

LAPORAN HASIL PENELITIAN

**EFEK ISOLATE KATEKIN TEH HIJAU KLON GMB4 TERHADAP STRES
RETIKULUM ENDOPLASMA PADA KATARAK YANG DISEBABKAN SODIUM
SELENITE PADA TIKUS WISTAR**

oleh

dr. Nugraha Wahyu Cahyana Sp.M

Dosen Fakultas Kedokteran

Universitas Jember



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN
PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA
MASYARAKAT

BIAYA MANDIRI

HALAMAN PENGESAHAN

LAPORAN HASIL PENELITIAN

Judul Kegiatan : Efek Isolate Katekin Teh Hijau Klon GMB4 Terhadap Stres Retikulum Endoplasma Pada Katarak Yang disebabkan Sodium Selenite Pada Tikus Wistar

Kode>Nama Rumpun Ilmu : Kedokteran Umum

Ketua Pelaksana

- a. Nama : dr. Nugraha Wahyu Cahyana, Sp.M
- b. Pangkat /Golongan/NIP : Penata/ III-c/196307141999031001
- c. Jabatan : Lektor

Jumlah Anggota : -

Waktu Pelaksanaan : Mei – November 2019

Biaya

- 1. Dana Yang diperlukan : Rp. 36.700.000;
- 2. Sumber Dana : Mandiri

Jember, 26 Desember 2019

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Jember



dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA
NIP. 19730424199903 1002

Ketua Pelaksana Penelitian

dr. Nugraha Wahyu Cahyana Sp.M
NIP. 196307141999031001

Mengetahui,
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Jember



Prof. Dr. Achmad Subagiyo, M.Agr., Ph.D
NIP. 196905171992011001

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Katarak adalah hilangnya transparansi lensa yang mengganggu penglihatan (Maddirala *et al.*, 2017). Katarak merupakan penyebab utama kebutaan, terhitung lebih dari 50% kasus diseluruh dunia (Mo'otapu *et al.*, 2015).

Data WHO menyebutkan 314 juta orang diseluruh dunia mengalami gangguan penglihatan dan 45 juta di antaranya mengalami kebutaan, yang lebih dari 90% kasusnya berada di negara berkembang. Katarak merupakan penyebab utama kebutaan dan gangguan tajam penglihatan di dunia. Tahun 2002 WHO memperkirakan sekitar 17 juta (47.8%) (Thiagrajan *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil Survey Kesehatan Indera di Indonesia periode 1993–1996, sebesar 1,5% penduduk Indonesia mengalami kebutaan. Sedangkan untuk daerah NTB didapatkan prevalensi kebutaan sekitar 1,2% (Khairallah *et al.*, 2016). Penyebab utama kebutaan adalah katarak (52%), glaukoma (13,4%), kelainan refraksi (9,5%), gangguan retina (8,5%), kelainan kornea (8,4%) dan penyakit mata lain (Dewi *et al.*, 2010; Madany., 2016).

Besarnya Jumlah penderita katarak di Indonesia saat ini berbanding lurus dengan jumlah usia lanjut, yang pada tahun 2000 diperkirakan sebesar 15,3 juta. Di Indonesia diperkirakan setiap menit ada satu orang buta. Sebagian besar orang buta di Indonesia berada di daerah miskin dengan kondisi sosial ekonomi

lemah (Tana *et al.*, 2009). Prevalensi katarak di Indonesia dalam Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 adalah sebesar 1.8%, tertinggi di Provinsi Sulawesi Utara (3.7%) dan terendah di DKI Jakarta (0.9%) (KEMENKES, 2013).

Patogenesis katarak senilis adalah multifaktorial, melibatkan mekanisme yang tidak sepenuhnya dipahami dan stres oksidatif menjadi penyebab utama dalam memulai pembentukan katarak. Stres oksidatif menyebabkan stress retikulum endoplasma. Stres retikulum endoplasma terjadi bila terdapat ketidakseimbangan antara protein yang tidak terlipat dibandingkan protein yang terlipat (Mulhern *et al.*, 2012). Bila stres retikulum endoplasma tidak segera teratasi maka akan mempengaruhi proses pelipatan protein sehingga menyebabkan protein cacat yaitu tidak terlipat atau salah lipat (*missfolding* atau *unfolding*). Jika protein gagal terlipat ini akumulasi maka terjadi agregasi dan tumbuh menjadi partikel agregat yang besar dalam sehingga menjadi katarak (Elanchezhian *et al.*, 2012).

Retikulum endoplasma melepaskan protein pengikat rantai berat immunoglobulin *Binding immunoglobulin Protein* (BiP)/ *Glukosa Regulated Protein* (GRP) 78 untuk mengatasi protein yang gagal melipat atau salah lipat dengan mendegradasi protein yang gagal melipat melalui jalur *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation* (ERAD). Jika protein yang gagal melipat masih menumpuk di retikulum endoplasma, maka GRP78 bertindak sebagai inisiator mengaktifkan *Unfolding Protein Respons* (UPR). UPR meregulasi stres retikulum endoplasma dengan mengaktifkan tiga transduser yaitu *Inositol-requiring kinase1* (IRE1), *protein-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) dan *Activating transcription factor6* (ATF6). Tiga transducer ini tidak aktif dalam keadaan normal dan dijaga ketat oleh GRP78 dan hanya akan dilepaskan bila ada stress retikulum

endoplasma untuk mencari dan mengikat protein yang gagal melipat (Elanchezhian *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Berbagai temuan ilmiah menunjukkan adanya hubungan fungsional antara stres retikulum endoplasma dan stres oksidatif, namun mekanisme di balik korelasi tersebut belum sepenuhnya diketahui. Studi masa depan diharapkan dapat menjelaskan patofisiologi di balik perubahan-perubahan yang diperantarai sel-sel dalam proses pelipatan protein, yang menghasilkan produksi protein yang tidak melipat, dan mendapatkan pemahaman mendalam tentang jalur yang terlibat pada mekanisme yang tepat dari interaksi antara stres retikulum endoplasma dan stres oksidatif. Temuan tersebut akan memberikan kontribusi besar terhadap pemahaman tentang pengembangan intervensi terapeutik baru penanganan katarak dalam hubungannya dengan stres retikulum endoplasma dan stres oksidatif (Palsamy *et al.*, 2014).

Stres retikulum endoplasma juga mengubah homeostasis lenticular Ca^{2+} , penurunan konten ATP, turunnya glutathione (GSH), peningkatan rasio NADP/NADPH, dan untai ganda DNA pecah. Tingkat Ca^{2+} yang tinggi mengaktifkan m-calpain dan proteolisis yang signifikan dari β -kristal dan α -spectrin, dan akhirnya terjadi kekeruhan lensa (Selvaraj *et al.*, 2013).

Pemilihan model hewan katarak sangat penting untuk mengetahui patogenesis katarak, pengembangan penanganan dan pencegahannya. Meskipun ada beberapa model hewan katarak yang tersedia, namun katarak yang diinduksi dengan sodium selenite bisa menjadi model yang baik. Selenium ($> 1 \mu\text{M}$) bertindak sebagai pro-oksidan yang sangat beracun memproduksi spesies oksigen reaktif (ROS) oleh metabolitnya melalui katalisis redoks (Selvaraj *et al.*, 2013, Le *et al.*, 2009). Selenit dapat menginduksi katarak nuklear dalam

waktu 4-6 hari, selanjutnya terjadi katarak kortikalis karena adanya degradasi protein dan fibrogenesis abnormal (Selenius *et al.*, 2010).

Operasi merupakan satu-satunya cara yang tersedia dan efektif untuk mengatasi katarak, namun memerlukan biaya yang tidak sedikit dan kebutuhan personil yang sangat terlatih. Sayangnya, sebagian besar penderita katarak tinggal di Negara berkembang dimana akses terhadap operasi terbatas. Oleh karena itu harus dipikirkan cara pencegahannya, yaitu dengan mengembangkan pendekatan non-bedah. Strategi-strategi ini tidak hanya meningkatkan kualitas hidup tetapi juga menekan beban kesehatan masyarakat (Wu *et al.*, 2014).

Beberapa senyawa polifenol dan senyawa bukan folifenol dengan sifat antioksidan telah dilaporkan dapat mencegah katarak yang diinduksi selenit, seperti resveratrol, saffron, asam ellagic, bawang putih, melatonin, drevogenin D, kafein, ebselen, lycopene, N-acetylcysteine amide (Varma *et al.*, 2010; Makri Oe *et al.*, 2013; Maddirala *et al.*, 2017).

Salah satu bahan alam yang berisi senyawa polifenol dan berpotensi sebagai anti oksidan adalah teh hijau (*Camellia sinensis*) (Allipoor & Rad., 2012). Teh hijau mengandung polyphenolic flavonoid yang disebut katekin. Katekin adalah komponen yang dominan dari polyphenol yang terdiri dari epicatechin (EC), epigallocatechi (EGC), epicatechins-3-gallate (ECG) dan epigallocatechins-3-gallate (EGCG). EGCG adalah katekin predominan yang terdapat dalam 48% sampai dengan 55% dari jumlah polyphenols dari daun teh hijau (Velayutham, Babu & Liu, 2008). Ratnawati *et al* (2009), telah menemukan isolasi dan purifikasi dari Katekin dan EGCG dari teh hijau GMB4 dari Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung. Dari 100 gram teh hijau mengandung 12 sampai 14% isolat katekin. Hasil dari analisa HPLC menunjukkan bahwa EGCG

dan ECG adalah komponen utama dari isolate teh hijau klon GMB-4 (Susanti *et al.*, 2015).

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa katekin memiliki beragam manfaat kesehatan, termasuk efek anti-oksidan, anti-hiperglikemik, anti-kanker, dan anti-apoptosis. Katekin juga telah dilaporkan memberikan efek perlindungan sel epitel lensa dari kerusakan akibat radiasi UV (Lee *et al.*, 2010; Kim & Koh., 2011, Miyoshi *et al.*, 2015). Namun sejauh pengetahuan kami, belum ada penelitian yang dilakukan untuk mengidentifikasi manfaat katekin yang diisolasi dari teh hijau klon GMB4 terhadap stres oksidatif dan stres retikulum endoplasma sel epitel lensa.

