



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TEH HIJAU (CAMELLIA
SINENSIS) TERHADAP SEL IMUNOKOMPETEN PADA MENCIT
PUTIH YANG TERPAPAR MERKURI (hg)**

TESIS



**DHONA AFRIZA
07212001**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2009**

Pengaruh Pemberian Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Terhadap Sel
Imunokompeten Pada Mencit Putih Yang Terpapar Merkuri (Hg)

Suatu Eksperimental Murni Laboratorium
Pada Mencit Putih (*Mus musculus*)

UNIVERSITAS ANDALAS
RINGKASAN

Merkuri (Hg) merupakan zat kimia yang sudah lama digunakan secara luas di bidang kedokteran gigi sebagai bahan restorasi, yaitu sebagai campuran pada amalgam. Pasien maupun personil kesehatan gigi sangat beresiko terhadap keracunan merkuri, tetapi personil kesehatan gigi lebih beresiko karena mereka bisa terpapar secara terus menerus. Merkuri dapat diabsorpsi menembus kulit atau tertelan, tetapi resiko utama dari personil kesehatan gigi adalah dari menghirup uapnya. Merkuri sangat berbahaya dalam bentuk cairan. Uap merkuri dapat terhirup atau terabsorpsi melalui alveolus di paru-paru sampai 80%. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa merkuri dapat berpengaruh terhadap sistem imun. Dapat menaikkan atau menurunkan kadar sel limfosit T CD4⁺ dan CD8⁺. Teh merupakan minuman yang paling banyak dikonsumsi masyarakat di seluruh dunia. Teh hijau mengandung polifenol yang tinggi, yang merupakan antioksidan yang kuat. Dapat berfungsi sebagai *scavenger* efektif menghambat pembentukan radikal bebas yang dihasilkan merkuri. Polifenol teh hijau juga mempunyai kemampuan dalam mengikat ion-ion metal dan dapat meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan (GPX, SOD dan katalase) dalam tubuh.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri.

Penelitian ini bersifat eksperimental murni, dengan rancangan faktorial, karena mempergunakan 2 faktor lama pemberian dan 3 faktor dosis pemberian. Penelitian ini menggunakan mencit putih (*Mus musculus*) jantan, sebanyak 36 ekor yang berumur \pm 2,5 bulan dengan berat badan 20-25 gram. Kemudian mencit-mencit tersebut dibagi ke dalam 6 kelompok secara acak sederhana. Masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor mencit. Kelompok A adalah kelompok kontrol, hanya dipapar dengan merkuri saja tanpa pemberian ekstrak teh hijau. Kelompok B adalah kelompok yang dipapar dengan merkuri dan diberi ekstrak teh hijau dengan dosis 0,52 mg/20 gr berat badan. Kelompok C adalah kelompok perlakuan yang dipapar dengan merkuri dan diberi ekstrak teh hijau dengan dosis 1,04 mg/20gr berat badan. Masing-masing kelompok A, B dan C diberi perlakuan selama 3 dan 6 minggu. Pada akhir perlakuan mencit diambil darahnya dan diperiksa kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dengan menggunakan teknik *flow cytometry*. Hasil penelitian dianalisis dengan uji ANOVA dan uji T, dengan Interval Kepercayaan 95%.

Analisis hasil penelitian ini menunjukkan bahwa: 1) pemberian ekstrak teh hijau dengan dosis 0,52 mg (Kelompok B) dapat menaikkan kadar sel T CD4⁺ secara bermakna dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diberi ekstrak teh hijau (kelompok A) dan kelompok yang diberi ekstrak teh hijau sebanyak 1,04 mg (Kelompok C) 2) Terdapat

perbedaan yang bermakna pada pemberian merkuri secara inhalasi tanpa pemberian ekstrak teh hijau antara 3 dan 6 minggu, dimana terjadi penurunan kadar sel T CD4⁺ secara bermakna pada mencit yang terpapar merkuri selama 6 minggu. 3) Terjadi penurunan kadar sel T CD4⁺ secara bermakna setelah 6 minggu dengan pemberian 1,04 mg ekstrak teh hijau (kelompok C) dibandingkan selama 3 minggu 4) Tidak terdapat perbedaan yang bermakna di antara rerata kadar sel T CD8⁺ pada semua kelompok, pada perlakuan selama 3 minggu maupun 6 minggu.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau berpengaruh terhadap kadar sel T CD4⁺, berperan sebagai immunomodulator, dapat menaikkan dan menurunkan kadar sel T CD4⁺ pada dosis tertentu, tetapi tidak berpengaruh terhadap kadar sel T CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri.

Kata kunci: Merkuri (Hg), inhalasi, ekstrak teh hijau, sel T CD4⁺, sel T CD8⁺



ABSTRACT

Mercury (Hg) is a chemical substance which has been used widely in dental practice as the restoration substance, that has been as a mixture into the amalgam. Mercury is well-known as metal toxic, formed free radical that induced oxidative stress, and further, many diseases will raise. Patient and dental health care workers have very high risk of mercury, but the dental health care workers have more risk than the patients because they could exposed continuously. Mercury can be absorbed through the skin or swallowed, but the ultimate risk of dental health care worker is derived from vapor of mercury. Mercury is very dangerous in liquid form. Mercury vapor could be absorbed or inhaled through alveolus in lung up to 80%. Some researches mentioned that mercury could effect immune system, increased or decreased CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte T cell level. Tea is a drink which much consumed by people in wide world. Green tea contains high polyphenol as a strong antioxidant. It function as an effective scavenger to prevent free radical resulted by mercury. Polyphenol of green tea had also an ability to chelate metal ions and could increase antioxidant enzyme activities (GPX, SOD, and catalase) in the body.

The aim of this study was to find out the effect of administering of green tea extract toward CD4⁺ and CD8⁺ T cells level in mice which exposed by mercury.

This study was pure experimental with factorial design because it used 2 factors of time administering and 3 factor of dosage administering. This study used white mile mice (*Mus musculus*), 36 mice, \pm 2.5 months of ages with 20-25 grams body weight. Mice were divided into 6 groups by simple random. Each group consists of 6 mice . Group A was a control group, which is only induced with mercury without green tea extract. Group B was induced with mercury and administered with 0,52 mg green tea extract. Group C was induced with mercury and administered with 1,04 mg green tea extract. Each group A, B and C were administered the treatment for 3 and 6 weeks. At the end of treatment, blood was taken in order to analyzed its CD4⁺ and CD8⁺ T cells level by using flowcytometry technique. Result of study were analyzed by using ANOVA test and T Test, with 95% confidence interval.

The analyzed of this result showed that: 1) treatment which administered with green tea extract with 0,52 mg dosage (group B) could increased CD4⁺ T cells level significantly compared to the mice group without administered green tea extract (group A) and a group with administered 1,04 mg green tea extract (group C). 2) There was significant difference in administered of mercury by inhalation without administered green tea extract between 3 and 6 weeks, were it took placed the decreased of CD4⁺ T cells level significantly in mice which were exposed by mercury for 6 weeks. 3) Significant difference also happened in group C that was exposed by mercury with administered 1,04 mg green tea extract for 3 weeks and 6 weeks. There was significant decrease CD4⁺ T cells level after 6 weeks. 4) There was no significant difference among mean of CD8⁺ T cells level in all group in treatments for 3 and 6 weeks.

This study concluded that administering of green tea extract affected CD4⁺ T cells level, act as immunomodulator, could increase and decrease CD4⁺ T cells in certain dosage, but it did not affect CD8⁺ T cells level in mice which was exposed by mercury.

Keywords: Mercury (Hg), inhalation, green tea extract, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells.

Judul Penelitian : Pengaruh Pemberian Ekstrak Teh Hijau (*Camellia Sinensis*) Terhadap Sel Imunokompeten Pada Mencit Putih Yang Terpapar Merkuri (Hg). Suatu Eksperimental Murni Laboratorium Pada Mencit Putih (*Mus musculus*)

Nama Mahasiswa : Dhona Afriza

Nomor Pokok : 07 212 001

Program Studi : Ilmu Biomedik

Tesis telah diuji dan dipertahankan di depan sidang Panitia Ujian Akhir Magister Biomedik pada Program Pascasarjana Universitas Andalas dan dinyatakan lulus pada tanggal 31 Juli 2009

Menyetujui
1. Komisi Pembimbing,



Prof. Dr.dr. Yanwirasti, PA
Ketua



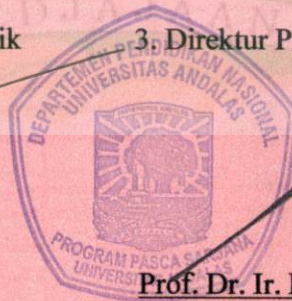
Dra. Eti Yerizel, MS
Anggota

2. Ketua Program Studi Ilmu Biomedik



Dr.dr. Adnil Edwin Nurdin, SpKj
NIP. 140 050 497

3. Direktur Program Pascasarjana Unand



Prof. Dr. Ir. H. Novirman Jamarun M.Sc
NIP. 130 819 552

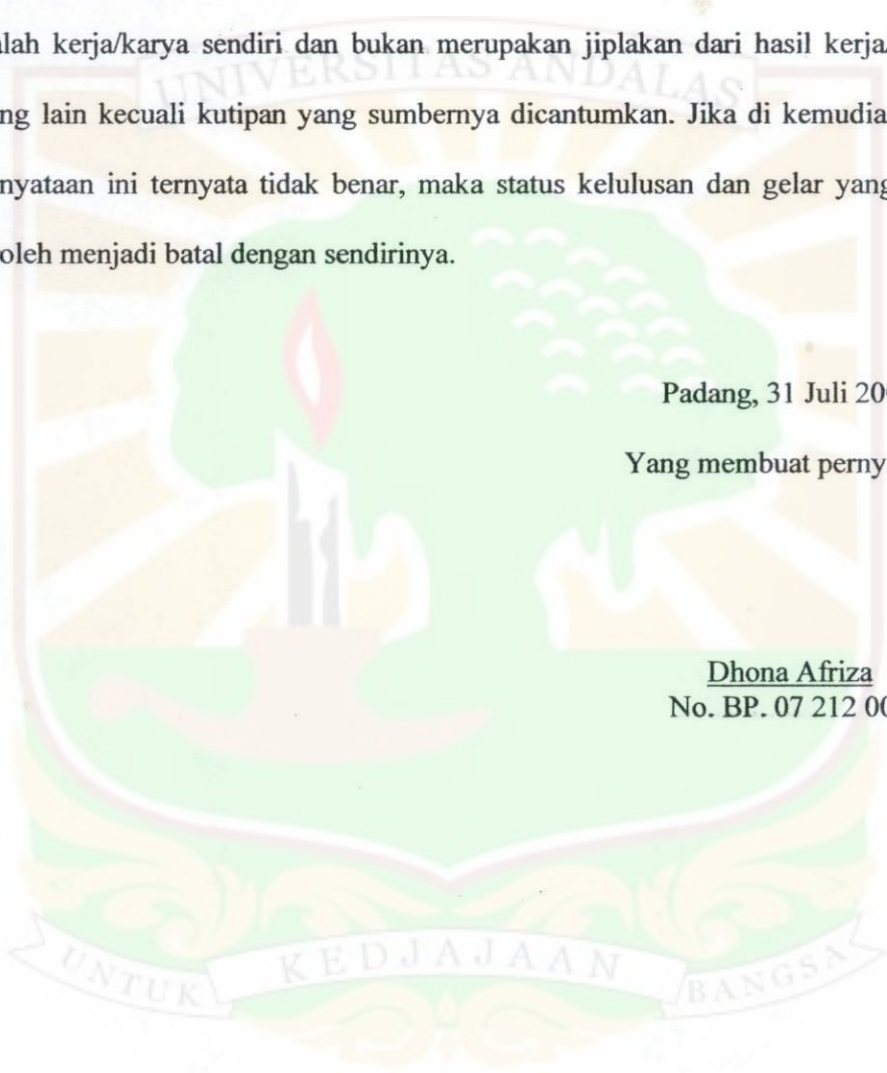
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini Saya menyatakan bahwa isi tesis yang Saya tulis dengan judul: **Pengaruh Pemberian Ekstrak Teh Hijau (*Camellia Sinensis*) Terhadap Sel Imunokompeten Pada Mencit Putih Yang Terpapar Merkuri (Hg). Suatu Eksperimental Murni Laboratorium Pada Mencit Putih (*Mus musculus*)** adalah kerja/karya sendiri dan bukan merupakan jiplakan dari hasil kerja/karya orang lain kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika di kemudian hari pernyataan ini ternyata tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, 31 Juli 2009

Yang membuat pernyataan,

Dhona Afriza
No. BP. 07 212 001



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bukittinggi sebagai anak pertama dari Ayah Aslim, SH dan Ibu Ermi Zein (Almh) pada tanggal 23 April 1972.

Tahun 1977 sampai dengan 1979, penulis mengikuti pendidikan di Taman kanak-kanak Cendrawasih V Padang.

Tahun 1979 sampai dengan 1984, penulis mengikuti pendidikan di Sekolah Dasar Negeri No. 1 Padang.

Tahun 1984 sampai dengan 1985, penulis mengikuti pendidikan di Sekolah Dasar Negeri No. 4 Sawahlunto

Tahun 1985 sampai dengan 1988, penulis mengikuti pendidikan di Sekolah Menengah Pertama Negeri 1 Sawahlunto.

Tahun 1988 sampai dengan 1991, penulis mengikuti pendidikan di Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Padang.

Penulis memperoleh gelar Dokter Gigi pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran tahun 1998.

Tahun 1998 sampai dengan 2001 penulis bekerja sebagai Dokter Gigi Pegawai Tidak Tetap (PTT) di Puskesmas Sicincin Kabupaten Padang Pariaman Sumatera Barat.

Tahun 2004 sampai sekarang penulis bekerja sebagai Dosen Tetap Yayasan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah.

Sejak 1 Januari 2005 penulis diangkat sebagai dosen PNSD pada Kopertis Wilayah X, dan ditempatkan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah.

Pada tahun 2007 penulis memperoleh kesempatan meneruskan pendidikan pada Program Magister Biomedik Pascasarjana Universitas Andalas.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji Syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan segala-galanya, Karunia, Taufik dan HidayahNya, sehingga penulis mendapat kekuatan, semangat, ketabahan serta tuntunanNya dalam menyelesaikan Tesis ini. Shalawat dan Salam kepada Rasulullah SAW beserta keluarganya, yang telah menjadi panutan terbaik bagi umat yang membawa cahaya Islam. Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Banyak kesulitan dan hambatan yang penulis alami dalam penelitian dan penyelesaian Tesis ini. Namun berkat Rahmat dan RidhoNya, serta bimbingan, dorongan dan bantuan dari berbagai pihak akhirnya Tesis ini dapat penulis selesaikan. Maka dari itu dengan hati yang tulus dan dengan penuh rasa Syukur penulis sampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. dr. Yanwirasti, PA sebagai pembimbing utama, yang telah dengan ikhlas dan penuh kesabaran tanpa rasa lelah, dalam membimbing, memotivasi, memperluas wawasan keilmuan serta memberikan saran dan dukungan moril kepada saya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Semoga Allah selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Juga kepada Dra. Eti Yerizel, MS. sebagai pembimbing pendamping, yang telah meluangkan waktu membimbing, mengoreksi, memberikan saran dan menambah wawasan keilmuan kepada penulis dalam penulisan tesis ini. Semoga Allah selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Demikian juga kepada:

1. Ketua Program Studi S-2 Biomedik Pascasarjana Universitas Andalas, Dr. dr. Adnil Edwin Nurdin, SpKj.
2. Staf Pengajar di Program S-2 Biomedik Pascasarjana Universitas Andalas, yang telah membimbing dan memberikan pengetahuan kepada penulis.
3. Rektor Universitas Baiturrahmah Prof. Ir. Firdaus Rivai M.Sc atas izin yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti Program Magister Biomedik Program Pascasarjana Universitas Andalas.
4. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah drg. R.Rama Putranto, MKes., Ph.D., yang telah memberikan izin kepada penulis untuk mengikuti Program Magister Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Andalas.
5. Staf karyawan S-2 Biomedik Pasca Sarjana Universitas Andalas

6. Staf karyawan Perpustakaan Kedokteran Universitas Andalas
7. Bapak Syafriman, SPt., dari Laboratorium Farmakologi Universitas Andalas yang telah membantu penulis dalam pemeliharaan hewan coba dan memberikan perlakuan percobaan pada penelitian ini
8. Kepala Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Kanker Dharmais Jakarta beserta staf yang telah membantu penulis dalam pemeriksaan kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺ mencit putih, khususnya dr. Liana Setiawan, SpPK yang sangat peduli dan telah banyak menolong penulis terutama dalam pemesanan reagent yang diperlukan.
9. Semua guru-guru sejak mulai sekolah taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi, yang telah banyak memberikan ilmu, sampai penulis dapat menyelesaikan pendidikan ini.
10. Semua rekan dan sahabat terutama Kosterman (terima kasih atas semua infonya), kelompok "Laskar Imun"(terima kasih atas kerjasama yang baik, semoga kita bisa menjalin persahabatan ini seterusnya).
11. Papa Aslim, SH dan Mama Ermi Zein (Almh) yang selalu memberikan kasih sayang, semangat, do'a dan dorongan untuk maju. Terima kasih atas segalanya, Semoga Allah SWT mengampuni segala dosa dan menerima amal ibadah Mama dan menempatkan Mama di tempat yang paling mulia di sisiNya.
12. Adik-adik yang selalu memberikan dorongan, semangat dan doa.
13. Suami dan anak-anakku TriFa (Fajar, Fathan dan Faruq), yang selalu menjadi sumber inspirasi dan pemberi semangat kepada penulis.
14. Dewi yang telah sangat membantu di rumah dalam mengasuh anak-anak
15. Kepada semua pihak dan teman-teman yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan dorongan selama menempuh pendidikan ini.

Semoga segala bantuan yang diberikan mendapat imbalan dari Allah SWT, dan semoga Allah SWT selalu memberikan petunjuk, rahmat dan hidayahNya kepada kita semua. Amin Ya Rabbal Alamin.

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
ABSTRACT	iii
RIWAYAT HIDUP	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	9
1.3. Tujuan Penelitian	9
1.3.1. Tujuan Umum	9
1.3.2. Tujuan Khusus	9
1.4. Manfaat penelitian	9
1.4.1. Untuk perkembangan ilmu pengetahuan	9
1.4.2. Untuk Kepentingan Masyarakat	10
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1. Sistem Imun	11
2.1.1. Limfosit T	12
2.1.2. Limfosit B	13
2.2. Komposisi Amalgam	15
2.2.1. Sifat-sifat Fisik dan Kimia Amalgam	16
2.2.2. Penatalaksanaan Tambalan Amalgam	17
2.3. Jenis Merkuri	18
2.3.1. Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi Merkuri	19
2.3.2. Pengaruh Merkuri Terhadap Organ/Sistem Tubuh	22
2.3.2.1. Pengaruh Merkuri Terhadap Sistem Syaraf	25
2.3.2.2. Pengaruh Merkuri Terhadap Ginjal	25
2.3.2.3. Pengaruh Merkuri Terhadap Sistem Reproduksi, Kehamilan dan Janin	26
2.3.2.4. Pengaruh Merkuri Terhadap Sistem Kardiovaskuler	27
2.3.2.5. Pengaruh Merkuri Terhadap Respon Imun	28
2.3.2.6. Pengaruh Merkuri Terhadap Stres Oksidatif	32
2.4. Radikal Bebas	34
2.4.1. <i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i>	37
2.5. Stres Oksidatif	41

2.6. Antioksidan	42
2.6.1. Parameter Status Antioksidan	44
2.7. Teh Hijau Sebagai Antioksidan	45
2.7.1. Komposisi Teh Hijau	46
2.7.2. Pengaruh Polifenol Terhadap Radikal Bebas	48
2.5.2.1. Pengaruh Polifenol Terhadap Antioksidan Tubuh	50
2.5.3. Pengaruh Polifenol Terhadap Sistem Imun	51
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	53
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	53
3.2. Hipotesis Penelitian	55
BAB IV. METODE PENELITIAN	56
4.1. Jenis Penelitian.....	56
4.2. Rancangan Penelitian	56
4.3. Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel ..	57
4.3.1. Populasi Penelitian	57
4.3.2. Sampel Penelitian	57
4.3.3. Besar Sampel	57
4.3.4. Teknik Pengambilan Sampel	58
4.4. Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel	58
4.4.1. Klasifikasi Variabel	58
4.4.2. Definisi Operasional Variabel	59
4.5. Bahan dan Instrumen Penelitian	59
4.5.1. Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian	59
4.5.2. Instrumen Penelitian	60
4.6. Persyaratan Etik	60
4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian	61
4.8. Prosedur atau Pengumpulan Data	61
4.8.1. Kerangka Operasional Penelitian	62
4.9. Pengolahan dan Analisa Data	62
BAB V. HASIL PENELITIAN	63
5.1. Pengaruh lama pemberian dan dosis ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4 ⁺ pada mencit yang terkontaminasi merkuri	63
5.2. Pengaruh lama pemberian dan dosis ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD8 ⁺ pada mencit yang terkontaminasi merkuri	66
BAB VI. PEMBAHASAN	70
6.1. Pengaruh lama pemberian dan dosis ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4 ⁺ pada mencit yang terkontaminasi merkuri	70
6.2. Pengaruh lama pemberian dan dosis ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD8 ⁺ pada mencit yang terkontaminasi merkuri	73
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	75
6.1. Kesimpulan	75
6.2. Saran	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN	81

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1. Identifikasi subset limfosit T	13
Tabel 2.2. Efek-efek merkuri pada sistem imun	32
Tabel 2.3. Senyawa oksigen reaktif	39
Tabel 5.1. Perbedaan rerata kadar sel T CD4 ⁺ menciit putih yang terpapar merkuri pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian ekstrak teh hijau ..	63
Tabel 5.2. Hasil analisis kadar sel T CD4 ⁺ pada berbagai kelompok berdasarkan dosis pemberian ekstrak teh hijau selama 3 minggu	64
Tabel 5.3 Hasil analisis kadar sel T CD4 ⁺ pada berbagai kelompok berdasarkan dosis pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu	65
Tabel 5.4. Hasil analisis uji T kadar sel T CD4 ⁺ pada masing-masing kelompok berdasarkan lama pemberian ekstrak teh hijau	65
Tabel 5.5. Rerata kadar sel T CD8 ⁺ menciit putih yang terpapr merkuri pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian ekstrak teh hijau	66
Tabel 5.6. Hasil analisis kadar sel T CD8 ⁺ pada berbagai kelompok berdasarkan dosis pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu	67
Tabel 5.7. Hasil analisis kadar sel T CD8 ⁺ pada berbagai kelompok berdasarkan dosis pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu	68
Tabel 5.8. Hasil analisis kadar sel T CD8 ⁺ pada masing-masing kelompok berdasarkan lama pemberian ekstrak teh hijau	68

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1. Gambaran respon imun spesifik (*acquired immune response*)14

Gambar.2.2. Struktur kimia *Epigallocatechin-3-gallate*, polifenol teh hijau47



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1a. Hasil Perhitungan Kadar Sel T CD4 ⁺ pada kelompok 3 minggu	..81
Lampiran 1b. Hasil Perhitungan Kadar Sel T CD4 ⁺ pada kelompok 6 minggu	..83
Lampiran 2a. Hasil Perhitungan kadar Sel T CD8 ⁺ pada kelompok 3 minggu	..85
Lampiran 2b. Hasil Perhitungan Kadar Sel T CD8 ⁺ pada kelompok 6 minggu	..86
Lampiran 3. Hasil Perhitungan Perbandingan Kadar sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada 3 dan 6 minggu87
Lampiran 3a. Uji T sel T CD4 ⁺ kelompok A (3 dan 6 minggu)88
Lampiran 3b. Uji T sel T CD8 ⁺ kelompok A (3 dan 6 minggu)89
Lampiran 3c. Uji T sel T CD4 ⁺ kelompok B (3 dan 6 minggu)90
Lampiran 3d. Uji T sel T CD8 ⁺ kelompok B (3 dan 6 minggu)91
Lampiran 3e. Uji T sel T CD4 ⁺ kelompok C (3 dan 6 minggu)92
Lampiran 3f. Uji T sel T CD8 ⁺ kelompok C (3 dan 6 minggu)93
Lampiran 4. Hasil Pemeriksaan Kadar Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ dengan Teknik <i>Flow Cytometry</i>94
Lampiran 5. Gambar alat dan perlakuan penelitian130

B A B I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Merkuri (Hg) merupakan zat kimia yang sudah lama digunakan secara luas di bidang kedokteran gigi sebagai bahan restorasi, yaitu sebagai campuran pada amalgam. Amalgam merupakan bahan tambal yang paling lama, sejak \pm 150 tahun yang lalu. Amalgam sebagai bahan tumpatan gigi terutama gigi bagian posterior masih banyak digunakan sekarang ini, baik di dalam maupun di luar negeri. Amalgam mempunyai keuntungan yang tidak dipunyai bahan tumpatan lain, antara lain dalam hal kekuatan terhadap tekanan pengunyahan, ekonomis dan teknik manipulasi yang mudah (Phillips,1994; Sturdevant,1995; Yusuf,1996; Anusavice,1996; Baum,1997; Cline, 2007).

Menurut WHO, merkuri dapat ditemukan dalam berbagai bentuk senyawa kimia dan termasuk logam yang sangat beracun. Semua senyawa Hg bersifat toksik untuk makhluk hidup bila memajan manusia dalam jumlah yang cukup dan dalam waktu yang lama. Senyawa Hg akan tersimpan secara permanen di dalam tubuh, yaitu terjadi inhibisi enzim dan kerusakan sel sehingga kerusakan tubuh dapat terjadi secara permanen (Inswiasri, 2008).

Pasien maupun personil kesehatan gigi sangat beresiko terhadap keracunan merkuri, tetapi personil kesehatan gigi lebih beresiko karena mereka bisa terpapar secara terus-menerus. Merkuri dapat diabsorpsi menembus kulit atau tertelan, tetapi resiko utama dari personil kesehatan gigi adalah dari menghirup uapnya. Merkuri sangat berbahaya dalam bentuk cairan. Uap merkuri dapat terhirup atau terabsorpsi melalui alveolus di paru-paru sampai 80% (Sumawinata,1991; Phillips,1994; Sturdevant,1995; Hultman,1998; Craigh,2000; Ochocka,2007; Inswiasri, 2008).

Penelitian pendahuluan yang dilakukan pada mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah tahun 2008, terdapat 73,33% mahasiswa yang tercemar merkuri dalam darahnya. Tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara jumlah melakukan penambalan amalgam dan jumlah gigi yang ditambal dengan amalgam dengan kadar merkuri dalam darah.

Bahaya yang ditimbulkan karena pencemaran merkuri ini cukup banyak, antara lain dapat menyebabkan *Multiple Sclerosis*, penyakit *Alzheimer*, gangguan sistem kardiovaskuler, penurunan fungsi imun, penyebab penyakit autoimun dan disebutkan juga bahwa merkuri sebagai “*a potent killer*” sel darah putih, gangguan pendengaran, gangguan fungsi ginjal, gangguan pada kehamilan, impotensi, *autisme*, *Parkinson's disease* sampai pada kematian (Phillips,1994; Sturdevant,1995; Baum,1997; Hu,1999; Craigh,2000; Rizvi,2005; Cline,2005; Larsen,2005; Singh,2007; Anonymous,2006; Maloney,2007).

Sel-sel imunokompeten utama adalah limfosit T (sel T) dengan berbagai subsetnya (T-helper, T-supresor, T-sitotoksik) dan limfosit B (sel B) (Selgrade,2004; Stine and Brown, 2006; Kresno,2007). Limfosit T memegang peranan penting dalam mengontrol respon imun secara keseluruhan (Kresno,2007). Sel T helper merupakan sel regulator yang mempunyai petanda permukaan CD4 (berjumlah 60% dari sel T), sel T sitotoksik merupakan sel efektor yang dapat membunuh sel yang terinfeksi dengan petanda permukaan CD8 (33% dari sel T dalam darah) (Darwin,2004; Kresno,2007).

Para peneliti melaporkan bahwa merkuri mempunyai kemampuan dalam aktivasi imun, memicu penyakit autoimun dan secara simultan dapat mengurangi respon imun selular maupun humoral (Hu,1997; Crinnion,2000). Secara *in vitro* terpajannya *peripheral blood leucocytes* dengan *metyl mercury* menghasilkan penekanan respon proliferasi sel B (0,1 µg/g dan 0,35 µg/g) dan sel T (0,7 µg/g) (Day,2007). Secara *in vivo*,

pajanan merkuri menambah respon limfosit T pada tikus BALB/c dan berkurang pada tikus *hybrid Swiss* dan (B6 x C3) F1. Merkuri juga menyebabkan apoptosis dan nekrosis pada bermacam-macam galur sel T (Bigazzi, 1999). Injeksi subkutan HgCl₂ tiga kali seminggu sebanyak 100µg HgCl₂/100gr berat badan, pada hari ke 15 memperlihatkan penambahan yang signifikan pada sejumlah sel-sel limfonodus seperti sel T CD4⁺, CD8⁺ dan sel-sel T total dibandingkan dengan tikus *naïve*. Penambahan yang signifikan pada semua populasi sel ini juga diobservasi segera setelah 3 hari sesudah injeksi HgCl₂. Tikus LEW yang tidak terpengaruh yang diinjeksi dengan HgCl₂ menunjukkan penambahan yang signifikan pada sejumlah sel-sel limfonodus, CD8⁺ dan total sel-sel T limfonodus pada hari ke 15, tetapi tidak pada hari ke 3 (Fillion, 1997).

Secara *in vivo*, pada tikus yang *susceptible* maupun yang resisten menggunakan marker aktivasi CD45RB ditemukan sel T CD4⁺ teraktivasi sama luasnya. Studi ini mengemukakan bahwa limfosit dari hewan yang resisten mempunyai respon yang potensial terhadap merkuri, tetapi regulasi respon ini belum diketahui mekanismenya. Secara *in vitro* merkuri menginduksi respon proliferasi yang tinggi pada tikus yang *susceptible* dalam aktivasi sel T CD4⁺, sedangkan pada tikus yang resisten responnya rendah dan hanya sel T CD8⁺ yang berubah. Tidak diketahui apa mekanisme respon yang rendah pada limfosit dari tikus yang resisten secara *in vitro*. Dengan autoradiografi terlihat ion merkuri berikatan dengan limfosit dengan cepat sekitar 15 menit setelah penambahan isotop, dan terlihat berikatan kuat setelah 48 jam. Hal ini memberikan kesan bahwa dalam waktu pendek kontak antara ion merkuri dengan limfosit cukup untuk aktivasi. Secara *in vitro*, *mercury chloride* menyebabkan proliferasi respon imun yang kuat pada tikus BALB/C. Pada tikus yang resisten, inkubasi dengan merkuri selama 1 hari juga cukup untuk menginduksi secara signifikan proliferasi limfosit limpa (Hu, 1997).

Kim Hyun Sang et al, pada tahun 2003 meneliti mencit jenis BALB/c jantan yang dipajan secara terus menerus dengan Hg pada dosis 0; 0,3; 1,5; 7,5 dan 37,5 ppm dalam air minum selama 14 hari. Kadar leukosit meningkat pada paparan Hg tertinggi. Kadar Hg 1,5 – 37,5 ppm kadar limfosit T CD3⁺ dalam limpa menurun. Limfosit T CD4⁺ dan CD8⁺ *single positive* menurun. Paparan 7,5 – 37,5 ppm Hg sel T CD8⁺ dalam timus menurun, sebaliknya *double positive* CD4⁺/CD8⁺ dan CD4⁺ tidak berubah. Hasil menandakan bahwa penurunan limfosit T dalam organ imun merubah ekspresi gen sitokin mungkin merupakan kontribusi Hg organik pada efek imunotoksik (Inswiasri, 2008). Pengurangan yang signifikan kadar serum IgG dan IgA, tetapi tidak IgM, IgD dan IgE telah diobservasi pada pekerja yang terpapar dengan uap merkuri secara klinis (Anonymous, 2001).

Satu studi menyebutkan penambalan dengan amalgam menyebabkan penekanan sejumlah limfosit T dan merusak rasio T-4/T-8. Merkuri juga menghambat sintesis RNA dan DNA sel T dan sel B. Penghambatan fungsi ini sebanyak 50% terjadi secara cepat pada kadar yang sangat rendah, antara 10-25 µg/L (Windham, 2001).

Merkuri mempunyai kemampuan menyebabkan kerusakan pada tingkat selular, bisa menyebabkan kerusakan pada platelet dan eritrosit. Merkuri bisa menyebabkan perpecahan yang hebat dari mikrotubul pada platelet dan eritrosit dan efek ini lebih ditemukan pada eritrosit dibanding platelet. Efek mikrotubul ini juga ditemukan pada otak dan menghasilkan perpecahan pada siklus sel. Perpecahan ini dapat menyebabkan apoptosis pada sel neuron dan non neuron. Merkuri juga bisa menyebabkan apoptosis pada monosit dan limfosit, sehingga menyebabkan pengurangan aktifitas fagosit monosit. Mekanisme ini menyebabkan pengurangan *Gluthatione* (GSH) yang memudahkan terjadinya kerusakan oksidatif sel. Merkuri mengikat GSH secara *irreversible*, menyebabkan lepasnya dua molekul GSH per molekul merkuri. Kompleks GSH-Hg-GSH

diekskresikan melalui empedu ke feses. Pada saat yang sama merkuri menghambat aktivitas GSH sintetase. Merkuri bisa memicu pembentukan hidrogen peroksida, lipid peroksidasi, radikal hidroksil dan kerusakan struktur protein. Hal ini membuktikan bahwa merkuri sebagai penyebab ketidakseimbangan oksidan (radikal bebas) dan antioksidan, dan ini bisa menimbulkan stres oksidatif pada jaringan dan organ tubuh bisa masuk ke dalam sel dan merusak sel. Kemampuan merkuri menghasilkan radikal bebas sangat luar biasa. (Crinnion,2000 ; Windham,2001; Larsens,2007). Hg diketahui dapat menghambat sintesis RNA dan DNA dan menahan laju siklus sel pada limfosit B (Windham,2001).

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif, karena memiliki elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya. Molekul tersebut bersifat reaktif dalam mencari pasangan elektronnya. Jika sudah terbentuk dalam tubuh maka akan terjadi reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas baru yang akhirnya jumlahnya terus bertambah. Reaksi ini akan terus berlanjut sampai radikal bebas itu dihilangkan oleh reaksi dengan radikal bebas lain atau sistem antioksidan tubuh. Kalau kelebihan radikal bebas dalam tubuh akan dapat mengganggu integritas sel dan dapat bereaksi dengan komponen-komponen sel, baik komponen struktural (molekul-molekul penyusun membran) maupun komponen fungsional (enzim-enzim dan DNA). Keadaan ini disebut dengan stres oksidatif, atau dengan kata lain stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas (prooksidan) dan antioksidan yang dipicu oleh dua kondisi umum: kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas. Atau stres oksidatif adalah penyerangan radikal bebas pada jaringan. Keadaan stres oksidatif membawa pada kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan, hingga ke organ tubuh, menyebabkan terjadinya percepatan proses penuaan dan munculnya berbagai penyakit kronis (Wijaya,1996; Sauriasari,2006; Vincent, 2006; Risher,2007; Larsens,2007).

Antioksidan adalah suatu zat yang bisa menangkal dan menangkap radikal bebas dalam tubuh. *Glutathione peroksidase* (GPx) adalah salah satu antioksidan primer dalam tubuh yang merupakan enzim utama yang memusnahkan hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh Superoksida dismutase (SOD) dalam sitosol dan mitokondria. GPx yang memusnahkan hidrogen peroksida mengandung selenium (Se) yang diperlukan untuk fungsi katalitik di tempat aktifnya. Enzim ini juga dapat menyingkirkan peroksida lipid dari membran sel (Wijaya,1996).

Akibat dari paparan Hg yang terus menerus maka akan terjadi penurunan aktivitas antioksidan dalam tubuh terutama *Glutathione peroksidase* (GPx). Penurunan aktivitas antioksidan ini akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel dalam tubuh, termasuk kerusakan membran sel limfosit T. Kerusakan membran sel limfosit T akan menyebabkan kerusakan sel limfosit T secara keseluruhan, yang ditunjukkan dengan petanda permukaan sel T yaitu CD4 dan CD8 juga akan berkurang. Maka untuk itu diperlukan antioksidan ekstraselular yang biasanya didapatkan dari makanan seperti vitamin C, Vitamin E dan polifenol teh hijau.

