOK		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Statistic	df	Sig.
NEUTROFIL	K	.323	5	.096
	K-	.318	5	.109

Group Statistics

	KELOMPOK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
NEUTROFIL	K	5	10.4000	2.70185	1.20830
	K-	5	6.0000	1.73205	.77460

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
NEUTROFIL	Equal variances assumed	3.540	.097	3.066	8	.015	4.40000	1.43527	1.09026	7.70974
	Equal variances not assumed			3.066	6.813	.019	4.40000	1.43527	.98711	7.81289

Tests of Normality

KELOMPOK		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Statistic	df	Sig.
NEUTROFIL	K-	.318	5	.109
	K+(1)	.287	5	.200*
	K+(2)	.221	5	.200*
	P1	.291	5	.193
	P2	.207	5	.200*

Test of Homogeneity of Variances

NEUTROFIL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.191	4	20	.107

Descriptives

NEUTROFIL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					K-	5		
K+(1)	5	8.2000	1.64317	.73485	6.1597	10.2403	6.00	10.00
K+(2)	5	10.2000	1.30384	.58310	8.5811	11.8189	9.00	12.00
P1	5	12.6000	3.20936	1.43527	8.6151	16.5849	9.00	16.00
P2	5	13.8000	2.94958	1.31909	10.1376	17.4624	10.00	18.00
Total	25	10.1600	3.57864	.71573	8.6828	11.6372	5.00	18.00

ANOVA

NEUTROFIL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	201.760	4	50.440	9.553	.000
Within Groups	105.600	20	5.280		
Total	307.360	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NEUTROFIL

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+(1)	-2.20000	1.45327	.566	-6.5487	2.1487
	K+(2)	-4.20000	1.45327	.062	-8.5487	.1487
	P1	-6.60000*	1.45327	.002	-10.9487	-2.2513
	P2	-7.80000*	1.45327	.000	-12.1487	-3.4513
K+(1)	K-	2.20000	1.45327	.566	-2.1487	6.5487
	K+(2)	-2.00000	1.45327	.649	-6.3487	2.3487
	P1	-4.40000*	1.45327	.047	-8.7487	-.0513
	P2	-5.60000*	1.45327	.008	-9.9487	-1.2513
K+(2)	K-	4.20000	1.45327	.062	-.1487	8.5487
	K+(1)	2.00000	1.45327	.649	-2.3487	6.3487
	P1	-2.40000	1.45327	.484	-6.7487	1.9487
	P2	-3.60000	1.45327	.136	-7.9487	.7487
P1	K-	6.60000*	1.45327	.002	2.2513	10.9487
	K+(1)	4.40000*	1.45327	.047	.0513	8.7487
	K+(2)	2.40000	1.45327	.484	-1.9487	6.7487
	P2	-1.20000	1.45327	.920	-5.5487	3.1487
P2	K-	7.80000*	1.45327	.000	3.4513	12.1487
	K+(1)	5.60000*	1.45327	.008	1.2513	9.9487
	K+(2)	3.60000	1.45327	.136	-.7487	7.9487
	P1	1.20000	1.45327	.920	-3.1487	5.5487

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets**NEUTROFIL**

Tukey HSD

KELOMPOK	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
K-	5	6.0000	
K+(1)	5	8.2000	
K+(2)	5	10.2000	10.2000
P1	5		12.6000
P2	5		13.8000
Sig.		.062	.136

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

T-Test

Tests of Normality

KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
FOAM CELL MAKROFAG K	.268	5	.200*
K-	.264	5	.200*

Group Statistics

KELOMPOK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
FOAM CELL MAKROFAG K	5	4.8000	2.48998	1.11355
K-	5	13.6000	3.78153	1.69115

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
FOAM CELL MAKROFAG	Equal variances assumed	2.074	.188	-4.346	8	.002	-8.80000	2.02485	-13.46930	-4.13070
	Equal variances not assumed			-4.346	6.920	.003	-8.80000	2.02485	-13.59929	-4.00071

Tests of Normality

KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
K-	.264	5	.200*
K+ (1)	.227	5	.200*
K+ (2)	.237	5	.200*
P1	.180	5	.200*
P2	.261	5	.200*

Test of Homogeneity of Variances

FOAM CELL MAKROFAG

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.805	4	20	.053

Descriptives

FOAM CELL MAKROFAG

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					K-	5		
K+ (1)	5	12.0000	2.12132	.94868	9.3660	14.6340	10.00	15.00
K+ (2)	5	11.4000	1.14018	.50990	9.9843	12.8157	10.00	13.00
P1	5	8.6000	2.07364	.92736	6.0252	11.1748	6.00	11.00
P2	5	5.8000	2.04939	.91652	3.2553	8.3447	4.00	9.00
Total	25	10.2800	3.56511	.71302	8.8084	11.7516	4.00	19.00