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka diperlukan penelitian untuk membuktikan pengaruh isolat katekin teh hijau klon GMB4 dapat melindungi sel epitel lensa terhadap stres retikulum endoplasma (BiP/GRP78) dan tingkat kekeruhan lensa sehingga dapat menunda timbulnya katarak.

1. 2. Rumusan Masalah

1. 2.1 Permasalahan Umum: Apakah pemberian katekin dapat menghambat katarak dengan mengurangi stres retikulum endoplasma pada sel epitel lensa?

1. 2. 2 Permasalahan Khusus

Berdasarkan permasalahan pada latar belakang tersebut, maka dapat dirumuskan permasalahan peneliti sebagai berikut:

1. Bagaimana ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa dan kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit?

2. Bagaimana pengaruh Katekin terhadap ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit?
3. Berapa dosis katekin yang mampu menghambat kekeruhan lensa, peningkatan ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi Sodium Selenite ?

1. 3 Tujuan Penelitian

1. 3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui katekin dapat menghambat katarak dengan mengurangi stres retikulum endoplasma pada epitel lensa

1. 3. 2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit.
2. Mengetahui pengaruh Katekin terhadap ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit.
3. Mengetahui dosis katekin yang mampu menghambat kekeruhan lensa, peningkatan ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenite.

1. 4 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah dan kerangka konsep berfikir, hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Hipotesis:

Isolat golongan senyawa katekin teh hijau GMB4 mampu mencegah katarak dengan menghambat Stres Retikulum Endoplasma

4. Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Pengembangan Ilmu Pengetahuan

Dengan diketahuinya dosis katekin yang mampu menghambat peningkatan ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa, pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi natrium selenit maka hasil penelitian ini dapat digunakan dalam pengembangan bahan obat untuk pencegahan penyakit katarak yang berasal dari tanaman obat.

2. Manfaat Klinis

Untuk dijadikan rekomendasi pada masyarakat dalam menggunakan katekin teh hijau untuk pencegahan terhadap penyakit katarak.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Lensa

2.1.1. Anatomi Lensa

Lensa Kristalina adalah suatu jaringan intraokuler yang berbentuk cakram, transparans, avaskuler, tidak berwarna dengan tebal 4 mm dan diameter 9 mm. Lensa terletak pada segmen anterior dari bola mata bergantung pada zonula di belakang iris. Di depan lensa terdapat humor akuos dan di belakangnya terdapat korpus vitreum. Permukaan lensa dibedakan menjadi permukaan anterior dan permukaan posterior. Permukaan anterior merupakan kurva seperti elips dengan puncak kurvatura di tengah disebut polus anterior, dengan radius kurvatura kurang lebih 10 mm. Permukaan posterior merupakan kurva seperti parabola dengan radius kurvatura kurang lebih 6 mm dan puncak kurvatura disebut polus posterior. Sehingga permukaan posterior lebih cembung daripada permukaan anterior. Garis yang menghubungkan antara polus anterior dan posterior disebut aksis lensa (Zorab *et al.*, 2010).

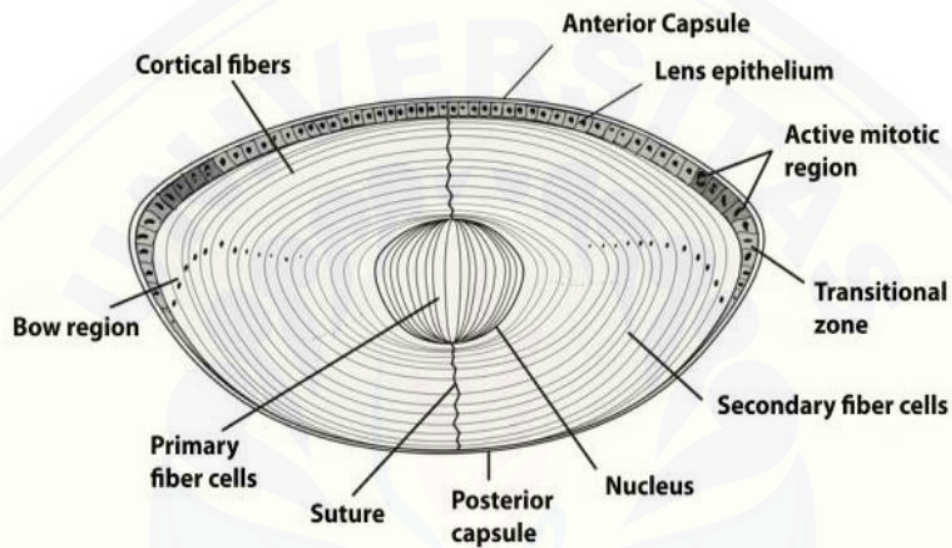
Secara struktural lensa dapat dibedakan atas:

- a. Kapsula Lensa yang merupakan suatu membran yang mengelilingi lensa. Membran ini tahan terhadap pengaruh patologis maupun kimiawi dan elastisitasnya sangat tinggi.
- b. Epitel Subkapsuler berada tepat dibawah kapsula lensa berupa selapis sel epitel kuboid. Seluruh proses metabolisme, sintesis, dan transport aktif terjadi pada lapisan epitel ini.

c. Substansi Lensa

Substansi lensa terdiri dari (Disajikan dalam Gambar 1)

- 1) Nukleus
- 2) Korteks



Gambar 1. Skema Potongan lintang Lensa (Sharma dan Santhoshkumar, 2009). Keterangan: Satu lapisan sel epitel mencakup penampang anterior. Sel-sel serat memanjang bersentuhan langsung dengan lapisan epitel di wilayah anterior, dan mereka melakukan kontak dengan kapsul di daerah posterior. Di daerah busur lensa sel-sel membedakan, memanjang, kehilangan organel mereka dan mulai membentuk sel-sel serat yang baru dibedakan.

Korteks terletak antara kapsula lensa dan nukleus mengandung serat-serat yang lembut. Serat-serat lensa terdiri dari protein gel yang homogen dibungkus membran plasma. Pada penampang lensa terlihat serat-serat lensa berbentuk heksagonal yang tersusun rapat sehingga dapat merefraksikan cahaya dengan baik.

Unsur terbesar dalam lensa adalah air (kira-kira 65%) dan sisanya protein (kira-kira 35%) yang merupakan kandungan protein tertinggi dari semua jaringan, juga terdapat zat-zat lain seperti lemak, glutathion, ion anorganik, Na, K, Asam Askorbat, glukosa dan hasil metabolisme. Asam amino masuk lensa secara transport aktif. Asam amino ini disintesis menjadi protein lensa. Sebagian besar protein lensa larut dalam air. Kalau komposisi kimia lensa ini dapat dipertahankan maka lensa akan tetap transparans (AAO., 2011).

2. 1. 2 Embriologi Lensa

Pada bulan pertama kehamilan permukaan ektoderm berinvaginasi ke vesikel optik primitif yang terdiri atas neuroektoderm. Struktur ektoderm murni ini akan berdiferensiasi menjadi tiga struktur, yakni serat geometrik sentral lensa, permukaan anterior sel epitel, dan kapsul hyalin aselular. Arah pertumbuhan struktur epitel yang normal adalah sentrifugal. Sel yang telah berkembang sempurna akan bermigrasi ke permukaan dan mengelupas. Pertumbuhan serat lensa primer membentuk nukleus embrionik. Di bagian ekuator, sel epitel akan berdiferensiasi menjadi serat lensa dan membentuk nukleus fetus. Serat sekunder yang baru ini akan menggantikan serat primer ke arah pertengahan lensa (Varma & Kevin., 2010; Wang *et al.*, 2013). Pembentukan nukleus fetus yang mendekati nukleus embrionik akan sempurna saat lahir. Laju pertumbuhan lensa fetus adalah 180 mg/tahun. Lensa fetus berbentuk bulat sempurna (AAO., 2011).

Lensa akan terus tumbuh dan membentuk serat lensa seumur hidup, tidak ada sel yang mati ataupun terbuang karena lensa ditutupi oleh kapsul lensa. Pembentukan serat lensa pada ekuator, yang akan terus berlanjut seumur hidup, membentuk nukleus infantil selama dekade pertama dan kedua kehidupan serta

membentuk nukleus dewasa selama dekade ketiga (Abenggosar *et al.*, 2015). Arah pertumbuhan lensa yang telah berkembang berlawanan dengan arah pertumbuhan embriologinya. Sel yang termuda akan selalu berada di permukaan dan sel yang paling tua berada di pusat lensa. Laju pertumbuhan lensa adalah 1,3 mg/tahun antara usia 10-90 tahun (Berthoud & Bayer., 2009; Addepalli *et al.*, 2012).

2.1.3 Komposisi Lensa

Lensa terdiri atas air sebanyak 65%, protein sebanyak 35% (kandungan protein tertinggi di antara jaringan-jaringan tubuh), dan sedikit sekali mineral dibandingkan jaringan tubuh lainnya. Kandungan kalium lebih tinggi di lensa daripada jaringan lain. Asam askorbat dan glutathion terdapat dalam bentuk teroksidasi maupun tereduksi. Lensa tidak memiliki serabut saraf, pembuluh darah, dan jaringan ikat (Lim *et al.*, 2014; Sciences., 2016).

Protein lensa dapat dibagi menjadi dua berdasarkan kelarutannya dalam air, yaitu protein larut air (protein sitoplasmik) dan protein tidak larut air (protein sitoskeletal). Jumlah protein larut air sebesar 80% dari seluruh protein lensa yang terdiri atas kristalin (Talebizadeh *et al.*, 2014). Kristalin adalah protein intraselular yang terdapat pada epithelium dan membran plasma dari sel serat lensa. Kristalin terbagi atas kristalin alpha (α), beta (β), dan gamma (γ). Akan tetapi, kristalin beta dan gamma adalah bagian dari familia yang sama sehingga sering disebut sebagai kristalin beta gamma. Kristalin alpha merepresentasikan 32% dari protein lensa (Wang *et al.*, 2013). Kristalin alpha adalah protein dengan besar molekul yang paling besar yaitu sebesar 600-4000 kDa, bergantung pada kecenderungan subunitnya untuk beragregasi. Kristalin alpha bukan merupakan suatu protein tersendiri, melainkan gabungan dari 4 subunit mayor dan 9 subunit minor. Setiap

polipeptida subunit memiliki berat molekul 20 kDa. Rantai ikatannya merupakan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik (Roberts, 2011; Ji *et al.*, 2016).