Teh merupakan minuman yang paling banyak dikonsumsi masyarakat di seluruh dunia. Teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah teh yang berasal dari pucuk daun teh yang sebelumnya mengalami pemanasan dengan uap air untuk menonaktifkan enzim-enzim yang terdapat dalam daun teh, kemudian digulung dan dikeringkan. Teh hijau identik dengan simbol minuman kesehatan (Wijaya,1997).

Kandungan kimiawi teh hijau sama seperti yang terkandung dalam daun teh segar, yaitu senyawa polifenol (*Flavanol, flafanol, flavone, flavanone, isoflavone, antocyanin*), teofilin, teobromin, vitamin C, vitamin E, vitamin B kompleks, serta sejumlah mineral seperti fluor, fosfor, kalsium, stronsium, Fe, Zn, Mg, dan Mo. Polifenol yang paling banyak ditemukan dalam teh hijau adalah monomer flavanol, yang dikenal sebagai

katekin. Katekin dalam teh hijau terdiri atas *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC). EGCG adalah katekin yang paling banyak di dalam teh hijau (Katiyar,1999; Frei and Higdon,2003; Anwar,2007).

Teh hijau mengandung polifenol yang merupakan antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibandingkan vitamin C dan 25 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin E. Polifenol bermanfaat untuk menangkap radikal bebas sehingga tidak mengoksidasi lemak, protein dan DNA dalam sel serta menghentikan perkembangbiakan sel-sel ganas (kanker). Flavonoid dalam polifenol adalah antioksidan yang sangat kuat yang merupakan *scavenger* untuk radikal anion, singlet oksigen, peroksi radikal lipid, dan juga dapat menghilangkan daya reaktif ion metal melalui penempelan (Wijaya,1997; Erba,et.al.,1999; Frei and Higdon,2003; Payne,2006; Abe,2007; Ping Hju,2007; Khomsan,2007; Sibuea,2007). Flavonoid (quercetin) sebanyak 47 μmol dapat mereduksi 50% kerusakan DNA limfosit manusia. Inkubasi sel Jurkat selama 24 jam dengan 15 $\mu\text{mol/L}$ EGCG cukup signifikan mengurangi kerusakan DNA. EGCG dapat menambah proteksi sel dari peroksidasi membran lipid dan kerusakan DNA (Erba et.al.,1999).

Polifenol yang terdapat pada sayuran dan buah-buahan adalah antioksidan sebagai *scavenger* yang efektif radikal bebas berupa gugus hidroksil yang memberikan mereka kemampuan untuk menyumbangkan elektron sehingga dapat melenyapkan radikal bebas. Untuk semua alasan ini, studi-studi terdahulu telah membenarkan peranan polifenol sebagai sistem imun. Telah dilaporkan bahwa flavonoid polifenol dapat menghindarkan proliferasi limfosit dan produksi IL-2. Khususnya quercetin menghambat immunoglobulin yang disekresikan oleh sel B yang distimulasi oleh mitogen. (Virnadell and Mitjans, 2008).

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) menyebabkan immunosupresi dan mengurangi produksi *Reactive Oxygen Intermediate*. Polifenol ini mempunyai efek yang besar sebagai *chemoprevention*. Percobaan pada polifenol teh hijau dapat menghambat lipid peroksida. EGCG dapat memberikan perlindungan kerusakan oksidatif dari DNA, dengan menembus *scavenging* langsung dari ROS. Penelitian ini juga telah memperlihatkan bahwa konsentrasi rendah polifenol teh hijau dapat mengurangi radikal hidroksil-penyebab kerusakan dasar dan kerusakan *DNA single strand*, oleh mekanisme transfer elektron dari katekin ke sisi radikal pada DNA. Secara *in vivo*, polifenol teh hijau juga menghambat UVB-penyebab petanda stres oksidatif pada binatang sebelum perlindungan radiasi UVB melawan deplesi *glutathione*, enzim antioksidan *glutathione peroxidase* dan katalase, mengurangi UV-penyebab lipid peroksidasi dan menghambat UVB-penyebab oksidasi protein. EGCG melindungi perlawanan UV-penyebab stress oksidatif pada manusia secara baik. (Yusuf,et.al.,2006). Aplikasi EGCG pada model *Chemopreventive* terlihat mampu untuk merangsang respon imun dalam pengembangan produksi sitokin tipe sel Th1 dan Th2 (Katiyar,et al.1999).

Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan pada tahun 2008, terdapat perbedaan yang signifikan kadar merkuri dalam darah pada mencit yang terpapar merkuri pada kelompok yang diberi ekstrak teh hijau dengan yang tidak diberi ekstrak teh hijau pada dosis 0,52 mg dan 0,78 mg/20 gr berat badan. Pada mencit yang diberi ekstrak teh hijau terdapat kadar merkuri dalam darah yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak teh hijau (Afriza,2008).

Dari latar belakang yang telah diuraikan, peneliti ingin mengetahui lebih jauh, apakah ada pengaruh ekstrak teh hijau terhadap kadar Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri. Penelitian ini menggunakan teknik *flowcytometry*, untuk melihat kadar sel limfosit T sel T CD4⁺ dan CD8⁺.

1.2. Perumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah diuraikan dapat dirumuskan masalah yaitu :

1. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ pada mencit yang terpapar merkuri?
2. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum:

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap sel imunokompeten pada mencit yang terpapar merkuri.

1.3.2. Tujuan Khusus:

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ pada mencit yang terpapar merkuri
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Untuk perkembangan ilmu pengetahuan

Penelitian ini mempunyai manfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan karena dapat mengetahui pengaruh merkuri sebagai radikal bebas terhadap sistem imun, khususnya kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺. Selanjutnya penelitian ini juga memberikan manfaat bagi pengembangan pengetahuan terhadap manfaat teh hijau sebagai antioksidan yang kuat dalam menangkal radikal bebas khususnya merkuri yang dapat menyebabkan berbagai macam penyakit.

1.4.2. Untuk kepentingan masyarakat

Penelitian ini memberikan informasi yang bermanfaat pada masyarakat khususnya dokter gigi tentang efek samping merkuri yang biasa digunakan sebagai bahan tambal gigi terhadap kesehatan. Penelitian ini juga memberikan informasi yang bermanfaat tentang minuman teh hijau sebagai minuman yang bermanfaat bagi kesehatan.



B A B II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sistem Imun

Sel-sel sistem imun meliputi beberapa tipe leukosit (sel-sel darah putih) yang berasal dari sumsum tulang. Semua sel yang berfungsi dalam respon imun diketahui berasal dari sel induk pluripoten yang kemudian berdiferensiasi melalui dua jalur, yaitu: a) jalur limfoid yang membentuk limfosit dan subsetnya; b) jalur myeloid yang membentuk sel-sel fagosit dan sel-sel lain (Kresno,2001; Selgrade,2004).

Peristiwa-peristiwa penting yang terjadi selama berdiferensiasi di dalam timus adalah: 1) pembentukan berbagai reseptor antigen; 2) seleksi sel T aktif fungsional yang dapat mengenal antigen yang disajikan bersama molekul *self-MHC*; 3) eliminasi selektif sel-sel T autoreaktif; 4) diferensiasi populasi sel T yang mengekspresikan CD4 atau CD8 (Kresno, 2001).

Leukosit bersirkulasi ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah dan limfe dan populasi jaringan limfoid yang lain, meliputi limpa, limfonodus (yang menyebar di seluruh tubuh), tonsil dan adenoid, seperti kumpulan jaringan limfoid di paru-paru, usus, dan kulit yang dikenal sebagai *bronchus-, gut- and skin- associated lymphoid tissue* (BALT, GALT, and SALT). Sel-sel imun juga dapat direkrut pada hampir banyak jaringan di tubuh dimana terjadi injuri atau infeksi. Akumulasi leukosit di jaringan karena respon terhadap injuri dikenal dengan inflamasi. Sitokin (seperti: interleukin, interferon dan kemokin), mediator *soluble* dihasilkan oleh sel-sel imun demikian juga sel-sel diluar sistem imun, mengontrol maturasi, diferensiasi dan mobilisasi sel-sel imun. Respon imun dibagi menjadi respon imun nonspesifik dan respon imun spesifik (Selgrade,2004; Stine and Brown,2006).

Granulosit, sel *Nature Killer* (sel NK) dan makrofag merupakan mediator yang penting dalam *innate immunity*. Granulosit mempunyai kapasitas untuk fagosit agen-agen infeksi atau partikel-partikel tipe lain dan menghancurkan atau memindahkan mereka keluar jaringan. Mereka melepaskan bermacam-macam mediator soluble yang dapat membunuh organisme yang menyerang, menambah permeabilitas vascular, dan merekrut lebih banyak leukosit ke jaringan. Sel NK adalah limfosit granular yang besar yang nonspesifik membunuh tumor dan sel-sel yang terinfeksi virus. Makrofag juga merupakan fagosit, dapat melepaskan sitokin kemotaktik dan sitotoksik, dan ketika diaktivasi, dapat membunuh sel-sel tumor atau infeksi virus. Mediator-mediator dilepaskan dari sel-sel ini selama respon inflamasi akut mempengaruhi perkembangan respon imun spesifik (Kresno,2001;Selgrade,2004).

Respon imun spesifik secara spesifik mengenal substansi asing (antigen) dan secara selektif mengeliminasinya. Limfosit T dan limfosit B (sel T dan sel B) memegang peranan mayor dalam respon imun spesifik (Gambar 2.1) (Selgrade, 2004; Stine and Brown, 2006).

2.1.1. Limfosit T

Sel T mengalami diferensiasi dan maturasi di dalam kelenjar timus. Sel-sel imunokompeten yang utama adalah limfosit T (sel T) dengan berbagai subsetnya (T-helper, T-supresor, sel T-sitotoksik) dan limfosit B (sel B) (Kresno, 2001; Selgrade, 2004). Penamaan subset limfosit T berdasarkan aktifitasnya adalah: 1) sel T sitotoksik (*cytotoxic T cell* T), merupakan sel efektor yang dapat membunuh sel yang terinfeksi. 2) Sel T helper (*helper T cell/Th*), merupakan sel regulator. Terdiri dari Th0 (*T naïve*), Th1 (*T inflammatory*), Th2 (*T helper*) dan Th3 (*T regulatory/Tr*) yang menyebabkan sel lain pada sistem imun menjadi sel efektor yang lebih baik. Sel Th membantu precursor Tc

untuk berkembang menjadi *killer cells*. Th juga membantu limfosit B untuk memproduksi antibodi dan meningkatkan fungsi efektor dari sel lain seperti makrofag. 3) sel T supresor (*suppressor T cells/Ts*) yang menghambat respon imun. Untuk mengidentifikasi populasi limfosit T dipergunakan marker atau penanda yang diekspresikan oleh molekul di permukaan sel, seperti terlihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Identifikasi subset limfosit T

Populasi limfosit T	Marker	Persentase dalam darah
Limfosit T	TCR	100% dari sel T (70% dari limfosit darah)
Limfosit T-helper (Th)	CD3	
	CD4	66% dari limfosit T
Limfosit T-cytotoxic/suppressor	CD8	33% dari limfosit T
Limfosit T yang diaktivasi	Reseptor IL-2	2-10% dari limfosit T
	Reseptor Transferin	
	Molekul HLA-kelas II	

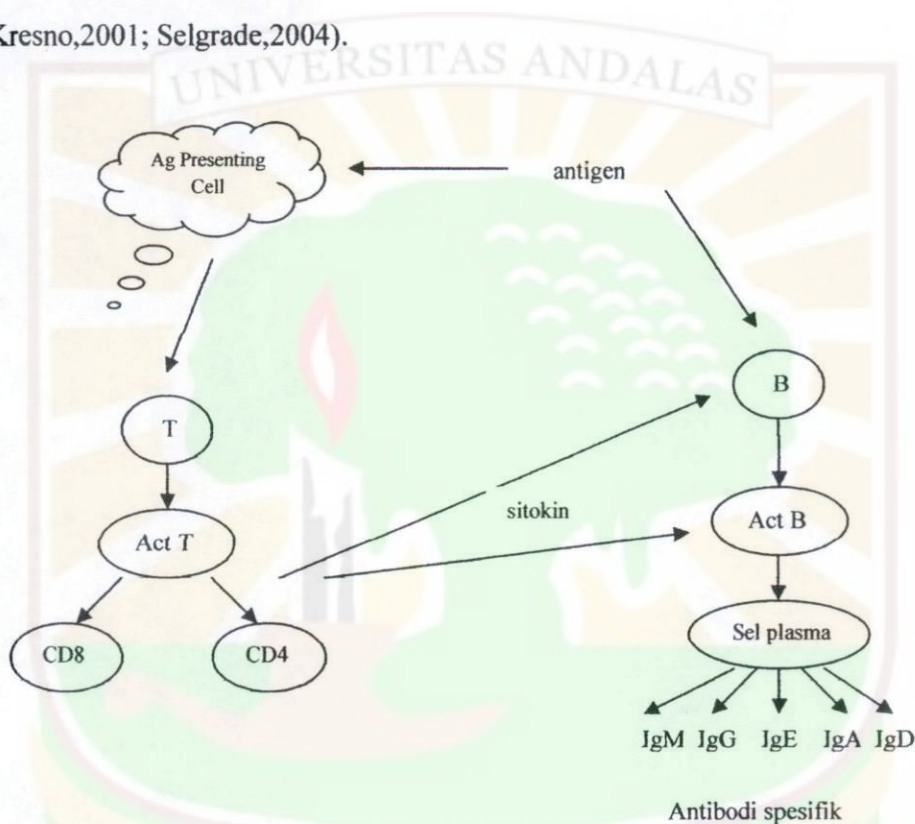
(dikutip dari Peakman dan Vergani, 1997; Basic and Clinical Immunology. London: Churchill Livingstone).

2.1.2. Limfosit B

Sel B adalah sel bertanggung jawab atas pembentukan imunoglobulin (Ig) dan merupakan 5-15% dari limfosit dalam sirkulasi darah. Limfosit B diproduksi sepanjang hidup manusia, walaupun jumlahnya menurun seiring dengan bertambahnya umur. Pada manusia limfosit B diproduksi pada hati janin dan pada minggu ke 12-16 ditransfer ke sumsum tulang. Pada manusia sel B berkembang mengambil tempat dalam tiga fase: fase inisial dalam sumsum tulang; pada tempat lain (misal, limfonodus, limpa) setelah keluar dari sumsum tulang; dan kemudian dalam pusat germinal limfonodus (Peakman dan Diego, 1997; Darwin, 2004).

Sel plasma merupakan fase diferensiasi terminal dari perkembangan sel B dalam upaya memproduksi dan mensekresi antibodi, merupakan protein yang soluble yang dikenal dengan imunoglobulin (Ig), yang bersirkulasi secara bebas dan bereaksi secara khusus dengan antigen. Terdapat beberapa kelas (*isotype*) imunoglobulin, yaitu IgM,

IgG, IgA, IgE dan IgD. Satu sel plasma dapat melepaskan beribu-ribu molekul antibodi setiap detik. Sel-sel pembentuk antibodi sebagian besar dijumpai ekstrasfolikuler misalnya dalam pulpa merah limpa, dan medula kelenjar getah bening. Sel-sel itu juga bermigrasi ke dalam sumsum tulang dan 2-3 minggu setelah terpapar antigen sumsum tulang merupakan tempat utama produksi antibodi. Sebagian besar sel plasma tidak beredar kembali secara aktif dan mempunyai jangka waktu hidup terbatas, mungkin beberapa minggu (Kresno,2001; Selgrade,2004).



Gambar 2.1. Gambaran respon imun spesifik (*acquired immune response*)
(dikutip dari: Selgrade,2004 : . Immunotoxicity. Dalam: A Textbook of Modern Toxicology.
Edited by Ernest Hodgson. Third edition. USA: Wiley-Interscience pp 327-342).

Sel T mengenal antigen yang dipresentasikan melalui *antigen-presenting cells* (APC) seperti makrofag atau sel dendritik. APCs memproses mempresentasikan kompleks fragmen peptida pendek dengan molekul *major histocompatibility* (MHC) pada permukaan APC. Presentasi dan proses ini dilakukan untuk aktivasi sel T. Terdapat dua divisi mayor sel T yang dipisahkan oleh ekspresi dari penanda permukaan sel yang

berbeda (CD4 dan CD8), CD4 diketahui sebagai sel T-helper karena membantu aktivasi sel B. Sel T CD-8 diketahui sebagai sel T sitotoksik karena melisis sel-sel yang diekspresikan khusus antigen tumor dan virus (Selgrade,2004).

2.2. Komposisi Amalgam

Dental amalgam merupakan campuran dari 45-50% merkuri yang dicampur dengan metal-metal toksik yang lain seperti perak, tembaga, timah, nikel, palladium, dan lain sebagainya (Hultman, 1998; Windham,2001; Inswiasri, 2008). Merkuri yang biasa dipakai sebagai bahan tambal gigi adalah dari golongan metal merkuri (elemental merkuri) (Cline,2005; Risher,2007). *American Dental Association Specification No. 1* mengharuskan aloi amalgam dominan mengandung perak dan timah. Elemen yang lain seperti tembaga, seng, emas dan merkuri diizinkan dalam konsentrasi yang lebih sedikit daripada perak dan timahnya. Tembaga menjadi pilihan yang penting dari aloi amalgam modern (Sturdevant,1995; Anusavice,1996; Baum,1997).

Perak pada aloi amalgam konvensional terdapat sekitar 40-70%. Efek umum dari perak adalah membentuk senyawa logam dengan merkuri, yang sangat mempengaruhi perubahan dimensional yang terjadi selama pengerasan. Perak cenderung meningkatkan pemuaihan dan juga menambah kekuatan. Tembaga umumnya 6% atau kurang, ditambahkan ke dalam amalgam untuk meningkatkan kekuatan dan kekerasan. Tembaga juga cenderung meningkatkan pemuaihan selama pengerasan. Seng boleh ada boleh tidak. Umumnya digunakan untuk mengurangi dehidrasi dari logam lain yang ada dalam aloi. Proporsi aloi dan merkuri bervariasi untuk aloi yang berbeda dan untuk teknik khusus serta sifat penanganan yang diinginkan oleh dokter gigi. Jadi bergantung kepada aloi serta cara pencampurannya. Untuk aloi-aloi yang mutakhir yang butirannya kecil, rasio aloi-merkuri terus menurun. Penggunaan rasio yang setara dengan 50% merkuri sekarang

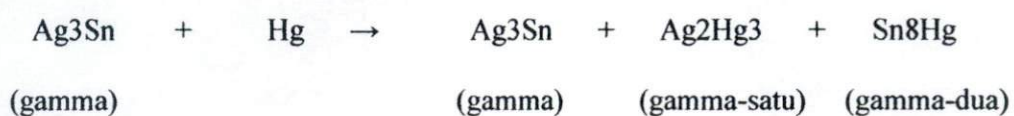
sudah umum dan untuk beberapa aloi bisa digunakan sampai 45% merkuri. (Reisbick,1992; Anusavice,1996; Craig et.al, 2000).

2.2.1. Sifat-sifat Fisik dan Kimia Amalgam

Amalgam adalah bahan yang paling banyak digunakan, khususnya untuk menambal gigi posterior. Kelemahan utama amalgam terletak pada warnanya dan tidak adanya adhesi terhadap jaringan gigi. Amalgam mengalami perubahan dimensi ketika pengerasan. Amalgam cenderung mudah korosi di dalam lingkungan mulut karena strukturnya yang heterogen, permukaannya yang kasar dan adanya lapisan senyawa oksida yang belum sempurna. Korosi ini mudah terjadi karena kontaminasi amalgam dengan air atau darah selama penambalan, dan juga karena penambalan amalgam yang kurang mampat. Amalgam merupakan bahan tambal yang cukup kuat menahan fraktur, tetapi kerusakan tepi sering terjadi karena pengerutan amalgam (Phillips,1994; Reisbick,1992; Baum,1997).

Amalgam dibuat dengan mencampurkan aloi Ag-Sn dengan Hg; hasilnya adalah pasta kental yang dapat dimasukkan ke kavitas sebelum mengeras. Reaksi yang terjadi selama pengerasan amalgam adalah rumit. Komponen utama dalam partikel aloi asli yang bereaksi dengan merkuri selama triturasi adalah fase gamma, Ag₃Sn. Awalnya akan terjadi absorpsi merkuri ke dalam partikel, diikuti oleh pengkristalan senyawa perak-merkuri (Ag₂Hg₃), fase gamma satu dan fase timah-merkuri (Sn₈Hg), fase gamma dua. Kristal-kristal ini membentuk pengerasan amalgam seperti yang terjadi pada pengerasan gips (Baum,1997). Reaksi yang terjadi adalah kurang lebih sebagai berikut :

Aloi perak-timah + Merkuri → Aloi perak-timah + merkuri-perak + timah-merkuri



2.2.2. Penatalaksanaan Tambalan Amalgam

Bubuk aloi disajikan dalam berbagai bentuk yakni bubuk yang dibotolkan dan dijual menurut beratnya, dipadatkan dalam bentuk pelet, atau didalam kapsul sekali pakai yang siap untuk dicampur. Hg bisa diperoleh dalam botol anti pecah atau dalam kapsul sekali pakai bersama-sama dengan aloinya. Hg merupakan zat yang berbahaya, dan dalam klinik gigi bahaya terutama timbul ketika Hg sedang terbuka atau dikeluarkan (Sturdevant,1995; Craig, et.al,1997; Craig, et.al,2000).

Amalgam dibuat dengan mencampurkan aloi Ag-Sn dengan Hg, hasilnya adalah pasta kental yang dapat dimasukkan ke kavitas sebelum mengeras. Proses pencampuran aloi dengan air raksa disebut dengan trituras amalgam. Agar amalgam yang dihasilkan mudah dimanipulasi, maka pencampuran aloi dengan Hg harus sempurna. Perbandingan aloi dengan Hg yang akan dicampur tergantung aturan dari pabrik amalgam yang digunakan (Sturdevant,1995; Craig, et.al,1997; Craig, et.al,2000).

Proses trituras amalgam dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu: secara konvensional, bubuk aloi dan Hg dicampur lalu digerus dengan menggunakan lumpang dan alu. Secara modern, dengan menggunakan alat yang disebut dengan amalgamator. Setelah dilakukan pencampuran aloi dan Hg, hasilnya adalah pasta kental, yang sebelum dimasukkan ke kavitas dibungkus dulu dengan kain kasa, dipelintir dan diperas untuk mengeluarkan kelebihan merkuri. Amalgam dibuka dari kain kasa dan diperiksa keplastisannya, kemudian ditempatkan dalam pembawa amalgam dan dimasukkan ke dalam kavitas. Sisa merkuri yang diperas dimasukkan bersama serpihan-serpihan amalgam dalam tempat tertutup yang berisi air. Kemudian dilakukan *carving* dan *burnishing*, untuk membentuk permukaan tambalan yang sesuai dengan anatomi gigi. Pemolesan tambalan dilakukan setelah 24 jam (Ford,1993; Sturdevant,1995; Anusavice,1996; Craig,1997; Craig, et.al,2000).

2.3. Jenis Merkuri

Merkuri atau quicksilver merupakan salah satu bahan kimia yang dapat memajan manusia, mempunyai berat molekul 200,9; berat jenis 13,59 (20/4); titik leleh $-38,88^{\circ}$ dan titik didih $356,7^{\circ}\text{C}$. Berwarna keperak-perakan, merupakan cairan berat dan tidak larut dalam asam hidroklorit, larut dalam asam sulfat di atas pendidihan, larut dalam asam nitrat, air, alkohol dan eter (Inswiasri,2008).

Merkuri muncul di lingkungan secara alamiah dan berada dalam beberapa bentuk yang pada prinsipnya dapat dibagi menjadi 3 bentuk utama, yaitu: (Cope,et.al.,2004; Cline,2005; Valco,et.al., 2005; Risher dan Rosa, 2007; Inswiasri,2008; Flora,et.al.,2008)

1. Merkuri metal (elemental merkuri) (Hg^0), merupakan logam berwarna putih, berkilau dan pada suhu kamar berada dalam bentuk cairan. Pada suhu kamar akan menguap dan membentuk uap Hg yang tidak berwarna dan tidak berbau. Makin tinggi suhu makin banyak yang menguap. Hg metal banyak digunakan untuk produksi gas chlorine dan caustic soda dan untuk pemurnian emas. Juga digunakan untuk pembuatan baterai, dan saklar listrik. Untuk bahan penambal gigi biasanya mengandung Hg metal 50%. Estimasi yang dilakukan oleh WHO menyatakan bahwa sekitar 3% dari total konsumsi merkuri digunakan untuk dental amalgam. Paparan yang ditimbulkannya adalah uap Hg.
2. Senyawa merkuri anorganik, terjadi ketika Hg dikombinasikan dengan elemen lain seperti *chlorine* (Cl), sulfur atau oksigen. Senyawa-senyawa ini biasa disebut garam-garam Hg. Senyawa Hg anorganik berbentuk bubuk putih atau kristal, kecuali merkuri sulfide (HgS) yang biasa disebut Cinabar adalah berwarna merah dan akan menjadi hitam setelah terkena sinar matahari. Senyawa Hg anorganik digunakan sebagai fungisida. Garam-garam merkuri anorganik termasuk amoniak merkuri klorida dan merkuri iodida digunakan untuk krim pemutih kulit.

Senyawa-senyawanya banyak digunakan sebagai antiseptic, desinfektan, pestisida, bahan cat, baterai kering, fotografi, di pabrik kayu dan pabrik tekstil.

3. Senyawa merkuri organik, terjadi ketika Hg bertemu dengan carbon atau organomerkuri. Banyak jenis organomerkuri, tetapi yang paling populer adalah metilmerkuri (dikenal dengan monometilmerkuri) (CH_3Hg). Organomerkuri yang lainnya adalah dimetilmerkuri ($\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$) yang juga digunakan sebagai standar referensi tes kimia.

2.3.1. Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi Merkuri

Sekali toksikan telah diabsorpsi, molekul-molekul toksikan dapat menyebar ke seluruh tubuh dalam dua cara: (1) dengan *bulk flow transfer* (misalnya dalam aliran darah) dan (2) dengan transfer secara difusi (antara molekul dengan molekul dalam jarak yang dekat). Selama proses absorpsi, distribusi dan eliminasi toksikan bertemu dengan berbagai macam membran sel sebelum berinteraksi dengan jaringan target. Masing-masing step dari proses ini meliputi translokasi dari zat kimia melewati bermacam-macam pertahanan membran kulit atau mukosa terus ke *capillary membranes*, kemudian membran selular dan organel. Membran barrier bervariasi dari tempat yang relatif padat di kulit kemudian ke tempat yang relatif tipis di membran paru-paru. Pada semua kasus bagaimanapun juga membran di jaringan, sel dan organel sel relatif serupa. Secara umum terdapat empat cara utama molekul-molekul kecil melewati membran lipid : (1) difusi pasif, difusi yang terjadi melewati membran lipid; (2) Filtrasi, difusi terjadi melewati porus-porus aqueous; (3) transport khusus, yang dibantu oleh molekul-molekul pembawa; dan (4) endositosis, transport membawa bentuk-bentuk pinositosis liquid dan fagositosis untuk solid (Baynes and Hodgson,2004).

Rute utama dari masuknya toksikan ke tubuh manusia melalui kulit, gastrointestinal dan pernafasan (Baynes and Hodgson,2004; Stine and Brown,2006). Inhalasi gas melewati hidung, faring, laring, trakea dan bronkiolus, sebelum masuk ke paru-paru. Dalam paru-paru barrier untuk difusi sedikit, karena sel-sel yang membatasi paru-paru tipis dan terletak sangat dekat dengan pembuluh darah. Terdapat beberapa mekanisme pertahanan dalam sistem pernafasan: silia dan mucus, ditemukan pada membran mukosa dari saluran pernafasan bagian atas yang membantu menangkap partikel-partikel dan mencegahnya untuk berpenetrasi lebih jauh ke paru-paru. Partikel-partikel dapat juga masuk ke paru-paru terus diabsorpsi dalam aliran darah atau sistem limfatik. Terdapat banyak sel-sel sistem imun yang terletak dalam paru-paru siap untuk merespon antigen yang masuk. Banyak sel-sel ini menghasilkan antibodi untuk melawan antigen asing, dan yang lainnya melepaskan zat-zat kimia endogen yang memperantarai respon alergi (seperti gejala asma atau alergi). Mekanisme pertahanan yang lain, terjadi kerusakan sel-sel alveolar, kemungkinan beberapa mengalami perbaikan. Ketika sel-sel tipe I rusak, sel-sel tipe II mengalami mitosis, proliferasi, dan menggantikan sel-sel yang rusak (Stine and Brown, 2006).

Semua senyawa Hg bersifat toksik untuk makhluk hidup bila memapar manusia dalam jumlah yang cukup dan dalam waktu yang lama. Senyawa Hg akan tersimpan secara permanen di dalam tubuh, yaitu terjadi inhibisi enzim dan kerusakan sel, sehingga kerusakan tubuh dapat terjadi secara permanen (Inswiasri,2008).

Secara umum merkuri organik lebih mudah diabsorpsi secara cepat dibandingkan dengan bentuk anorganik. Merkuri merupakan metal yang paling toksik. Merkuri (khususnya uap merkuri) ditransmisikan secara cepat melewati tubuh, dengan mudah melewati membran sel. Metil merkuri organik telah mempunyai efek toksik yang signifikan hanya terpajan pada kadar yang rendah, dibanding bentuk-bentuk merkuri

anorganik. Beberapa merkuri yang masuk melewati hidung bisa diabsorpsi langsung ke dalam lobus olfaktori dan otak tanpa lewat darah. Merkuri juga bisa ditransportasikan oleh akson dari serabut-serabut syaraf. Merkuri mempunyai waktu paruh di dalam tubuh, lebih 20 tahun di otak dan pada kadar rendah pajanan merkuri secara kronis menghasilkan akumulasi secara perlahan dalam jaringan tubuh (Windham,2001).

Manusia dapat terpapar uap merkuri bila bernafas dalam lingkungan yang terkontaminasi oleh uap merkuri, menelan atau makan makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh merkuri, dan melalui kulit yang kontak dengan merkuri yang terdapat dalam cream pemutih kulit. Jadi paparan dapat terjadi melalui udara, makanan dan kontak dengan kulit. Ketika orang menelan Hg metal dalam jumlah kecil, < 0,01% dari Hg tersebut akan masuk ke dalam tubuh melalui pencernaan dan tidak menimbulkan sakit. Bila jumlah lebih besar (misalnya setengah sendok teh = 204 gr) tertelan oleh seseorang, sangat kecil yang akan terserap oleh tubuh (Inswiasri,2008). Ketika menghirup uap Hg, 80% Hg akan masuk ke dalam aliran darah secara langsung melalui paru-paru, kemudian dengan cepat akan menyebar ke bagian-bagian lain termasuk otak dan ginjal (Craig,2000; Windham 2001; Ochocka,2007; Inswiasri,2008).

Merkuri metal mempunyai sifat *lipid solubility*. Uap merkuri (HgO) yang dilepaskan dari penambalan amalgam secara efisien diabsorpsi melewati alveoli, kemudian diabsorpsi melewati paru-paru. Uap merkuri hanya ditemukan sementara dalam darah. Oleh karena sifat elemental merkuri yang *lipid solubility*, dengan cepat ditransportasikan melalui membran sel (termasuk membran sel-sel barrier darah-otak). Ketika memasuki sel-sel yang aktif secara metabolik, elemental merkuri kemudian dioksidasi oleh katalase untuk membentuk ion merkuri (Hg²⁺). Ion merkuri tidak larut dalam lemak dan oleh karena itu menghasilkan tingkat retensi arbsorpsi merkuri yang

tinggi dan rentang waktu jaringan dari beberapa hari sampai beberapa dekade tergantung pada organ tertentu (Cline,2005).

Merkuri tidak dihancurkan oleh metabolisme tubuh, tetapi dikonversikan ke dalam bentuk-bentuk yang berbeda. Metabolisme dari merkuri dan senyawa-senyawa merkuri terlihat hampir sama pada hewan dan manusia dan meliputi siklus reduksi oksidasi. Inhalasi uap merkuri secara cepat akan dioksidasi menjadi bentuk-bentuk yang divalen dalam sel-sel darah merah. Oksidasi elemental merkuri juga terjadi di paru-paru manusia dan hewan. Jalur detoksifikasi/ekskresi primer dari merkuri yang diabsorpsi tubuh sebagai senyawa merkuri-glutathion melewati hati/ empedu ke feses, tetapi beberapa merkuri juga diekskresikan melalui ginjal ke urin dan keringat (Windham,2001).

2.3.2. Pengaruh Merkuri Terhadap Organ/Sistem Tubuh

Uap Hg bebas dapat menimbulkan keracunan bagi Dokter Gigi dan asistennya. Tetapi apabila telah berikatan dengan aloi sebagaimana halnya dalam amalgam, bahaya itu tidak ada lagi. Hanya sejumlah kecil merkuri yang diperlukan untuk menimbulkan reaksi keracunan (Ford,1993; Anusavice,1996; Baum et.al,1997; Craig, et.al,2000).

Merkuri dapat diabsorpsi menembus kulit atau tertelan, tetapi resiko utama untuk personil kesehatan gigi adalah dari menghirup uapnya. Merkuri mudah menguap pada suhu kamar dan mempunyai tekanan uap 400X dari batas maksimum yang dapat diterima. Uap merkuri tidak berwarna, tidak berbau atau terasa dan tidak dapat dideteksi dengan cara-cara sederhana pada kadar mendekati batas pemajanan maksimal yang aman. Karena cairan merkuri 14X lebih padat daripada air, satu tetes merkuri cukup untuk menjenuhi udara dalam kamar praktek biasa (Ford,1993; Sturdevant,1995; Baum,1997; Craig,2000).

Sekali terabsorpsi merkuri cenderung untuk mengendap di organ-organ seperti hati, ginjal dan otak. Kemungkinan semua akan dikeluarkan tubuh, tetapi tergantung dari

kemampuan tubuh masing-masing individu untuk mengubahnya ke dalam bentuk lain (Ford,1993; Sturdevant,1995; Baum,1997; Craig,2000).

Merkuri diduga sebagai penyebab dari berbagai macam penyakit, antara lain penyakit-penyakit kardiovaskuler, *Alzheimer*, *Multiple Sclerosis*, *autism*, gagal ginjal, *parkinson's disease*, kehilangan pendengaran, peningkatan tekanan darah, depresi, penurunan fungsi imun dan disebutkan juga bahwa merkuri sebagai "*a potent killer*" sel darah putih. Keracunan merkuri juga bisa melemahkan kandungan selama kehamilan, merkuri bisa melewati plasenta dan memberi resiko pada janin. Pada laki-laki bisa menyebabkan hipospermia, penurunan libido dan impotensi (Baum,1997; Craig,2000; Larsen,2005; Singh,2007; Sunardi,2007; Emerson,2007; Martaningtyas,2007).

Sumber-sumber merkuri pada penggunaan bahan tambal gigi yang menjadi penyebab kontaminasi/keracunan merkuri di lingkungan kedokteran gigi adalah sebagai berikut : (1) Merkuri yang belum dicampur dengan aloi pada dental amalgam; (2) Campuran dental amalgam sebelum pengerasan selama triturasi, insersi dan *intraoral setting*; (3) Sisa-sisa amalgam yang tidak bercampur sempurna antara aloi dan merkuri; (4) Tambalan amalgam yang sedang diselesaikan dan dipoles; (5) Tambalan amalgam yang sedang dilepaskan (Yusuf,1996).

Keracunan merkuri akut dapat menimbulkan gejala seperti berkurangnya pengeluaran air seni sampai berhenti sama sekali, rasa haus, adanya rasa sakit dan terbakar pada kerongkongan dan perut, pusing, penyempitan lapang pandang, tremor, muntah darah, diare disertai lendir dan darah, sukar berbicara, menelan dan bernapas, nadi cepat dan tidak teratur serta kulit pucat dan dingin (Yusuf 1996).