ANOVA

FOAM CELL MAKROFAG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	190.640	4	47.660	8.332	.000
Within Groups	114.400	20	5.720		
Total	305.040	24			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: FOAM CELL MAKROFAG

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+ (1)	1.60000	1.51261	.825	-2.9263	6.1263
	K+ (2)	2.20000	1.51261	.602	-2.3263	6.7263
	P1	5.00000*	1.51261	.026	.4737	9.5263
	P2	7.80000*	1.51261	.000	3.2737	12.3263
K+ (1)	K-	-1.60000	1.51261	.825	-6.1263	2.9263
	K+ (2)	.60000	1.51261	.994	-3.9263	5.1263
	P1	3.40000	1.51261	.203	-1.1263	7.9263
	P2	6.20000*	1.51261	.005	1.6737	10.7263
K+ (2)	K-	-2.20000	1.51261	.602	-6.7263	2.3263
	K+ (1)	-.60000	1.51261	.994	-5.1263	3.9263
	P1	2.80000	1.51261	.374	-1.7263	7.3263
	P2	5.60000*	1.51261	.011	1.0737	10.1263
P1	K-	-5.00000*	1.51261	.026	-9.5263	-.4737
	K+ (1)	-3.40000	1.51261	.203	-7.9263	1.1263
	K+ (2)	-2.80000	1.51261	.374	-7.3263	1.7263
	P2	2.80000	1.51261	.374	-1.7263	7.3263
P2	K-	-7.80000*	1.51261	.000	-12.3263	-3.2737

K+ (1)	-6.20000*	1.51261	.005	-10.7263	-1.6737
K+ (2)	-5.60000*	1.51261	.011	-10.1263	-1.0737
P1	-2.80000	1.51261	.374	-7.3263	1.7263

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

FOAM CELL MAKROFAG


Tukey HSD

KELOMPOK	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P2	5	5.8000		
P1	5	8.6000	8.6000	
K+ (2)	5		11.4000	11.4000
K+ (1)	5		12.0000	12.0000
K-	5			13.6000
Sig.		.374	.203	.602

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 3. Laporan Hasil Uji Ekstrak *Green Tea*

NO: F-04								
<u>LAPORAN HASIL UJI</u>								
No. 082 / LHU / III / 2019								
<p>1. Tanggal / No. Surat Perintah Uji : 25.02.19 / 055 / SPU / II / 19</p> <p>2. Tanggal Selesai Uji : 12.03.19</p> <p>3. Nama Sampel : Ekstrak green tea (freeze drying)</p> <p>4. Kode Sampel : EGCG 02 – 257</p> <p>5. Hasil Pemeriksaan :</p>								
No.	Parameter	Metode + BD	Hasil (rata-rata ± RPD)	Syarat	Keterangan			
1.	EGCG	HPLC	(2,382 ± 0,76)%b/b	-				
*RPD = Relative Percent Difference								
<p>Surabaya, 12.03.19 Manajer Teknis,  <u>Drs. Harijana, M.Sc., Apt.</u></p>								
<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">Rev. 0</td> <td style="padding: 2px 5px;">Terb. 4</td> <td style="padding: 2px 5px;">Thn.11</td> </tr> </table>						Rev. 0	Terb. 4	Thn.11
Rev. 0	Terb. 4	Thn.11						
<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">1 / 1</td> </tr> </table>						1 / 1		
1 / 1								

Pemeriksaan Kadar EGCG Kode 2-257**Gara Kerja :**

1. Timbang teliti sampel 100 mg larutkan dalam labu 25ml
2. Tambahkan methanol p.a. hingga tepat tanda
3. Ultrasonikasi selama 15 menit, lalu diamkan hingga methanol kembali tepat tanda
4. Kocok sebentar
5. Saring dengan membran nylon 0.2 mikron ke dalam vial HPLC
6. Analisis dengan HPLC
7. Hitung kadar EGCG dalam sampel

Kondisi HPLC

Instrument : HPLC Agilent 1100 Series dengan autosampler dan detektor PDA
 Kolom : LiChrospher 100 RP 18 (8µm), 250-4
 Eluen : Metanol : Asam asetat 2% (90:10)
 Suhu : 30 C
 Lambda : 274 nm
 Volume injek : 10 µL

Data Penimbangan

Baku EGCG = 20.2 mg dilarutkan dalam 20 ml = 1010 ppm
 dilakukan pengenceran 101ppm