Kristalin alpha terlibat dalam transformasi sel epitel menjadi serat lensa. Laju sintesis kristalin alpha tujuh kali lebih cepat di sel epitel dari pada di serat kortikal, mengindikasikan penurunan laju sintesis setelah transformasi (Galichanin *et al.*, 2010). Kristalin beta dan gamma memiliki rangkaian asam amino homolog dan struktur yang sama sehingga dapat dipertimbangkan sebagai satu famili protein. Kristalin beta berkontribusi sebesar 55% dari protein larut air pada protein lensa (Zorab *et al.*, 2010). Protein lensa yang tidak larut air dapat dibagi menjadi dua, yaitu protein yang larut dalam urea dan yang tidak larut dalam urea. Fraksi yang larut dalam urea terdiri atas protein sitoskeletal yang berfungsi sebagai rangka struktural sel lensa. Fraksi yang tidak larut urea terdiri atas membran plasma serat lensa. Plasma membran sebagian besar tersusun oleh Protein, yang disebut *Major Intrinsic Protein* (MIP). Pada serat lensa dan membran plasma di seluruh masa lensa didapatkan MIP, sedangkan di sel epitel tidak didapatkan, maka dari itu MIP berhubungan dengan diferensiasi sel menjadi serat lensa. Seiring dengan meningkatnya usia, protein lensa menjadi tidak larut air dan beragregasi membentuk partikel dengan ukuran lebih besar yang mengaburkan cahaya. Akibatnya lensa menjadi tidak tembus cahaya. Selain itu, seiring dengan bertambahnya usia, maka makin banyak protein yang larut urea menjadi tidak larut urea (AAO, 2011).

2. 1.4 Metabolisme Lensa

Tujuan utama dari metabolisme lensa adalah mempertahankan ketransparanan lensa. Lensa mendapatkan energi terutama melalui metabolisme glukosa anaerobik. Komponen penting lain yang dibutuhkan lensa adalah bentuk NADPH tereduksi yang didapatkan melalui jalur pentosa yang berfungsi sebagai agen pereduksi dalam biosintesis asam lemak dan glutati6n (Berthoud & Bayer, 2009). Metabolisme berbagai zat di lensa adalah sebagai berikut:

1. Metabolisme gula

Glukosa memasuki lensa dari humor akuos melalui difusi sederhana dan difusi yang difasilitasi. Kira-kira 90-95% glukosa yang masuk ke lensa akan difosforilasi oleh enzim hexokinase menjadi glukosa-6-fosfat. Hexokinase akan tersaturasi oleh kadar glukosa normal pada lensa sehingga apabila kadar glukosa normal telah dicapai, maka akan reaksi ini akan terhenti. Glukosa-6-fosfat yang terbentuk ini akan digunakan di jalur glikolisis anaerob dan jalur pentosa fosfat (Goyal *et al.*, 2010).

Lensa tidak dilalui pembuluh darah sehingga kadar oksigen lensa sangat rendah. Oleh karena itu, metabolisme utamanya berlangsung secara anaerob yaitu glikolisis anaerob. Sebesar 70% ATP lensa dihasilkan melalui glikolisis anaerob. Walaupun kira-kira hanya 3% dari glukosa masuk ke siklus Krebs, tetapi siklus ini menghasilkan 25% dari seluruh ATP yang dibentuk di lensa (Varma *et al.*, 2010).

Jalur lain yang memetabolisme glukosa-6-fosfat adalah jalur pentosa fosfat. Kira-kira 5% dari seluruh glukosa lensa dimetabolisme oleh jalur ini dan dapat distimulasi oleh peningkatan kadar glukosa. Aktivitas jalur pentosa

fosfat di lensa lebih tinggi dibandingkan di jaringan lain untuk menghasilkan banyak NADPH yang berfungsi untuk mereduksi glutation. Jalur lain yang berperan dalam metabolisme glukosa di lensa adalah jalur sorbitol. Ketika kadar glukosa meningkat, seperti pada keadaan hiperglikemik, jalur sorbitol akan lebih aktif dari pada jalur glikolisis sehingga sorbitol akan terakumulasi. Glukosa akan diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim yang berada dipermukaan epitel yaitu aldose reduktase. Lalu sorbitol akan dimetabolisme menjadi fruktosa oleh enzim poliol dehidrogenase. Enzim ini memiliki afinitas yang rendah, artinya sorbitol akan terakumulasi sebelum dapat dimetabolisme, sehingga menyebabkan retensi sorbitol di lensa. Selanjutnya sorbitol dan fruktosa menyebabkan tekanan osmotik meningkat dan akan menarik air sehingga lensa akan menggebung, sitoskeletal mengalami kerusakan, dan lensa menjadi keruh (Goyal *et al.*, 2010).

2. Metabolisme protein

Konsentrasi protein lensa adalah konsentrasi protein yang tertinggi dari seluruh jaringan tubuh. Sintesa protein lensa berlangsung seumur hidup. Sintesis protein utama adalah protein kristalin dan *Major Intrinsic Protein* (MIP). Sintesa protein hanya berlangsung di sel epitel dan di permukaan serabut kortikal.

Lensa protein dapat stabil dalam waktu yang panjang karena kebanyakan enzim pendegradasi protein dalam keadaan normal dapat diinhibisi. Lensa dapat mengontrol degradasi protein dengan menandai protein yang akan didegradasi dengan ubiquitin. Proses ini berlangsung di lapisan epitelial dan membutuhkan ATP. Lensa protein dirombak menjadi peptida oleh endopeptidase lalu dirombak lagi menjadi asam amino oleh eksopeptidase. Endopeptidase diaktivasi oleh magnesium dan kalsium dan bekerja optimal pada pH 7,5. Substrat utama enzim

ini adalah kristalin alpha. Contoh endopeptidase adalah calpain. Calpain dapat diinhibisi oleh calpastatin. Calpastatin adalah merupakan inhibitor netral yang konsentrasinya lebih tinggi daripada calpain (AAO., 2011).

3. Glutation

Glutation (L- γ -glutamil-L-sisteinglisin) dijumpai dalam konsentrasi yang besar di lensa, terutama di lapisan epithelial. Fungsi glutacion adalah mempertahankan ketransparanan lensa dengan cara mencegah agregasi kristalin dan melindungi dari kerusakan oksidatif (Akharaiyi *et al.*, 2012). Glutation memiliki waktu paruh 1-2 hari dan didaur ulang pada siklus γ -glutamil. Sintesis dan degradasi glutacion berlangsung dalam kecepatan yang sama. Glutation disintesis dari L-glutamat, L-sistein, dan glisin dalam dua tahap yang membutuhkan 11-12% ATP lensa. Glutation tereduksi juga didapatkan dari aqueous humor melalui transporter khusus. Pemecahan glutacion mengeluarkan asam amino yang akan didaur ulang untuk pembentukan glutacion selanjutnya (Varma & Kevin 2010).

4. Mekanisme antioksidan

Lensa dapat mengalami kerusakan akibat radikal bebas seperti spesies oksigen reaktif. Spesies oksigen reaktif adalah sebutan untuk sekelompok radikal oksigen yang sangat reaktif, merusak lipid, protein, karbohidrat dan asam nukleat. Contoh-contoh radikal oksigen adalah anion superoksida (O_2^-), radikal bebas hidroksil (OH^\cdot), radikal peroksil (ROO^\cdot), radikal lipid peroksil (LOOH), oksigen tunggal (O_2), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Wang *et al.*, 2013).

Mekanisme kerusakan yang diakibatkan oleh spesies oksigen reaktif adalah peroksidasi lipid membran membentuk malondialdehid, yang akan membentuk ikatan silang antara protein dan lipid membran sehingga sel menjadi rusak. Polimerisasi dan ikatan silang protein tersebut menyebabkan agregasi kristalin dan inaktivasi enzim-enzim yang berperan dalam mekanisme antioksidan seperti katalase dan glutathion reduktase (Zorab *et al.*, 2010).

Lensa memiliki beberapa enzim yang berfungsi untuk melindungi dari radikal bebas seperti glutathion peroksidase, katalase dan superoksida dismutase. Mekanisme antioksidan pada lensa adalah dengan cara dismutasi radikal bebas superoksida menjadi hidrogen peroksida dengan bantuan enzim superoksida dismutase. Lalu hidrogen peroksida tersebut akan diubah menjadi molekul air dan oksigen melalui bantuan enzim katalase. Selain itu, glutathion tereduksi dapat mendonorkan gugus hidrogennya pada hidrogen peroksida sehingga berubah menjadi molekul air dengan bantuan enzim glutathion peroksidase. Glutathion tereduksi yang telah memberikan gugus hidrogennya akan membentuk glutathion teroksidasi yang tidak aktif, tetapi NADPH yang berasal dari jalur pentosa akan mengubahnya kembali menjadi glutathion tereduksi dengan bantuan enzim glutathion reduktase (Galichanin *et al.*, 2010; AAO., 2011).

5. Mekanisme pengaturan keseimbangan cairan dan elektrolit

Aspek fisiologi yang terpenting dalam menjaga ketransparanan adalah pengaturan keseimbangan cairan dan elektrolit. Ketranparanan lensa sangat bergantung pada komponen struktural dan makromolekular. Selain itu, hidrasi lensa dapat menyebabkan kekeruhan lensa.

Lensa mempunyai kadar kalium dan asam amino yang tinggi dibandingkan aqueous dan vitreus dan memiliki kadar natrium dan klorida yang lebih rendah dibandingkan sekitarnya. Keseimbangan elektrolit diatur oleh permeabilitas membran dan pompa natrium dan kalium (Na-K-ATPase). Pompa ini berfungsi memompa natrium keluar dan memompa kalium untuk masuk (Lan Li *et al.*, 2016).

Kombinasi transport aktif dan permeabilitas membran di lensa di sebut teori pompa bocor. Kalium dan asam amino ditransportasikan ke dalam lensa secara aktif ke anterior lensa melalui epithelium. Lalu kalium dan asam amino akan berdifusi melalui bagian posterior lensa. Sedangkan natrium masuk ke dalam lensa di bagian posterior lensa secara difusi dan keluar melalui bagian anterior lensa secara aktif (Goyal *et al.*, 2010).