Keracunan merkuri kronis lebih sering dijumpai daripada bentuk keracunan akut. Hal ini merupakan akibat terpapar merkuri secara terus-menerus dalam dosis kecil, seperti pada pekerja pabrik, personil kesehatan gigi, masyarakat yang tinggal di lingkungan

pabrik yang menggunakan air raksa. Gejala-gejala yang dapat timbul akibat keracunan merkuri kronis ini, dapat berupa :

1. Perasaan mual yang kronis, nafsu makan menurun, nyeri kolik pada abdomen.
2. Gusi mengalami peradangan, membengkak dan nyeri. Pembentukan air liur meningkat. Garis berwarna kebiruan tampak diantara gusi dan gigi, stomatitis, gigi geligi menjadi goyang, nekrosis tulang alveolaris, saliva kental, mulut terasa panas, rasa gatal dan rasa logam di lidah, ulserasi pada membran mukosa, palatum dan faring, lidah bengkak, sakit dan mengalami ulserasi, kelenjar ludah dan limfe mengalami bengkak dan sakit.
3. Sering ditemukan erupsi kulit
4. Bisa ditemukan tremor akibat air raksa. Jika sudah berlangsung lama, maka pembicaraan juga menjadi kaku dan tidak lancar.
5. Otot-otot untuk fungsi bicara akan mengalami paralysis
6. Tampak gejala seperti Parkinsonisme seperti terjadi perubahan kepribadian, tremor dan kejang, albuminuria, radang selaput mata serta kebutaan, ketidakteraturan bunyi jantung, urtikaria, erythema, polineuropati, halusinasi, depresi mental, dan lain-lain (Chada,1995; Yusuf;1996).

Terpapar dengan merkuri dapat menghasilkan efek yang sangat bervariasi. Semua bentuk efek merkuri tergantung dari besarnya dan lamanya terpajan, dan juga umur dan status kesehatan dari individu yang terpajan. Terpapar dengan merkuri pada kadar yang signifikan dapat menghasilkan efek pada sistem syaraf, pernafasan, ginjal, sistem imun, kehamilan, dermatologi dan bermacam-macam efek yang lain (Windham,2001; Risher and Rosa,2007).

2.3.2.1. Pengaruh Merkuri Terhadap Sistem Syaraf

Sistem syaraf merupakan target utama dari toksisitas metal, terutama senyawa metal organik. Misalnya metal merkuri, karena merupakan *lipid soluble*, secara mudah melewati *blood brain barrier* dan masuk ke sistem syaraf. Sebaliknya, merkuri anorganik yang lebih bersifat *water soluble*, hanya sedikit masuk ke sistem syaraf dan secara utama lebih bersifat *nephrotokxicants*. Gejala pertama yang dirasakan pada keracunan kronik merkuri adalah rasa kesemutan, rasa baal pada kulit, jarak pandang mata menyempit, pendengaran berkurang, berjalan limbung, tremor dan daya ingat berkurang (Cope,et.al.,2004; Risher dan Rosa,2007; Inswiasri,2008). Kasus keracunan di Jepang oleh metal merkuri yang masuk ke dalam tubuh melalui makan ikan, terlihat pada 121 pasien menderita paraesthesia, ataxia, pandangan menyempit, pendengaran menurun dan neuropati (Inswiasri,2008). Kasus keracunan pada seorang anak umur 19 tahun setelah 8 bulan bekerja di perusahaan tambang emas, anak tersebut menderita tremor dan fatigue karena terpajan Hg dari tempat kerja. Hasil pemeriksaan bahwa anak tersebut menderita tremor, *dysdiadochokinesis* dan *mild rigidity*. Hg urine 24 jam terdeteksi 715 nmol/l (=148 µg/l) (Inswiasri,2008).

2.3.2.2. Pengaruh Merkuri Terhadap Ginjal

Ginjal merupakan organ ekskresi utama tubuh dan merupakan organ target utama untuk toksisitas metal. Terutama merkuri dan cadmium merupakan *nephrotoxicant* yang poten. (Cope,et.al.,2004). Organik merkuri mempunyai efek yang sangat merugikan pada ginjal. Bagian recta tubulus proksimal dari nefron adalah daerah yang paling terpengaruh terhadap efek-efek toksik merkuri (Flora,et.al.,2008). Merkuri dapat menyebabkan penyakit autoimun pada ginjal (Bigazzi, 1999).

2.3.2.3. Pengaruh Merkuri Terhadap Sistem Reproduksi, Kehamilan dan Janin

Terpapar dengan uap merkuri (metal merkuri) dapat secara cepat ditransmisikan oleh plasenta ke fetus (Windham,2001; Anonymous,2006) dan secara signifikan lebih mempunyai efek yang merusak terhadap perkembangan fetus dibandingkan kehamilan yang terpajan dengan merkuri anorganik (Windham,2001; Risher and Rosa, 2007). MeHg adalah senyawa kimia yang sangat dikenal dengan resiko terhadap perkembangan anak. Paparan dapat melalui makan ikan, roti yang terkontaminasi MeHg. Ibu yang terpajan MeHg dapat memajan anaknya melalui air susu ibu. Kadang-kadang efek pada anak tidak begitu terlihat seperti pada perkembangan IQ atau efek pada otak. Hanya dapat dideteksi dengan tes neuropsychologi, namun selanjutnya mengalami keterlambatan dalam perkembangan bicara atau perkembangan yang lainnya. Penelitian retrospektif kadar Hg darah tali pusat pada 1000 anak di P. Faroe pada umur 7 tahun yang telah terpajan pada waktu prenatal telah dilakukan. Setelah diadjust dengan berat badan, kenaikan MeHg darah tali pusat 1-10 μ g/l, memberikan kenaikan diastolik dan sistolik 13,9 dan 14,6 mmHg. Pada anak laki-laki MeHg darah tali pusat naik 1-10 μ g/l kecepatan jantungnya turun 47%. Variasi kecepatan jantung refleksi dari kontrol autoimun jantung (Inswiasri,2008). Pada kasus Minamata di Jepang pada tahun 1970, konsumsi ikan dan *shellfish* oleh populasi lokal menghasilkan 107 kematian karena keracunan merkuri dan 800 kasus penyakit Minamata dikonfirmasi. Walaupun ibu terlihat sehat, banyak bayi lahir dari ibu yang mengkonsumsi ikan yang terkontaminasi merkuri berkembang gejala seperti *Cerebral Palsy* dan defisiensi mental. Merkuri organik terutama mempengaruhi system syaraf, dimana otak janin lebih sensitif terhadap efek merkuri dibanding orang dewasa (Cope et.al.,2004).

Pada sistem reproduksi dan perkembangan toksin, dapat merusak DNA, menghambat sintesis DNA dan RNA, merusak sperma, jumlah sperma yang kurang dan

mengurangi motilitas, menyebabkan gangguan menstruasi, mengurangi kemampuan darah mengangkut oksigen ke fetus dan transpor nutrisi esensial meliputi asam amino, glukosa, magnesium, zinc dan vitamin B12, menekan enzim *isocitric dehydrogenase* (ICD) dalam fetus, mengurangi asupan *iodine* dan *hypotiroidism*, menyebabkan kecacatan dan kerusakan dalam pengetahuan (*learning disability and impairment*) dan reduksi IQ, menyebabkan infertilitas dan kecacatan kelahiran (*birth defects*) (Windham, 2001).

2.3.2.4. Pengaruh Merkuri Terhadap Sistem Kardiovaskuler

Konsumsi merkuri dari ikan dan berakibat penumpukan merkuri dalam tubuh dihubungkan dengan resiko *acute myocardial infarction* begitu juga kematian dari *coronary heart disease*, penyakit kardiovaskular. Penambahan resiko mungkin disebabkan karena kenaikan peroksida lipid oleh merkuri. Penelitian dua studi epidemiologi baru-baru ini menyelidiki kemungkinan keterlibatan merkuri dalam *myocardial infarction*. Penelitian ini dihubungkan dengan konsumsi ikan, karena ikan merupakan sumber utama terpapar merkuri. Percobaan ini menyimpulkan bahwa merkuri yang terdapat di dalam ikan dapat menghilangkan efek-efek yang bermanfaat dari n-3 *fatty acids* (Valko, et.al., 2005). Merkuri bisa menyebabkan kerusakan dan penyakit kardiovaskular: meliputi kerusakan terhadap sel-sel endotel vaskular, kerusakan pada *sarcoplasmic reticula*, *sarcolemma* dan protein *contractile*, menambah jumlah sel-sel darah putih, mengurangi kadar oksihemoglobin, meninggikan tekanan darah, takikardi, menghambat sintesis sitokrom P45/heme dan penambahan resiko *myocardial infarction* (Windham, 2001).

2.3.2.5. Pengaruh Merkuri Terhadap Respon Imun

Beberapa toksikan dapat memberikan efek pada sistem pernafasan setelah melewati interaksi dengan sistem imun. Efek toksikan terhadap sistem imun dapat berupa reaksi alergi, autoimunitas dan immunosupresi. Terdapat empat tipe reaksi alergi: (1) respon tipe I yang dikenal dengan respon anafilaksis atau *hypersensitivitas immediate* terjadi ketika pajanan antigen menyebabkan dihasilkannya antibody IgE dan mengikat sisi basofil dan sel mast pada jaringan dan dalam sirkulasi umum; (2) respon tipe II (*antibody-dependent cytotoxic hypersensitivity*) dihasilkan ketika molekul IgG atau IgM berikatan dan menghancurkan sel-sel darah atau sel-sel lain; (3) respon tipe III (*immune complex-mediated hypersensitivity*), terjadi bila kompleks antigen-antibodi berikatan dalam jaringan vaskular dan menghasilkan inflamasi; (4) respon tipe IV (*cell mediated hypersensitivity*) dapat terjadi dalam beberapa hari untuk berkembang dan melibatkan aktivasi dan proliferasi sel T (Stine and Brown, 2006).

Toksikan juga dapat menyebabkan autoimunitas, terjadi karena sistem imun kehilangan toleransi diri (*self-tolerance*), menyebabkan sel-sel sistem imun mengenal antigen tubuh sendiri sebagai benda asing (Stine and Brown, 2006; Kresno, 2007). Penyakit-penyakit autoimun ini antara lain *myastemia gravis* (disebabkan karena penyerangan dalam *neuromuscular junction*), *multiple sclerosis* (disebabkan karena penyerangan pada myelin), diabetes tipe I (karena penyerangan pada sel-sel β pancreas) dan *systemic lupus erythematosus* (disebabkan karena penyerangan pada bermacam-macam jaringan tubuh) (Stine and Brown, 2006).

Toksikan juga dapat menyebabkan immunosupresi. Akibat-akibat immunosupresi tergantung dari bagian sistem imun yang dipengaruhi begitu juga derajat supresinya. Imunitas selular dan humoral dapat terkena (Stine and Brown, 2006).

Merkuri baik dalam bentuk organik maupun anorganik mempunyai efek imunotoksik. Terdapat bukti-bukti yang solid bahwa merkuri dapat menyebabkan penyakit autoimun baik pada manusia maupun pada hewan (Bigazzi, 1999; Hu et al., 1999; Windham, 2001). Paparan uap merkuri pada kadar yang sangat rendah dapat mempunyai efek merugikan sistem imun. Studi-studi yang telah dilakukan pada hewan, telah diteliti bahwa merkuri dapat merusak sel T oleh hasil *Reactive Oxygen Species* (ROS), mendepleksikan thiol dari sel, merusak dan mengurangi ukuran mitokondria, menyebabkan destruksi organel-organel sitoplasmik dengan kehilangan integritas membran sel, menghambat kemampuan sekresi IL-1 dan IL-2R, menyebabkan aktivasi sel-sel glia untuk menghasilkan superoxide dan nitrite oxide (NO) dan menginaktifkan atau menghambat sistem enzim yang meliputi group protein sulfhidril. Merkuri mempunyai efek yang merugikan pada fungsi neutrofil dan makrofag dan setelah mendepleksikan cadangan thiol, sel T yang dipengaruhi Hg menyebabkan kematian sel (apoptosis). Satu studi menyebutkan penambalan dengan amalgam atau material dental nickel menyebabkan penekanan sejumlah limfosit T dan merusak rasio T-4/T-8. Merkuri juga menghambat sintesis RNA dan DNA sel T dan sel B. Penghambatan fungsi ini sebanyak 50% terjadi secara cepat pada kadar yang sangat rendah, antara 10-25 µg/L (Windham, 2001).

Beberapa studi tentang merkuri penyebab autoimun pada tikus C57BL/6(H-2b) telah banyak kontroversi. Pada satu studi telah menunjukkan bahwa perlakuan dengan merkuri chloride tidak hanya menambah sekresi sel-sel IgM, IgG dan IgG1 ginjal, tetapi juga IgG1 dan konsentrasi total serum immunoglobulin. Penelitian lainnya menunjukkan tidak ada penambahan serum antibodi IgM atau IgG dari beberapa subklas setelah merkuri diinjeksikan dan tidak ada pembentukan deposit kompleks imun pada ginjal. Pada hewan *susceptible*, merkuri menyebabkan penyakit autoimun sistemik yang dicirikan oleh

aktivasi sel T dependen poliklonal sel B, penambahan serum IgG1 dan IgE, produksi antibodi dan bentuk-bentuk kompleks imun di ginjal. Secara *in vitro*, limfosit ginjal dari tikus strain 57BL/6 menghasilkan tidak hanya sitokin Th1 tetapi juga Th2 setelah distimulasi dengan merkuri. (Hu et al.,1999). Berbagai macam komponen selular dari sistem imun dapat diaktivasi atau dihambat dengan kadar rendah dari merkuri. Secara *in vivo* terpajan merkuri bisa menambah respon limfosit pada tikus BALB/c dan berkurang pada tikus hybrid Swiss dan (B6xC3)F₁. Merkuri juga menyebabkan apoptosis dan nekrosis pada bermacam-macam galur sel T. Studi baru-baru ini memperlihatkan bahwa sel B manusia yang diberi HgCl₂ dan *pokeweed mitogen* distimulasi untuk menghasilkan IgE (Bigazzi,1999).

Pada perlakuan injeksi subkutan HgCl₂ tiga kali seminggu sebanyak 100 µg/100gr berat badan didapatkan pada hari ke-15, HgCl₂ yang diberikan pada tikus BN memperlihatkan perubahan yang signifikan pada sejumlah sel-sel limfonodus (3,6-fold) seperti CD4⁺ (3-fold), CD8⁺(3-8 fold) dan sel-sel T total (3-4 fold) yang dibandingkan dengan tikus *naïve*. Penambahan yang signifikan pada sejumlah populasi sel ini juga diobservasi segera tiga hari setelah injeksi HgCl₂. Tikus LEW yang diinjeksi dengan HgCl₂ menunjukkan penambahan yang signifikan pada sejumlah sel-sel limfonodus, CD8⁺ dan total sel-sel T limfonodus (1,5-1,7 dan 1,3-fold) pada hari ke lima belas, tetapi tidak pada hari ke tiga (Fillion et al.,1997).

Studi-studi telah memperlihatkan bahwa injeksi dengan merkuri menyebabkan penambahan ekspresi molekul MHC kelas II pada binatang yang *susceptible* maupun yang resisten. Menggunakan marker aktivasi CD45RB, ditemukan bahwa sel T CD4⁺ pada tikus yang *susceptible* maupun yang resisten teraktivasi sama luasnya secara *in vivo*. Studi ini mengusulkan bahwa limfosit dari binatang yang resisten mempunyai respon yang potensial terhadap merkuri, tetapi regulasi respon ini belum diketahui

mekanismenya. Secara *in vitro* merkuri menginduksi respon proliferasi yang tinggi pada tikus yang *susceptible* dalam aktivasi sel T CD4⁺, sedangkan pada tikus yang resisten responnya rendah dan hanya sel T CD8⁺ yang berubah. Tidak diketahui apa mekanisme respon yang rendah pada limfosit dari tikus yang resisten secara *in vitro*. Dengan autoradiografi, terlihat ion merkuri berikatan dengan membran limfosit dengan cepat sekitar 15 menit setelah penambahan isotope dan berikatan kuat terlihat setelah 48 jam. Hal ini memberikan kesan bahwa dalam waktu pendek kontak antara ion merkuri dengan limfosit cukup untuk aktivasi. Secara *in vitro* merkuri chloride menyebabkan proliferasi respon imun yang kuat pada tikus BALB/c. Pada tikus yang resisten, inkubasi dengan merkuri selama satu hari juga cukup untuk menginduksi secara signifikan proliferasi limfosit limpa. Kedua sel T CD4⁺ dan CD8⁺ teraktivasi, tetapi CD4⁺ lebih banyak daripada CD8⁺. Bukti-bukti menunjukkan bahwa mayor IFN- γ menghasilkan sel T CD8⁺ sedangkan mayor IL-4 menghasilkan sel T CD4⁺ (Hu, et.al., 1999).

Studi tentang mekanisme *immunoreceptor mediated* terhadap merkuri penyebab proliferasi limfosit pada manusia menunjukkan aktivasi khusus dari limfosit CD4⁺ dalam CD14⁺-*dependent manner*. 10 μ M HgCl₂ dapat menyebabkan proliferasi limfosit limpa tikus DBA/2 (Cederbrant, et.al., 1999). Secara *in vitro* terpaparnya *peripheral blood leucocytes* dengan metal merkuri menghasilkan supresi respon proliferasi pada sel B (0,1 μ g/g dan 0,35 μ g/g) dan sel T (0,7 μ g/g) (Day et.al., 2007). Limfosit B pada tikus yang dipajan merkuri dirangsang memproduksi IgE dan isotope imunoglobulin yang lain. Treatmen dengan HgCl₂ dapat menginduksi produksi IL-1 oleh makrofag murin dan ekspresi gen yang tinggi dari IL-12 sel-sel limpa pada tikus LEW. Konsentrasi HgCl₂ antara 1 μ m dan 0,01 fM menghambat *adherence*, polarisasi, kemotaksis dan eritrofagositosis pada PMN manusia. Sel mast tikus BN yang terpapar dengan HgCl₂ mempunyai sensitivitas yang tinggi terhadap degranulasi oleh monoklonal antibodi IgE.

Treatment pada tikus dengan metal merkuri menyebabkan reduksi atau supresi dari aktivitas sel NK (Bigazzi, 1999). Efek-efek merkuri pada sistem imun dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2. Efek-efek merkuri pada sistem imun

Sel-sel pada sistem imun	Efek merkuri
Limfosit T	↑↓ (↑atau ↓ IFN- γ , ↑IL-4)
Limfosit B	↑↓
Makrofag	↑↓ (fagositosis, rad bebas, IL-1)
PMN leukosit	↑↓ (kemotaksis, fagositosis, rad bebas)
Sel-sel mast	↑↓ (degranulasi, IL-8, TNF- α , IL-4)
Sel-sel NK	↓ (<i>killer activity</i>)
Sel-sel lain	?

Keterangan : ↑= penambahan, ↓= pengurangan, ?= tidak diketahui,
IFN= interferon, IL= interleukin, TNF= *tumor necrosis factor*

(Dikutip dari: Bigazzi PE. Metals and Kidney Autoimmunity. Environmental Health Perspectives. October 1999.107(5); 753-62).

2.3.2 6. Pengaruh Merkuri Terhadap Stres Oksidatif

Beberapa toksikan pernafasan terlihat menghasilkan radikal bebas, yang dapat berinteraksi dengan membran dan unsur-unsur selular yang lain untuk menghasilkan kerusakan selular yang signifikan. Radikal bebas meliputi oksigen reaktif (ROS) yang terdiri dari senyawa-senyawa seperti anion superoksida (O_2°) yang dihasilkan selama proses normal. Molekul reaktif yang lain, Hidrogen peroksida (H_2O_2) terbentuk ketika anion superoksida dioksidasi lebih lanjut dalam reaksi katalisasi oleh enzim SOD, dan dapat dirusak untuk membentuk radikal bebas yang lain, yaitu radikal hidroksil (OH). Dalam lingkungan oksigen yang tinggi seperti dalam alveoli, reaksi ini diperkirakan seringkali terjadi, dan senyawa-senyawa yang distimulasi dari proses metabolik yang normal ini diperkirakan juga menstimulasiproduksi radikal bebas. Sebagai tambahan

sumber-sumber radikal bebas juga dihasilkan dari metabolisme sitokrom P450 dari xenobiotik (Stine and Brown, 2006).

Salah satu radikal bebas yang memegang peranan penting dalam kerusakan pernafasan adalah oksida nitrit. Senyawa ini dihasilkan dalam paru-paru oleh aksi dari enzim nitric oxide synthase, yang ditemukan dalam berbagai tipe sel paru-paru, meliputi sel-sel tipe II, makrofag dan sel-sel endotel. Oksida nitrit memegang peranan penting dalam regulasi aliran darah, tetapi kadar NO dalam paru-paru memperlihatkan penambahan mengikuti pajanan toksikan (Stine and Brown, 2006).

Merkuri diketahui merupakan metal yang toksik yang menyebabkan stress oksidatif di jaringan (Chen, et.al., 2006). Konsentrasi submikromolar dari $HgCl_2$ atau metilmerkuri memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS). (Chen, 2006). Merkuri bisa masuk ke dalam sel dan merusak sel. Merkuri bisa mengurangi produksi *glutathione* dan menghambat aktivitas enzim *glutathione peroksidase* dan ini bisa menimbulkan stres oksidatif pada otak dan organ tubuh lainnya (Kobal, 2004; Cline, 2005).

Jadi dalam hal ini merkuri bertindak sebagai radikal bebas dalam tubuh, yaitu suatu molekul yang relatif tidak stabil, mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya. Molekul tersebut bersifat reaktif dalam mencari pasangan elektronnya. Jika sudah terbentuk dalam tubuh maka akan terjadi reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas baru yang akhirnya jumlahnya terus bertambah. Jadi radikal bebas dapat mengganggu integritas sel dan dapat bereaksi dengan komponen-komponen sel, baik komponen struktural (molekul-molekul penyusun membran) maupun komponen fungsional (enzim-enzim dan DNA) (Wijaya, 1996; Sumampouw, 2003; Sauriasari, 2006; Sinitsyna, 2006; Maloney, 2007; Anonymous, 2007).

Sel B pada murin yang dipapar dengan merkuri memperlihatkan penghambatan sintesis RNA dan DNA dan pengurangan yang signifikan pada produksi isotope

immunoglobulin. Penyelidikan tentang efek-efek merkuri pada makrofag telah dideteksi menghambat fagositosis dan produksi radikal bebas. Terkait dengan itu konsentrasi secara *in vitro*, HgCl_2 merangsang pelepasan H_2O_2 dari tikus LEW tetapi tidak makrofag tikus BN dan dapat menghambat fagositosis pada peritoneal makrofag. 1nM - 1fM HgCl_2 secara signifikan menstimulasi produksi H_2O_2 dan *chemiluminescence* dari sel-sel ini. Penghambatan aktivitas mikrobisidal dan *respiratory burst*, mengurangi pembentukan *anion superoxide* dan kemotaksis juga telah dideteksi setelah terpapar dengan metal merkuri, merkuri chloride dan silver laktat (Bigazzi,1999).

Beberapa penelitian secara *in vivo* dan *in vitro* mengemukakan binatang eksperimen yang dipapar dengan merkuri dapat menyebabkan sebagian besar stress oksidatif karena deplesi dari thiol alami khususnya GSH. Lund et al mendemonstrasikan bahwa pemberian merkuri menghasilkan deplesi GSH, peroksida lipid dan juga penambahan pembentukan H_2O_2 di ginjal tikus. Mahbood et al menunjukkan bahwa ketika CD-1 tikus dipajan dengan merkuri, terdapat perubahan pada peroksidasi lipid (LPO), *glutathione reductase* (GR), *glutathione peroxidase* (GPx), *superoxida dismutase* (SOD) dan kadar GSH pada organ-organ yang berbeda selain daripada ginjal. Efek-efek toksik merkuri juga telah diobservasi di oligodendrosit, astrosit, kortikal serebral dan *cerebellar granular neuron* yang berasal dari embrio dan neonatal otak tikus (Flora et.al., 2008).

2.4. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang relatif tidak stabil, mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya. Molekul tersebut bersifat reaktif dalam mencari pasangan elektronnya. Jika sudah terbentuk dalam tubuh maka akan terjadi reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas baru yang akhirnya jumlahnya terus bertambah. Jadi radikal bebas dapat mengganggu integritas sel

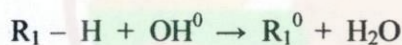
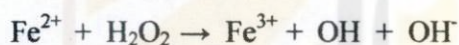
dan dapat bereaksi dengan komponen-komponen sel, baik komponen struktural (molekul-molekul penyusun membran) maupun komponen fungsional (enzim-enzim dan DNA) (Wijaya,1996; Halliwell and Gutteridge,1999; Sumampouw,2003; Sauriasari,2006; Sinitsyna,2006; Maloney,2007).

Radikal bebas memiliki dua sifat yaitu : reaktivitas tinggi, karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal. Sifat radikal bebas mirip dengan oksidan yaitu suatu senyawa penerima elektron, tetapi radikal bebas jauh lebih berbahaya dibanding dengan oksidan. Hal ini disebabkan reaktivitasnya yang tinggi, juga kecenderungannya membentuk radikal baru, yang apabila bertemu dengan molekul baru akan membentuk molekul baru lagi, sehingga terjadilah reaksi rantai (Halliwell and Gutteridge,1999; Yanwirasti,2004).

Seluruh reaksi radikal bebas dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu :

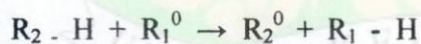
1. Tahap inisiasi

Pada tahap ini akan terjadi pembentukan radikal bebas awal



2. Tahap Propagasi

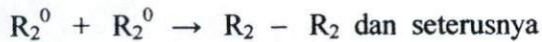
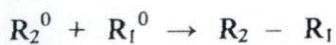
Setelah pembentukan radikal bebas awal , maka radikal bebas cenderung bertambah banyak dengan membuat reaksi rantai dengan molekul lain.



3. Tahap Terminasi

Pada tahap ini akan terjadi reaksi antara radikal bebas dengan radikal bebas lain atau antara radikal bebas dengan suatu senyawa pembasmi radikal (*scavenger*).





Radikal bebas yang terbentuk akan merusak molekul yang elektronnya ditarik oleh radikal bebas tersebut, sehingga menyebabkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel bahkan kematian sel. Karena reaktivitasnya yang tinggi, radikal bebas tak stabil dan berumur pendek, sehingga sulit dideteksi, kecuali dengan metode-metode khusus seperti pengukuran EPR (*Electron Paramagnetik Resonance*) (Halliwell and Gutteridge, 1999; Yanwirasti, 2004).

Kerusakan oksidatif yang terjadi bila tidak terlalu parah masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA. Di dalam penelitian-penelitian ternyata p53 memainkan peranan penting di dalam pengaturan siklus sel dan mempertahankan integritas genom setelah sel tersebut mengalami induksi yang menyebabkan kerusakan genetic. Hal ini dilakukan p53 bukan saja dengan menghentikan pertumbuhan sel yang mengalami kerusakan DNA, tetapi juga memfasilitasi perbaikan DNA baik secara langsung atau transaktivasi gen (Yanwirasti, 2004).

Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (*endogenous free radical*) ataupun dari luar tubuh (*exogenous free radical*). Secara berkesinambungan tubuh akan menghasilkan radikal bebas melalui:

1. Reaksi redoks biokimiawi yang melibatkan oksigen yang merupakan bagian metabolisme sel. Kaskade asam arakhidonat menjadi prostaglandin dan prostasiklin melalui lipoksigenase dan siklooksigenase akan menghasilkan O_2^- atau H_2O_2 . Pembentukan enzim oksidase seperti monoamino oksidase atau aldehyd oksidase akan menghasilkan O_2^- atau H_2O_2 . Superoksida terbentuk karena penambahan 1 elektron pada O_2 , yang terjadi secara tidak sengaja. Demikian juga sitokrom P-450, yang terlibat di dalam biotransformasi dan detoksifikasi metabolit intermediet dan

xenobiotics akan menghasilkan peroksida dan senyawa oksigen reaktif lainnya. Lebih lanjut didapatkan bahwa metabolisme sel yang melibatkan enzim yang menghasilkan radikal bebas adalah karena perubahan xantin dehidrogenase menjadi xantin oksidase ataupun iskemia yang terutama muncul pada jaringan endothelial.

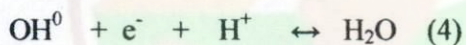
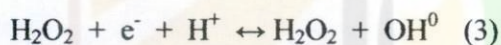
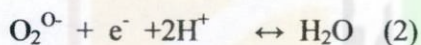
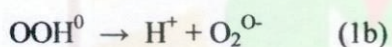
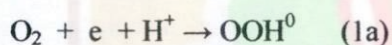
2. Proses fagosit, yang merupakan bagian dari reaksi inflamasi. Di dalam proses ini akan dihasilkan sejumlah besar superoksida sebagai bagian dari metabolisme tubuh dengan cara oksidasi dan oksigenase yang bertujuan untuk membunuh mikroorganisme asing.
3. Walaupun produksi H_2O_2 tidak terlalu mengganggu, tetapi dengan kehadiran ion logam transisi seperti Fe dan Cu akan dapat menghasilkan dengan segera OH^{\cdot} melalui reaksi Haber Weis ataupun reaksi Fenton. Contoh: mono amino oksidase yang terdapat di dalam bentuk isoenzimik di dalam otak akan menghasilkan H_2O_2 . Dengan kehadiran Fe^{++} dan Cu^+ , maka H_2O_2 yang terbentuk akan bereaksi membentuk OH^{\cdot} yang akan menghancurkan struktur seluler.
4. Gangguan pada system antioksidan tubuh. Gangguan ini dapat berupa induksi atau represi protein yang terlibat di dalam system ini, sehingga mengurangi cadangan antioksidan sel seperti glutathion dan vitamin E. (Halliwell and Gutteridge, 1999; Yanwirasti, 2004).

2.4.1. *Reactive Oxygen Species (ROS)*

Oksigen yang kita hirup akan diubah oleh sel tubuh secara konstan menjadi senyawa yang sangat reaktif, dikenal sebagai senyawa reaktif oksigen (*Reactive Oxygen Species/ROS*), suatu bentuk radikal bebas. Peristiwa ini berlangsung saat proses sintesa energi oleh mitokondria atau proses detoksifikasi yang melibatkan enzim sitokrom P-45

di hati. Produksi ROS secara fisiologis ini merupakan konsekuensi logis dalam kehidupan aerobik (Sumampouw,2003; Sinitsyna,2006; Sauriasari,2006).

Hasil dari oksidasi yang terjadi pada proses transformasi energi metabolik mempunyai efek samping yang berupa terbentuknya senyawa-senyawa radikal bebas pada peristiwa oksidasi tersebut. Bila molekul dioksidasi dengan oksigen, oksigen itu sendiri akan mengalami reduksi dengan membentuk berbagai-bagai bentuk intermediet. (Yanwirasti,2004). Reduksi oksigen memerlukan pengalihan empat elektron, dimana pengalihan ini tidak dapat terjadi sekaligus, tetapi dalam empat tahapan yang setiap tahap melibatkan pengalihan satu elektron. Oleh karena oksigen hanya dapat menerima satu electron setiap tahap akan menyebabkan kurang reaktifnya oksigen dan terjadinya senyawa-senyawa oksigen reaktif (Yanwirasti,2004).



Dari reaksi di atas dapat dilihat bahwa radikal peroksil, ion superoksida, hydrogen peroksida dan radikal hidroksil terjadi karena pengalihan electron yang kurang sempurna pada saat terjadi reduksi oksigen (Halliwell and Gutteridge, 1999 ; Yanwirasti, 2004).

Sebagian ROS berasal dari proses fisiologis (ROS endogen) dan lainnya adalah ROS eksogen, seperti berbagai polutan lingkungan (emisi kendaraan bermotor dan industri, asbes, asap rokok, dan lain-lain), radiasi ionisasi, infeksi bakteri, jamur serta paparan zat kimia yang bersifat mengoksidasi, seperti merkuri. Sebenarnya radikal bebas, termasuk ROS, penting artinya bagi kesehatan dan fungsi tubuh yang normal dalam memerangi peradangan, membunuh bakteri dan mengendalikan tonus otot polos,

pembuluh darah dan organ-organ dalam tubuh kita. Namun bila dihasilkan melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan seluler, maka dia akan menyerang sel itu sendiri. Struktur sel yang berubah turut merubah fungsinya, yang akan mengarah pada proses munculnya penyakit (Sumampouw,2003; Sauriasari,2006; Bellinger,2006; Sinitsyna,2006). ROS meliputi superoksida (O_2°), hydrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil (OH°), oksida nitrit (NO), hypochlorite dan peroxynitrite ($ONOO^-$, hasil reaksi dari O_2° dan NO) (Halliwell and Gutteridge,1999; Yanwirasti,2004; Vincent and Taylor,2006).

Senyawa oksigen reaktif dapat diklasifikasikan berupa radikal dan non radikal seperti terlihat pada tabel 2.3.

Tabel 2.3. Senyawa oksigen reaktif

Radikal	Non Radikal
Superoksida (O_2°)	Hidrogen peroksida (H_2O_2)
Hidroksil (OH°)	Asam hipoklorat (HOCl)
Peroksil (RO_2°)	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO°)	Singlet Oksigen ($^1\Delta_g$)
Hidroperoksil (HO_2°)	

(Dikutip dari : Halliwell and Gutteridge. Free Radicals in Biology and Medicine,1999; 27)

Dalam keadaan normal tanpa induksi pembentukan O_2° dan H_2O_2 pembentukan OH° dapat diredam oleh enzim antioksidan tubuh seperti katalase dan superoksida dismutase (SOD). Tetapi induksi yang terus menerus akan menyebabkan enzim ini lumpuh sehingga memudahkan pembentukan OH° (Yanwirasti,2004). Akibat ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dengan enzim antioksidan tubuh akan timbul stres oksidatif. Pemaparan stres oksidatif pada sel mamalia akan menghasilkan oksidasi glutathion dan NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) yang

diikuti oleh gangguan homeostatis thiol protein dan deplesi ATP. Deplesi ATP akan menyebabkan sistem pompa natrium berkurang sehingga ion Na akan berakumulasi di dalam sel, sehingga akan terjadi pemasukan air ke dalam sel yang ditandai dengan membengkaknya sel dan dilatasi retikulum endoplasma. Gangguan homeostatis thiol akan menyebabkan gangguan homeostatis Ca^{++} di dalam sel yang akan diikuti oleh peningkatan Ca^{++} intraseluler. Hal ini akan menyebabkan pengaktifan sejumlah enzim seperti fosfolipase, protease dan endonuklease yang akan menimbulkan kerusakan mitokondria yang ditandai dengan terbentuknya porus pada mitokondria yang disebut *mitochondrial permeability transition* (MPT) sehingga akan menyebabkan kematian sel seperti nekrosis dan apoptosis (Yanwirasti,2004).

ROS mempunyai target pada tiga jenis senyawa yang penting untuk integritas sel yaitu lipid, protein dan DNA (Halliwell and Gutteridge,1999 ; Yanwirasti,2004). Kerusakan oksidatif pada lipid terutama dialami oleh asam lemak tak jenuh ganda (polyunsaturated fatty acid = PUFA) yang mengalami oksidasi. Kerusakan ini berupa reaksi rantai yang akan membentuk hasil akhir berupa peroksida, aldehid seperti malonaldehid (MDA), 9-hidroksi nonenal serta bermacam-macam hidrokarbon dan etana yang bersifat toksik terhadap sel (Yanwirasti,2004). Peroksidasi lipid pada membran sel akan menyebabkan peningkatan permeabilitas membran, sehingga terjadi pembengkakan pasif mitokondria yang akan memperparah kerusakan sel (Halliwell and Gutteridge,1999; Yanwirasti,2004).