Hasil :

Kode	Area Std						
Std 1	3245.04175						
Std 2	3157.95898						
Std 3	3121.42236						
Rata-rata Area	3174.80770						
Kode Sampel	Area Sampel	Berat (mg)	ppm terukur	berat dlm 25ml (mg)	% b/b EGCG	Rata2	RPD
2-257-1	3162.74000	106.0	100.62	2.515	2.373	2.382	0.76%
2-257-2	3162.59000	105.2	100.61	2.515	2.391		

Kesimpulan

Kadar EGCG dalam sampel 2-257 (2.382 ± 0.76)%

Surabaya, 12 Maret 2019
 Analisis ULFFUA



Elisy Novita M. S.Farm. Apt.

NO: F-04

LAPORAN HASIL UJI

No. 283 / LHU / IV / 2019

1. Tanggal / No. Surat Perintah Uji : 29.04.19 / 063 / SPU / IV / 19
2. Tanggal Selesai Uji : 10.04.19
3. Nama Sampel : Ekstrak green tea (freeze drying)
4. Kode Sampel : GC-MSD 03 – 468
5. Hasil Pemeriksaan :

No.	Parameter	Metode + BD	Hasil		Syarat	Ket
			Nama Senyawa	% Normalisasi		
1.	Profil GC-MSD	GC-MSD	Caffeine	100%	-	

Surabaya, 08.04.19
Manajer Teknis,



Drs. Harjana, M.Sc., Apt

Rev. 0 | Terb. 4 | Thn.11

1 / 1

Pemeriksaan Profiling Sampel 3-468**Cara Kerja**

1. Sampel ditimbang 1 g ditambah 2 ml etanol pa
2. Vortex 2 menit, disonifikasi 15 menit
3. Sampel diinjeksikan ke GC 1 μ l

Kondisi GC

Instrument = Agilent 6980N Network GC System dengan autosampler
Detektor = Agilent 5973 inert MSD
Kolom = J&W Scientific, HP-5MS, 0.25mm x 30m x 0.25 μ m
Inlet = split 1/100, 250°C
Oven = terprogram; 100°C (5mnt) -> 10°C/mnt -> 200°C (5mnt)
Flow dim Kolom = 1 ml/menit (konstan)
Aux = 250°C
MS Quad = 150°C
MS Source = 230°C
Scan Mode = 20-600 amu
Solvent delay = 0 menit
Pustaka = Wiley versi 7.0
Volume Injeksi = 1 μ l


Hasil

RT	Nama Senyawa	% Normalisasi
12.59	Caffeine	100%


Kromatogram dan data profiling terlampir

Surabaya, 09 April 2019

Analisis ULPFFUA


Laili Mutarrifah, S. Farm., Apt

Lampiran 4. Laporan Hasil Uji Meditea



PT. Angler BioChem
Committed to Global Standard
Independent Analytical Laboratory in Indonesia

Certificate No. 183689
June 12, 2018

5.10/F/2/2 Rev. 2/2
page 1 of 1

REPORT OF ANALYSIS

CLIENT : Prof. Dr. H. Djoko Agus Purwanto, Apt, M.Si
Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga Surabaya

RECEIVED ON : May 30, 2018

TEST REQUIRED : Epigallocatechin gallate and Caffeine Analyses

VOLUME RECEIVED : 50 grams sample solid in package was submitted by client

TYPE OF SAMPLE : Tea

DESCRIPTION of SAMPLE : Ekstrak Teh Hijau (Meditea)

METHOD & EQUIPMENT :
Analyzed by HPLC hyphenated with ultraviolet (UV) detection.



TEST RESULT :


Measurand	Result (%)		
	1	2	3
Caffeine	0.487	0.491	0.495
Epigallocatechin gallate	2.45	2.58	2.61

Note :
Precision of the analysis batch had been checked and fulfilled the declared Laboratory Quality Control Criteria
(x.xx) : (.) as character indicates decimal notation.