2. 2 Katarak

2. 2.1 Definisi Katarak

Katarak adalah keadaan dimana lensa mata yang biasanya jernih dan bening menjadi keruh. Bila lensa mata kehilangan sifat beningnya atau kejernihannya maka penglihatan akan menjadi berkabut atau tidak dapat melihat sama sekali (Martin *et al.*, 2015).

2. 2. 2 Epidemiologi

Data WHO menyebutkan 314 juta orang diseluruh dunia mengalami gangguan penglihatan dan 45 juta di antaranya mengalami kebutaan, yang lebih dari 90% kasusnya berada di negara berkembang (Thiagrajan *et al.*, 2013). Berdasarkan hasil Survey Kesehatan Indera di Indonesia periode 1993–1996,

sebesar 1,5% penduduk Indonesia mengalami kebutaan. Sedangkan untuk daerah NTB didapatkan prevalensi kebutaan sekitar 1,2% (Khairallah *et al.*, 2016). Penyebab utama kebutaan adalah katarak (52%), glaukoma (13,4%), kelainan refraksi (9,5%), gangguan retina (8,5%), kelainan kornea (8,4%) dan penyakit mata lain (Dewi *et al.*, 2010; Madany., 2016).

Prevalensi Katarak Indonesia sesuai yang dilaporkan oleh Survei Kesehatan Rumah Tangga-Survei Kesehatan Nasional (SKRT-SURKESNAS) tahun 2001 adalah 4,99% dimana di daerah pedesaan 6,29% lebih tinggi jika dibandingkan daerah perkotaan sebesar 4,5%. Survei kesehatan indera penglihatan di Indonesia tahun 1993-1996 menunjukkan angka kebutaan 1,47%. Penyebab utama kebutaan adalah katarak (0,78%), glaucoma (0,16%), kelainan refraksi (0,14%), kelainan retina 0,09%, dan kelainan kornea 0,06%. Besarnya Jumlah penderita katarak di Indonesia saat ini berbanding lurus dengan jumlah usia lanjut, yang pada tahun 2000 diperkirakan sebesar 15,3 juta. Di Indonesia diperkirakan setiap menit ada satu orang buta. Sebagian besar orang buta di Indonesia berada di daerah miskin dengan kondisi sosial ekonomi lemah (Tana *et al.*, 2009)

Prevalensi katarak di Indonesia dalam Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 adalah sebesar 1.8%, tertinggi di Provinsi Sulawesi Utara (3.7%) dan terendah di DKI Jakarta (0.9%). Sedangkan prevalensi katarak di Sumatera Utara sebesar 1.4% (KEMENKES 2013).

Menurut *World Health Organization (WHO)* katarak merupakan penyebab utama kebutaan dan gangguan tajam penglihatan di dunia. Tahun 2002 WHO memperkirakan sekitar 17 juta (47.8%)

The Beaver Dam Eye Study, melaporkan 38.8% pada laki-laki, dan 45.9% pada wanita dengan usia lebih dari 74 tahun. Menurut *Baltimore eye survey* katarak pada ras kaukasian (AAO; 2011).

2. 2. 3 Tipe Katarak

Katarak dapat dikelompokkan berdasarkan lokasinya didalam lensa (kortikal, nuklear, subkapsular), kenampakkannya (total dan pulverulen), sedangkan kombinasi yang paling sering terjadi adalah nuklear pulverulen (Berthoud & Beyer, 2009).

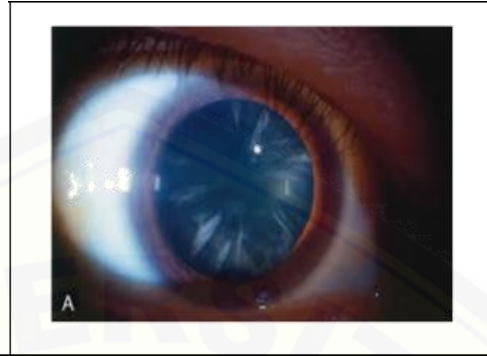
Berdasarkan lokasi katarak dibagi menjadi :

1. Katarak kortikalis

Pada awal pembentukan katarak kortikalis, terjadi perubahan komposisi ion pada korteks lensa sehingga menyebabkan perubahan hidrasi. Perubahan hidrasi ini akan menghasilkan celah dengan pola radiasi di sekitar daerah ekuator dan lama kelamaan akan timbul kekeruhan di kortek lensa. Pengaruhnya pada fungsi penglihatan tergantung pada kedekatan opasitas dengan aksis visual. Gejala awalnya biasanya adalah penderita merasa silau saat mencoba memfokuskan pandangan pada suatu sumber cahaya di malam hari. Selain itu diploopia monokular juga dapat dikeluhkan penderita (AAO, 2011).

Pemeriksaan menggunakan biomikroskop slitlamp akan mendapatkan gambaran vakuola dan seperti celah air disebabkan degenerasi serabut lensa, serta pemisahan lamela korteks anterior atau posterior oleh air. Gambaran *Cortical-spokes* seperti baji terlihat di perifer lensa dengan ujungnya mengarah ke

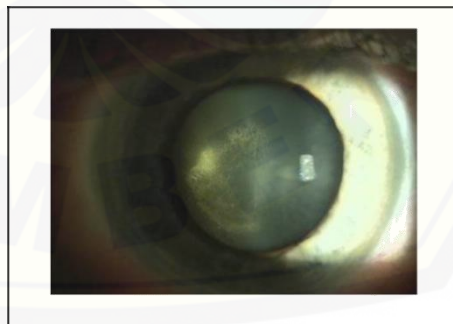
sentral, kekeruhan ini tampak gelap apabila dilihat menggunakan retroiluminasi (AAO, 2011).



Gambar 2. Katarak Kortikal (Dikutip dari jurnal Cataract:Clinical Types Vol 1 Chapter 73)

1. Katarak nuklearis

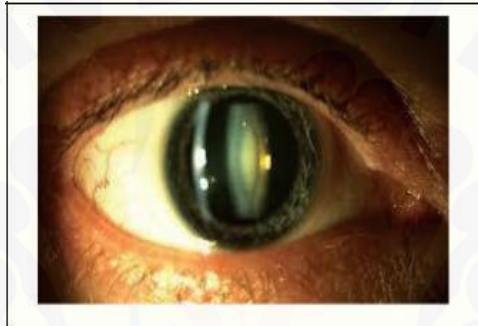
Jenis katarak ini biasanya berkembang lambat dan terjadi bilateral, meskipun bisa asimetris. Gejala yang paling menonjol dari katarak jenis ini adalah kabur melihat jauh daripada melihat dekat. Katarak jenis ini sedikit berwarna kekuningan dan menyebabkan kekeruhan di sentral (AAO, 2011)



Gambar 3. Katarak nuklearis (Dikutip dari jurnal Cataract:Clinical Types of 1 Chapter 73).

2. Katarak subkapsularis posterior

Katarak tipe ini terletak pada lapisan korteks posterior dan biasanya selalu aksial. Pada tahap awal biasanya katarak subkapsularis posterior ini masih terlihat halus pada pemeriksaan slit lamp di lapisan korteks posterior, tetapi pada tahap lebih lanjut terlihat kekeruhan granular dan seperti plak pada korteks subkapsular posterior. Gejala yang timbul dapat berupa silau, diploopia monokular dan lebih kabur melihat dekat dibandingkan melihat jauh (AAO, 2011)



Gambar 4. Katarak Subkapsularis Posterior (Dikutip dari jurnal Cataract: Clinical Types Vol 1 Chapter 73).

2. 2. 4 Klasifikasi Katarak

Katarak berdasarkan derajat kekeruhan lensa menurut *Buratto* :

Derajat 1 : Nukleus lunak. Pada katarak derajat 1 biasanya visus masih lebih baik dari 6/12. Tampak sedikit keruh dengan warna agak keputihan. Refleksi fundus juga masih mudah diperoleh dan usia penderita juga biasanya kurang dari 50 tahun.

Derajat 2 : Nukleus dengan kekerasan ringan. Pada katarak jenis ini tampak nukleus mulais sedikit berwarna kekuningan, visus biasanya antara 6/12-6/30. Refleksi fundus juga masih mudah diperoleh dan katarak jenis ini paling sering memberikan gambaran seperti katarak subkapsularis posterior,

Derajat 3 : Nukleus dengan kekeruhan medium. Katarak ini yang paling sering ditemukan dimana nukleus tampak berwarna kuning disertai dengan kekeruhan korteks yang berwarna keabu-abuan. Visus biasanya antara 3/60-6/30 dan bergantung juga dari usia pasien, semakin tua usia pasien maka semakin keras nukleusnya.

Derajat 4 : Nukleus keras. Pada katarak ini warna nukleus sudah berwarna kuning kecoklatan, dimana usia penderita biasanya lebih dari 65 tahun. Visus biasanya antara 3/60-1/60. Dimana refleksi fundus maupun keadaan fundus sudah sulit dinilai.

Derajat 5 : Nukleus sangat keras. Pada katarak jenis ini nukleus sudah berwarna kecoklatan bahkan agak kehitaman. Visus biasanya hanya 1/60 atau lebih jelek dan usia penderita sudah diatas 65 tahun. Katarak ini sangat keras dan disebut juga brunescant cataract atau black cataract (Pasikova *et al.*, 2015; Bezkorovaina & stebiovsk., 2018).

Katarak berdasarkan morfologi menurut *Lens Opacity Classification System (LOCS) III* :

- Nuklear
- Kortikal
- *Posterior Sub Capsular (PSC)* (Sabanayagam *et al.*, 2011)

Lens Opacity Classification System (LOCS) III adalah sistem perbandingan fotografi yang distandarisasi untuk menilai kondisi katarak. LOCS III digunakan untuk menilai tipe dan derajat katarak pada pemeriksaan slitlamp

Klasifikasi ini mengevaluasi empat kondisi : *nuclear opalescence (NO)*, *nuclear color (NC)*, *cortical cataract (C)*, *posterior subcapsular cataract (P)*. NO adalah cahaya yang tersebar dari regio nuklear dan NC adalah intensitas dari warna kekuningan nukleus lensa. Derajat setiap kondisi diperoleh dengan menempatkan foto lensa pasien pada skala dari 1-6, berdasarkan enam foto standar. C dan P dinilai dalam skala dari 1-5, masing-masing berdasarkan lima foto standar. Penilaian akhir LOCS III berisi 4 nilai, satu untuk setiap NO, NC, C dan P (Pasikova *et al.*, 2015)



Gambar 5. Foto standar LOCS III pada standar color fotografic berukuran 8.5 x 11 inci yang digunakan pada pemeriksaan slitlamp.