Kerusakan oksidatif DNA akan menimbulkan kerusakan pada DNA yang berupa putusny rantai DNA, kerusakan pada deoksiribosa dan modifikasi basa purin dan pirimidin. Kerusakan ini terjadi baik secara langsung atau tidak langsung. Secara langsung akan terbentuk adduct pada 8 hidroksil guanine, pembentukan cincin imidazol yang menghasilkan FAPy-adduct (*Fomamido pyrimidine guanine*). Kerusakan secara

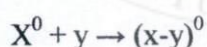
tidak langsung disebabkan MDA yang terbentuk akibat peroksidasi lipid akan membentuk *MDA-DNA adduct* yang berkontribusi untuk terjadinya mutagenesis. (Halliwell and Gutteridge,1999; Yanwirasti,2004). Di samping itu OH^\bullet yang terbentuk juga akan mempengaruhi sinyal transduksi proliferasi, kematian sel dan penurunan komunikasi sel, sehingga akan menimbulkan proliferasi sel yang berlebihan. Akibat pembentukan ROS yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan DNA yang di kemudian hari akan berkembang ke arah terjadinya kanker (Yanwirasti,2004).

2.5. Stres Oksidatif

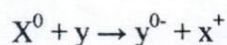
Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas (prooksidan) dan antioksidan yang dipicu oleh dua kondisi umur kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas. Keadaan stress oksidatif membawa pada kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan hingga ke organ tubuh, menyebabkan terjadinya proses penuaan dan munculnya berbagai penyakit. Merkuri sebagai logam berat dalam hal ini sangat berperan dalam meningkatkan stress oksidatif yang bisa menimbulkan berbagai macam penyakit seperti Multiplesclerosis, Alzheimer's, penyakit-penyakit kardiovaskuler, penurunan sistem imun tubuh, penyakit autoimmune dan lain sebagainya (Sumampouw,2003; Sauriasari,2006; Chen,2006; Risher,2007; Maloney,2007).

Reaksi radikal bebas dengan senyawa lain :

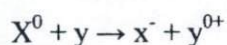
1. Penambahan



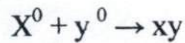
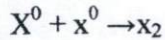
2. Donasi elektron



3. Penghilangan electron



Hanya bila ada dua radikal bebas bertemu reaksi rantai ini dapat dihentikan



Stres oksidatif akan bisa menyebabkan kerusakan jaringan dan pada gilirannya akan dapat menimbulkan:

1. Fagositosis dan aktivasi dapat menghasilkan : $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO^0 , $HOCl$.
2. Dilepaskannya asam arakhidonat, pembentukan enzim peroksidase oleh aktivasi enzim lipooksigenase, siklooksigenase
3. Pelepasan ion metal dari protein penyimpanan dan transport (Fe, Cu) akan merangsang pembentukan OH^0 .
4. Pelepasan protein heme, yang akan bereaksi dengan peroksidase dan melepaskan ion $Fe^{2=}$
5. Gangguan pada pertahanan antioksidan (misalnya kehilangan GSH dari sel)

Stres oksidatif yang ditimbulkan dapat merusak sel-sel dan menimbulkan berbagai macam penyakit. Jadi kegagalan sistem oksidan tubuh akan menyebabkan perlindungan terhadap serangan antioksidan hilang.

2.6. Antioksidan

Tubuh kita secara terus menerus mengalami proses pembentukan radikal bebas melalui peristiwa metabolisme sel normal, proses peradangan, kekurangan nutrisi, dan sebagai respon terhadap adanya radiasi sinar gamma, UV, polusi lingkungan, dan asap rokok. Oleh karena itu tubuh kita memerlukan substansi vital, yaitu antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dengan menetralsirnya atau meredam dampak negatif radikal bebas (Wijaya, 1996)

Antioksidan adalah suatu zat yang bisa menangkap dan menangkap radikal bebas dalam tubuh. Sebenarnya antioksidan sudah terdapat dalam tubuh manusia, seperti *glutathion peroksidase*, *ubiquinol katalase*, *superoxide dismutase*. Stres oksidatif timbul karena terdapat ketidakseimbangan radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh, sehingga bisa menimbulkan berbagai macam penyakit (Sumampouw,2003; Sauriasari,2006; Shizuko,2007).

Sistem antioksidan tubuh melindungi jaringan dari efek negatif radikal bebas. Terdapat tiga kelompok antioksidan dalam tubuh kita :

1. Antioksidan Primer

Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan radikal bebas baru. Antioksidan ini mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang mempunyai dampak negatif, sebelum radikal bebas itu mempunyai kesempatan untuk bereaksi, atau dengan mencegah pembentukan radikal bebas baru dari molekul lain. Contoh: (a) Superoksida Dismutase (SOD) merubah $O_2^{\cdot-}$ menjadi hydrogen peroksida; (b) Glutathione peroksidase (GPx) merubah hydrogen peroksida dan lipid peroksida menjadi molekul yang kurang berbahaya sebelum mereka membentuk radikal bebas; (c) Protein Pengikat Metal (misalnya ferritin dan Ceruloplasmin) mencegah adanya ion Fe^{2+} untuk pembentukan radikal hidroksil (OH^{\cdot}).

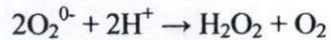
2. Antioksidan Sekunder

Menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Contoh: Vitamin E (α -tocoferol), vitamin C (askorbat), β -karoten, asam urat, bilirubin dan albumin.

3. Antioksidan Tersier

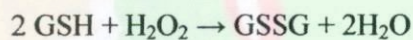
Antioksidan jenis ini akan memperbaiki kerusakan biomolekuler yang disebabkan oleh radikal bebas. Contohnya : enzim-enzim yang memperbaiki DNA dan metionin sulfoksida reduktase

Superoksida dismutase (SOD) terdapat dalam sitosol dan mitokondria. Enzim ini akan merubah superoksida menjadi hidrogen peroksida :



Selanjutnya hidrogen peroksida akan dihilangkan oleh katalase dan *glutathione peroksidase* (GPx).

Glutathione peroksidase (GPx) merupakan enzim utama yang memusnahkan hydrogen peroksida yang dihasilkan oleh SOD dalam sitosol dan mitokondria, dengan mengoksidasi tripeptida glutation (GSH) menjadi bentuk teroksidasinya (GSSG) :



Gangguan metabolisme enzim GPx sejak lahir mempunyai konsekuensi klinis yang berat (Wijaya,1996).

GSH intraselular diketahui mengatur fungsi limfosit T, *scavenger* senyawa reaktif dan terlibat dalam bloking sitokin yang distimulasi replikasi HIV secara in vitro. Kadar GSH intraselular menambah ekspresi reseptor CD4 dan CD8 pada limfosit murine (Liang,et.al.,1990).

2.6.1. Parameter Status Antioksidan

Sistem antioksidan tubuh sebagai mekanisme perlindungan tubuh terhadap serangan radikal bebas, memiliki banyak komponen, diantaranya enzim superoksida dismutase (SOD), Glutathione peroksidase (GPx), dan antioksidan ekstraseluler yang kebanyakan berasal dari makanan, seperti vitamin E, vitamin C dan β -karoten, asam urat, bilirubin dan albumin.

Kekurangan salah satu komponen tersebut dapat menyebabkan terjadinya penurunan status antioksidan secara menyeluruh pada seorang individu, dan berakibat perlindungan tubuh terhadap serangan radikal bebas melemah dan terjadilah berbagai macam penyakit.

Pemeriksaan status antioksidan tubuh dapat dilakukan melalui pengukuran :

1. Status Antioksidan Total
2. Enzim-enzim antioksidan:
 - Superoksida Dismutase (SOD)
 - Glutathione Peroksidase (GPx) dan Status selenium (Wijaya,1996).

2.7. Teh Hijau Sebagai Antioksidan

Pada beberapa penelitian disebutkan bahwa polifenol, terutama yang terdapat dalam teh hijau secara signifikan bisa mengurangi stress oksidatif dan terbukti bisa mengurangi resiko penyakit degeneratif yang ditimbulkan karena stress oksidatif seperti *alzheimer's*, kanker, penyakit jantung koroner, mencegah kolesterol, hipertensi serta bisa juga melawan aktivitas bakteri tertentu yang bisa menyebabkan kerusakan gusi dan tanggalnya gigi (Erba et.al.,1999; Sibuea,2003; Chen,2006; Dough,2006; Ping Hju,2007). Beberapa studi epidemiologi mengemukakan bahwa terdapat hubungan antara konsentrasi teh hijau dengan pengurangan resiko bermacam-macam kanker pada manusia (Erba,1999; Katiyar,1999). Konsumsi teh hijau mempunyai aktivitas antikarsinogenik melawan kanker payudara dan kanker yang lain pada model hewan. Demikian juga konsumsi polifenol secara oral telah dilaporkan dapat menghambat aktivitas telomerase secara langsung dan *chymotrypsin-like activity* dari proteasome. Pada bermacam-macam model, EGCG dilaporkan turut dalam banyak aspek dalam mengontrol proliferasi, apoptosis, angiogenesis, invasi dan metastase sel tumor (Guo,et.al., 2005).

2.7.1. Komposisi Teh Hijau

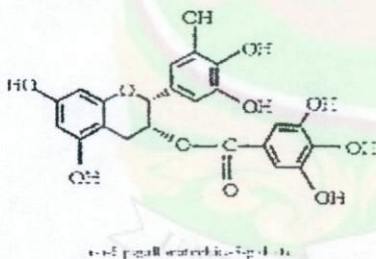
Teh adalah tanaman yang dapat tumbuh di daerah tropis dan sub tropis dengan curah hujan tidak kurang dari 1500 mm. Tanaman teh memerlukan kelembaban tinggi dengan temperature udara 13-29,5 derajat C sehingga tanaman ini tumbuh baik di dataran tinggi dan pegunungan yang berhawa sejuk. Teh hijau adalah teh yang berasal dari pucuk daun teh yang sebelumnya mengalami pemanasan dengan uap air untuk menonaktifkan enzim-enzim yang terdapat dalam daun teh, kemudian digulung dan dikeringkan. Teh hijau identik dengan simbol minuman kesehatan. Komposisi kimia daun teh segar : serat kasar, selulosa, lignin 22% berat kering; protein dan asam-asam amino 23%; lemak 8 %; polifenol 30%; kafein 4% dan pektin 4% (Khomsan,2007).

Daun teh mengandung tiga komponen penting yang mempengaruhi mutu minuman yaitu kafein yang memberikan efek stimulant, tannin yang memberi kekuatan rasa (ketir) dan polifenol. Polifenol yang terkandung dalam teh meliputi katekin, theaflavin dan tearubigin mempunyai banyak khasiat kesehatan. Katekin dalam teh hijau terdiri atas *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC). EGCG adalah katekin yang paling banyak di dalam teh. (Wijaya,1997; Katiyar et.al, 1999; Frei and Higdon, 2003; Payne,2006; Ping Hju,2007; Khomsan,2007; Sibuea,2007).

Daun-daun teh yang dipersiapkan menjadi teh hitam digiling dan dibiarkan untuk difermentasi (oksidasi), menghasilkan konsentrasi yang relatif tinggi dari theaflavin dan thearubigin dan konsentrasi yang relatif rendah dari katekin. Teh hijau dilayukan dan kemudian diuapkan untuk menginaktifkan polifenol oksidase, sebagai akibatnya polifenol teh hijau terdiri dari konsentrasi yang relatif tinggi dari katekin dan konsentrasi yang rendah dari theaflavin dan thearubigin (Frei and Higdon,2003). Polifenol adalah antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibandingkan vitamin C dan 25 kali

lebih tinggi dibandingkan vitamin E. Polifenol bermanfaat untuk mencegah radikal bebas yang merusak DNA dan menghentikan perkembangbiakan sel-sel liar (kanker) (Wijaya,1997; Payne,2006; Ping Hju,2007; Khomsan,2007; Sibuea,2007).

Teh adalah minuman pengulur usia . Studi di Norwegia menunjukkan bahwa mereka yang rajin minum teh minimal secangkir sehari akan dapat menekan angka kematian. Penelitian lainnya dengan subyek manusia usia lanjut di Belanda menghasilkan temuan bahwa resiko akibat penyakit jantung (terutama) menurun seiring dengan kebiasaan minum teh. Teh juga akan menetralkan nitrosamine (penghancur sel) yang berasal dari daging olahan yang diawetkan dan menangkal HCA (Amina heterosiklik). Bila kita memasak daging maka akan terbentuk senyawa HCA adalah zat penyebab mutasi yang dapat merangsang munculnya radikal bebas dan secara luas merusak DNA sel-sel manusia. Kekuatan antioksidan pada teh akan mencegah efek buruk HCA. Minum teh juga akan menghambat penumpukkan plak di arteri sehingga mengurangi resiko penyakit jantung koroner. Para peminum teh juga mempunyai arteri yang lebih muda dan kurang rusak. Arteri yang rapuh akan mempermudah penumpukkan kolesterol yang menyumbat pembuluh darah (Khomsan,2007).



Gambar.2.2. Struktur kimia *Epigallocatechin-3-gallate*, polifenol teh hijau (dikutip dari : Katiyar,et.al, 1999 *Molecular Epidemiology and Cancer Protection. Carcinogenesis*, 20 (11), 2117-2124. November 1999).

2.7.2. Pengaruh Polifenol Terhadap Radikal Bebas

Dalam polifenol terdapat senyawa flavonoid yang meliputi quersetin, katekin dan epikatekin, yang telah terbukti secara *in vitro* mempunyai efek biologis yang sangat kuat sebagai antioksidan dan menghambat sintesis eikosanoid dan agregasi trombosit, juga menghambat pertumbuhan sel kanker. Flavonoid juga terbukti merangsang produksi oksida nitrit yang merupakan faktor relaksasi otot polos pada vaskuler. Senyawa flavonoid, yang merupakan antioksidan yang sangat kuat yang merupakan scavenger untuk radikal anion, oksigen singlet, peroksi radikal lipid, dan juga dapat menghilangkan daya reaktif ion metal melalui penempelan (Wijaya,1997; Payne,2006; Ping Hju,2007; Sibuea,2007). Telah dilaporkan bahwa EGCG yang merupakan komponen utama polifenol mempunyai aktivitas modulasi fisiologi yang bervariasi seperti efek antibakteri, aksi scavenging radikal, mencegah arterosklerosis dan aktivitas antioksidan (Kawai,et.al., 2003).

Polifenol mempunyai reaktivitas yang tinggi terhadap ROS dan mengurangi peroksida. Polifenol juga telah menunjukkan untuk menekan peroksida lipid dan kerusakan DNA, lebih jauh polifenol juga bisa memproteksi dalam melawan berbagai macam penyakit yang berhubungan dengan ROS, misalnya gangguan kardiovaskular pada manusia, *ischemia reperfusion injurries* pada hati kelinci dan aterosklerosis pada tikus (Erba,et.al.,1999;Yusuf, et.al.,2006; Abe,2007).

Polifenol teh mempunyai aksi sebagai antioksidan, sebagai *scavenger* oksigen reaktif dan spesies nitrogen dan *chelating redox-active transition metal ion*. Juga berfungsi sebagai antioksidan secara tidak langsung melalui : (1) menghambat faktor-faktor transkripsi sensitive-redoks, nuclear factor kB dan protein activator-1; (2) menghambat enzim-enzim prooksidan, seperti *inducible nitrit oxide synthase*, lipoksigenase, siklooksigenase dan *xantine oxidase*; (3) Induksi fase II dan enzim

antioksidan, seperti *glutathione s-transferase* dan *superoxide dismutase* (Frei and Higdon,2003).

Sejumlah studi mendemonstrasikan bahwa polifenol dan katekin teh merupakan *scavenger* efektif secara fisiologis berkaitan dengan oksigen reaktif dan spesies nitrogen secara *in vivo*, meliputi superoksida (O_2°), radikal peroksil, oksigen singlet, peroksi nitrit ($ONOO^{\circ}$) dan *hypochlorous acid* (Frei and Higdon,2003).

Suplementasi dengan ekstrak teh hijau secara signifikan dapat mengurangi produksi malondialdehid ($1,6 \pm 0,3$ vs $0,6 \pm 0,1$ nmol/mg protein) dan kerusakan DNA ($0,32 \pm 0,07$ vs $0,12 \pm 0,04$ RTM, $p < 0,05$) setelah treatment oksidatif Fe^{2+} . Antioksidan yang dimiliki polifenol meliputi scavenging radikal oksigen dan radikal lipid. Inkubasi selama 24 jam sel-sel Jurkat dalam $\sim 15\mu\text{mol/L}$ EGCG cukup secara signifikan mengurangi kerusakan DNA. Konsentrasi EGCG sekitar delapan kali lebih tinggi ($15\mu\text{mol/L}$) menambah proteksi sel dari peroksida lipid dan kerusakan DNA (Erba,1999).

Polifenol teh hijau menghambat produksi NO dalam sel eksudat peritoneal (makrofag), menghambat lipopolisakarida- yang menginduksi produksi NO dan ekspresi gen iNOS dalam isolasi makrofag peritoneal oleh pengurangan aktivasi NF-kB, menghalangi ekspresi TNF- α karena penghambatan aktivasi NF-kB dan mengurangi respon inflamasi (Virnadell and Mitjans,2008).

Polifenol teh menghambat pembentukan ROS dengan menghambat enzim *xanthine oxidase*. *Xanthine oxidase* mengkatalisis oksidasi hipoxantine dan xantine ke asam urat, ketika pengurangan O_2 ke O_2° dan H_2O_2 . Katekin teh hijau dapat menghambat aktivitas *xanthine oxidase* secara *in vitro*, dengan EGCG menggunakan efek paling poten. Pada kultur sel leukemia manusia, EGCG dari teh hijau dan *theaflavin gallates* dari teh hitam juga menghambat aktivitas *xanthine oxidase* (Frei and Higdon,2003).

EGCG menyebabkan imunosupresi dan mengurangi produksi *Reactive Oxygen Intermediate*. Polifenol ini mempunyai efek yang besar sebagai *chemoprevention*. Percobaan pada polifenol teh hijau dapat menghambat lipid peroksida. EGCG dapat memberikan perlindungan kerusakan oksidatif dari DNA, dengan menembus *scavenging* langsung dari ROS. Penelitian ini juga telah memperlihatkan bahwa konsentrasi rendah polifenol teh hijau dapat mengurangi radikal hidroksil-penyebab kerusakan dasar dan kerusakan *DNA single strand*, oleh mekanisme transfer elektron dari katekin ke sisi radikal pada DNA. Secara *in vivo*, polifenol teh hijau juga menghambat UVB-penyebab petanda stress oksidatif pada binatang sebelum perlindungan radiasi UVB melawan deplesi glutathione, enzim antioksidan *glutathione peroxidase* dan *catalase*, mengurangi UV-penyebab lipid peroksidasi dan menghambat UVB-penyebab oksidasi protein. EGCG melindungi perlawanan UV-penyebab stress oksidatif pada manusia secara baik (Yusuf, et.al, 2006).

2.5.2.1. Pengaruh Polifenol Terhadap Antioksidan Tubuh

Pemberian daun teh hijau pada tikus secara signifikan menambah aktivitas GST di hati dan pemberian polifenol teh hijau pada tikus dalam air minumnya juga menambah aktivitas GST pada hati dan usus halus. Pemberian teh mencegah pengurangan konsentrasi *glutathione* (GSH) pada jaringan, pada 3 dari 4 studi pada binatang. Konsumsi teh hitam mencegah carbontetrachloride menginduksi deplesi GSH pada hati tikus jantan, tetapi tidak pada betina. Demikian juga pemberian ekstrak teh hijau pada minuman tikus jantan mencegah pengurangan konsentrasi GSH di hati, yang diinduksi dengan pemberian etanol. Ada tikus yang terinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*, pemberian ekstrak teh hijau secara oral melemahkan pengurangan konsentrasi GSH di eritrosit yang disebabkan oleh infeksi. Pemberian teh dan polifenol teh telah dilaporkan

untuk mencegah pengurangan dalam aktivitas enzim antioksidan pada sejumlah model hewan yang mengalami stres oksidatif. Pemberian polifenol teh hijau pada tikus yang botak pada minumannya secara signifikan menghambat UVB- menginduksi pengurangan katalase epidermal dan aktivitas *glutathione reduktase*. Pemberian ekstrak teh hijau secara oral pada tikus yang terinfeksi dengan *Micobacterium tuberculosis* melemahkan infeksi-yang dihubungkan dengan pengurangan pada aktivitas SOD pada eritrosit, ketika pemberian secara oral ekstrak teh hitam atau hijau dihasilkan penambahan aktivitas serum SOD pada tikus yang terekspos dengan karsinogen, *3-metylcolanthrene*. Pemberian ekstrak teh hijau pada minuman tikus melemahkan etanol-terkait dengan pengurangan aktivitas SOD dalam serum dan hati, demikian juga *Glutathione peroksidase* (GPx) pada hati dan katalase (Frei and Higdon,2003).

2.5.3. Pengaruh Polifenol Terhadap Sistem Imun

Epigalloatechin gallate (EGCG) bisa menyebabkan imunosupresi dan mengurangi produksi *reactive oxygen intermediate*. EGCG telah memperlihatkan perubahan keseimbangan, yaitu pengurangan produksi IL-10 dan penambahan IL-12. EGCG adalah komponen mayor dari polifenol teh telah dilaporkan mempunyai aktivitas modulator fisiologis yang bervariasi. (Yusuf,et.al.,2006). Dalam beberapa studi menunjukkan bahwa aplikasi topical dari fraksi polifenol yang diisolasi dari teh hijau sebelum dan sesudah radiasi UV (2kJ/m^2) pada kulit tikus C3H/HeN mempunyai proteksi dalam melawan UV-penyebab imunosupresi. Aplikasi EGCG pada model *Chemopreventive* terlihat mampu untuk merangsang respon imun dalam pengembangan produksi sitokin tipe sel Th1 dan Th2 (Katiyar,et.al.,1999).

Polifenol dapat menghambat produksi sitokin pro inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β dan IL-6. Itu sebagai bukti tambahan bahwa polifenol teh hijau juga mempunyai efek

anti inflamasi. Modulasi fungsi imun oleh polifenol bervariasi meliputi penurunan dan kenaikan regulasi. Efek yang bermanfaat adalah penghambatan yang meliputi pengurangan respon inflamasi dan juga kemungkinan digunakan zat kimia ini sebagai zat antiinflamasi (Vinardell & Mitjans,2008).

Pemberian 47 $\mu\text{mol/L}$ quercetin dapat menghasilkan 50% pengurangan kerusakan DNA limfosit. Sel-sel yang diinkubasi dengan quercetin (dari 7,6 – 279,4 $\mu\text{mol/L}$) selama hanya 30 menit dan menemukan hubungan kerusakan DNA dan konsentrasi flavonoid (Erba,1999).

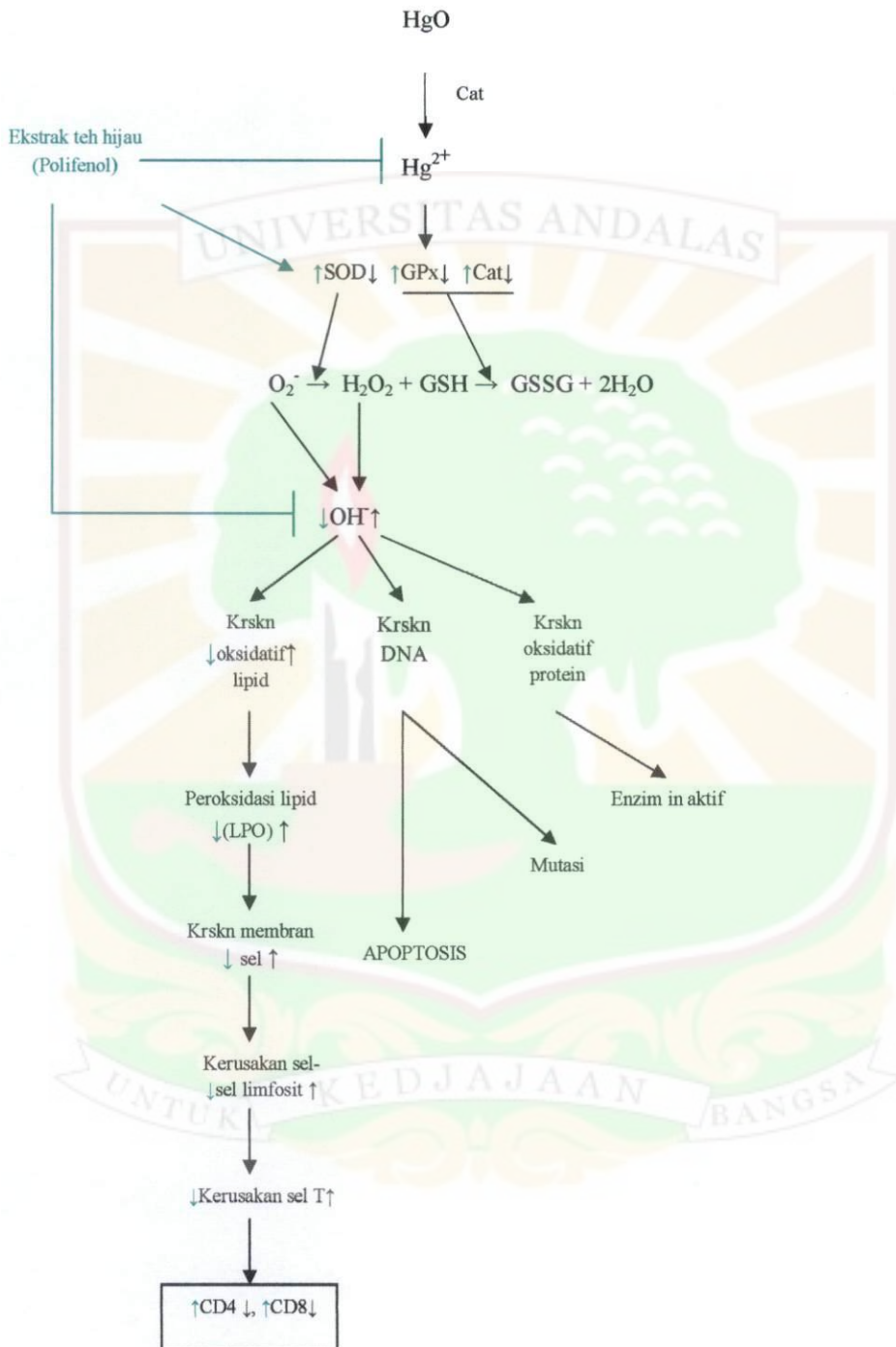
Beberapa laporan telah menunjukkan bahwa katekin mempunyai efek protektif melawan infeksi HIV, bagian yang diperantarai oleh penghambatan virion untuk berikatan dengan permukaan sel target. EGCG secara efisien menghambat perlekatan dari antibodi anti-CD4 terhadap antigen. Efek ini secara langsung diperantarai oleh perlekatan langsung EGCG pada molekul CD4, dengan akibat penghambatan perlekatan antibodi, seperti perlekatan gp 120 (Tsuno,et.al.,2003).

Telah dilaporkan bahwa flavonoid polifenol dapat menghindarkan proliferasi limfosit dan produksi IL-12. khususnya quercetin menghambat immunoglobulin yang diekskresikan oleh sel B yang distimulasi oleh mitogen (Virnadell and Mitjans,2008).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan: yang diperiksa, ↓ = pengurangan oleh teh hijau ↑ = peningkatan oleh teh hijau, ↑ = peningkatan oleh Hg, ↓ = pengurangan oleh Hg

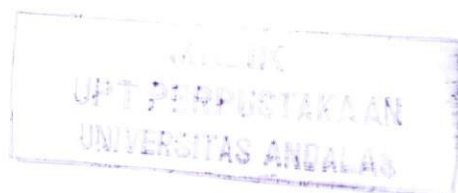
Penjelasan Kerangka Konseptual Penelitian :

Metal merkuri (Hg) mudah menguap pada suhu kamar sebagai HgO. Uap Hg secara efisien diabsorpsi melewati alveoli, kemudian ke paru-paru dan dengan cepat ditransportasikan melalui membran sel. Ketika memasuki sel-sel yang aktif secara metabolik, metal merkuri kemudian dioksidasi oleh katalase membentuk ion merkuri (Hg^{2+}).

Hg bisa menyebabkan deplesi pada enzim SOD, GPx dan katalase (Cat). Bila terjadi penghambatan aktivitas enzim-enzim ini, maka tidak akan dapat menetralkan pembentukan $\text{O}_2^{\cdot-}$ dan H_2O_2 yang berlebihan sehingga akan terbentuk radikal hidroksil (OH^{\cdot}). Bila terjadi paparan merkuri terus menerus maka produksi $\text{O}_2^{\cdot-}$ dan H_2O_2 akan meningkat. OH^{\cdot} merupakan senyawa oksigen reaktif yang sangat berbahaya bagi tubuh yang akan menimbulkan kerusakan pada tiga senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel, yaitu : lipid peroksida, protein dan DNA. Kerusakan oksidatif lipid akan menimbulkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan menimbulkan kerusakan pada membran sel, termasuk kerusakan sel-sel limfosit yang ditunjukkan dengan penurunan petanda permukaan sel T CD4^+ dan CD8^+ .

Ekstrak teh hijau mengandung polifenol yang merupakan antioksidan yang kuat dan merupakan *scavenger* radikal bebas dan juga dapat menghilangkan daya reaktif ion metal melalui penempelan. Polifenol juga dapat meningkatkan aktivitas SOD, GPX, dan katalase.

Berdasarkan uraian di atas, maka pada penelitian ini diharapkan akan dapat dilihat pengaruh pemberian ekstrak teh hijau yang mengandung polifenol terhadap kadar CD4^+ dan CD8^+ pada mencit yang terpapar merkuri sehubungan dengan reaksi yang ditimbulkan oleh merkuri.



3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan teori pada tinjauan pustaka, maka dapat dibuat hipotesis penelitian:

1. Ada pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ pada mencit yang terpapar merkuri.
2. Ada pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri.



B A B IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Berdasarkan tujuan yang akan dicapai, maka jenis penelitian ini adalah eksperimental murni, karena semua variabel yang berpengaruh selain perlakuan dapat dikendalikan.

4.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan faktorial, karena dalam penelitian ini digunakan dua faktor yaitu faktor lama pemberian dan faktor dosis pemberian. Faktor lama pemberian terdiri dari 2 tingkat dan faktor dosis terdiri atas 3 tingkat. Dengan ini maka akan terdapat 2x3 perlakuan yaitu 6 perlakuan, sehingga bagan rancangan penelitian dapat dibuat sebagai berikut:

Lama pemberian	Dosis pemberian ekstrak teh hijau (mg/20gr)		
	Kel A (0)	Kel B (0,52)	Kel C (1,04)
3 minggu			
6 minggu			

Pada semua kelompok mencit dipapar dengan merkuri secara inhalasi selama 4 jam sehari selama 3 dan 6 minggu. Pada kelompok B dan C diberi ekstrak teh hijau sesuai dengan dosis seperti bagan di atas.

4.3. Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah mencit putih (*Mus musculus*) jantan, yang terdapat di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas.

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bagian dari populasi yang memenuhi persyaratan :

- Jumlah memenuhi persyaratan jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini
- Anggota sampel berjenis kelamin jantan dengan pertimbangan agar sampel lebih homogen.
- Berumur ± 2 bulan dengan berat badan 20-25 gram.

Replikasi pada penelitian ini dengan menggunakan rumus Kemas (1991), yaitu:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Keterangan : t = treatment/perlakuan
r = replikasi/ulangan

Dari rumus ini didapatkan replikasi sebanyak 4. Jadi sampel minimal adalah 4. Pada penelitian ini banyaknya replikasi pada setiap kelompok adalah 6.

4.3.3. Besar Sampel

Dari perhitungan di atas, replikasi minimal pada setiap kelompok adalah 4. Pada penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 6 untuk setiap kelompok. Banyaknya

kelompok pada penelitian ini adalah 6, sehingga dalam penelitian ini diperlukan $6 \times 6 = 36$ ekor mencit.

4.3.4. Teknik Pengambilan Sampel

Mencit yang diambil dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan sebanyak 36 ekor. Kemudian mencit-mencit tersebut dibagi ke dalam 6 kelompok secara acak sederhana.

4.4. Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

4.4.1. Klasifikasi Variabel

Penelitian ini merupakan penelitian multivariat yang mempunyai :

1. Variabel Bebas, yaitu:
 - a. Lama pemberian ekstrak teh hijau
 - b. Dosis ekstrak teh hijau
2. Variabel terkontrol:
 - a. Umur hewan percobaan
 - b. Jenis kelamin hewan percobaan
 - c. Berat badan hewan percobaan
 - d. Jenis, cara dan lama merkuri yang digunakan
3. Variabel penghubung, yaitu:
 - a. Enzim *Glutathione peroksidase* (GPx)
4. Variabel tergantung, yaitu:
 - a. Jumlah sel T CD4 dan CD8

4.4.2. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi operasional
Variabel Bebas:	
1. Ekstrak teh hijau	Teh hijau yang digunakan adalah teh hijau yang ada di pasaran yang diekstraksi di Laboratorium Kesehatan Propinsi Sumatera Barat
2. Dosis ekstrak teh hijau	Pemberian ekstrak teh hijau dilakukan selama 3 dan 6 minggu dengan dosis per hari 0,52 dan 1,04 mg/20gr BB pada masing-masing kelompok
3. Jumlah sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺	Merupakan jumlah sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ per μ L darah, yang diperiksa di Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Kanker Dharmais Jakarta

4.5. Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1. Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah:

- a. Mencit putih (Mus musculus) jantan
- b. Makanan dasar mencit berupa pellet butiran jenis 521 produksi PT. Charoen Pokhand Indonesia, Mojokerto Jawa Timur yang mengandung:
 - protein 10-21 %
 - hidrat arang 36-40%
 - serat 3 – 5 %
 - lemak 5 – 8 %
 - mineral 4 – 7 %
 - kandungan energi 2.800 – 3.000 kkal/kg
- c. Merkuri yang digunakan adalah jenis merkuri metal yang biasa digunakan sebagai bahan tambal amalgam, dengan merk Kasadental Japan.
- d. Teh hijau yang digunakan adalah teh hijau yang ada di pasaran dengan merk Teh Hijau (Green Tea) cap Kepala Djenggot, yang diekstraksi di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas

e. *Reagent CD 8a APC, CD 4 PE, CD 3 FITC, CD 45 PerCP-Cy5.5*

4.5.2. Instrumen Penelitian

- a. Alat gelas
- b. Timbangan untuk mengukur berat badan mencit
- c. Timbangan untuk mengukur dosis ekstrak teh hijau
- d. Kandang mencit

Kandang mencit yang digunakan terbuat dari bak plastik yang ditutup dengan anyaman kawat beralas sekam. Masing-masing kelompok menempati satu kandang. Sebelum digunakan kandang dicuci bersih, kemudian alas kandang diberi sekam. Setiap dua hari sekam diganti sehingga kebersihan tetap terjaga. Tempat pakan terbuat dari plastik. Tempat minum terbuat dari botol plastik yang dilengkapi tutup jenis termo plastik. Botol diletakan di atas kandang dengan posisi terbalik yang berisi aquades yang diganti tiap hari. Pada waktu perlakuan pemberian merkuri selama 4 jam, kandang ditutup dengan karton dan diberi ventilasi. Merkuri sebanyak 50 gram diletakan dalam suatu wadah dalam keadaan terbuka selama 4 jam sehari.

e. *Trucount tube, facs Lysing, Facs flow, Tip putih, Tip kuning, alat Facs Calibur*

4.6. Persyaratan Etik

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan hewan coba pada penelitian ini mengikuti *animal ethic* yang meliputi perawatan dalam kandang, pemberian makan dan minum, aliran udara dalam kandang. Perlakuan pada saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya.

4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di:

1. Laboratorium Farmasi Universitas Andalas untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba.
2. Laboratorium Kesehatan Propinsi Sumatera Barat untuk pembuatan ekstrak teh hijau.
3. Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Kanker Dharmais untuk pemeriksaan kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺.

Jadwal Penelitian :

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2008 - Juli 2009.