KJU 18050560
#CA-180612#93-TE

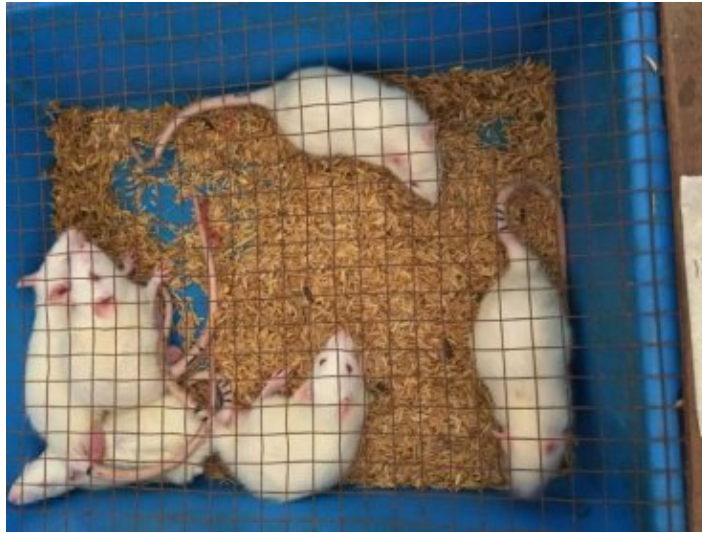
This result related to the samples submitted only.

Quality Assurance Manager


 Veronika Erna B., ST


 AN0010095

Jl. Sawo No. 17 - 19, Bringin, Sambikerep, Surabaya 60218, Indonesia • [http : //www.anglerlab.co.id](http://www.anglerlab.co.id)
 Telp : +62 31 745 6111, Fax : +62 31 99 161 116 • Email : marketing@anglerlab.net • info@anglerlab.co.id

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian



Tikus dipuaskan sebelum induksi STZ



Induksi STZ secara intraperitoneal



Pengukuran gula darah acak melalui vena lateralis ekor tikus



Inokulasi *C. albicans* pada rongga mulut tikus



C. albicans 6×10^8 CFU/ml dalam SDB



Menimbang ekstrak air *green tea* (*Camellia sinensis*) yang telah di *freeze drying* menggunakan neraca analitik



Pelarutan bubuk meditea menggunakan alat ultrasonik



Penyimpanan ekstrak air *green tea* pada botol tertutup dengan dilapisi aluminium foil



Penyimpanan ekstrak air meditea pada botol tertutup dengan dilapisi aluminium foil



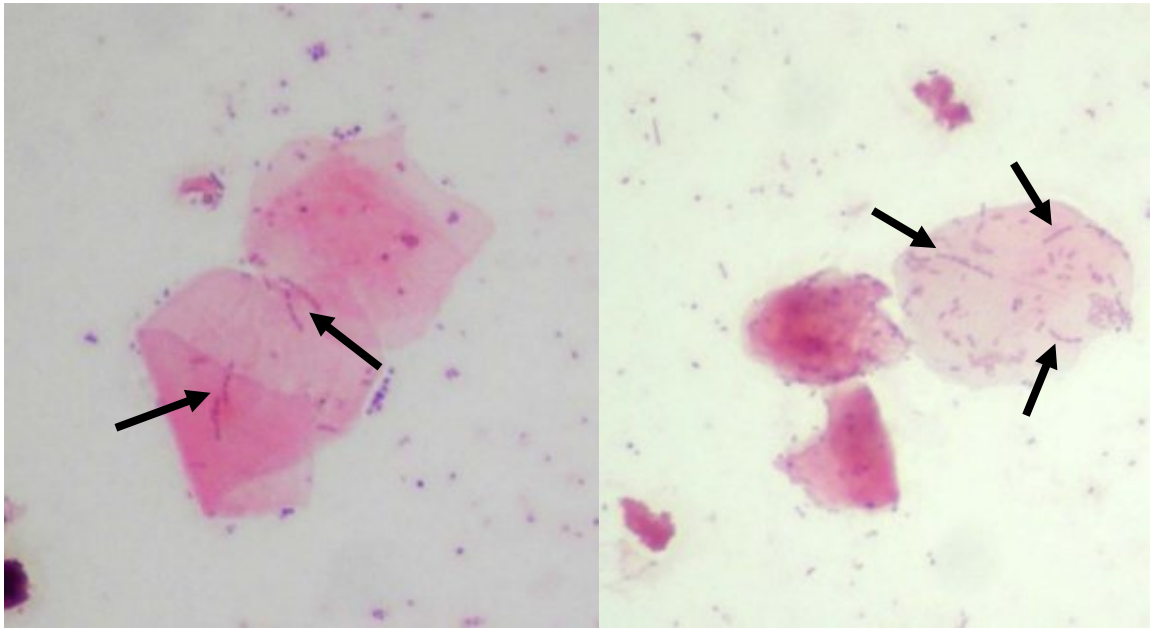
Pemberian ekstrak *green tea*/meditea pada tikus wistar secara per oral menggunakan selang pediatrik



Kondisi klinis lidah tikus yang terinfeksi *C. albicans* (sebelum pemberian ekstrak *green tea*/meditea)



Kondisi klinis lidah tikus setelah pemberian ekstrak *green tea*/meditea



Hasil Tes Papanicoulau