Berdasarkan hasil klasifikasi LOCS III, dokter dapat memilih prosedur operasi yang sesuai untuk pasien sehingga resiko komplikasi lebih kecil dan dapat mempersiapkan operasi dengan lebih baik. Pencatatan klasifikasi LOCS III dalam catatan medis pasien dapat memberikan dokumentasi klinis yang lebih baik, menurunkan pengaruh subjektif dari observer yang berbeda, dan

memungkinkan pembuatan rencana preoperatif yang sesuai untuk pasien (Pasikova *et al.*, 2015).

2. 2. 5. Patofisiologi Katarak

Patofisiologi katarak sangat kompleks dan belum sepenuhnya dapat dipahami. Dengan bertambahnya umur, lensa akan mengalami perubahan menjadi lebih berat dan tebal sedangkan kemampuan akomodasinya berkurang. Lapisan kortikal baru akan terus bertambah dalam pola konsentris lensa, sedangkan nukelus sentral mengalami kompresi dan mengeras dalam proses yang disebut sklerosis nuklear (Gupta., 2016).

Beberapa kemungkinan proses yang menyebabkan terjadinya katarak dikelompokkan menjadi berikut:

- a) **Biofisik:** beberapa pertimbangan penting dari segi biofisik adalah sebagai berikut, Saat sinar UV mengenai lensa maka energi foton diserap oleh asam amino dalam lensa, triptofan+ UV menghasilkan 3-HKG (hydroxykynurenine) dan produk lainnya, dan 3-HKG-melekat pada protein dan berubah dari jernih menjadi berwarna coklat (Galichanin *et al.*, 2010).
- b) **Biokimia:** Beberapa pertimbangan biokimia terkait dengan katarak lentikular berhubungan dengan cedera oksidatif potensial seiring dengan penuaan: enzim pertahanan, Glukosa-3-Fosfat dehidrogenase, G-6-PD, Aldolase, Enolase, dan aktivitas phosphokinase menurun dengan usia. Penuaan berhubungan dengan menurunnya konsentrasi antioksidan (misalnya, glutation, askorbat), yang menyebabkan peningkatan kerentanan terhadap kerusakan oksidatif dan peroksidasi lipid (Demir *et*

al., 2015). Penuaan juga berhubungan dengan kelarutan protein menurun dan peningkatan jumlah protein yang tidak larut (denaturasi protein oleh radikal bebas), ikatan disulfida pada protein meningkat, oksidasi protein tiol, dan perubahan dalam permeabilitas membran, yang semuanya dapat menyebabkan dehidrasi osmotik sel lentikular. Efek ini ditunjukkan dengan paparan radiasi (Galichanin *et al.*, 2010; Halliwell & Gutteridge., 2015).

Berikut ini adalah yang sering diamati pada katarak senilis yang khas:

- 1) pembentukan dari kristalin, agregat dengan berat molekul tinggi yang menumpuk dengan penuaan;
 - 2) polipeptida yang terdegradasi
 - 3) perubahan asam amino (misalnya, hilangnya kelompok sulfhidril dan deaminasi glutamin dan asparagin)
- c) **Fisiologis:** perubahan fisiologis khas diamati di lensa dengan penuaan meliputi: hilangnya gap junction protein, hilangnya potensial membrane seluler, peningkatan konsentrasi natrium intraseluler (25 mEqL⁻¹ sampai 40 mEqL⁻¹), perubahan sekunder dalam Na⁺-K⁺-ATPase serta hilangnya γ -isoform ATP-ase seiring dengan usia lanjut (Pollreisz *et al.*, 2010).
- d) **Seluler:** Perubahan sel-sel lentikular tergantung pada mekanisme dan lokasi dari proses katarak. Katarak subkapsular anterior, paling sering dikaitkan dengan paparan sinar UV, terlihat metaplasia lentikular dan sel menjadi berbentuk spindle (seperti myofibroblast) pada pusat epitel lensa. Katarak subkapsular posterior, yang umumnya terkait dengan radiasi pengion dan juga dengan paparan UV, menunjukkan displasia epitel germinal dan migrasi posterior disepanjang garis jahitan. Katarak nuklear paling sering dikaitkan dengan penuaan menunjukkan beberapa

perubahan sel, karena tampaknya cahaya pencar diproduksi oleh protein dengan berat molekul tinggi di sitoplasma (Mazzanti *et al.*, 2009; Renyi *et al.*, 2010).

- e) **Stres retikulum endoplasma:** Lumen retikulum endoplasma sangat teroksidasi, sehingga stres retikulum endoplasma dapat menghasilkan agregat protein yang tidak terlipat, yang mengaktifkan UPR yang mengarah pada peningkatan produksi radikal bebas dalam sel epitel lensa. Radikal bebas menurunkan jumlah glutathione bebas dari seluruh lensa dan menimbulkan lingkungan yang lebih teroksidasi, dimana agregat protein yang tidak terlipat terbentuk dan tumbuh menjadi partikel agregat protein yang besar yang dapat menyebabkan penghamburan cahaya (Palsamy *et al.* 2014).

Beberapa mekanisme berkontribusi terhadap hilangnya secara progresif transparansi dari lensa. Epitel lensa diduga mengalami perubahan yang berkaitan dengan usia, terutama penurunan densitas sel epitel lensa dan diferensiasi menyimpang dari sel serat lensa. Walaupun epitel dari lensa katarak mengalami kematian apoptosis dalam tingkat yang rendah yang tidak menyebabkan penurunan yang signifikan dalam kepadatan sel. Akumulasi kehilangan epitel dalam skala kecil dapat menyebabkan perubahan pembentukan serat lensa dan homeostasis yang selanjutnya dapat menyebabkan hilangnya transparansi lensa (Jamwal *et al.*, 2014). Selanjutnya dengan bertambahnya usia, penurunan tingkat di mana air dan metabolit dengan berat molekul rendah yang larut dalam air dapat masuk ke dalam sel inti lensa melalui epitelium dan korteks terjadi dengan penurunan berikutnya di tingkat transportasi air, nutrisi, dan antioksidan. Akibatnya kerusakan oksidatif progresif lensa yang berhubungan dengan

penuaan terjadi yang selanjutnya mengarah berkembang menjadi katarak senilis (Gullapalil *et al.*, 2011; Martinus *et al.*, 2014).

Berbagai studi menunjukkan peningkatan produk oksidasi misalnya glutathione teroksidasi serta penurunan vitamin antioksidan dan enzim superoxida dismutase mempunyai peran penting dalam proses oksidatif dalam proses kataraktogenesis (Adhikary *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2016). Mekanisme lain yang terlibat adalah konversi larutan dengan berat molekul rendah protein sitoplasma lensa menjadi larutan agregat dengan berat molekul tinggi, fase tidak larut, dan matrix membran protein yang tidak dapat larut. Perubahan protein yang terjadi menyebabkan fluktuasi mendadak dalam indeks bias dari lensa, sinar menghamburkan cahaya, dan mengurangi transparansi. Hal lainnya sedang diselidiki termasuk peran gizi dalam perkembangan katarak, khususnya keterlibatan glukosa, mineral dan vitamin (Kimball J., 2009; Ji *et al.*, 2014). Stres oksidatif merupakan salah satu penyebab utama dari katarak. Terbentuknya ROS merupakan akibat karena degradasi, reaksi silang, serta agregasi dari protein pada lensa yang merupakan faktor penting dalam proses kataraktogenesis (Styskal *et al.*, 2012).

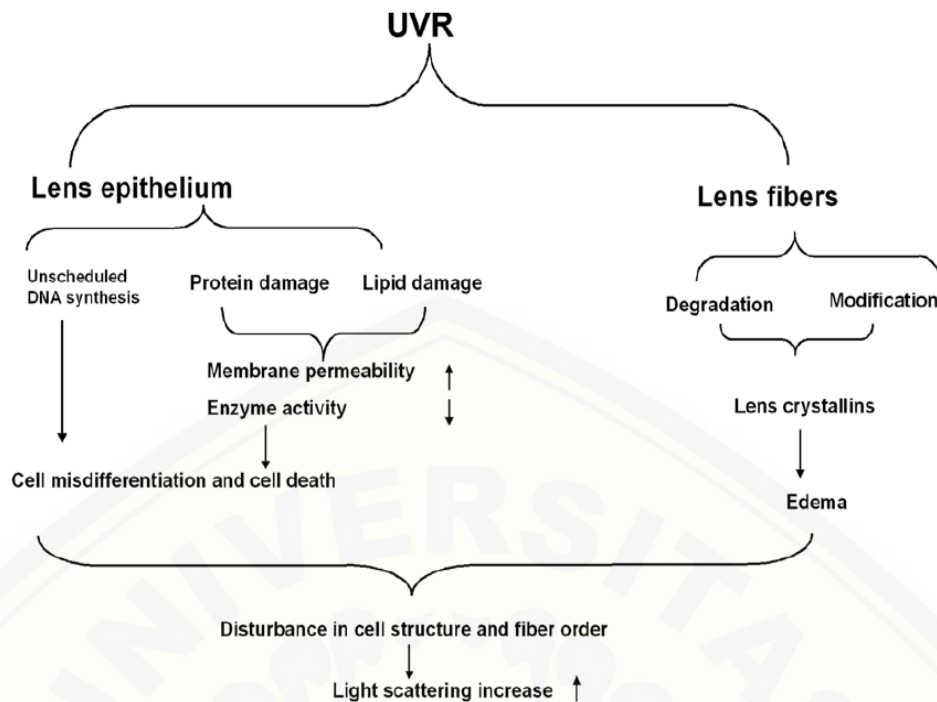
2. 2. 6 Definisi dan Mekanisme Terjadinya Katarak

Katarak adalah keadaan lensa mata yang biasanya jernih menjadi keruh. Bila lensa mata kehilangan kejernihannya maka penglihatan akan menjadi berkabut atau tidak dapat melihat sama sekali (Goyal *et al.*, 2010).