4.8. Prosedur atau Pengumpulan Data

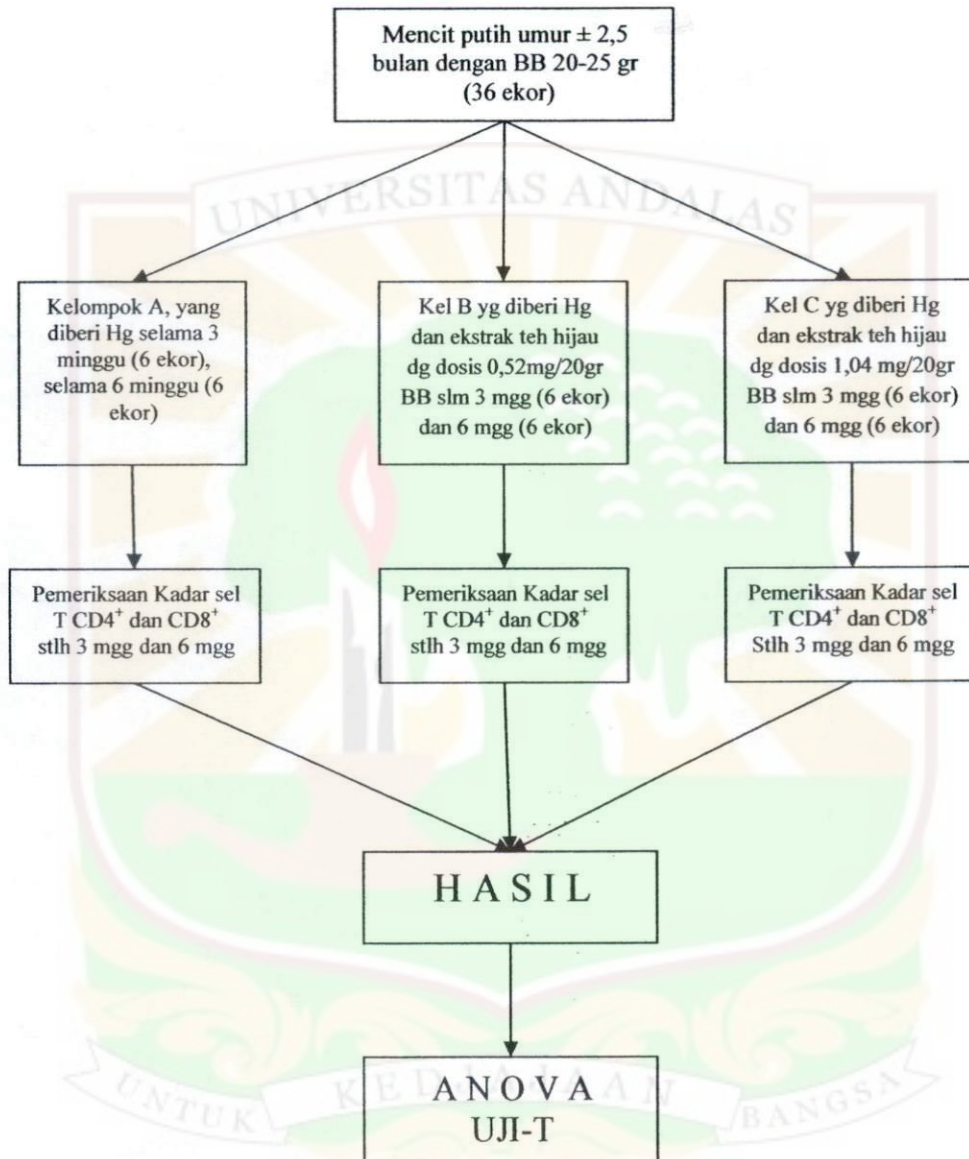
Pada penelitian ini digunakan mencit putih (*Mus musculus*) dengan berat badan 20-25 gram, dipilih secara acak sederhana. Mencit yang digunakan sebanyak 36 ekor, yang dibagi ke dalam 6 kelompok yaitu kelompok A, B, C, (dengan perlakuan 3 dan 6 minggu). Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit. Kelompok A adalah kelompok kontrol, hanya dipapar dengan merkuri saja tanpa pemberian ekstrak teh hijau. Kelompok B adalah kelompok yang dipapar dengan merkuri dan diberi ekstrak teh hijau dengan dosis 0,52 mg/20 gram. Kelompok C adalah kelompok perlakuan yang dipapar dengan merkuri dan diberi ekstrak teh hijau dengan dosis 1,04mg/20gr.

Mencit pada semua kelompok dipapar dengan merkuri secara inhalasi selama 4 jam sehari. Mencit diletakkan dalam kandang dengan desain khusus, diberikan perlakuan dan pakan yang sama.

Pada minggu ke tiga dan enam masing-masing kelompok diambil darahnya dengan memotong pembuluh darah di leher, kemudian dimasukkan ke dalam EDTA 3 ml. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan terhadap kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dengan teknik

Flowcytometry. Pemeriksaan kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Kanker Dharmais Jakarta.

4.8.1. Kerangka Operasional Penelitian:



4.9. Pengolahan dan Analisa Data

Data yang diperoleh diolah dan dianalisis dengan menggunakan analisis ANOVA dan Uji T independen dengan Interval Kepercayaan 95%.

BAB V

HASIL PENELITIAN

Pada penelitian ini telah dilakukan pemeriksaan terhadap pengaruh pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada mencit putih (*Mus musculus*) yang terpapar merkuri. Mencit berjumlah 36 ekor yang berumur lebih kurang dua setengah bulan dengan berat badan sekitar 20-25 gram, yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan. Hasil analisa statistik dapat dilihat sebagai berikut:

5.1. Pengaruh lama pemberian dan dosis ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ pada mencit yang terpapar merkuri

Perbedaan rerata kadar sel T CD4⁺ mencit putih yang terpapar merkuri pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian ekstrak teh hijau dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Perbedaan rerata kadar sel T CD4⁺ mencit putih yang terpapar merkuri pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian ekstrak teh hijau

Lama pemberian Dosis (mg/20 gr BB)	Kadar sel T CD4 ⁺ setelah pemberian ekstrak teh hijau			p
	A (0)	B (0,52)	C (1,04)	
3 minggu	8.076,67 ± 3307,79	9.895,00 ± 4249,42	11.158,33 ± 2412,70	0,317
6 minggu	4.001,67 ± 1710,07	9.438,33 ± 5099,46	5.368,33 ± 2523,58	0,039*

Keterangan: *signifikansi pada $p < 0,05$

Dari tabel 5.1 dapat dilihat terjadi peningkatan rerata kadar sel T CD4⁺ pada kelompok B dan C dalam waktu 3 dan 6 minggu. Hasil yang didapat dianalisis dengan analisis satu jalur (ANOVA), untuk mengetahui pengaruh dosis maupun lama pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ mencit putih.

Hasil analisis variansi satu jalur diperoleh nilai $p = 0,317$ ($p > 0,05$) pada pemberian ekstrak teh hijau selama 3 minggu (Tabel 5.2). Hal ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna di antara rerata jumlah sel T CD4⁺ kelompok perlakuan dengan kontrol selama 3 minggu. Tetapi pada pemberian selama 6 minggu terdapat perbedaan yang bermakna, $p = 0,039$ ($p < 0,05$) diantara rerata jumlah sel T CD4⁺ pada ketiga kelompok. Hasil analisis perbedaan rerata kadar sel T CD4⁺ pada pemberian ekstrak teh hijau selama 3 minggu dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil analisis kadar sel T CD4⁺ pada berbagai kelompok berdasarkan dosis pemberian ekstrak teh hijau selama 3 minggu

Kelompok	A3	B3	C3
A3	-	1,000	0,414
B3	-	-	1,000
C3	-	-	-

Keterangan: signifikansi pada $p < 0,05$

Dari tabel di atas dapat dilihat tidak terdapat perbedaan yang bermakna kadar sel T CD4⁺ antara kelompok A3 dengan B3 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau dengan dosis 0,52 mg/20 gram BB (B3) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diberi ekstrak teh hijau. Demikian juga dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak teh hijau (A3) dengan kelompok yang diberi ekstrak teh hijau sebanyak 1,04 mg/20 gr BB (C3). Pemberian ekstrak teh hijau pada kelompok B3 (0,52 mg/20 gr BB) dan C3 (1,04 mg/20 gr BB) juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada perlakuan selama 3 minggu.

Hasil analisis perbedaan rerata jumlah sel T CD4⁺ pada pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil analisis kadar sel T CD4⁺ pada berbagai kelompok berdasarkan dosis pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu

Kelompok	A6	B6	C6
A6	-	0,045*	1,000
B6	-	-	0,173
C6	-	-	-

Keterangan: * signifikansi pada $p < 0,05$

Dari tabel di atas dapat dilihat terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok A6 dengan B6 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu dengan dosis 0,52 mg/20 gram BB (B6) dapat menaikkan kadar sel T CD4⁺ secara bermakna dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diberi ekstrak teh hijau. Tetapi antara kelompok yang tidak diberi ekstrak teh hijau (A6) dengan kelompok yang diberi ekstrak teh hijau sebanyak 1,04 mg/20 gram BB (C6), tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Demikian juga antara kelompok yang diberi 0,52 mg ekstrak teh hijau (B6) dan kelompok yang diberi 1,04 mg ekstrak teh hijau (C6) tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada perlakuan selama 6 minggu.

Analisis kadar sel T CD4⁺ pada masing-masing kelompok berdasarkan lama pemberian ekstrak teh hijau (3 dan 6 minggu) dilakukan dengan menggunakan uji-T. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.4

Tabel 5.4. Hasil analisis uji T kadar sel T CD4⁺ pada masing-masing kelompok berdasarkan lama pemberian ekstrak teh hijau

Kelompok	Uji T	ρ
A3 - A6	2,681	0,023*
B3 - B6	0,169	0,870
C3 - C6	4,062	0,002*

Keterangan: *signifikansi pada $p < 0,05$

Hasil uji T pada tabel di atas dapat dilihat perbedaan yang bermakna pada kelompok A yaitu pemberian merkuri secara inhalasi tanpa pemberian ekstrak teh hijau antara 3 minggu dan 6 minggu, dimana terjadi penurunan rerata kadar sel T CD4⁺ secara bermakna pada mencit yang terpapar merkuri selama 6 minggu. Perbedaan yang bermakna juga terjadi pada kelompok C yaitu pada kelompok yang terpapar merkuri dengan pemberian 1,04 mg/gram berat badan ekstrak teh hijau. selama 3 minggu dan 6 minggu. Terjadi penurunan rerata kadar sel T CD4⁺ secara bermakna pada kelompok 6 minggu. Dari tabel 5.4. ini juga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau dengan dosis 0,52 mg (B) tidak menunjukkan perbedaan rerata kadar sel T CD4⁺ secara bermakna pada pemberian 3 minggu dan 6 minggu

5.2. Pengaruh lama pemberian dan dosis ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri

Rerata kadar sel T CD8⁺ mencit putih yang terpapar merkuri pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian ekstrak teh hijau dapat dilihat pada tabel 5.5.

Tabel 5.5. Rerata kadar sel T CD8⁺ mencit putih yang terpapar merkuri pada bermacam-macam dosis dan lama pemberian ekstrak teh hijau

Lama pemberian Dosis (mg/20 gr BB)	Dosis pemberian ekstrak teh hijau (mg/20gr)			p
	Kel A (0)	Kel B (0,52)	Kel C (1,04)	
3 minggu	2440,00 ± 1284,96	3435,00 ± 1201,06	4331,67 ± 3007,14	0,294
6 minggu	1306,67 ± 1415,99	3325,00 ± 2200,75	1593,33 ± 512,47	0,079

Keterangan: signifikansi pada $p < 0,05$

Dari tabel 5.5 dapat dilihat terjadi peningkatan rerata kadar sel T CD8⁺ pada kelompok B dan C dalam waktu 3 minggu. Juga dapat dilihat peningkatan kadar sel T CD8⁺ pada kelompok B dan C dalam waktu 6 minggu. Tetapi setelah dilakukan uji

ANOVA diperoleh nilai $p = 0,294$ ($p > 0,05$) pada pemberian ekstrak teh hijau selama 3 minggu dan $p = 0,079$ ($p > 0,05$) pada pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu (Tabel 5.5). Hal ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna di antara rerata kadar sel T CD8⁺ pada semua kelompok, baik pada perlakuan selama 3 minggu maupun selama 6 minggu.

Tabel 5.6 Hasil analisis kadar sel T CD8⁺ pada berbagai kelompok berdasarkan dosis pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu

Kelompok	A3	B3	C3
A3	-	1,000	0,372
B3	-	-	1,000
C3	-	-	-

Keterangan: signifikansi pada $p < 0,05$

Dari tabel di atas dapat dilihat tidak terdapat perbedaan yang bermakna kadar sel T CD8⁺ semua kelompok ($p > 0,05$) pada perlakuan selama 3 minggu.. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau dengan dosis 0,52 mg/20 gram BB (B3) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna kadar sel T CD8⁺ dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diberi ekstrak teh hijau. Demikian juga dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak teh hijau (A3) dengan kelompok yang diberi ekstrak teh hijau sebanyak 1,04 mg/20 gr BB (C3). Pemberian ekstrak teh hijau pada kelompok B3 (0,52 mg/20 gr BB) dan C3 (1,04 mg/20 gr BB) juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna kadar sel T CD8⁺ pada perlakuan selama 3 minggu.

Hasil analisis perbedaan rerata jumlah sel T CD8⁺ pada berbagai kelompok pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu dapat dilihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.7. Hasil analisis kadar sel T CD8⁺ pada berbagai kelompok berdasarkan dosis pemberian ekstrak teh hijau selama 6 minggu

Kelompok	A6	B6	C6
A6	-	0,115	1,000
B6	-	-	0,211
C6	-	-	-

Keterangan: signifikansi pada $p < 0,05$

Dari tabel di atas dapat dilihat tidak terdapat perbedaan yang bermakna kadar sel T CD8⁺ semua kelompok ($p > 0,05$) pada perlakuan selama 6 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau dengan dosis 0,52 mg/20 gram BB (B6) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna kadar sel T CD8⁺ dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diberi ekstrak teh hijau. Demikian juga dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak teh hijau (A6) dengan kelompok yang diberi ekstrak teh hijau sebanyak 1,04 mg/20 gr BB (C6). Pemberian ekstrak teh hijau pada kelompok B6 (0,52 mg/20 gr BB) dan C6 (1,04 mg/20 gr BB) juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna kadar sel T CD8⁺ pada perlakuan selama 6 minggu.

Analisis kadar sel T CD8⁺ pada masing-masing kelompok berdasarkan lama pemberian ekstrak teh hijau (3 dan 6 minggu) dilakukan dengan menggunakan uji-T. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.8

Tabel 5.8. Hasil analisis kadar sel T CD8⁺ pada masing-masing kelompok berdasarkan lama pemberian ekstrak teh hijau

Kelompok	Uji T	ρ
A3 - A6	1,452	0,177
B3 - B6	0,107	0,917
C3 - C6	2,199	0,053

Keterangan: signifikansi pada $p < 0,05$

Hasil uji T diperoleh nilai $p > 0,05$ (Tabel 5.8) pada semua kelompok. Hal ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna diantara rerata kadar sel T CD8⁺ kelompok pada pemberian ekstrak teh hijau selama 3 minggu maupun 6 minggu.



BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Pengaruh lama pemberian dan dosis ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ pada mencit yang terpapar merkuri

Hasil penelitian yang didapatkan menunjukkan bahwa terjadi peningkatan rerata kadar sel T CD4⁺ pada kelompok B dan C dalam waktu 3 dan 6 minggu. Hasil yang didapat dianalisis dengan ANOVA untuk mengetahui pengaruh dosis maupun lama pemberian ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD4⁺ mencit putih (Tabel 5.1). Tetapi setelah dianalisa secara statistik peningkatan rerata kadar sel T CD4⁺ ini tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (tidak bermakna) pada pemberian ekstrak teh hijau selama 3 minggu pada semua dosis (Tabel 5.2). Tetapi pada pemberian 0,52 mg/20 gr BB ekstrak teh hijau (B) selama 6 minggu menunjukkan peningkatan kadar sel T CD4⁺ yang bermakna ($p = 0,039$) dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak teh hijau (A) (Tabel 5.3).

Sejumlah studi mengemukakan bahwa polifenol teh hijau merupakan *scavenger* efektif berkaitan dengan spesies oksigen dan nitrogen reaktif. Polifenol juga mempunyai kemampuan dalam mengikat (*chelate*) ion-ion metal. Polifenol juga dapat menghambat pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dengan menghambat xantine oksidase. Pemberian teh pada tikus secara signifikan menambah aktifitas GST di hati dan pemberian polifenol teh hijau pada air minum mencit juga secara signifikan menambah aktivitas GST pada hati dan usus halus. Konsumsi teh dapat mencegah deplesi GSH akibat carbon-tetrachloride pada hati tikus jantan, tetapi tidak pada tikus betina. Pemberian teh dan polifenol teh telah dilaporkan dapat mencegah pengurangan aktivitas enzim antioksidan dari sejumlah hewan coba yang mengalami stress oksidatif. Pemberian

ekstrak teh hijau dalam air minum tikus dapat mencegah pengurangan SOD pada hati dan serum terkait dengan etanol begitu juga aktivitas *gluthatione peroxidase* (GPX) dan katalase hati (Frei et.al,2003). Epigallocatechin gallate (EGCG) dalam teh hijau dapat menambah proteksi sel dari peroksidasi lipid membran dan kerusakan DNA (Erba et al, 1999).

Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan pada tahun 2008, terdapat perbedaan yang signifikan kadar merkuri dalam darah pada mencit yang terpapar merkuri pada kelompok yang diberi ekstrak teh hijau dengan yang tidak diberi ekstrak teh hijau pada dosis 0,52 mg dan 0,78 mg/20 gr berat badan. Pada mencit yang diberi ekstrak teh hijau terdapat kadar merkuri dalam darah yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak teh hijau (Afriza,2008).

Jadi dengan berkurangnya merkuri akibat fungsi dari polifenol teh hijau yang dapat mengikat (*chelate*) ion logam, sebagai *scavenger* radikal bebas serta dapat meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan (GPX, SOD dan katalase) dalam tubuh maka ekstrak teh hijau secara tidak langsung dapat mengurangi kerusakan sel-sel tubuh akibat radikal bebas yang ditimbulkan oleh merkuri, termasuk sel T (sel T CD4⁺ dan CD8⁺).

Hasil penelitian juga didapatkan perbedaan yang bermakna pada kelompok A yaitu pemberian merkuri secara inhalasi tanpa pemberian ekstrak teh hijau antara 3 minggu dan 6 minggu, dimana terjadi penurunan rerata kadar sel T CD4⁺ secara bermakna pada mencit yang terpapar merkuri selama 6 minggu (Tabel 5.4).

Merkuri merupakan logam berat yang sangat berbahaya, karena kemampuan merkuri dalam menghasilkan radikal bebas sangat luar biasa. Merkuri bisa menyebabkan deplesi pada enzim-enzim antioksidan tubuh seperti GPX, SOD dan Katalase. Enzim-enzim tersebut sangat berperan dalam menangkal pembentukan radikal bebas dalam

tubuh. Merkuri juga menghasilkan lipid peroksidasi dan juga menambah pembentukan H_2O_2 pada ginjal tikus (Crinnion,2000; Windham,2001; Valko et.al,2005; Larsens,2007, Flora et.al., 2008). Dengan terjadinya deplesi pada enzim-enzim tersebut akan dapat menyebabkan pembentukan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel tubuh termasuk sel-sel sistem imun, yaitu sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$.

Penelitian yang dilakukan oleh Kim Hyun Sang et.al (2003) meneliti mencit jenis BALB/c jantan yang dipapar secara terus menerus dengan dosis 0; 0,3; 1,5; 7,5 dan 37,5 ppm dalam air minum selama 14 hari menunjukkan kadar sel T $CD4^+$ limpa menurun tetapi kadar sel T $CD4^+$ timosit tidak berubah (Inswasri,2008). Penelitian yang dilakukan oleh Day et.al (2007) menemukan bahwa terpapar dengan metilmerkuri dapat menyebabkan penekanan respon proliferasi sel T (0,7 $\mu g/g$). Dapat disimpulkan bahwa terpapar dengan merkuri secara terus-menerus dapat menurunkan kadar sel T, khususnya sel T $CD4^+$.

Perbedaan yang bermakna juga terjadi pada kelompok C yaitu pada kelompok yang terpapar merkuri dengan pemberian 1,04 mg/gram berat badan ekstrak teh hijau. selama 3 minggu dan 6 minggu. Terjadi penurunan rerata kadar sel T $CD4^+$ secara bermakna pada 6 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa terpapar dengan merkuri dalam waktu yang lama disertai dengan konsumsi teh hijau pada dosis 1,04 mg dapat juga menurunkan kadar sel T $CD4^+$ secara bermakna (Tabel 5.4).

Penelitian yang dilakukan oleh Kawai et.al (2003) menyebutkan bahwa pemberian *Epigallocatechin gallate* (EGCG) yang merupakan komponen mayor polifenol teh hijau dapat menyebabkan penurunan sel T $CD4^+$ secara signifikan pada dosis 25 $\mu mol/L$, tetapi lebih menonjol pada dosis 50 $\mu mol/L$ secara in vitro. Penelitian yang lain menyebutkan bahwa polifenol mempunyai sifat sebagai imunomodulator, dapat menaikkan dan menurunkan regulasi sistem imun (Vinardell et.al, 2008). Jadi dari penelitian ini dapat

disimpulkan bahwa polifenol teh hijau dapat berfungsi menaikkan dan menurunkan kadar sel-sel pada sistem imun, khususnya kadar sel T CD4⁺. Pada dosis 1,04 mg/20 gr BB ekstrak teh hijau dapat menurunkan kadar sel T CD4⁺ pada mencit yang terpapar merkuri. Sedangkan pada kadar 0,52 mg/20 gr BB dapat menaikkan kadar sel T CD4⁺ pada mencit yang terpapar merkuri.

6.2. Pengaruh lama pemberian dan dosis ekstrak teh hijau terhadap kadar sel T CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri

Hasil penelitian yang didapatkan menunjukkan terjadinya peningkatan rerata kadar sel T CD8⁺ pada kelompok B dan C dalam waktu 3 dan 6 minggu dibandingkan dengan kelompok A (kontrol). Tetapi setelah dianalisa secara statistik, peningkatan rerata kadar sel T CD8⁺ tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (bermakna) (Tabel 5.5).

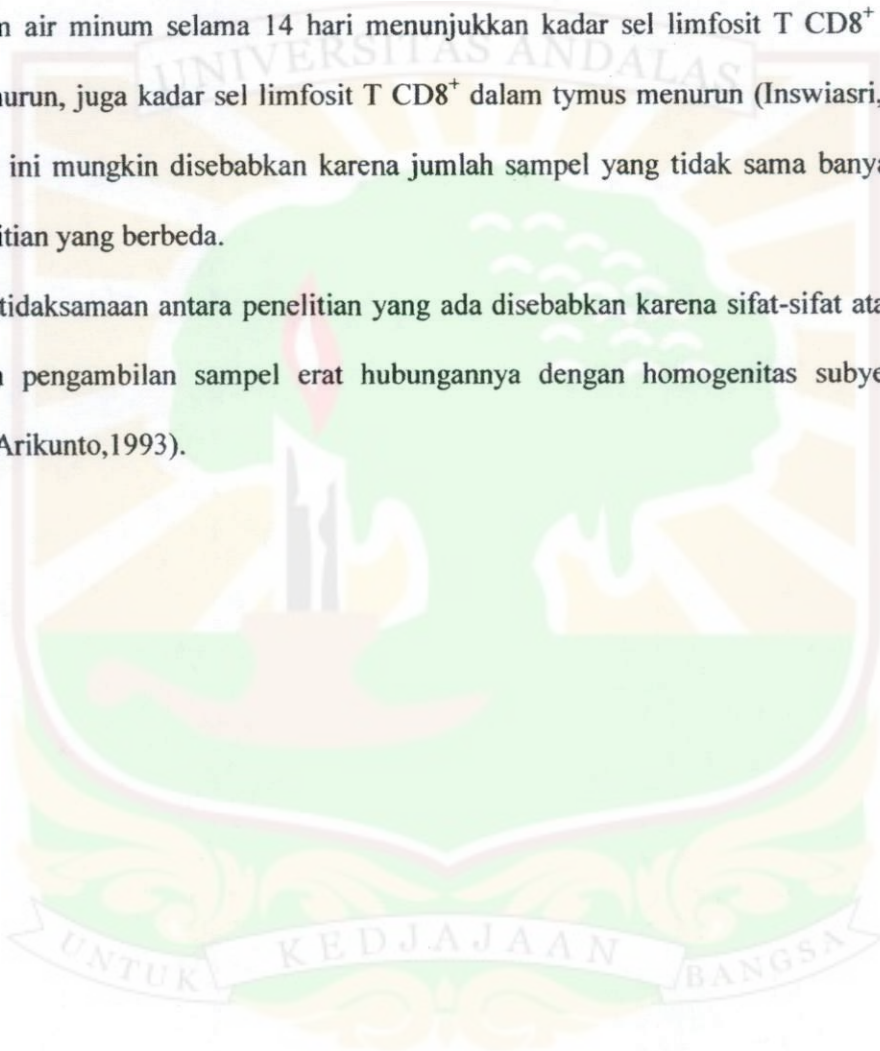
Hasil analisis statistik juga menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna diantara rerata kadar sel T CD8⁺ semua kelompok pada pemberian ekstrak teh hijau selama 3 minggu maupun 6 minggu. Ekstrak teh hijau merupakan antioksidan yang kuat yang dapat berfungsi sebagai *scavenger* efektif menghambat pembentukan spesies oksigen dan nitrogen reaktif yang dihasilkan merkuri. Polifenol juga mempunyai kemampuan dalam mengikat (*chelate*) ion-ion metal, dapat meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan (GPX, SOD dan katalase) dalam tubuh. Maka ekstrak teh hijau secara tidak langsung dapat mengurangi kerusakan sel-sel tubuh akibat radikal bebas yang ditimbulkan oleh merkuri, termasuk sel T (sel T CD4⁺ dan CD8⁺).

Disebutkan juga bahwa ekstrak teh hijau dapat menaikkan dan menurunkan regulasi sistem imun. Tetapi pada penelitian ini ekstrak teh hijau tidak mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap kadar sel T CD8⁺ mencit yang terpapar merkuri. Hal

ini kemungkinan disebabkan karena dosis ekstrak teh hijau yang belum optimal dalam menaikkan kadar sel T CD8⁺.

Pada kelompok yang hanya diberi merkuri saja tanpa pemberian teh hijau tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok 3 minggu dan 6 minggu. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Kim Hyun Sang et.al (2003) meneliti mencit jenis BALB/c jantan yang dipajan secara terus menerus dengan dosis 0; 0,3; 1,5; 7,5 dan 37,5 ppm dalam air minum selama 14 hari menunjukkan kadar sel limfosit T CD8⁺ dalam limpa menurun, juga kadar sel limfosit T CD8⁺ dalam tymus menurun (Inswiasri,2008). Perbedaan ini mungkin disebabkan karena jumlah sampel yang tidak sama banyak dan cara penelitian yang berbeda.

Ketidaksamaan antara penelitian yang ada disebabkan karena sifat-sifat atau ciri-ciri dalam pengambilan sampel erat hubungannya dengan homogenitas subyek dan populasi (Arikunto,1993).



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan analisis hasil penelitian dan pembahasannya dapat dibuatkan kesimpulan yaitu:

1. Pemberian ekstrak teh hijau berpengaruh terhadap kadar sel T CD4⁺ pada mencit yang terpapar merkuri, berperan sebagai immunomodulator, dapat menaikkan dan menurunkan kadar sel T CD4⁺ pada dosis tertentu.
2. Pemberian ekstrak teh hijau tidak berpengaruh terhadap kadar sel T CD8⁺ pada mencit yang terpapar merkuri.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian merkuri secara inhalasi terhadap kadar sel limfosit T CD4⁺ dan CD8⁺ dalam rentang waktu yang lebih lama.
2. Harus terus dilakukan upaya pencegahan pencemaran merkuri di lingkungan kerja dokter gigi dengan cara-cara yang sudah ditentukan.
3. Pemerintah harus makin meningkatkan pengawasan terhadap pembuangan sampah yang berbahaya termasuk amalgam gigi dan merkuri.
4. Konsumsi teh hijau dapat dianjurkan khususnya bagi dokter gigi dan masyarakat yang hidup di lingkungan yang terpapar merkuri seperti di daerah industri yang menggunakan merkuri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe S, Tanaka Y, Fujise N, Nakamura T, et al. 2007. An Antioxidative Nutrient-Rich Enteral Diet Attenuates Lethal Activity and Oxidative Stress Induced By Lipopolysaccharide In Mice. *JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. Silver Spring: May/June 2007; 31(3): 181-7.
- Afriza D, 2008. Kadar Merkuri Dalam Urin dan Darah Mahasiswa yang Bekerja di Laboratorium Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah. *Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian 2008*. Bogor: Universitas Djuanda Press
- Afriza D and Widiawati, 2008. Influence of Green Tea Extract to Reduce Mercury Level in Blood. *Proceeding: Asian Oral Health Care*. Jakarta Indonesia. 20-22.
- Anonymous, 2001. Immune Response to Exposure to Occupational and Environmental Agents. *ICMR Bulletin*. June-July 2001, 31(6&7).
- Anonymous, 2006. Mercury Amalgams: Can They Cause Neurological Problems? *Nutrition Health Review*. Haverford; (94):10-2.
- Anusavice KJ, 1996. *Phillip's Science of Dental Materials*. Tenth ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company.
- Anwar DA, Supartinah AI, Handajani J. 2007. Efek kumur ekstrak the hijau (*Camellia sinensis*) terhadap derajat keasaman dan volume saliva penderita gingivitis. *Indonesian Journal of Dentistry*; 14 (1): 22-26.
- Arikunto S, 1993. *Prosedur Penelitian, Suatu Pendekatan Praktek*. Edisi revisi II. Jakarta: PT. Rhineka Cipta.
- Baum et al, 1997. *Buku Ajar Ilmu Konservasi Gigi (Text Book Operative Dentistry)*. Jakarta : EGC.
- Baynes ER and Hodgson E, 2004. Absorbtion and Distribution of Toxicants. Dalam: *A Textbook of Modern Toxicology*. Edited by Ernest Hodgson. Third edition. USA: Wiley-Interscience.
- Bellinger DC, Trachtenberg F, Barregard L, Traveres M, et al, 2006. Neuropsychological and Renal Effects of Dental Amalgam in Children; A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. Chicago: 295 (15);1775-9.
- Bigazzi PE, 1999. Metals and Kidney Autoimmunity. *Environmental Health Perspectives*. October 1999. 107 (5); 753-62.
- Cederbrant K, Gunnarson, LG, et al., 1999. In Vitro Proliferative Assays with HgCl₂ cannot Identify Patients with Systemic Stntoms Attributed to Dental Amalgam. *Journal of Dental Research*. Houston; 78 (8): 1450-9.
- Craig RG, et al. 1997. *Restorative Dental Materials*. Tenth ed. USA : Mosby.
- Craig RG, et al, 2000. *Dental Materials Properties & Manipulation*. USA: Mosby.

- Chada PV. 1995. Ilmu Forensik dan Toksikologi. Jakarta : Widya Medika.
- Chen YW, Huang CF, Tsai KS, Yang RS, et.al, 2006. The Role of Phosphoinositide 3-Kinase/Akt. Signaling In Low-Dose Mercury-Induced Mouse Pancreatic (beta)-Cell Disfunction In Vitro and In Vivo. *Diabetes*. New York; 55 (6): 1614-25.
- Cline JC. 2005. Mercury toxicity and the use of DMPS chelation. <http://www.talkinternational.org/>.
- Cope WG, Leidy RB, Hodgson E, 2004. Classes of Toxicants: Uses Classes. Dalam: A Textbook of Modern Toxicology. Edited by Ernest Hodgson. Third edition. USA: Wiley-Interscience. pp 49-54
- Crinion,WJ. 2000. Long Term Effects of Chronic Low Dose Mercury Expose. *Environmental Medicine*, part three.
- Darwin E, 2004. *Imunologi dan Infeksi*. Padang: Andalas University Press.
- Day RD, et.al.2007. Relationship of blood mercury levels to health parameters n the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) environmental health prospective research triangle park; 115 (10): 1421-29.
- Emerson. 2007. *Mercury Free and Healthy*. <http://www.amalgam.org/>.
- Erba D, Riso P, Colombo A and Testolin G, 1999. Supplementation of Jurkat T cells with Green Tea Extracts Decreases Oxidative Damage Due to Iron Treatment. *Journal of Nutrition*; 129: 2130-2134.
- Fattah M, 2006. Sindroma Metabolik dan Penanda Baru Disfungsi Endotel: Asimetrik Dimetil Arginin (ADMA) dan High Sensitivity C-reactive Protein (hs-CRP). *Forum Diagnosticum*. Prodia Diagnostics Educational Services. ISSN 0854-7173. No. 1/2006.
- Fillion J, Baccala R, Pannetier C, et al., 1997. Evidence for heterogenous TCR V β repertoire expression in mercury-induced immune disorders in rats. *International Immunology*. Feb 1997. 9 (2); 263-70. Proquest Medical Library
- Flora SJS, Mittal M, Mehta A, 2008. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medicine Research*: October 2008; 128(4): ProQuest Medical Library.
- Ford TRP, 1993. *Restorasi Gigi*. Edisi 2. Jakarta: EGC.
- Frei B and Higdon JV, 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evienc from animals Studies. *The Journal of Nutrition*: 133(10): ProQuest Medical Library. Pg. 3275s.
- Guo S, Yang S, Taylor C, Sonenshein GE, 2005. Green Tea Polyphenol Epigalloatechin-3 Gallate (EGCG) Affects Gene Expression of Breast Cancer Cells Transformed by the Carcinogen 7,12-Dymethylbenz[a]Anthracenel-3. *The Journal of Nutrition*. Bethesda; 135 (12): 2978-87.

- Halliwell B and Gutteridge JMC, 1999. The chemistry of free radicals and related reactive species. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition. New York: Oxford University Press: 48-95.
- Halliwell B and Gutteridge JMC, 1999. Oxidative stress: adaption, damage repair and death. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition. New York: Oxford University Press: 48-95.
- Halliwell B and Gutteridge JMC, 1999. Free radicals, other reactive species and diseases. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition. New York: Oxford University Press: 48-95.
- Hu H, Valugerdi MA, Moller G, 1997. Pretreatment of lymphocytes with mercury in vitro induces a response in T cells from genetically determined low-responders and a shift of the interleukin profile. *Immunology*; (90): 198-204.
- Hu H, Moller G, Valugerdi MA, 1999. Mechanisme of Mercury-Induced Autoimmunity: Both T helper 1- and T helper 2-Type Responses are Involved. Blackwell Science Ltd. 10.1046/j.1365-2567.1999.00671.x.
- Hultman P, Lindh U, Bindsley PH. 1998. Activation of the immune system and systemic immune-complex deposits in Brown Norway rats with dental amalgam restorations. *Journal of Dental Research*. Houston: 77(6), 1415-26.
- Inswiasri, 2008. Paradigma Kejadian Penyakit Paparan Merkuri (Hg). *Jurnal Ekologi Kesehatan*. Agustus 2008. 7(2); 775-785.
- Katiyar SK, Challa A, Cormick TS, 1999. Molecular Epidemiology and Cancer Protection Carcinogenesis. 20 (11), 2117-24.
- Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, et al, 2003. Epigallocatechin-gallate, the Main of Tea Polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp 120 binding. *Journal Allergy Clin Immunol*.
- Kobal AB, Horvat M, Prezelj M et al, 2004. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Stuttgart: 17 (4); 261-75.
- Kresno SB, 2007. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi IV. Jakarta: FKUI
- Larsen HR, 2005. Amalgam (Silver) Fillings. Summaries of The latest Reseaech Concernibg Amalgam Fillings. <http://www.yourhealthbase.com/amalgam.html>.
- Liang CM, Lian SM, Henry S, Epstein JS, 1990. Glutathione regulates CD4 and CD8 expression in murine splenic lymphocytes.
- Maloney DW, 2007. How I was Cured of Mercury Amalgam Poisoning. *Drug Topics*. Oradell; 151 (19) : 56-7.
- Payne D, 2006. Polifenol-Rich Juice Offers. Protection Againts Alzheimer's. *Medical Post*. Toronto; 42 (37): 27-8.

- Peakman M and Vergani D, 1997. *Basic and Clinical Immunology*. London: Churchill Livingstone
- Phillips RW, 1994. *Elements of Dental Materials for Dental Hygienist & Dental Assistents*. Philadelphia : W.B Saunders Company.
- Ping Hju S, Shiou Wu M, Ching Yang K, et al, 2007. Chronic green tea extract supplementation reduces hemodialysis-enhanced production of hydrogen peroxide and hypochlorous acid, atherosclerotic factors, and proinflammatory cytokines 1,2,3. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Bethesda; 86 (5): 1539.
- Reisbick MH, 1992. *Dental Materials in Clinical Dentistry*. John Right : PSG Inc.
- Risher JF, Rosa CTD, 2007. Inorganic: The Other Mercury. *Journal of Environmental Health*. Denver; 70 (4): 9-17.
- Rizvi SJ, Zahir F, Jairajpuri S. 2005. Mercury: The Lucking Danger. *Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*: 6(1).
- Sauriasari R, 2006. Mengenal dan Menangkal Radikal Babas. *Artikel Iptek-Bidang Biologi, Pangan dan Kesehatan*.
- Selgrade MK, 2004. Immunotoxicity. Dalam: *A Textbook of Modern Toxicology*. Edited by Ernest Hodgson. Third edition. USA: Wiley-Interscience: 327-342.
- Singh R, 2007. Your Dental Practice Could Be Killing You and Your Family. <http://www.noharm.org/details.cfm?ID=1201&type=document>.
- Sinityna O, Krysanova Z, Ischenko A, Dikalova, AE, et al, 2006. Age Associated Changes in Oxidative Damage and The Activity of Antioxidant Enzymes In Rats With In Herited Overgeneration Of Free Radical. *Journal Of Cellular and Molecular. Medicine*. Bucharest; 10 (1): 206-16.
- Sturdevant CM, 1995. *The Art and Science of Operative Dentistry*. Third ed. St. Louis: Mosby.
- Stine KE and Brown TM, 2006. *Principles of Toxicology*. Second edition. Boca Raton: Taylor and Francis Group.
- Sumampouw A, 2003. Radikal Bebas & Antioksidan. <http://www.medikaholistik.com>.
- Sumawinata N, 1991. *Tambalan Amalgam Berbahaya untuk Kesehatan?* Jakarta : EGC.
- Ochoka MT, Gazewski A, Brodzka R. 2007. Exposure to Mercury Vapor in Dental Workers in Poland. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. Lodz; 20(2): 147-7.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD, 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*; 12: 1161-1208.
- Van Der Ven JA, Verver TJ, Koopmans PP, Van Der Meer JW, 1994. Glutathione levels are significantly reduced in CD4 T-cells but not in monocytes in HIV-infected individuals. *Abstr Intersei Conf Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Oct 4-7;131.

- Vinardell MP and Mitjans M., 2008 Immunomodulatory Effects of Polyphenols. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, EJEAFChe; 7(8): 3347-53.
- Vincent HK and Taylor AG, 2006. Biomarkers and potential mechanism of obesity-induced oxidative stress in humans. *International Journal of Obesity*; 30: 400-418.
- Wijaya A, 1996. Radikal Bebas dan Status Antioksidan. *Forum Diagnosticum. Prodia Diagnostics Educational Services*. ISSN 0854-7173. No.1/1996.
- Wijaya A, 1997. Oksidasi LDL, Aterosklerosis dan Antioksidan. *Forum Diagnosticum. Prodia Diagnostics Educational Services*. ISSN 0854-7173. No.3/1997.
- Wild LG, Ortega HG, Lopez M, Salvaggio JE, 1997. Immunesystem alteration in the rat after indirect exposure to methyl mercury chloride or methyl mercury sulfide. *Environmental research*. 74 (1); 34-42.
- Windham B, 2001. Facts about mercury and dental amalgam with medical study references. Dutch Anti Amalgam Foundation Sticing Amalgaamvrij Nederland IAOMT-protocol for removal of amalgam fillings. March 2001.
- Yanwirasti, 2004. Pengaruh Pemberian Aflatoksin B₁ Terhadap Kerusakan Sel Hati Akibat Proses Oksidatif. Disertasi. Universitas Airlangga Surabaya.
- Yusuf HM, 1996. Pencemaran Air Raksa di Lingkungan Kerja Dokter Gigi. <http://www.smf.com/issue009/tillis/07tillis.htm>.1996.
- Yusuf N, Irby C, Katiyar SK, Elmets CA, 2006. Photoprotective effects of green tea polyphenols. Department of Dermatology University of Alabama at Birmingham. USA.
- Zainuddin M, 2000. Metodologi Penelitian. Surabaya: Universitas Airlangga Press.

Lampiran 1a

Hasil Perhitungan Kadar Sel T CD4⁺ pada kelompok 3 minggu

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD 4 ABSOLUT	CD 8 ABSOLUT
N		18	18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9710.0000	3402.2222
	Std. Deviation	3454.7393	2049.7878
Most Extreme Differences	Absolute	.171	.221
	Positive	.171	.221
	Negative	-.154	-.145
Kolmogorov-Smirnov Z		.725	.936
Asymp. Sig. (2-tailed)		.669	.344

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

CD 4 ABSOLUT

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A3	6	8076.6667	3307.78879	1350.399	4605.3552	11547.9781	2980.00	11740.00
B3	6	9895.0000	4249.41761	1734.817	5435.5097	14354.4903	7020.00	18430.00
C3	6	11158.33	2412.70319	984.98195	8626.3566	13690.3100	8350.00	15070.00
Total	18	9710.0000	3454.73929	814.28986	7991.9986	11428.0014	2980.00	18430.00

Test of Homogeneity of Variances

CD 4 ABSOLUT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.419	2	15	.665

UNIVERSITAS ANEKA
KEDJAJAAN BANGSA

ANOVA

CD 4 ABSOLUT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28798033	2	14399016.67	1.241	.317
Within Groups	1.7E+008	15	11606717.78		
Total	2.0E+008	17			

Post Hoc Tests

UNIVERSITAS ANDALAS

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD 4 ABSOLUT

Bonferroni

(I) control positif	(J) control positif	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A3	B3	-1818.3333	1966.953	1.000	-7116.7932	3480.1265
	C3	-3081.6667	1966.953	.414	-8380.1265	2216.7932
B3	A3	1818.33333	1966.953	1.000	-3480.1265	7116.7932
	C3	-1263.3333	1966.953	1.000	-6561.7932	4035.1265
C3	A3	3081.66667	1966.953	.414	-2216.7932	8380.1265
	B3	1263.33333	1966.953	1.000	-4035.1265	6561.7932

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

Lampiran 1b

Hasil Perhitungan kadar Sel T CD4⁺ Pada Kelompok 6 Minggu

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD 4 ABSOLUT	CD 8 ABSOLUT
N		18	18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	6269.4444	2075.0000
	Std. Deviation	4003.4272	1712.6493
Most Extreme Differences	Absolute	.196	.207
	Positive	.196	.207
	Negative	-.152	-.177
Kolmogorov-Smirnov Z		.830	.879
Asymp. Sig. (2-tailed)		.496	.423

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

CD 4 ABSOLUT

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A6	6	4001.6667	1710.06920	698.13283	2207.0591	5796.2742	2150.00	7190.00
B6	6	9438.3333	5099.45651	2081.844	4086.7819	14789.8847	3570.00	17630.00
C6	6	5368.3333	2523.58013	1030.247	2719.9984	8016.6683	2920.00	9520.00
Total	18	6269.4444	4003.42717	943.61683	4278.5870	8260.3019	2150.00	17630.00

ANOVA

CD 4 ABSOLUT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	95980044	2	47990022.22	4.079	.039
Within Groups	1.8E+008	15	11765750.00		
Total	2.7E+008	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD 4 ABSOLUT

Bonferroni

(I) control positif	(J) control positif	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A6	B6	-5436.6667*	1980.383	.045	-10771.3021	-102.0312
	C6	-1366.6667	1980.383	1.000	-6701.3021	3967.9688
B6	A6	5436.6667*	1980.383	.045	102.0312	10771.3021
	C6	4070.0000	1980.383	.173	-1264.6354	9404.6354
C6	A6	1366.6667	1980.383	1.000	-3967.9688	6701.3021
	B6	-4070.0000	1980.383	.173	-9404.6354	1264.6354

*. The mean difference is significant at the .05 level.



Lampiran 2a

Hasil Perhitungan kadar Sel T CD8⁺ pada kelompok 3 minggu

Oneway

Descriptives

CD 8 ABSOLUT

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A3	6	2440.0000	1284.95914	524.58237	1091.5181	3788.4819	1050.00	4630.00
B3	6	3435.0000	1201.06203	490.33152	2174.5627	4695.4373	2060.00	5100.00
C3	6	4331.6667	3007.14095	1227.660	1175.8658	7487.4675	2110.00	10230.00
Total	18	3402.2222	2049.78781	483.13962	2382.8867	4421.5577	1050.00	10230.00

Test of Homogeneity of Variances

CD 8 ABSOLUT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.532	2	15	.248

ANOVA

CD 8 ABSOLUT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10744878	2	5372438.889	1.328	.294
Within Groups	60682833	15	4045522.222		
Total	71427711	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD 8 ABSOLUT

Bonferroni

(I) control positif	(J) control positif	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A3	B3	-995.00000	1161.253	1.000	-4123.1116	2133.1116
	C3	-1891.66667	1161.253	.372	-5019.7782	1236.4449
B3	A3	995.00000	1161.253	1.000	-2133.1116	4123.1116
	C3	-896.66667	1161.253	1.000	-4024.7782	2231.4449
C3	A3	1891.66667	1161.253	.372	-1236.4449	5019.7782
	B3	896.66667	1161.253	1.000	-2231.4449	4024.7782

Lampiran 2b

Hasil Perhitungan Kadar sel T CD8⁺ pada kelompok 6 minggu

Oneway

Descriptives

CD 8 ABSOLUT

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A6	6	1306.6667	1415.98964	578.07535	-179.3233	2792.6567	490.00	4130.00
B6	6	3325.0000	2200.75214	898.45330	1015.4523	5634.5477	1030.00	6930.00
C6	6	1593.3333	512.47114	209.21547	1055.5279	2131.1388	1080.00	2380.00
Total	18	2075.0000	1712.64931	403.67531	1223.3195	2926.6805	490.00	6930.00

Test of Homogeneity of Variances

CD 8 ABSOLUT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.956	2	15	.083

ANOVA

CD 8 ABSOLUT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14309033	2	7154516.667	3.018	.079
Within Groups	35554817	15	2370321.111		
Total	49863850	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD 8 ABSOLUT

Bonferroni

(I) control positif	(J) control positif	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A6	B6	-2018.3333	888.87965	.115	-4412.7434	376.0767
	C6	-286.66667	888.87965	1.000	-2681.0767	2107.7434
B6	A6	2018.33333	888.87965	.115	-376.0767	4412.7434
	C6	1731.66667	888.87965	.211	-662.7434	4126.0767
C6	A6	286.66667	888.87965	1.000	-2107.7434	2681.0767
	B6	-1731.6667	888.87965	.211	-4126.0767	662.7434

Lampiran 3

Hasil Perhitungan Perbandingan Kadar sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada 3 dan 6 minggu

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

			CD 4 ABSOLUT A	CD 8 ABSOLUT A	CD 4 ABSOLUT B	CD 8 ABSOLUT B	CD 4 ABSOLUT C	CD 8 ABSOLUT C
N			12	12	12	12	12	12
Normal Parameters	^{a,b} Mean		6039.1667	1873.3333	9666.6667	3380.0000	8263.3333	2962.5000
	Std. Deviation		3291.11603	1418.51608	4481.63593	1691.30396	3831.92649	2504.95917
Most Extreme Differences	Absolute		.210	.240	.292	.160	.115	.278
	Positive		.210	.240	.292	.160	.115	.278
	Negative		-.125	-.165	-.175	-.083	-.100	-.226
Kolmogorov-Smirnov Z			.727	.832	1.013	.553	.398	.964
Asymp. Sig. (2-tailed)			.666	.492	.257	.920	.997	.311

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.



Lampiran 3a

Uji T sel T CD4⁺ kelompok A (3 dan 6 minggu)

T-Test

Group Statistics

Minggu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CD 4 ABSOLUT A 3 Minggu	6	8076.6667	3307.78879	1350.399
6 Minggu	6	4001.6667	1710.06920	698.13283

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
CD 4 ABSOLUT , Equal variances assumed	1.967	.191	2.681	10	.023	4075.0000	1520.1866	687.81323	7462.187
Equal variances not assumed			2.681	7.495	.030	4075.0000	1520.1866	527.85840	7622.142

Lampiran 3b

Uji T sel T CD8⁺ kelompok A (3 dan 6 minggu)

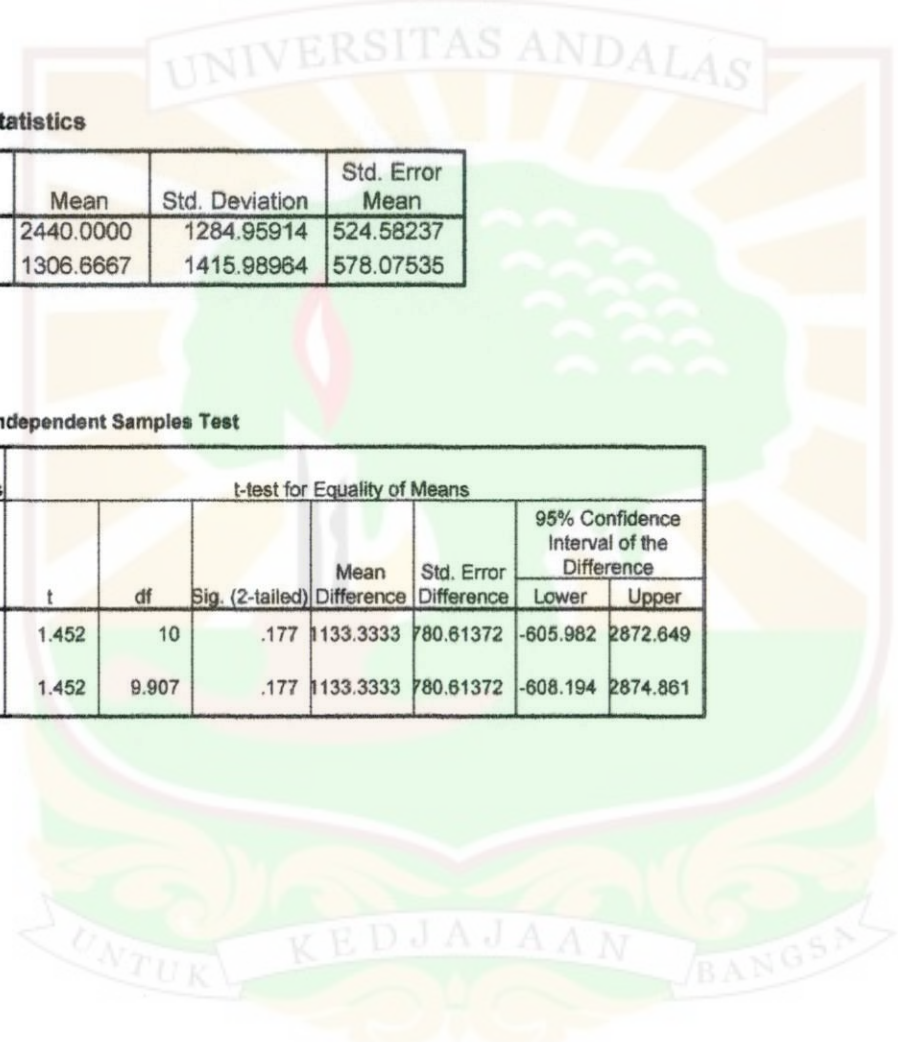
T-Test

Group Statistics

	Minggu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CD 8 ABSOLUT A	3 Minggu	6	2440.0000	1284.95914	524.58237
	6 Minggu	6	1306.6667	1415.98984	578.07535

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
CD 8 ABSOLUT	.010	.924	1.452	10	.177	1133.3333	780.61372	-605.982	2872.649
Equal variance not assumed			1.452	9.907	.177	1133.3333	780.61372	-608.194	2874.861



Lampiran 3c

Uji T sel T CD4⁺ kelompok B (3 dan 6 minggu)

T-Test

Group Statistics

	Minggu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CD 4 ABSOLUT B	3 Minggu	6	9895.0000	4249.41761	1734.817
	6 Minggu	6	9438.3333	5099.45651	2081.844

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
CD 4 ABSOLUT I	.560	.472	.169	10	.870	456.66667	2709.9203	-5581.41	6494.745
Equal variances not assumed			.169	9.685	.870	456.66667	2709.9203	-5608.14	6521.475

Lampiran 3d

Uji T sel T CD8⁺ kelompok B (3 dan 6 minggu)

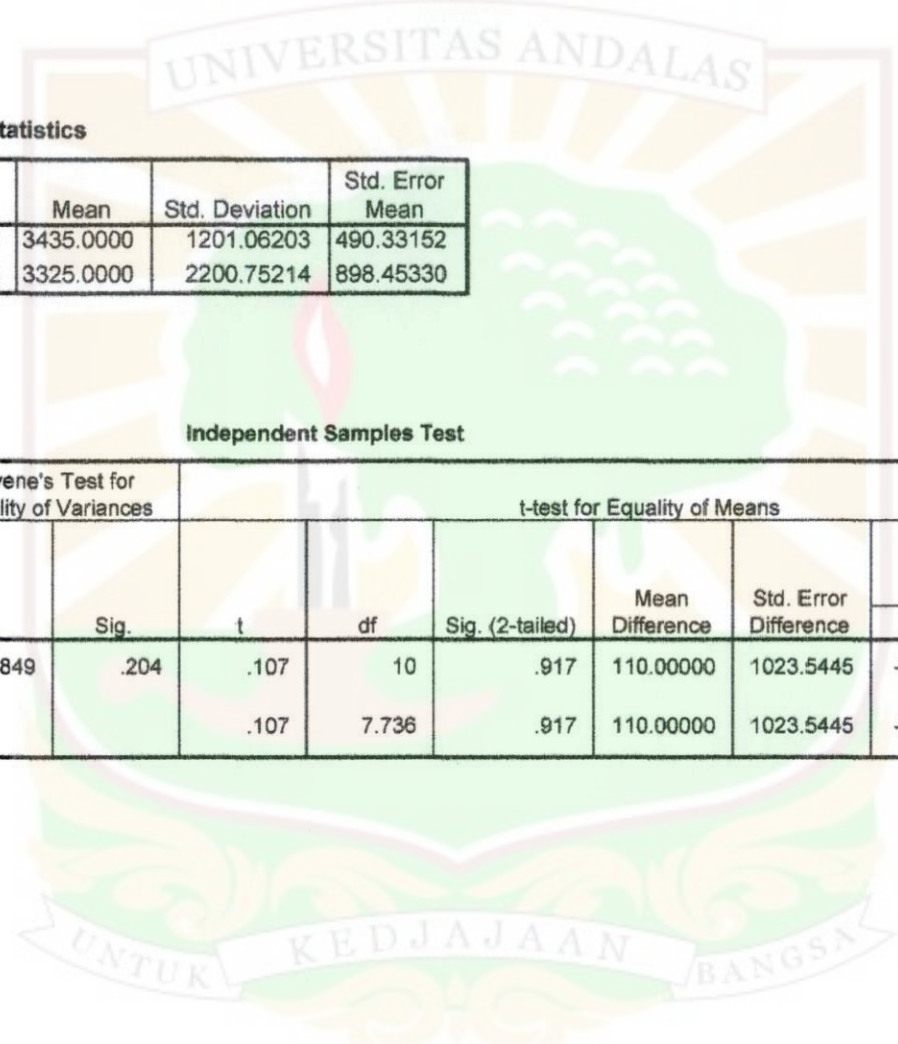
T-Test

Group Statistics

Minggu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CD 8 ABSOLUT B 3 Minggu	6	3435.0000	1201.06203	490.33152
6 Minggu	6	3325.0000	2200.75214	898.45330

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
CD 8 ABSOLUT B	Equal variances assumed	1.849	.204	.107	10	.917	110.00000	1023.5445	-2170.60	2390.599
	Equal variances not assumed			.107	7.736	.917	110.00000	1023.5445	-2264.41	2484.406



Lampiran 3e

Uji T sel T CD4⁺ kelompok C (3 dan 6 minggu)

T-Test

Group Statistics

	Minggu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CD 4 ABSOLUT C	3 Minggu	6	11158.33	2412.70319	984.98195
	6 Minggu	6	5368.3333	2523.58013	1030.247

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
CD 4 ABSOLUT C	Equal variances assumed	.110	.747	4.062	10	.002	5790.0000	1425.3417	2614.141	8965.859
	Equal variances not assumed			4.062	9.980	.002	5790.0000	1425.3417	2613.273	8966.727

Lampiran 3f

Uji T sel T CD8⁺ kelompok C (3 dan 6 minggu)

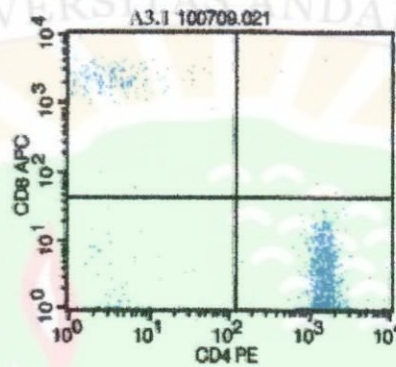
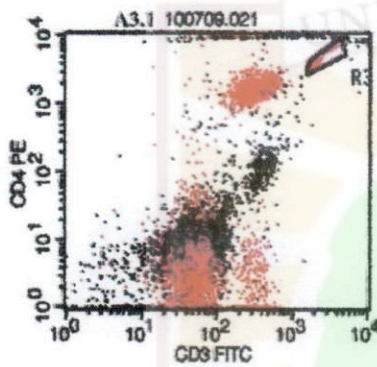
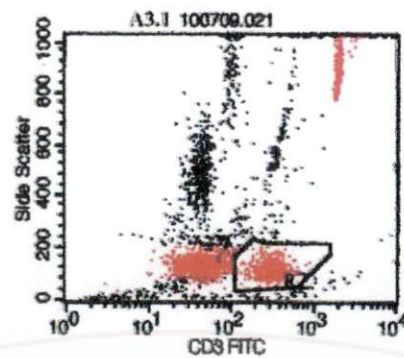
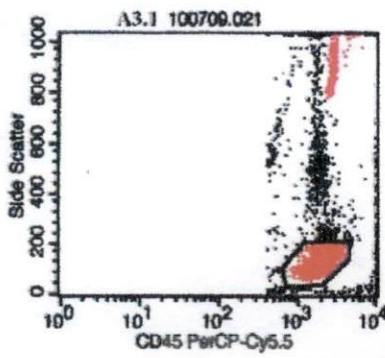
T-Test

Group Statistics

	Minggu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CD 8 ABSOLUT C	3 Minggu	6	4331.6667	3007.14095	1227.660
	6 Minggu	6	1593.3333	512.47114	209.21547

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
CD 8 ABSOLUT C	Equal variances assumed	3.938	.075	2.199	10	.053	2738.3333	1245.3596	-36.50080	5513.167
	Equal variances not assumed			2.199	5.290	.076	2738.3333	1245.3596	-410.864	5887.530



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:A3.1100709.021
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1494
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	218	14.68	2.19
UR	5	0.33	0.06
LL	70	4.68	0.70
LR	1200	80.32	12.00

Gate Statistics

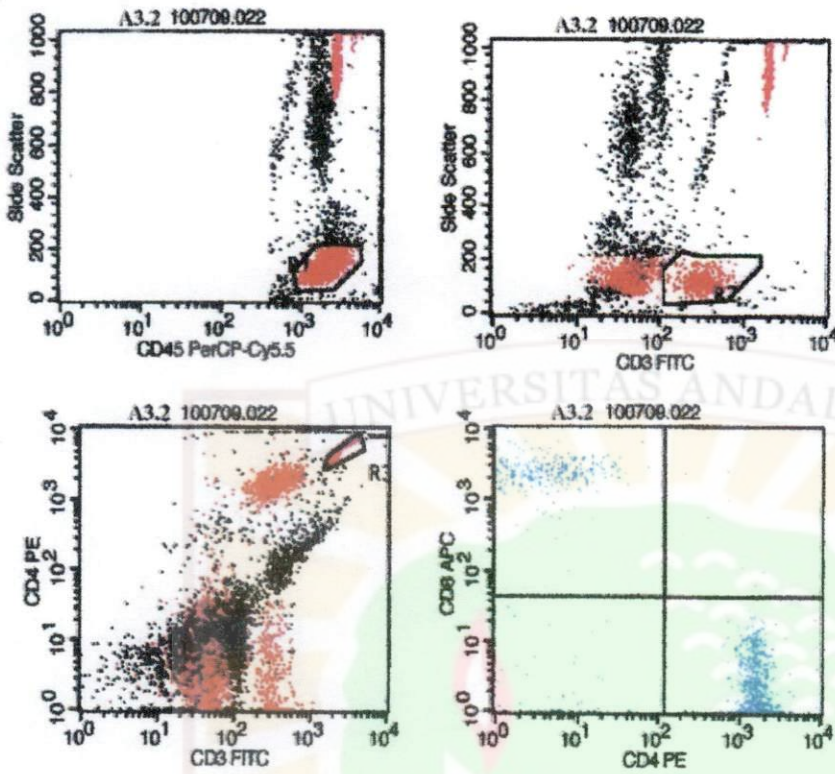
File:A3.1100709.021
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	5276	52.76	52.76
G2	1548	15.48	15.48
Beads	1738	17.38	17.38
Total T Lymphs	1494	14.94	14.94

Abs CD3+ Cells = 8.62×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 6.92×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.26×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:A3.2100709.022
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1430
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	332	23.22	3.32
UR	7	0.49	0.07
LL	47	3.29	0.47
LR	1044	73.01	10.44

Gate Statistics

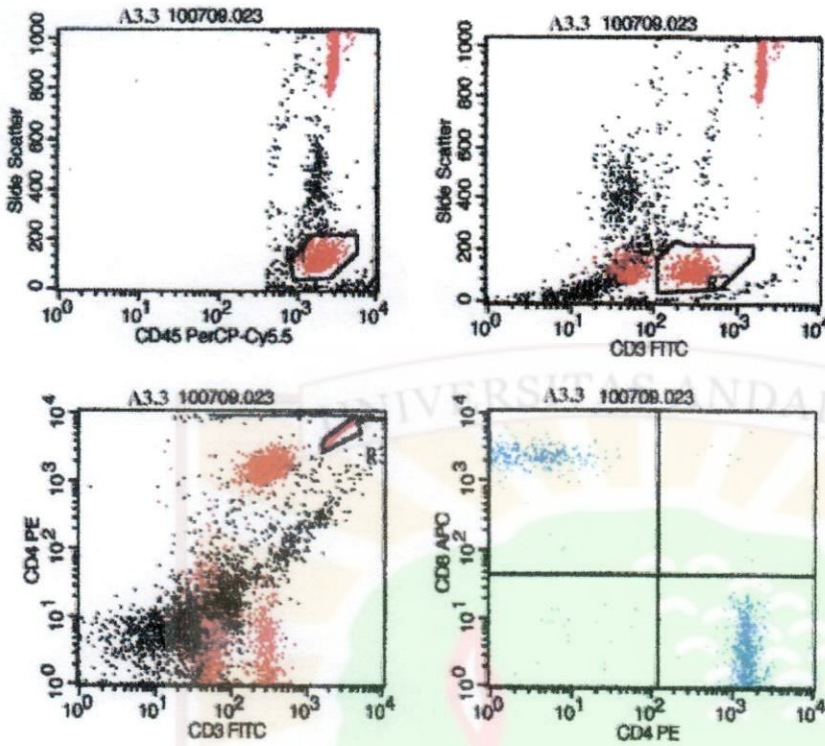
File:A3.2100709.022
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4186	41.86	41.86
G2	1492	14.92	14.92
Beads	1421	14.21	14.21
Total T Lymphs	1430	14.30	14.30

Abs CD3+ Cells = 10.09×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 7.37×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 2.34×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:A3.3100709.023
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1519
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File:A3.3100709.023
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

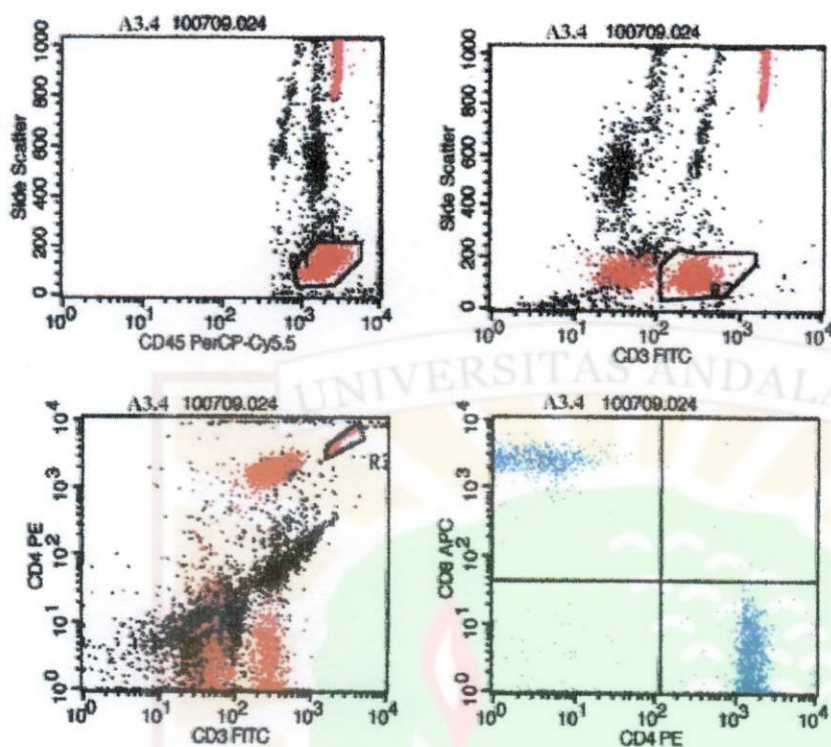
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	383	25.21	3.83
UR	11	0.72	0.11
LL	43	2.83	0.43
LR	1082	71.23	10.82

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	2989	29.89	29.89
G2	1810	18.10	18.10
Beads	3842	36.42	36.42
Total T Lymphs	1519	15.19	15.19

Abs CD3+ Cells = 4.18×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 2.98×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.05×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:A3.4100709.024
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2224
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	804	27.16	8.04
UR	14	0.63	0.14
LL	75	3.37	0.75
LR	1531	68.84	15.31

Gate Statistics

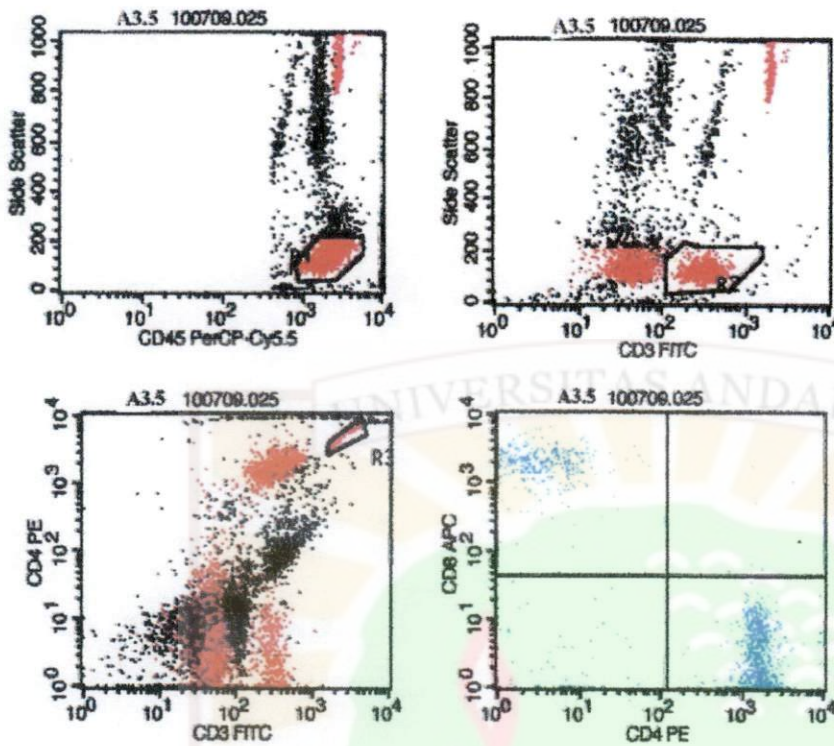
File:A3.4100709.024
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4419	44.19	44.19
G2	2278	22.78	22.78
Beads	1309	13.09	13.09
Total T Lymphs	2224	22.24	22.24

Abs CD3+ Cells = 17.03×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 11.73×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 4.63×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:A3.5100709.025
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1507
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	376	24.95	3.76
UR	7	0.48	0.07
LL	68	4.51	0.68
LR	1056	70.07	10.56

Gate Statistics

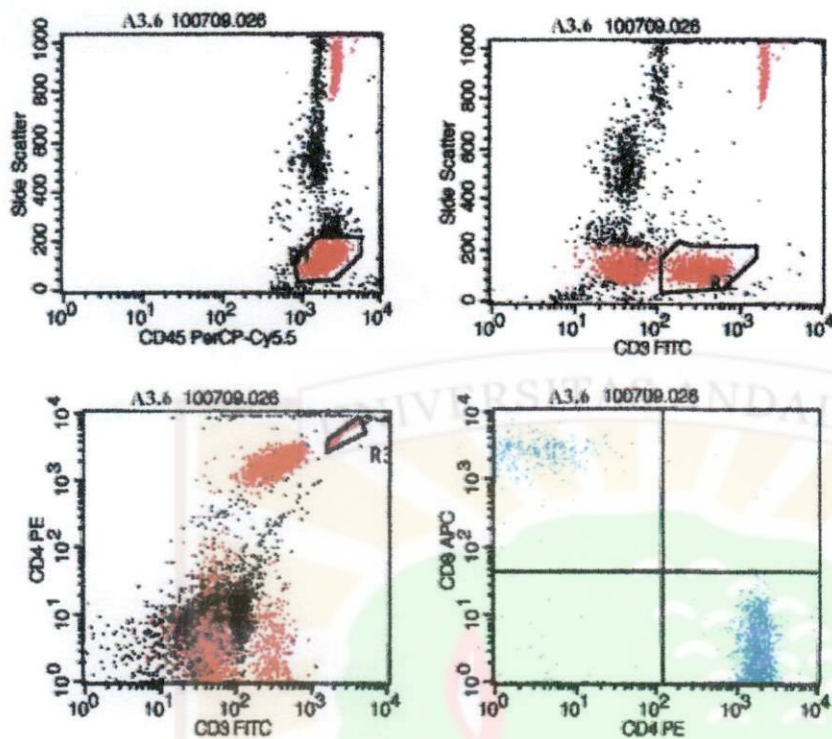
File:A3.5100709.025
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4552	45.52	45.52
G2	1563	15.63	15.63
Beads	1372	13.72	13.72
Total T Lymphs	1507	15.07	15.07

Abs CD3+ Cells = 11.01×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 7.72×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 2.75×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:A3.6100709.026
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2159
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	384	17.79	3.84
UR	8	0.28	0.08
LL	40	1.85	0.40
LR	1729	80.08	17.29

Gate Statistics

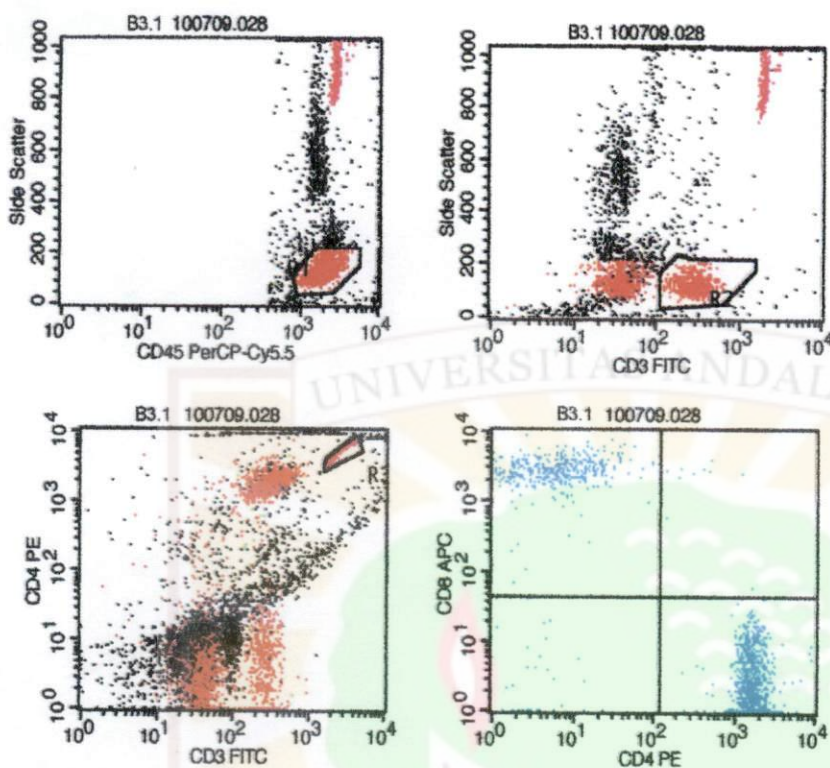
File:A3.6100709.026
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	5181	51.81	51.81
G2	2208	22.08	22.08
Beads	1476	14.76	14.76
Total T Lymphs	2159	21.58	21.58