Penyebab katarak sampai saat ini masih belum diketahui secara pasti. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa stres oksidatif memiliki peran yang penting dalam mekanisme terjadinya katarak stres oksidatif dapat disebabkan

oleh Radiasi UV. Radiasi UV diketahui merusak pompa molekul pada membran sel yang menyebabkan masuknya kalsium ke dalam sel epitel lensa. Hal tersebut menyebabkan meningkatnya konsentrasi *sodium* dan menurunnya konsentrasi *potassium*. Radiasi UV juga diketahui menyebabkan inaktivasi dari berbagai enzim metabolik dan merusak struktur lensa. Pada sel serat, sinar UV menyebabkan degradasi dan modifikasi dari kristalin lensa, sedangkan paparan UV pada sel epitel menyebabkan kerusakan sel untuk memrogram (Kimet *al.*, 2011). Radiasi UV menyebabkan kerusakan epitel dan serat lensa (disajikan dalam Gambar 6 (Dong, 2005).

Efek penyaringan berhubungan dengan tingginya konsentrasi asam askorbat yang berperan sebagai antioksidan. Asam askorbat diketahui dapat membersihkan radikal bebas yang terdapat pada aqueous, sehingga dapat melindungi kerusakan DNA yang disebabkan oleh paparan UV pada lensa serta meminimalisasi radiasi UV dengan menyerap dan dengan menekan fluoresens dari radiasi. *Humor Aqueous* pada pasien yang menderita katarak diketahui mempunyai jumlah asam askorbat yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan yang tidak menderita katarak (Shinde *et al.*, 2012).



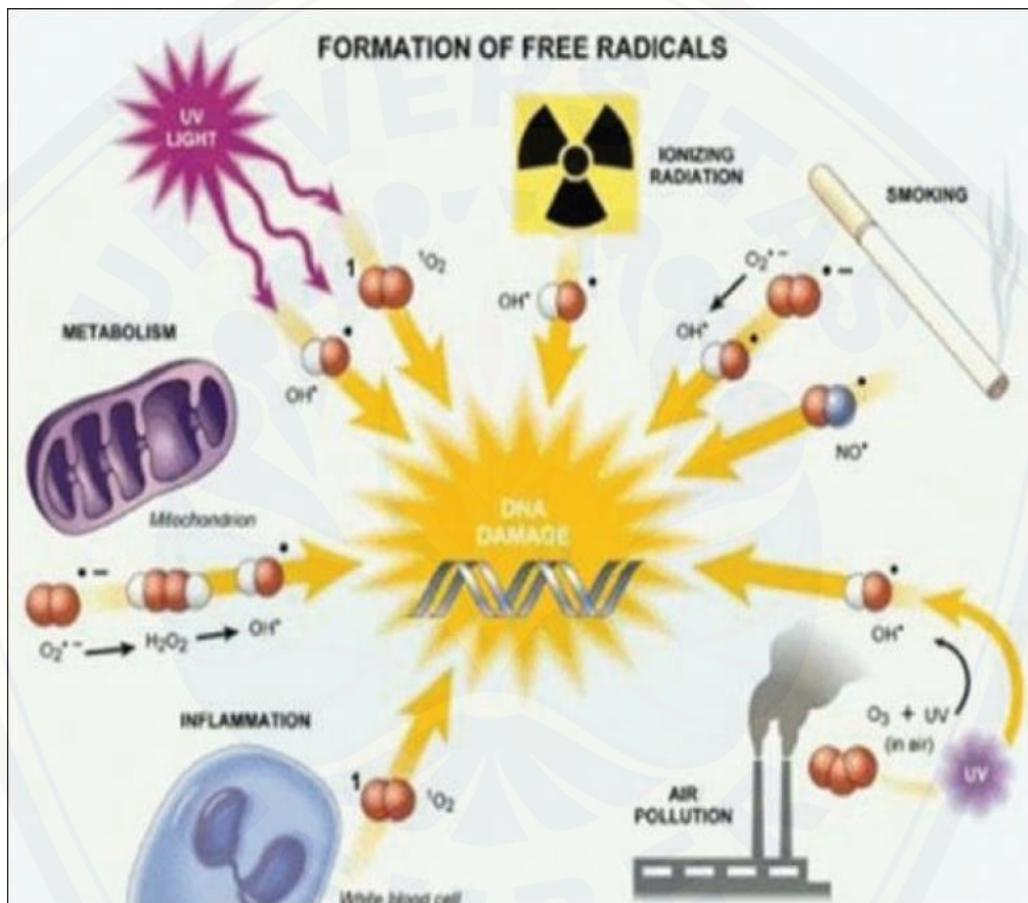
Gambar 6. Mekanisme induksi katarak karena sinar UV. Keterangan.
Keterangan: Pada sel serat, sinar UV menyebabkan degradasi dan modifikasi kristalin lensa, sedangkan paparan UV pada sel epitel menyebabkan kerusakan sel untuk memrogram. Radiasi UV menyebabkan kerusakan epitel dan serat lensa (Dong, 2005).

2. 3. Radikal bebas dan oksidan

Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan apabila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit (Nurhidayah, 2009).

Radikal bebas dihasilkan selama proses fisiologis normal, namun pelepasannya meningkat pada saat iskemia, reperfusi, reaksi inflamasi dan

penyakit degeneratif. Sumber-sumber endogen terbentuknya radikal bebas meliputi sistem NADPH oksidase, reaksi fosforilasi oksidatif, enzim oksidasi dan metabolisme arakhidonat, sedangkan sumber eksogen terbentuknya radikal bebas adalah radiasi ionisasi, merokok, paparan polutan dan sinar ultraviolet. Sumber eksogen ini antara lain polusi udara, ozon, radiasi, bahan kimia, racun, mikroorganisme patogen (Chapple & Matthew, 2007). Gambar 7



Gambar 7. Pembentukan radikal bebas. Keterangan: Radikal bebas dapat berasal dari berbagai macam sumber eksogen atau endogen. Sumber endogen berasal dari sistem NADPH oksidase, reaksi fosforilasi oksidatif, enzim oksidasi dan metabolisme arakhidonat, sedangkan sumber eksogen meliputi radiasi ionisasi, merokok, polusi udara dan sinar ultraviolet (Chapple & Matthew, 2007).

Tingginya kadar antioksidan pada aqueous humor dapat melindungi kristalin lensa terhadap katarak. Kristalin lensa dapat menyerap UV-A (sebanyak 36% UV-A pada panjang gelombang 320 nm dan sebanyak 48% pada 340 nm)

dan hanya tersisa 2% UV-B (pada panjang gelombang 300 nm) yang tidak diserap oleh kornea dan aqueous humor. Kisaran panjang gelombang antara 295 nm dan 320 nm diketahui paling efisien dalam menginduksi katarak (Rafansson, 2005).

Radikal bebas menyebabkan kerusakan jaringan dengan berbagai mekanisme yang berbeda yang meliputi:

1. kerusakan DNA
2. peroksidasi lipid
3. kerusakan protein
4. oksidasi enzim misalnya antiprotease
5. stimulasi sitokin proinflamasi

Radikal bebas sering disamakan dengan oksidan karena memiliki sifat yang mirip dan dapat menyebabkan kerusakan yang sama walaupun prosesnya berbeda. Radikal bebas yang diproduksi di dalam tubuh normal akan dinetralisir oleh antioksidan yang ada di dalam tubuh. Kadar radikal bebas terlalu tinggi maka kemampuan dari antioksidan endogen tidak memadai untuk menetralsir radikal bebas sehingga terjadi keadaan yang tidak seimbang antara radikal bebas dengan antioksidan. Oksidan adalah bahan kimia elektrofil yang sangat reaktif dan dapat memindahkan elektron dari molekul lain dan menghasilkan oksidasi pada molekul tersebut (Halliwell, 2007).

Oksidan dalam ilmu kimia adalah senyawa penerima elektron. Sementara itu, radikal bebas mempunyai dua sifat, yakni memiliki reaktivitas yang tinggi karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal baru. Sifat radikal bebas yang mirip oksidan ialah menarik elektron, sehingga radikal bebas dapat digolongkan kedalam oksidan, tetapi tidak semua oksidan adalah radikal bebas. Saat ini senyawa oksidan tersebut

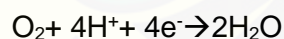
sering di sebut senyawa reaktif (Chandler *et al.*, 2010)

Berdasarkan derajat reaktivitasnya, senyawa reaktif dibedakan atas radikal bebas dan non radikal bebas. Selain itu berdasarkan komponen penyusunnya, senyawa reaktif di bedakan atas Senyawa Oksigen Reaktif (SOR), Senyawa Nitrogen Reaktif (SNR) dan Senyawa Klorin Reaktif (SKR) (Lee *et al.*, 2007).

Senyawa oksigen reaktif merupakan senyawa turunan oksigen yang lebih reaktif dibandingkan dengan oksigen dalam bentuk triplet (diradikal). Senyawa oksigen reaktif dapat bereaksi dengan berbagai biomolekul dan dapat menyebabkan stres oksidatif (Lee *et al.*, 2007).

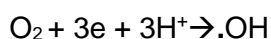
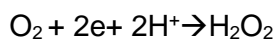
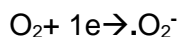
Senyawa reaktif dibentuk secara normal pada proses fosforilasi oksidasi di mitokondria (proses respirasi sel). Sebanyak 98% molekul O₂ direduksi menjadi H₂O dan sisanya mengalami reduksi tidak sempurna menjadi senyawa reaktif. Pada reaksi fosforilasi normal mitokondria, 1 molekul O₂ direduksi oleh 4 ion hidrogen menjadi 2 molekul H₂O

Reaksi:



Proses fosforilasi menjadi tidak sempurna dan terbentuk senyawa reaktif bila jumlah elektron yang mereduksi kurang dari 4. Reduksi 1 elektron molekul O₂ menghasilkan radikal superoksida ($\cdot\text{O}_2$), reduksi 2 elektron menghasilkan hidrogen peroksida H₂O₂ dan reduksi 3 elektron menghasilkan radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$).