Abs CD3+ Cells = 14.66×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 11.74×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 2.61×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B3.1100709.028
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1822
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	433	23.77	4.33
UR	10	0.55	0.10
LL	46	2.52	0.46
LR	1333	73.16	13.33

Gate Statistics

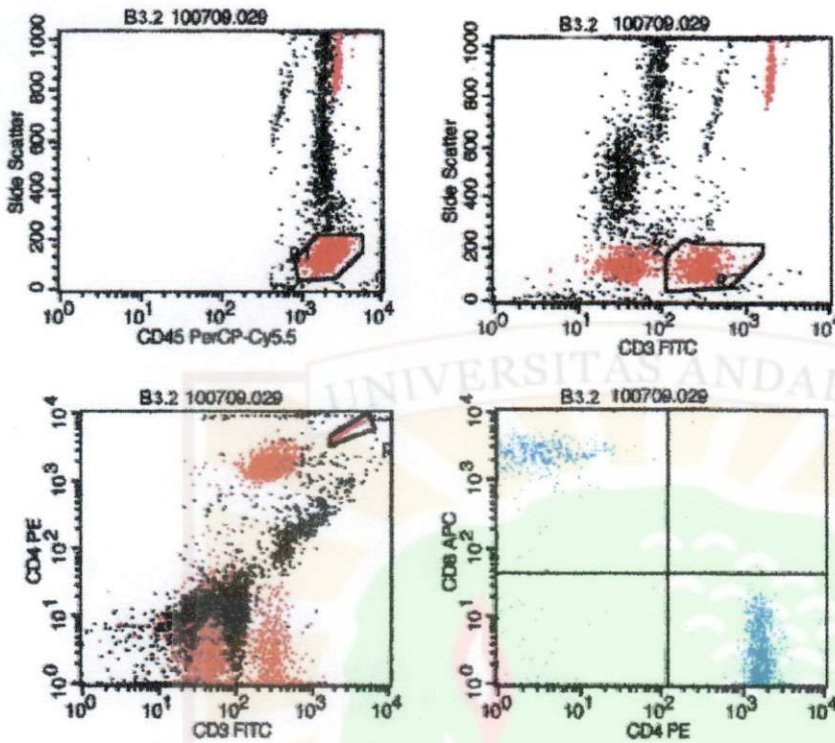
File: B3.1100709.028
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4273	42.73	42.73
G2	1876	18.76	18.76
Beads	1904	19.04	19.04
Total T Lymphs	1822	18.22	18.22

Abs CD3+ Cells = 9.59×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 7.02×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 2.28×10^3 / uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B3.2100709.029
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1728
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	449	26.01	4.49
UR	6	0.35	0.06
LL	62	3.58	0.62
LR	1209	70.05	12.09

Gate Statistics

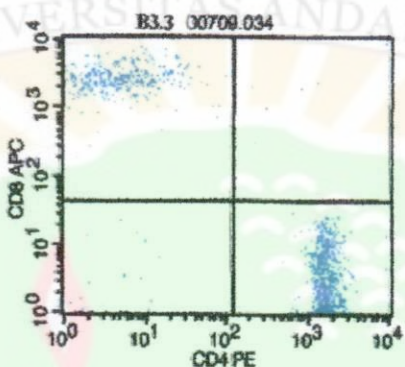
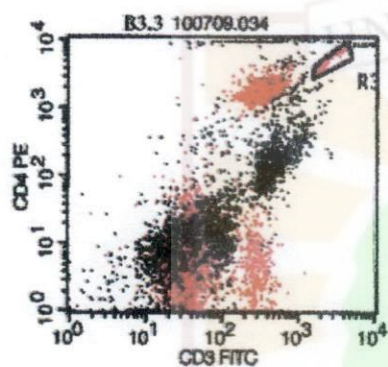
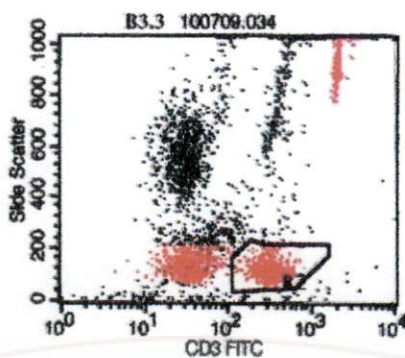
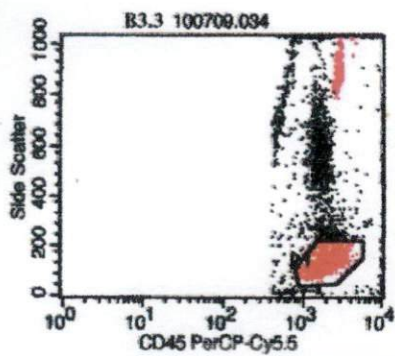
File: B3.2100709.029
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4178	41.78	41.78
G2	1772	17.72	17.72
Beads	1319	13.19	13.19
Total T Lymphs	1726	17.26	17.26

Abs CD3+ Cells = 13.12×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 9.19×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 3.41×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B3.3100709.034
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1485
 Total Events: 16000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	426	28.86	4.29
UR	5	0.34	0.05
LL	29	1.95	0.29
LR	1022	68.82	10.22

Gate Statistics

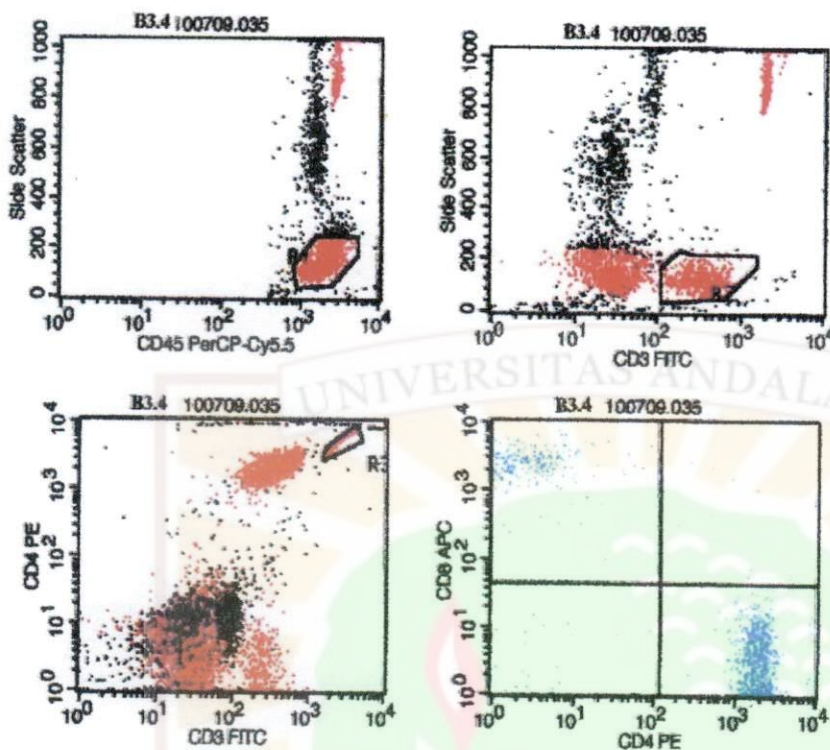
File: B3.3100709.034
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4016	40.16	40.16
G2	1534	15.34	15.34
Beads	1328	13.28	13.28
Total T Lymphs	1485	14.85	14.85

Abs CD3+ Cells = 11.21×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 7.72×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 3.24×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B3.4100709.035
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1655
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File: B3.4100709.035
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

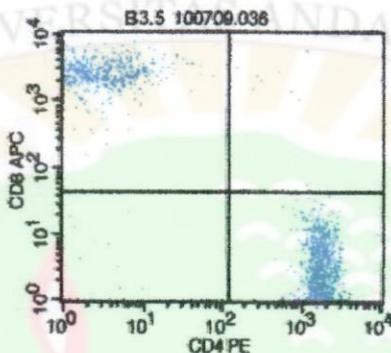
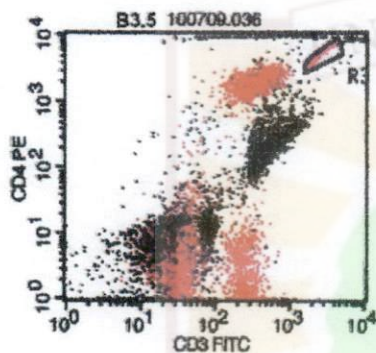
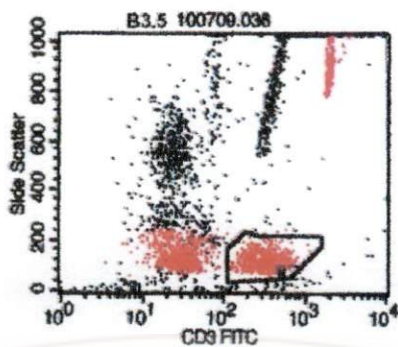
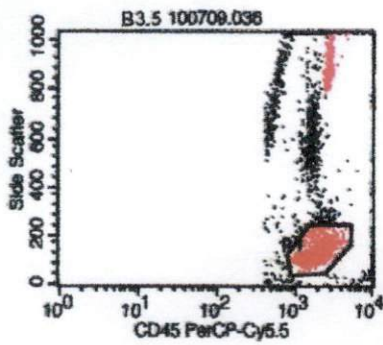
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	318	19.21	3.18
UR	8	0.48	0.08
LL	50	3.02	0.50
LR	1279	77.28	12.79

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	5253	52.53	52.53
G2	1898	18.99	18.99
Beads	1545	15.45	15.45
Total T Lymphs	1655	16.55	16.55

Abs CD3+ Cells = 10.74×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 8.30×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 2.06×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B3.5100709.036
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1959
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File: B3.5100709.036
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

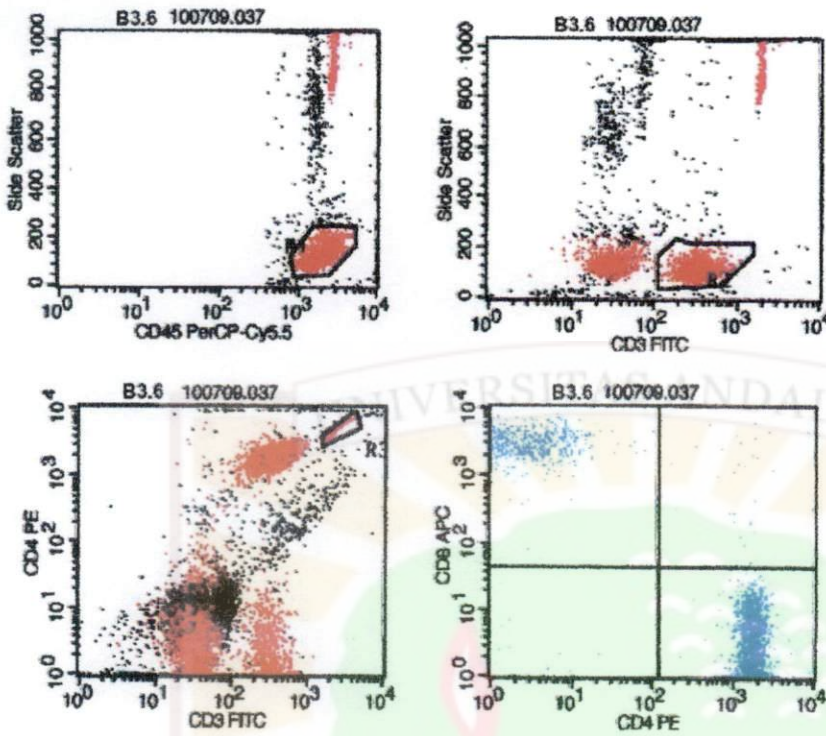
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	657	33.54	6.57
UR	10	0.51	0.10
LL	25	1.28	0.25
LR	1267	64.68	12.67

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4668	46.68	46.68
G2	2026	20.26	20.26
Beads	1458	14.58	14.58
Total T Lymphs	1959	19.59	19.59

Abs CD3+ Cells = 13.47×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 8.71×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 4.52×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B3.6100709.037
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 3123
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	667	21.36	6.67
UR	28	0.90	0.28
LL	20	0.64	0.20
LR	2408	77.11	24.08

Gate Statistics

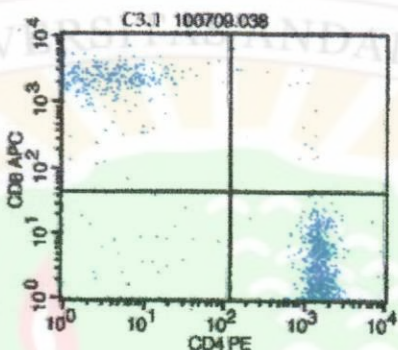
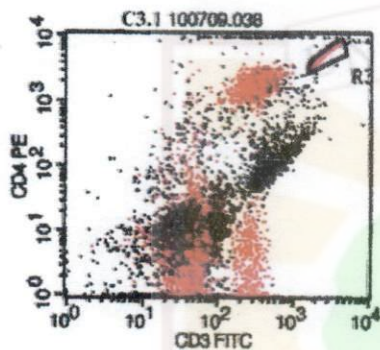
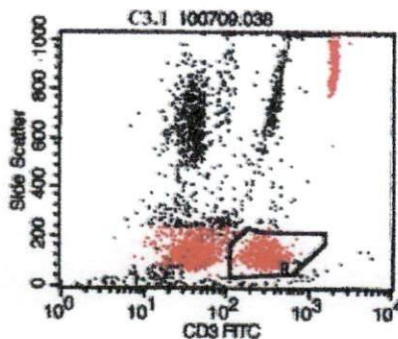
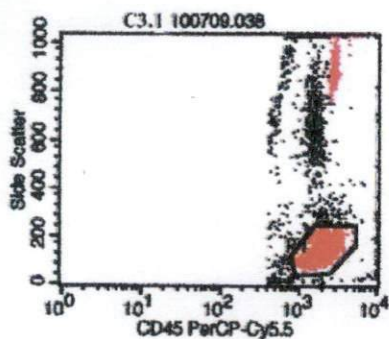
File: B3.6100709.037
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	6284	62.84	62.84
G2	3190	31.90	31.90
Beads	1310	13.10	13.10
Total T Lymphs	3123	31.23	31.23

Abs CD3+ Cells = 23.90×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 18.43×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 5.10×10^3 / uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: C3.1100709.038
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1396
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File: C3.1100709.038
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

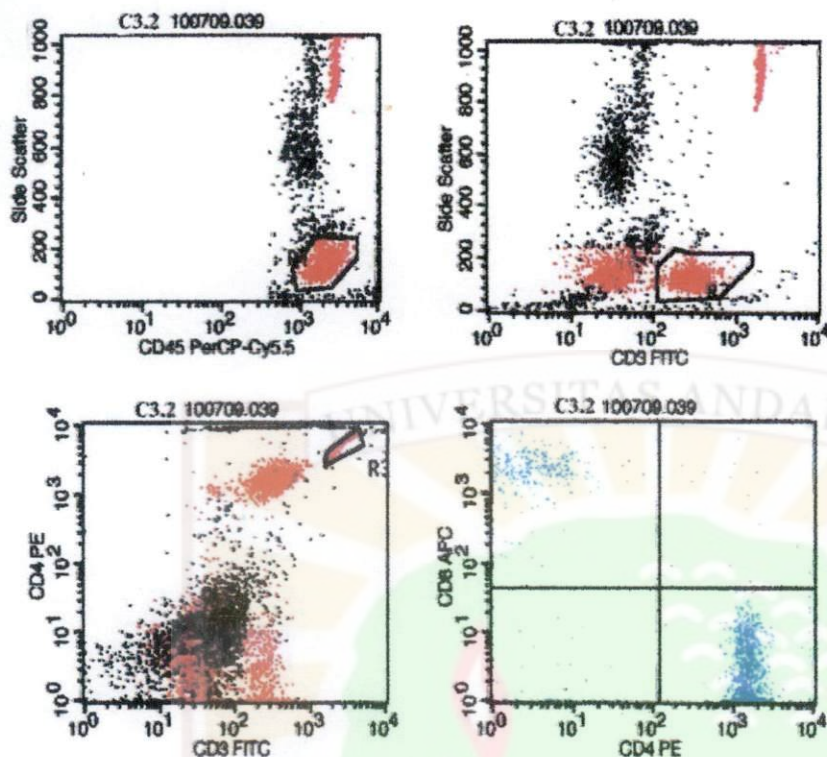
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	367	26.29	3.67
UR	23	1.85	0.23
LL	39	2.79	0.39
LR	967	69.27	9.67

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4834	48.34	48.34
G2	1430	14.30	14.30
Beads	1181	11.81	11.81
Total T Lymphs	1396	13.96	13.96

Abs CD3+ Cells = 12.05×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 8.35×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 3.17×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:C3.2100709.039
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1807
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	331	18.32	3.31
UR	17	0.94	0.17
LL	52	2.88	0.52
LR	1407	77.86	14.07

Gate Statistics

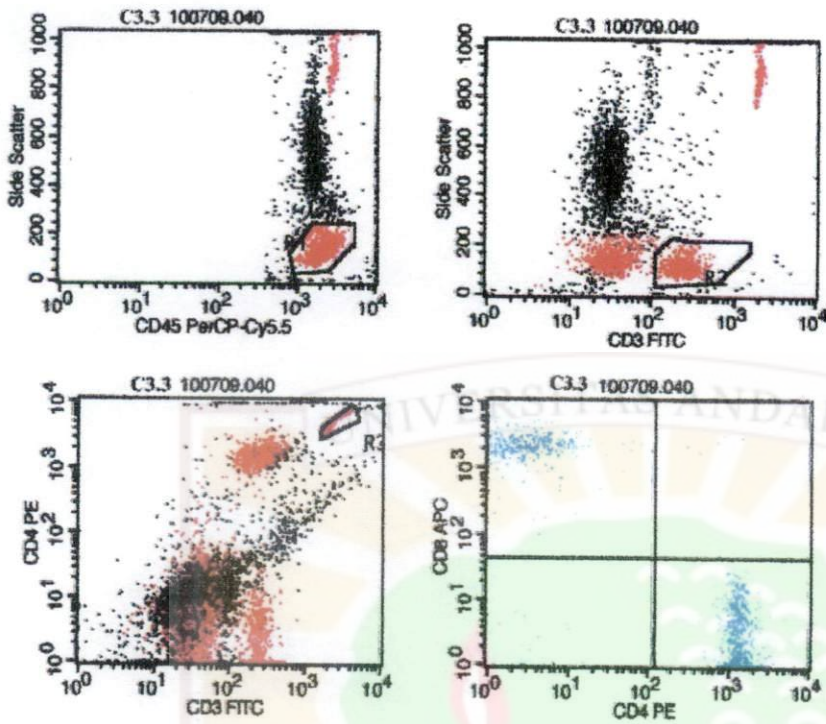
File:C3.2100709.039
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4223	42.23	42.23
G2	1880	18.80	18.80
Beads	1571	15.71	15.71
Total T Lymphs	1807	18.07	18.07

Abs CD3+ Cells = 11.53×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 8.98×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 2.11×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:C3.3100709.040
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1489
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File:C3.3100709.040
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

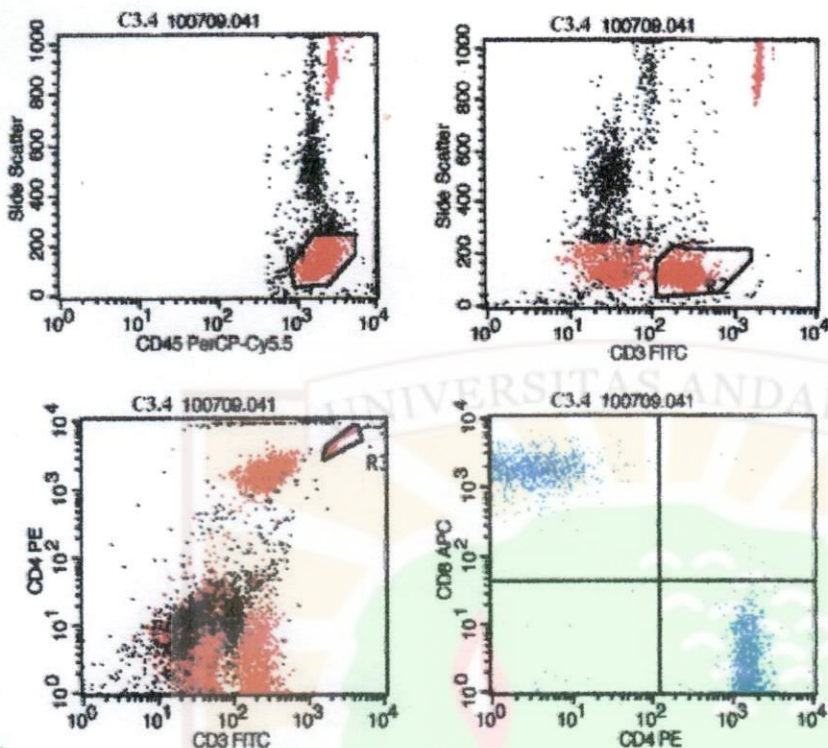
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	427	28.68	4.27
UR	8	0.54	0.08
LL	23	1.54	0.23
LR	1031	69.24	10.31

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4018	40.18	40.18
G2	1505	15.05	15.05
Beads	935	9.35	9.35
Total T Lymphs	1489	14.89	14.89

Abs CD3+ Cells = 15.97×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 11.05×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 4.58×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:C3.4100709.041
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2605
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File:C3.4100709.041
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

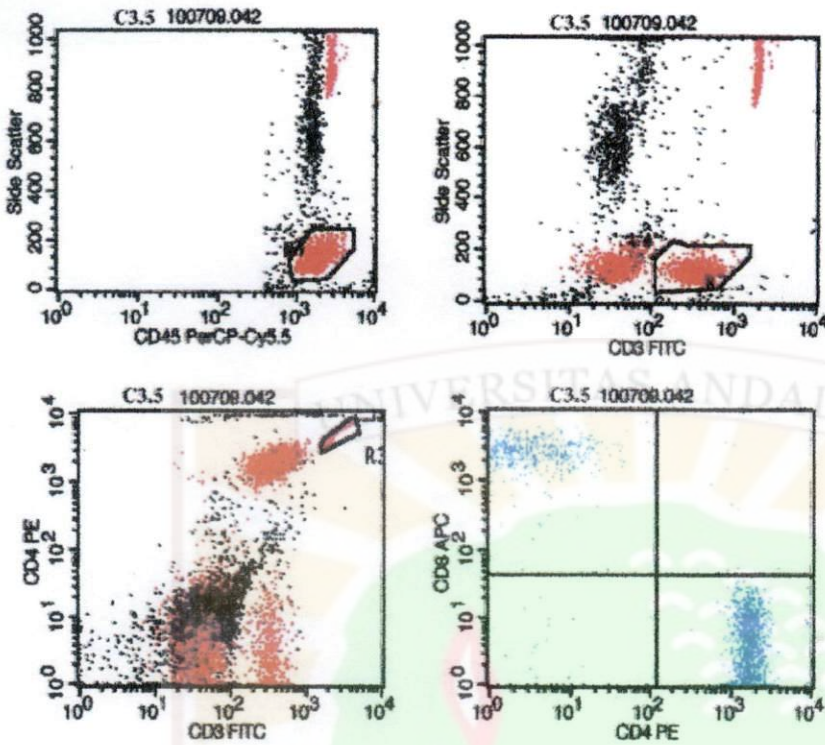
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1037	39.81	10.37
UR	16	0.61	0.16
LL	25	0.96	0.25
LR	1527	58.62	15.27

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	5533	55.33	55.33
Gate	2638	26.38	26.38
Beads	1018	10.18	10.18
Total T Lymphs	2605	26.05	26.05

Abs CD3+ Cells = 25.70×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 15.07×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 10.23×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: C3.5100709.042
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2202
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File: C3.5100709.042
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

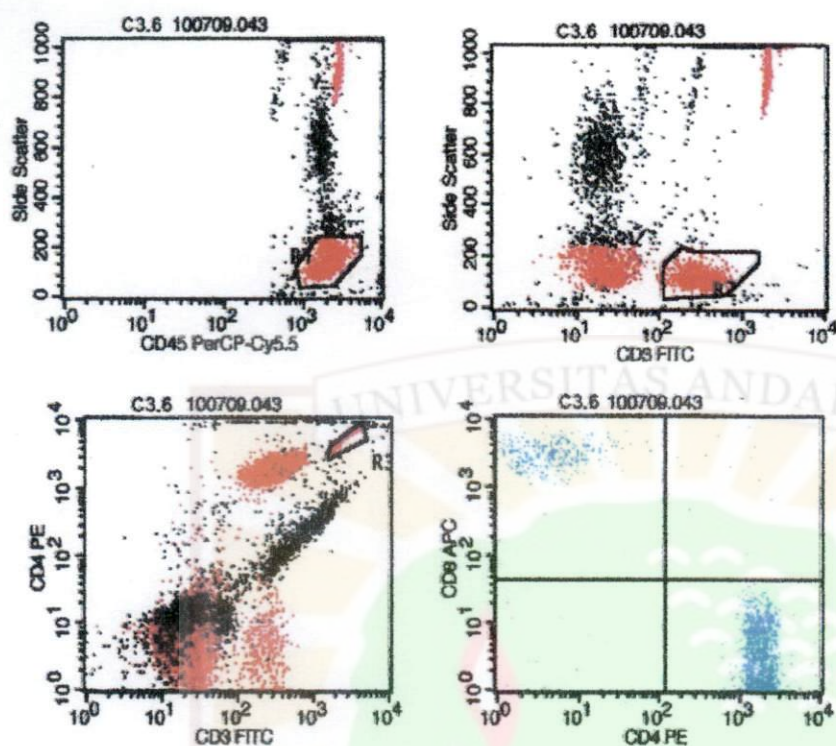
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	489	22.21	4.89
UR	13	0.59	0.13
LL	34	1.54	0.34
LR	1666	75.66	16.66

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	5188	51.88	51.88
G2	2227	22.27	22.27
Beads	1482	14.82	14.82
Total T Lymphs	2202	22.02	22.02

Abs CD3+ Cells = 14.90×10^3 / uL

Abs CD4+ T Lymphs = 11.27×10^3 / uL

Abs CD8+ T Lymphs = 3.31×10^3 / uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: C3.6100709.043
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2111
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	363	17.20	3.63
UR	14	0.66	0.14
LL	18	0.85	0.18
LR	1716	81.26	17.16

Gate Statistics

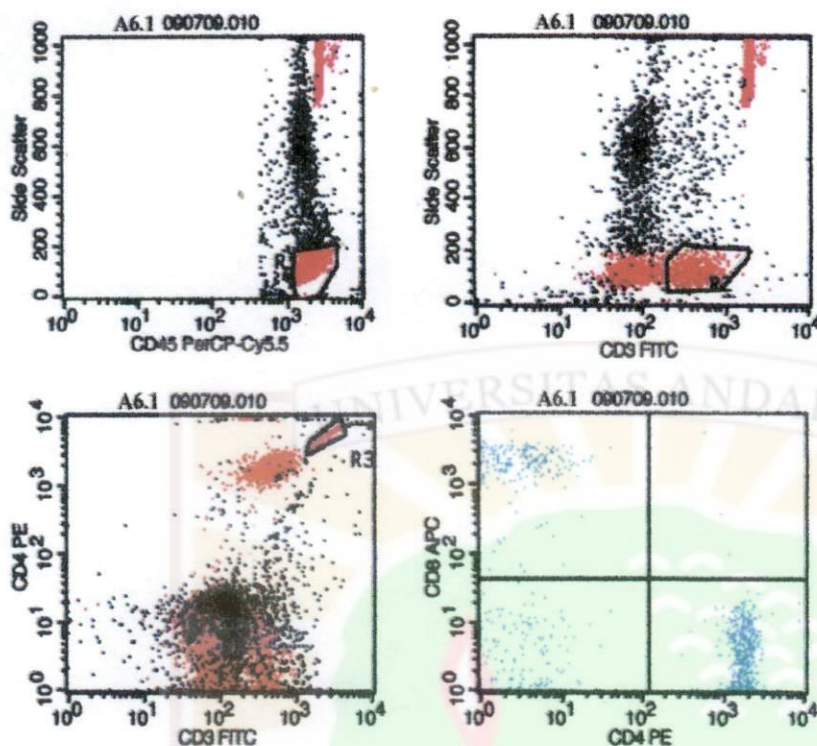
File: C3.6100709.043
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4689	46.89	46.89
G2	2152	21.52	21.52
Beads	1407	14.07	14.07
Total T Lymphs	2111	21.11	21.11

Abs CD3+ Cells = 15.04×10^3 / μ L

Abs CD4+ T Lymphs = 12.23×10^3 / μ L

Abs CD8+ T Lymphs = 2.59×10^3 / μ L



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: A6.1090709.010
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1240
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	269	21.69	2.69
UR	5	0.40	0.05
LL	258	20.81	2.58
LR	708	57.10	7.08

Gate Statistics

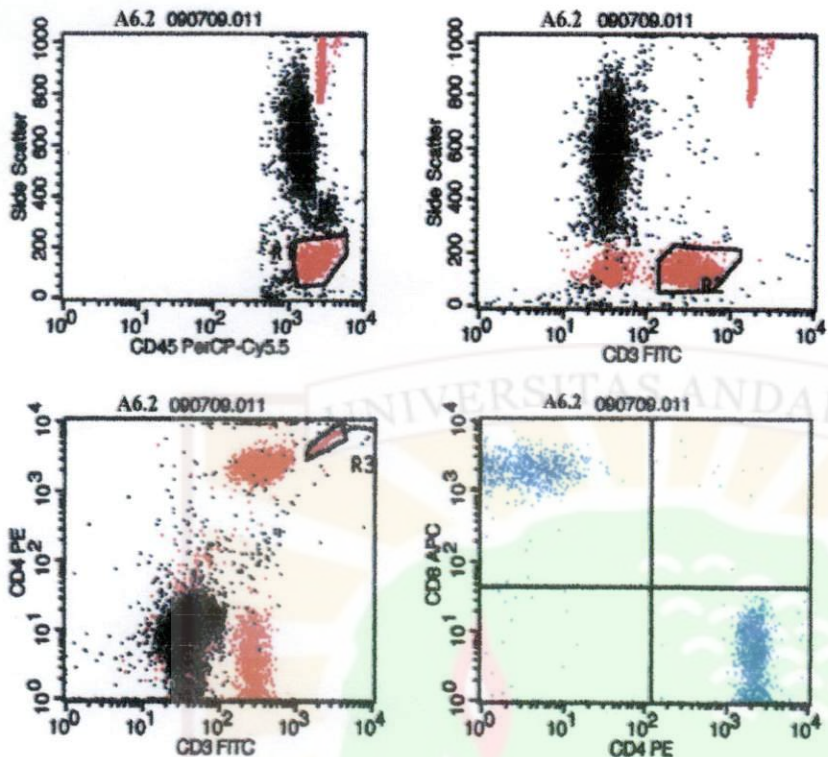
File: A6.1090709.010
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	3457	34.57	34.57
G2	1296	12.96	12.96
Beads	3302	33.02	33.02
Total T Lymphs	1240	12.40	12.40

Abs CD3+ Cells = 3.76×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 2.15×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 0.82×10^3 / uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: A6.2090709.011
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2061
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	736	35.71	7.36
UR	14	0.68	0.14
LL	30	1.46	0.30
LR	1281	62.15	12.81

Gate Statistics

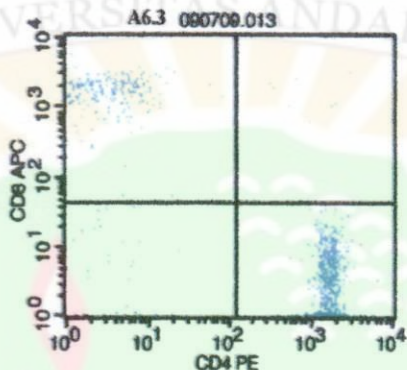
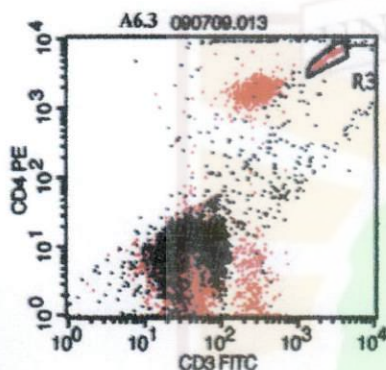
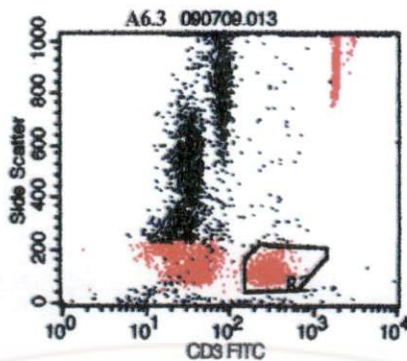
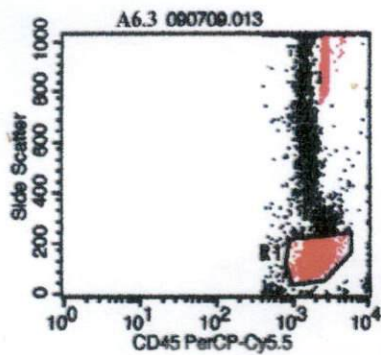
File: A6.2090709.011
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	2936	29.36	29.36
G2	2072	20.72	20.72
Beads	1786	17.86	17.86
Total T Lymphs	2061	20.61	20.61

Abs CD3+ Cells = 11.57×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 7.19×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 4.13×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: A6.3090709.013
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1040
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	256	24.62	2.56
UR	13	1.25	0.13
LL	39	3.75	0.39
LR	732	70.36	7.32

Gate Statistics

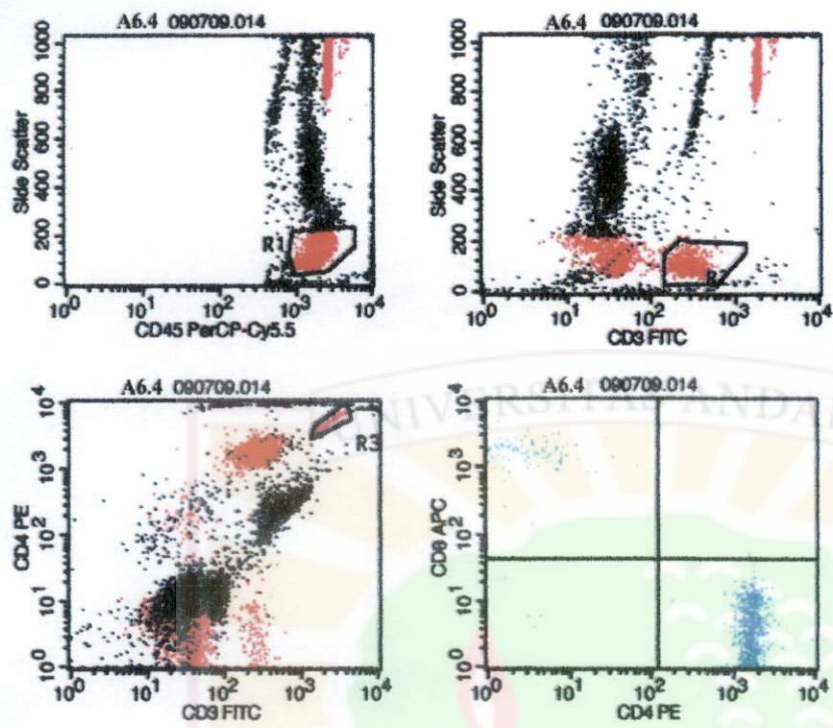
File: A6.3090709.013
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	3412	34.12	34.12
G2	1043	10.43	10.43
Beads	1979	19.79	19.79
Total T Lymphs	1040	10.40	10.40

Abs CD3+ Cells = 5.27×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 3.71×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.30×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:A6.4 090709.014
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1253
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	120	10.30	1.29
UR	2	0.16	0.02
LL	9	0.72	0.09
LR	1113	88.83	11.13

Gate Statistics

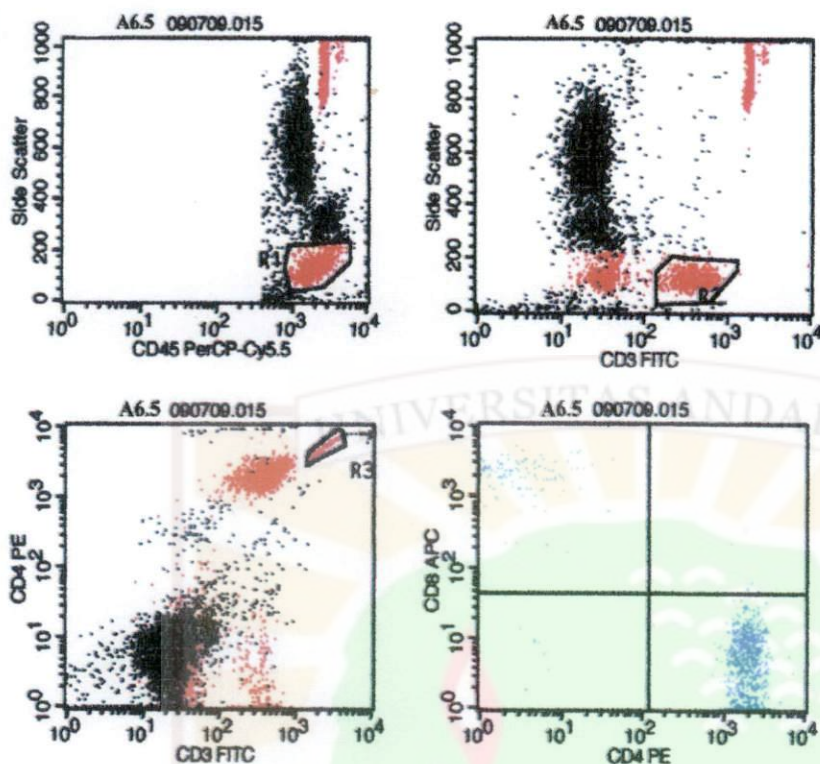
File:A6.4 090709.014
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	2906	29.06	29.06
G2	1259	12.59	12.59
Beads	2643	26.43	26.43
Total T Lymphs	1253	12.53	12.53

Abs CD3+ Cells = 4.75×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 4.22×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 0.49×10^3 / uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:A6.5090709.015
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1080
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	149	14.06	1.49
UR	6	0.57	0.06
LL	10	0.94	0.10
LR	895	84.43	8.65

Gate Statistics

File:A6.5090709.015
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	1992	19.92	19.92
G2	1071	10.71	10.71
Beads	2501	25.01	25.01
Total T Lymphs	1080	10.80	10.80

Abs CD3+ Cells = 4.25×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 3.59×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 0.60×10^3 /uL

Abs CD3+ Cells = 3.72×10^3 /ul

Abs CD4+ T Lymphs = 3.15×10^3 /ul

Abs CD8+ T Lymphs = 0.50×10^3 / ul

Sample Volume = 50.00

Dilution Factor = 10.00

TruCount = 50126.00

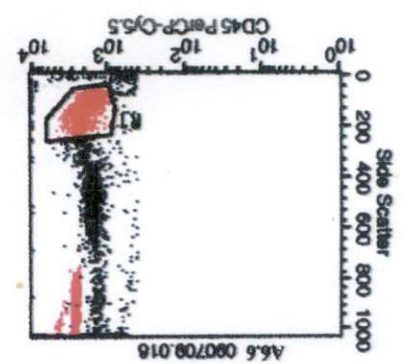
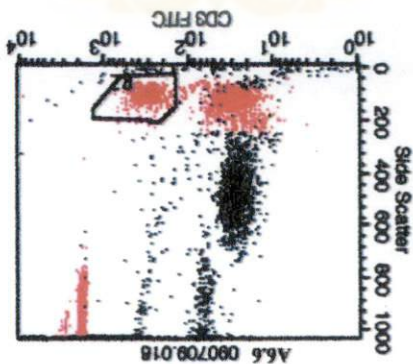
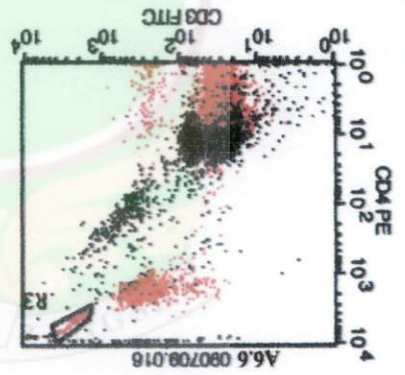
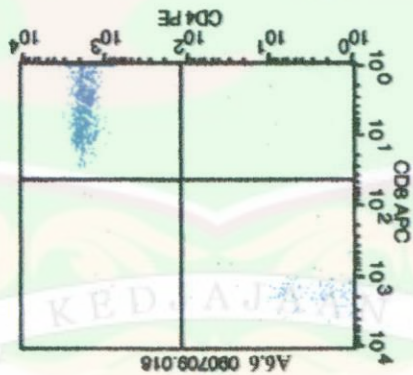
Gate	Events	% Gated	% Total
UL	135	13.45	1.35
UR	9	0.90	0.09
LL	11	1.10	0.11
LR	848	84.56	8.48
CD45+ Lymphs			
	3785	37.85	37.85
Gate			
	Events	% Gated	% Total
Total T Lymphs	1004	10.04	10.04
Beads	2703	27.03	27.03

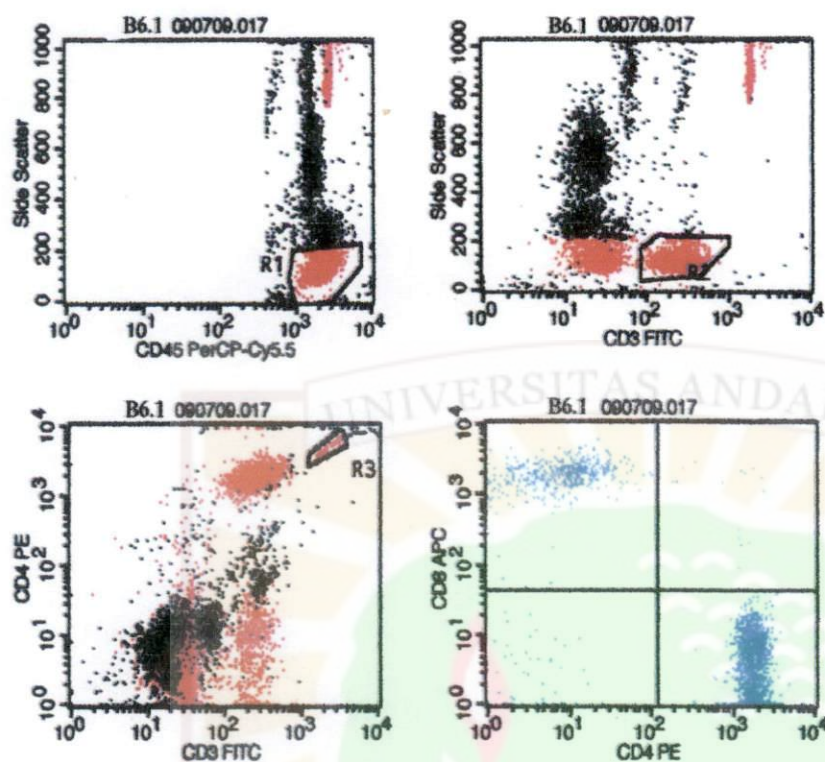
Quadrant Statistics

File: A6.6080709.018
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-08
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1004
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File: A6.6080709.018
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-08
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000





TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B6.1 090709.017
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2402
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	465	19.36	4.65
UR	17	0.71	0.17
LL	52	2.16	0.52
LR	1868	77.77	18.68

Gate Statistics

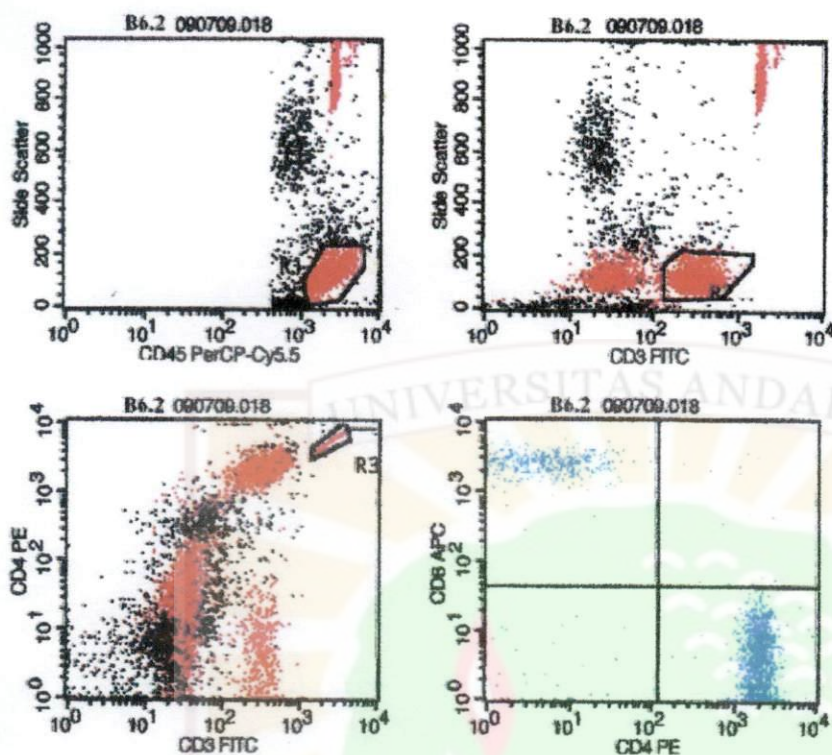
File: B6.1 090709.017
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	5148	51.48	51.48
G2	2413	24.13	24.13
Beads	1406	14.06	14.06
Total T Lymphs	2402	24.02	24.02

Abs CD3+ Cells = 17.13×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 13.32×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 3.32×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B6.2 090709.018
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2289
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	400	17.47	4.00
UR	16	0.70	0.16
LL	33	1.44	0.33
LR	1840	80.38	18.40

Gate Statistics

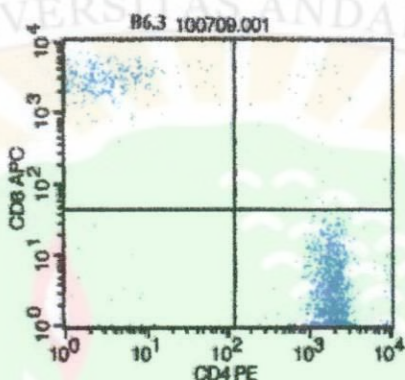
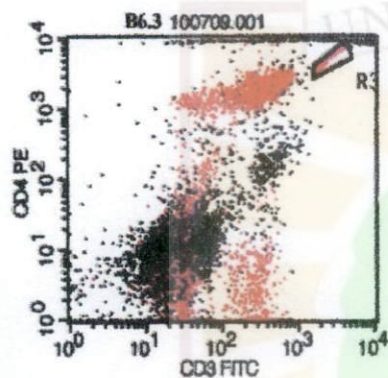
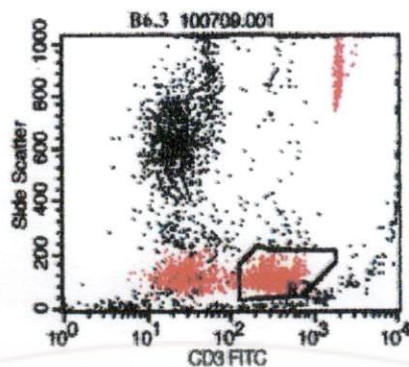
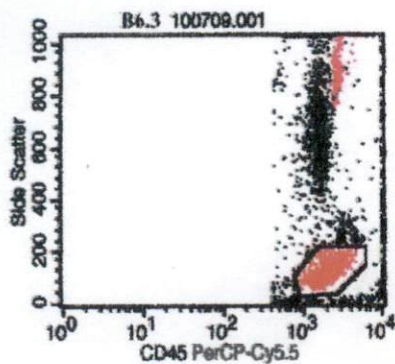
File: B6.2 090709.018
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 09-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	5384	53.84	53.84
G2	2330	23.30	23.30
Beads	2370	23.70	23.70
Total T Lymphs	2289	22.89	22.89

Abs CD3+ Cells = 9.68×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 7.78×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.69×10^3 / uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B6.3100709.001
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1892
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	389	20.56	3.89
UR	45	2.38	0.45
LL	18	0.95	0.18
LR	1440	76.11	14.40

Gate Statistics

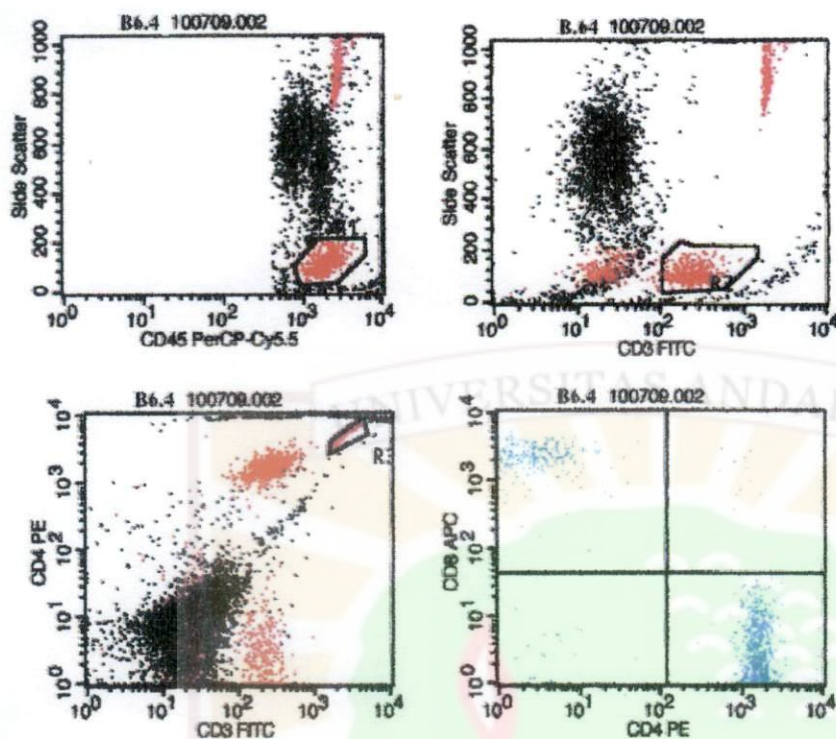
File: B6.3100709.001
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	3730	37.30	37.30
G2	1989	19.89	19.89
Beads	819	8.19	8.19
Total T Lymphs	1892	18.92	18.92

Abs CD3+ Cells = 23.16×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 17.63×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 4.76×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B6.4100709.002
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1200
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	287	23.92	2.87
UR	13	1.08	0.13
LL	26	2.17	0.26
LR	874	72.83	8.74

Gate Statistics

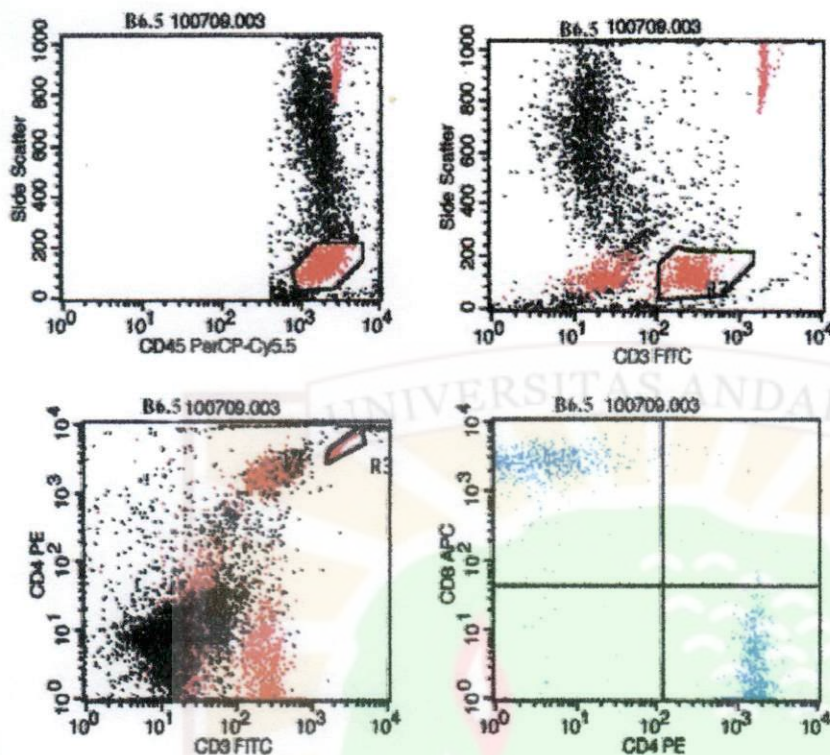
File: B6.4100709.002
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	2012	20.12	20.12
G2	1245	12.45	12.45
Beads	1296	12.96	12.96
Total T Lymphs	1200	12.00	12.00

Abs CD3+ Cells = 9.28×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 6.76×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 2.22×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B6.5100709.003
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1324
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File: B6.5100709.003
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

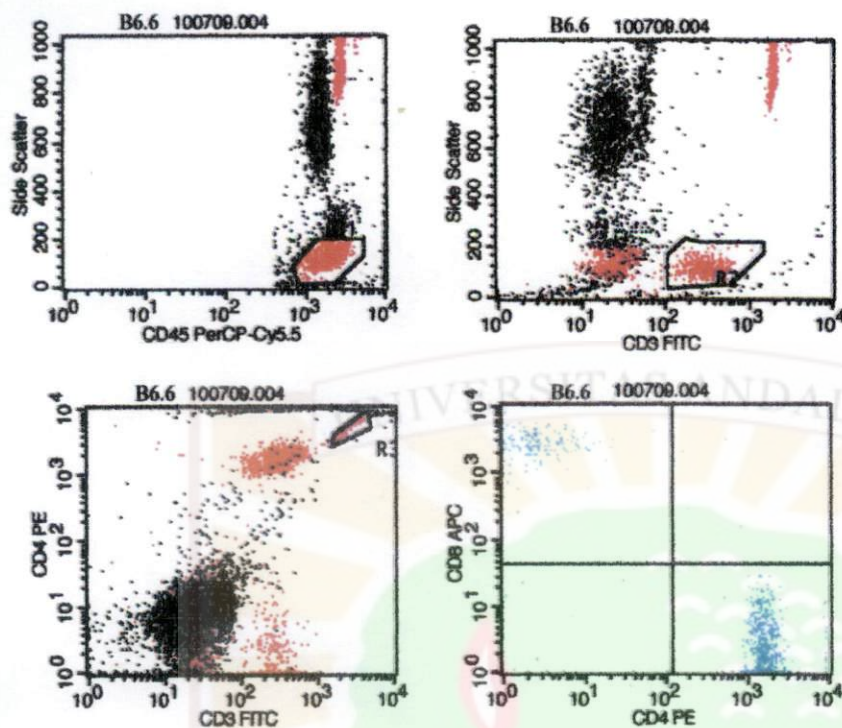
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	809	46.00	6.09
UR	27	2.04	0.27
LL	23	1.74	0.23
LR	865	50.23	6.65

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	2581	25.81	25.81
G2	1382	13.82	13.82
Beads	881	8.81	8.81
Total T Lymphs	1324	13.24	13.24

Abs CD3+ Cells = 15.07×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 7.57×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 6.93×10^3 / uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: B6.6100709.004
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 993
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	218	21.75	2.18
UR	8	0.81	0.08
LL	18	1.81	0.18
LR	751	75.63	7.51

Gate Statistics

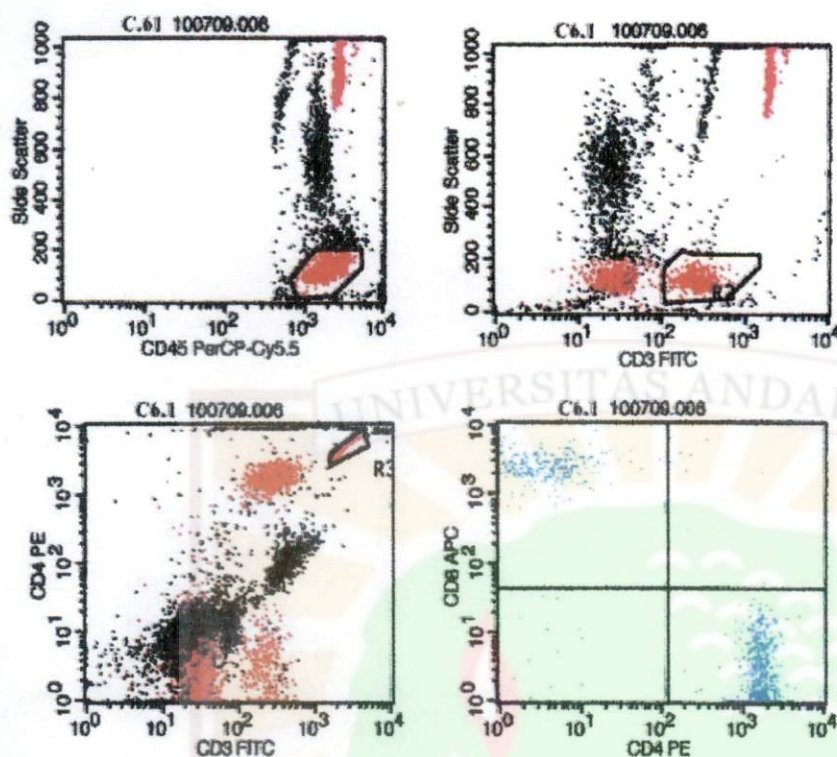
File: B6.6100709.004
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	2229	22.29	22.29
G2	1031	10.31	10.31
Beads	2111	21.11	21.11
Total T Lymphs	993	9.93	9.93

Abs CD3+ Cells = 4.72×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 3.57×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.03×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics
 File: C6.1100709.008
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1175
 Total Events: 10000

Gate Statistics
 File: C6.1100709.008
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

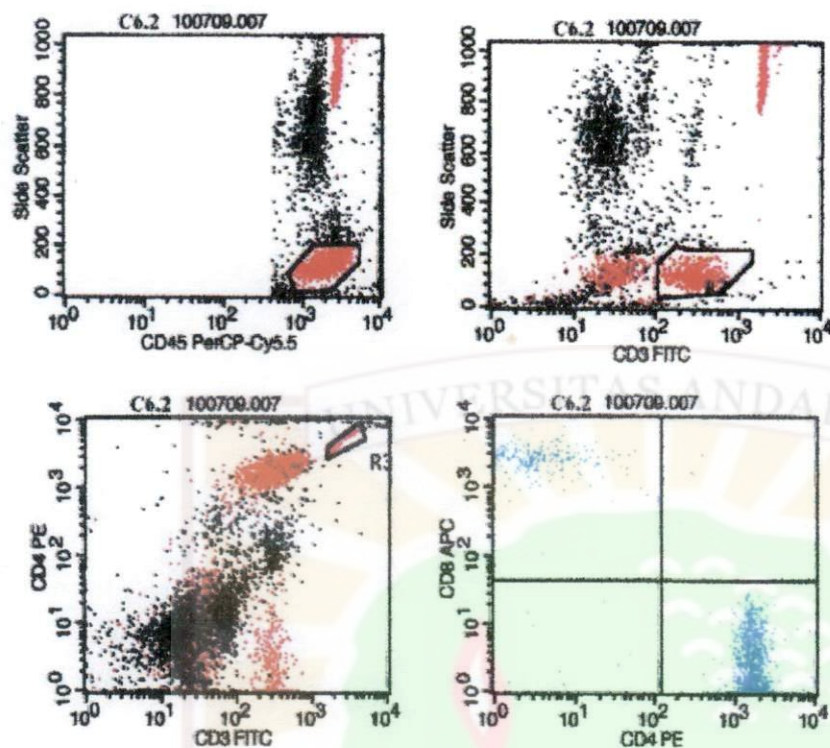
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	307	26.13	3.07
UR	8	0.68	0.08
LL	17	1.45	0.17
LR	843	71.74	8.43

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	3172	31.72	31.72
G2	1212	12.12	12.12
Beads	2818	28.18	28.18
Total T Lymphs	1175	11.75	11.75

Abs CD3+ Cells = 4.50×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 3.23×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.18×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File:C6.2100709.007
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 2025
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	288	14.72	2.98
UR	4	0.20	0.04
LL	21	1.04	0.21
LR	1702	84.05	17.02

Gate Statistics

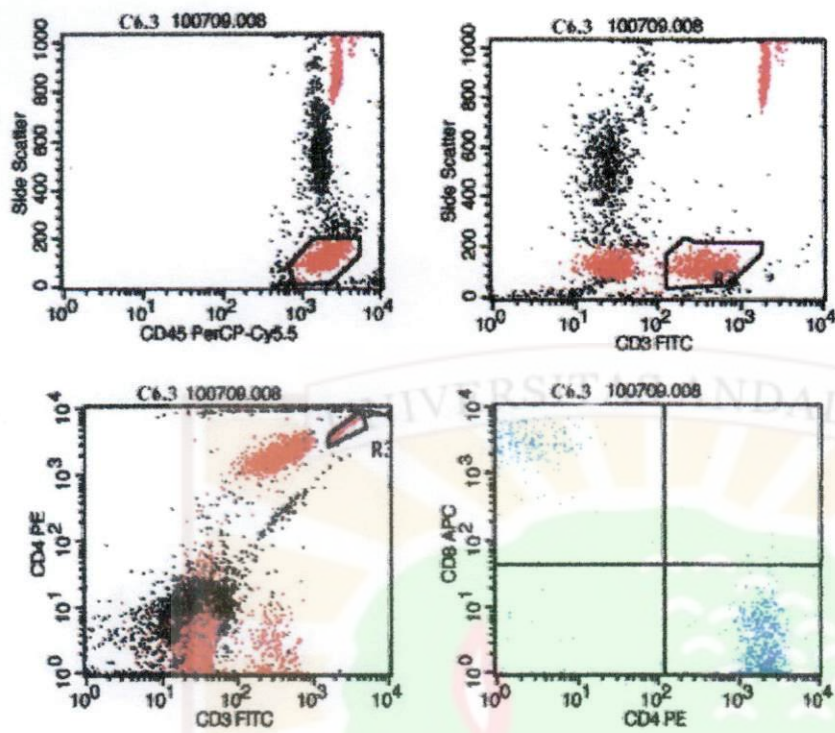
File:C6.2100709.007
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	3325	33.25	33.25
G2	2128	21.28	21.28
Beads	1792	17.92	17.92
Total T Lymphs	2025	20.25	20.25

Abs CD3+ Cells = 11.33×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 9.52×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.67×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: C6.3100709.008
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1212
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File: C6.3100709.008
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

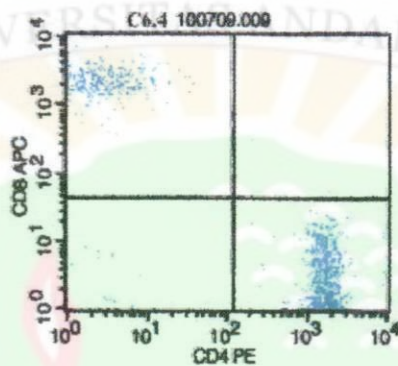
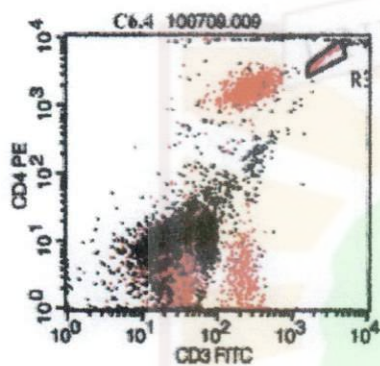
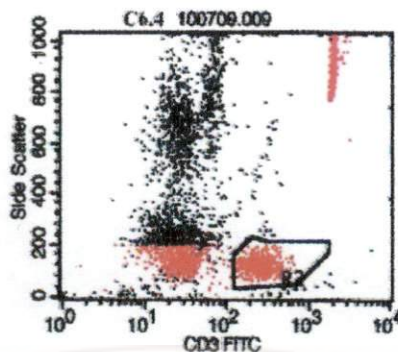
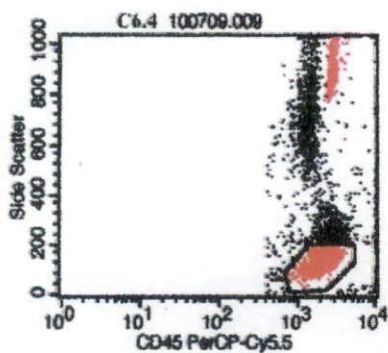
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	249	20.54	2.49
UR	5	0.41	0.05
LL	24	1.98	0.24
LR	934	77.06	9.34

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	4590	45.90	45.90
G2	1243	12.43	12.43
Beads	2317	23.17	23.17
Total T Lymphs	1212	12.12	12.12

Abs CD3+ Cells = 5.24×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 4.04×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.08×10^3 / uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: C6.4100709.009
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1450
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	388	25.24	3.88
UR	1	0.07	0.01
LL	31	2.14	0.31
LR	1052	72.55	10.52

Gate Statistics

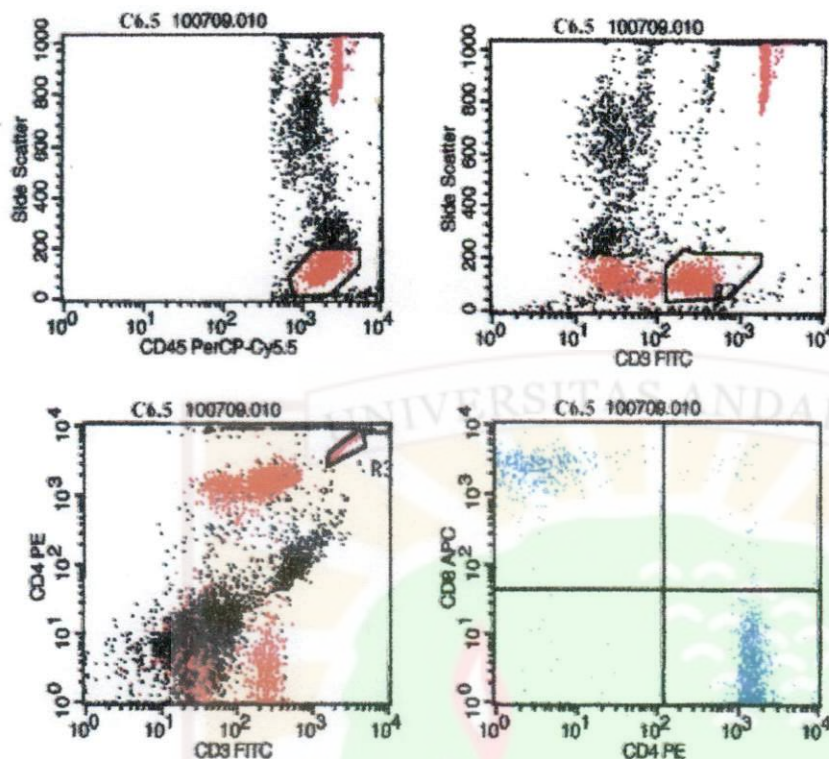
File: C6.4100709.009
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	3644	36.44	36.44
G2	1498	14.98	14.98
Beads	1540	15.40	15.40
Total T Lymphs	1450	14.50	14.50

Abs CD3+ Cells = 9.44×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 6.85×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 2.38×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: C6.5100709.010
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1837
 Total Events: 10000

Gate Statistics

File: C6.5100709.010
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

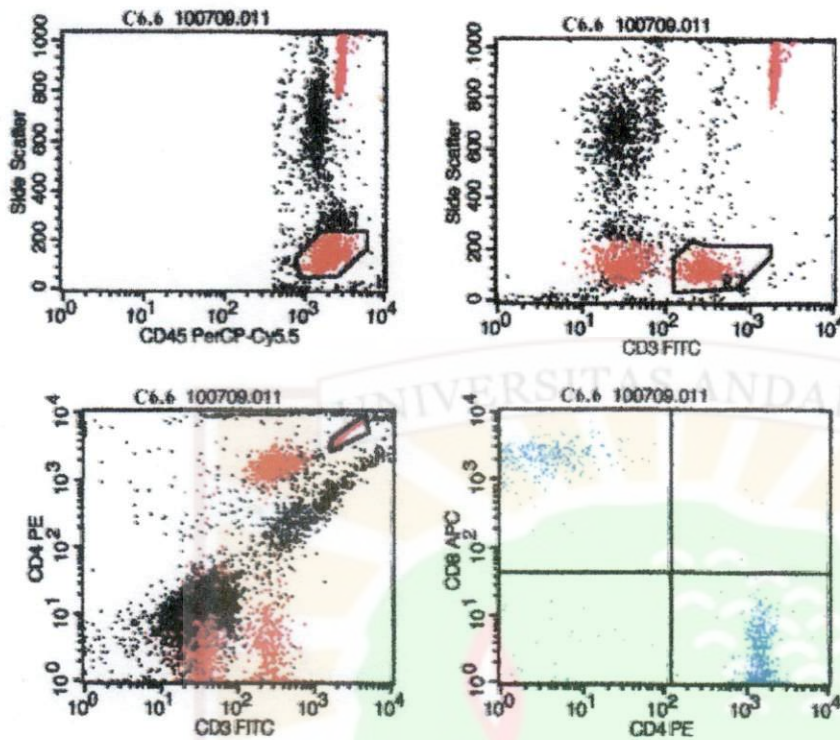
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	457	24.88	4.57
UR	50	2.72	0.50
LL	29	1.58	0.29
LR	1301	70.82	13.01

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	3583	35.83	35.83
G2	1878	18.78	18.78
Beads	2300	23.00	23.00
Total T Lymphs	1837	18.37	18.37

Abs CD3+ Cells = 7.98×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 5.65×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.98×10^3 /uL



TruCount = 50126.00

Dilution Factor = 10.00

Sample Volume = 50.00

Quadrant Statistics

File: C6.6100709.011
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: Total T Lymphs
 Gated Events: 1129
 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	328	29.05	3.28
UR	5	0.44	0.05
LL	43	3.81	0.43
LR	753	68.70	7.53

Gate Statistics

File: C6.6100709.011
 Sample ID: Sample (with TruC)
 Acquisition Date: 10-Jul-09
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Gate	Events	% Gated	% Total
CD45+ Lymphs	3080	30.80	30.80
G2	1158	11.58	11.58
Beads	2582	25.82	25.82
Total T Lymphs	1129	11.29	11.29

Abs CD3+ Cells = 4.38×10^3 /uL

Abs CD4+ T Lymphs = 2.92×10^3 /uL

Abs CD8+ T Lymphs = 1.27×10^3 /uL

Lampiran 5. Gambar alat dan perlakuan penelitian



Keterangan gambar:

Gbr a. Teh hijau yang digunakan

Gbr b. Ekstrak teh hijau

Gbr c. Merkuri (Hg) dan wadah yang digunakan untuk meletakkan merkuri dalam kandang mencit

Gbr d dan e Merkuri dalam kandang mencit

Gbr f. perlakuan pemberian merkuri secara inhalasi dengan menutup kandang mencit yang sudah diletakkan merkuri selama 4 jam sehari

Gbr g. pengambilan darah mencit

Gbr h. Alat Facs Calibur di Rumah Sakit Kanker Dharmas Jakarta