Reaksi:



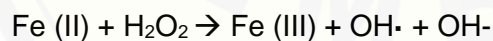
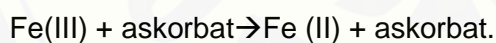
Selain berasal dari rantai respirasi di mitokondria, senyawa reaktif ini juga dihasilkan oleh proses fagositosis dan berbagai sumber dari luar tubuh. Apabila senyawa reaktif telah terbentuk maka akan terjadi metabolisme di dalam tubuh yang melibatkan enzim antioksidan. Pertahanan seluler pertama terhadap senyawa oksigen reaktif melalui aktivasi superoksida dismutase (E.C.1.15.1.1, CuZnSOD) yang akan memproduksi hidrogen peroksida (H_2O_2). Selanjutnya H_2O_2 akan dimetabolisme oleh glutathion peroxidase (E.C.1.11.1.9, glutathion peroxidase) dan catalase (E.C.1.11.1.6, catalase). Pada berbagai kondisi, terjadi ketidakseimbangan antara produksi senyawa oksigen reaktif dan pertahanan antioksidan sehingga memicu destruksi dan disfungsi seluler (Lee *et al.*, 2007).

Radikal superoksida adalah produk dari reduksi satu elektron kepada molekul oksigen melalui katalisis enzimatik atau melalui penarikan elektron pada berbagai reaksi transfer elektron. Kimia radikal superoksida pada larutan non organik sangat berbeda dibandingkan pada pelarut organik. Radikal superoksida di dalam pelarut organik mempunyai umur pendek. Instabilitas ini berdasarkan dismutasi cepat radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida, sebagai reaksi yang difasilitasi melalui tingginya konsentrasi bentuk radikal superoksida terprotonasi pada kondisi yang lebih asam. Kecepatan reaksi dismutasi pada pH 7,0 adalah $5 \times 10^5 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Superoksida dismutase mempercepat reaksi dismutasi sebesar empat kali lipat (kecepatan reaksi: $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

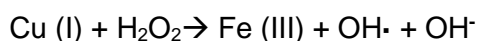
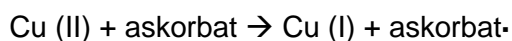
Superoksidasi dismutase mempercepat reaksi dismutasi sebesar empat kali lipat (kecepatan reaksi: $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$). Hal ini mengimplikasikan bahwa reaksi radikal superoksida pada larutan nonorganik akan berkompetisi dengan SOD (Shinde *et al*, 2012).

Hidrogen peroksida adalah senyawa turunan oksigen yang bersifat oksidan kuat, dan bereaksi lambat dengan substrat organik. Senyawa ini dianggap toksik pada kadar tinggi (antara 10-100 μM). Hidrogen peroksida dapat terbentuk melalui dismutasi spontan terhadap radikal superoksida atau terbentuk secara langsung melalui reduksi dua elektron kepada molekul oksigen. Meskipun bukan radikal bebas, akumulasi senyawa ini dapat berbahaya bila terdapat bersama-sama dengan logam (Fe dan Cu). Senyawa H_2O_2 dapat menginaktivasi beberapa enzim secara langsung, yaitu dengan cara mengoksidasi gugus thiol (-SH) yang terdapat pada active site enzim. H_2O_2 dapat menembus masuk ke dalam membran sel dan mungkin bereaksi dengan Fe ataupun Cu untuk membentuk radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) melalui reaksi fenton atau Harber-Weiss (Kadiiska *et al.*, 2005; Chapple & Matthews, 2007).

Reaksi Fenton:



Reaksi Harber-Weiss



Hidrogen peroksida berperan penting dalam sinyal seluler. Hidrogen peroksida sifatnya relatif stabil dan tidak bermuatan sehingga mampu untuk berdifusi dari sel yang satu ke sel yang lain. Sejumlah target intraseluler dari hidrogen peroksida meliputi famili MAPK, cell survival kinase Akt, ras/rac, c-src, PKC dan tirosin fosfatase (Halliwell, 2007).

2.4 Antioksidan

Efek radikal bebas dalam tubuh akan dinetralisir oleh antioksidan yang dibentuk oleh tubuh sendiri dan suplemen dari luar melalui makanan, minuman atau obat-obatan, seperti karotenoid, vitamin C, E, dan lain-lain. Antioksidan adalah senyawa yang melindungi sel melawan radikal bebas, seperti *oksigen singlet*, superoksida, radikal peroksil, radikal hidroksil dan peroxynitrite. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Ketidakseimbangan antara antioksidan dan hasil spesies oksigen reaktif dalam stres oksidatif menyebabkan kerusakan sel (Wang *et al.*, 2007).

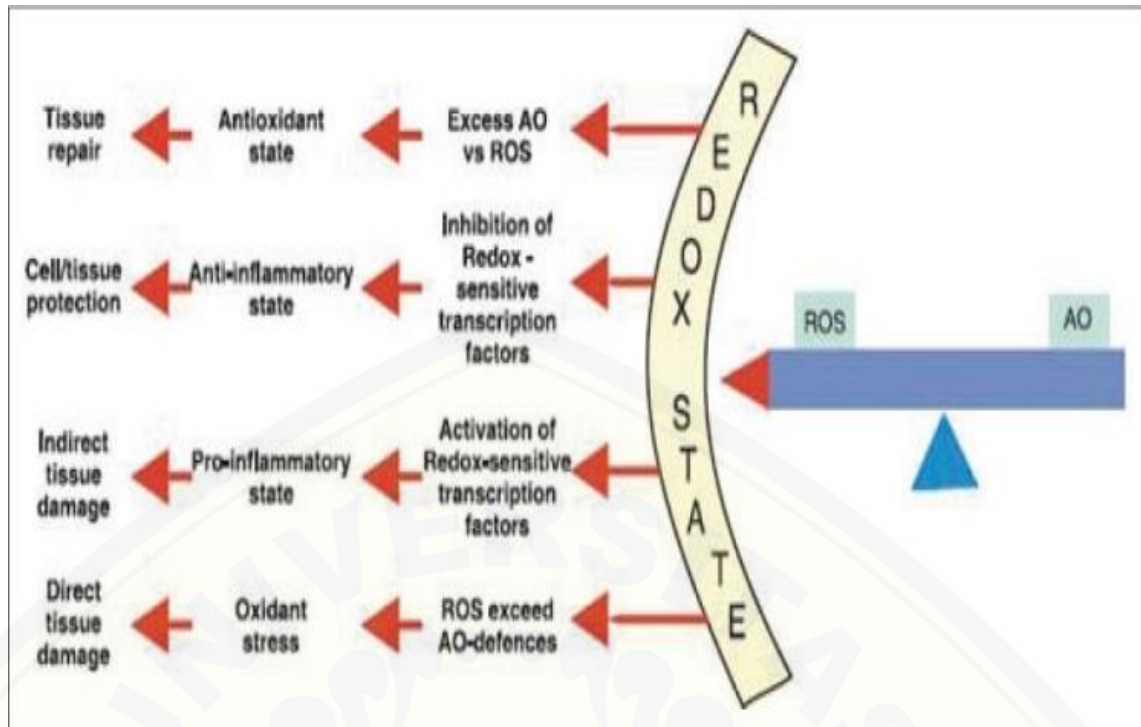
Fungsi sistem antioksidasi dan tubuh dalam melindungi jaringan terhadap efek negatif radikal bebas dapat dikelompokkan menjadi 5 macam yaitu :

- 1) Antioksidan primer berfungsi mencegah terbentuknya radikal bebas baru, yaitu enzim super oksidodismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPX), dan katalase,
- 2) Antioksidan sekunder berfungsi menangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai, yaitu vitamin C, vitamin E, dan beta karoten,
- 3) antioksidan tersier berfungsi memperbaiki sel-sel dan jaringan yang

rusak karena serangan radikal bebas, yaitu jenis enzim misalnya metionin sulfosida reduktase,

- 4) *oxygen scavenger* berfungsi mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi, misalnya
- 5) vitamin C, *Chelators* atau *sequestrants* bersifat mengikat logam yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi misalnya asam sitrat dan asam amino (Purboyo, 2009).

Beberapa fungsi antioksidan antara lain; vitamin E dapat mengatasi *oksigen singlet*, superoksida dan radikal bebas peroksil; vitamin A mampu mengatasi singlet oksigen; beta-karoten mampu mengatasi superoksida, peroksil dan singlet oksigen, vitamin C mengatasi radikal peroksil, superoksida dismutase terhadap radikal superoksida, katalase terhadap H_2O_2 dan glutathion peroksidase mengatasi H_2O_2 dan LOOH (lipidhydroperoxide). Kemampuan betakaroten untuk menginaktifkan radikal bebas bukan karena dapat berubah menjadi provitamin A, tetapi karena adanya ikatan rangkap yang banyak pada struktur molekul menangkap radikal peroksildi dalam jaringan pada tekanan parsial oksigen yang rendah (Shinde *et al.*, 2012).



Gambar 8. Efek biologis dari pergeseran keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan. Keterangan: Sistem pertahanan antioksidan sangat dinamis dan responsif terhadap setiap gangguan yang terjadi dalam keseimbangan redoks tubuh. Antioksidan bisa sampai diatur dan menetralkan radikal bebas, formasi yang bisa terjadi karena stres oksidatif. Potensi redoks adalah ukuran afinitas zat untuk elektron. Perubahan kecil dalam keadaan redoks. Peristiwa transkripsi gen pemicu yang menyebabkan kerusakan jaringan sekunder terhadap induksi proinflamasi. Pergeseran ke atas lebih besar ratio oksidan/antioksidan mengakibatkan kerusakan langsung biomolekul dan struktur (Pendyala *et al.*, 2008).

Efek biologis dari pergeseran kecil dan besar dalam keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan. Tubuh memiliki sistem pertahanan antioksidan yang canggih untuk mengatasi pembentukan radikal bebas dalam kondisi normal dan dengan demikian mempertahankan keseimbangan redoks. Namun, ketika tidak ada kelebihan pertahanan antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas atau penurunan tingkat antioksidan itu akan menyebabkan ketidakseimbangan dan menyebabkan efek merusak situasi yang dikenal sebagai stres oksidatif (Anggraini, 2011)

2. 5 Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara prooksidan dengan antioksidan, produksi radikal bebas melebihi kemampuan penghambat radikal alamiah atau mekanisme *scavenging* (pembersih). Mekanisme penghambat radikal bebas terdiri dari antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen terdiri dari superoksid dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), katalase, sedangkan antioksidan eksogen terdiri dari vitamin C, betakaroten dan vitamin E (Pendyala *et al.*, 2008).

Stres oksidatif adalah keadaan dengan jumlah radikal bebas didalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkannya. Akibatnya intensitas proses oksidasi sel-sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan menimbulkan kerusakan yang lebih banyak. Transformasi protein yang terjadi akibat stres oksidatif dapat mengakibatkan disfungsi protein, kerusakan jaringan dan berkembangnya berbagai jenis penyakit (Anggraini, 2011).

Efek kerusakan dari stres oksidatif dapat dilihat dari produk hasil peroksidasi lipid, protein dan DNA yang diukur dari sampel plasma darah dan urin. Kadar plasma MDA, kadar isoprostan dalam plasma dan urin, sebagai petanda biologis stress oksidatif yang reliabel. MDA dan 4 hydroxynonenal (HNE) merupakan produk utama hasil oksidasi PUFA dan MDA merupakan salah satu yang paling sering digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid. MDA juga digunakan secara luas sebagai petanda biologik stres oksidatif, sensitif, dan bisa digunakan pada penelitian dalam jumlah besar. MDA merupakan produk peroksidasi lipid yang relatif konstan terhadap proporsi peroksidasi lipid, oleh karena itu merupakan indikator yang tepat untuk mengetahui kecepatan (*rate*) proses peroksidasi lipid *in vivo* (Kadiiska *et al.*, 2005).

Stres oksidatif menyebabkan terjadinya berbagai modifikasi protein seperti seperti oksidasi methionin, oksidasi sistein, dan cross-linking protein melalui asam amino lain daripada sistein. Modifikasi-modifikasi tersebut menyebabkan terbentuknya agregat tidak terlarut dengan berat molekul besar yang banyak ditemukan pada lensa penderita katarak (Kim & Koh *et al.*,2011).

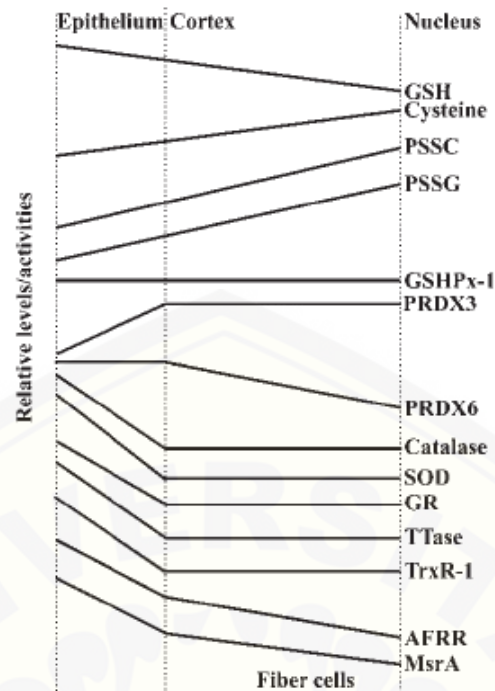
Perbaikan protein lensa setelah kerusakan karena stres oksidatif diperantarai oleh GSH-dependent thioltransferase, NADPH-dependent thioredoxin/thioredoxin reductase system, dan metionin sulfoksida reduktase. GSH-dependent thioltransferase mengkatalisis detiolasi dari campuran disulfida protein-thiol. Thioredoksin mereduksi ikatan disulfida antar protein dalam reaksi yang mengarahkan terjadinya oksidasi thioredoksin. Thioredoksin yang telah teroksidasi direduksi oleh thioredoksin reduktase yang merupakan enzim yang menggunakan NADPH sebagai kofaktor (Truscott, 2005). Metionin sulfoksida reduktase mengkonversi metionin yang teroksidasi (metionin sulfoksida) kembali menjadi metionin dalam reaksi yang melibatkan thioredoksin reduktase, sistem thioredoksin, dan NADPH. Ekspresi cystathionine- β -synthase diketahui ditemukan juga pada lensa mata. Enzim ini membatasi jalur persinyalan transulfurasi yang berkontribusi terhadap produksi sistein dan glutation. Enzim ini bekerja secara bersamaan untuk melindungi lensa dari stres oksidatif. Kerusakan pada DNA baik disebabkan radikal bebas maupun peroksinitrit mengakibatkan terbentuknya *single strand break DNA* dan struktur ini akan mengaktifasi ADP Ribus Polimerase (PARP). Aktifasi PARP mengakibatkan berkurangnya adenin nukleotida yang akan menghambat fungsi mitokondria, sehingga terjadi penurunan ATP sel dan mengakibatkan kematian sel. PARP juga dapat mengaktifasi *apoptotic inducing factor* (AIF) di mitokondria. Mekanisme ini juga

didukung dengan berkurangnya infark pada otak tikus yang diterapi dengan PARP inhibitor (Yan *et al.*, 2007)

2. 6. Sistem Redoks Lensa

Level GSH pada lensa manusia menurun dari region kortikal menuju nukleus, sedangkan level sistein meningkat dari region kortikal menuju nukleus. Dikarenakan nukleus dan organel lain sel hilang selama diferensiasi, sel epitel dan sel serat mempunyai sistem redoks paling banyak pada lensa. Berbagai komponen dari sistem redoks (SOD, katalase, GSSG reduktase, NADPH oksidase, peroksiredoksin 6, thioltransferase, thioredoksin reduktase, *ascorbate free radical reductase*, metionin sulfoksida reduktase) mempunyai aktivitas dan jumlah yang lebih tinggi pada sel epitel dibandingkan dengan sel pada bagian lain dari lensa (Kubo *et al.*, 2006). Dua enzim yang tidak mengikuti pola ini adalah GSHPx-1 dengan aktivitasnya sama antara sel banyak dalam sel serat dibandingkan dalam sel epitel (disajikan dalam gambar 2.4) (Lee *et al.*, 2007).

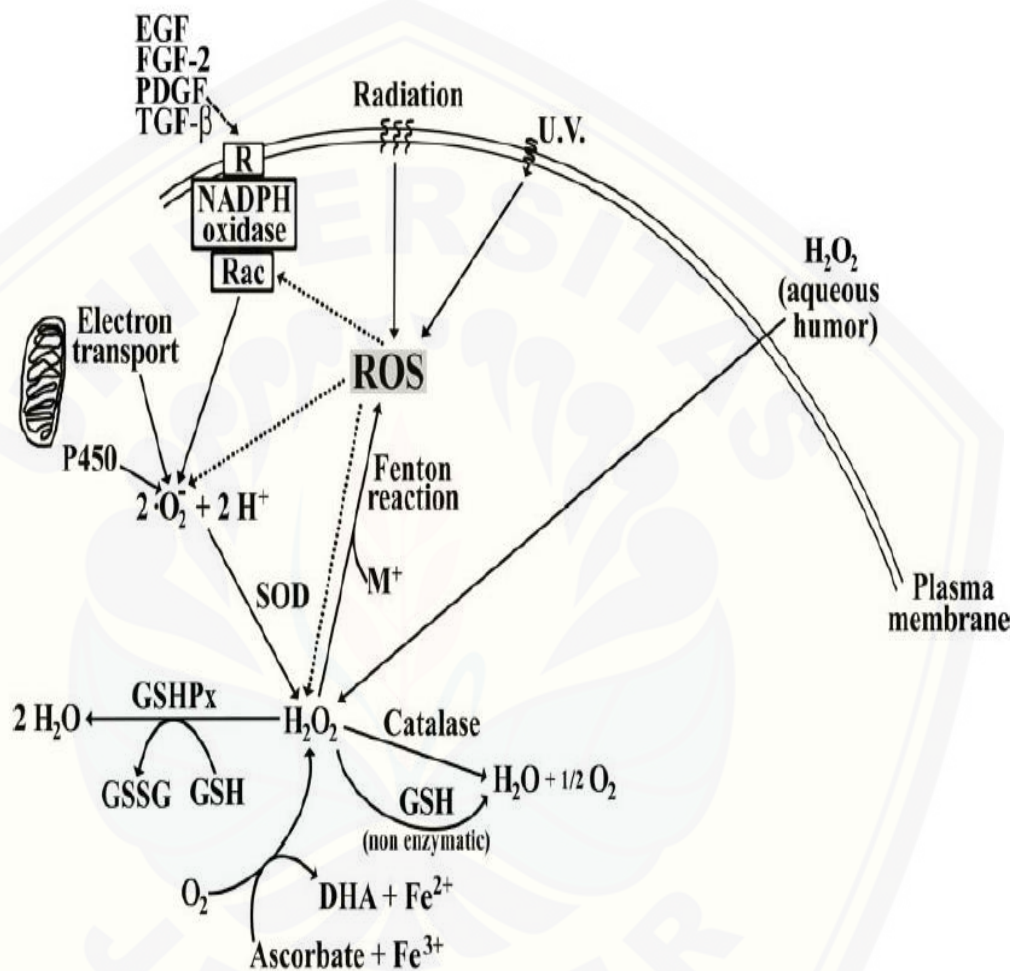
Anion superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), hidroksil ($\bullet\text{OH}$) dan H_2O_2 adalah ROS (reaktif oksigen spesies) yang diduga berkontribusi terhadap pembentukan katarak. OH adalah radikal bebas yang paling reaktif sedangkan H_2O_2 mempunyai ukuran yang kecil dan muatan yang netral sehingga dapat melewati membran plasma. Konsentrasi normal H_2O_2 dalam aqueous humor dan lensa adalah 25-30 μM . Jumlah Konsentrasi H_2O_2 meningkat sebanyak 3 kali lipat pada lensa pasien yang mengalami katarak (Pendyala *et al.*, 2008).



Gambar 9. Distribusi komponen sistem redoks di dalam lensa. Keterangan: Representasi grafis ini merangkum data dari banyak penelitian mengenai tingkat relatif/kegiatan dari molekul yang berbeda/enzim di daerah yang berbeda dari lensa. Tingkat/kegiatan sebagian besar komponen dari sistem redoks yang lebih tinggi pada epitel. AFRR, tergantung NADH askorbat reduktase radikal bebas; GR, GSSG reduktase; GSH, glutathion tereduksi; GSHPx-1, tergantung glutathione peroxidase-1; MSRA, metionin sulfoksida reduktase A; PRDX3, peroxiredoxin 3; PRDX6, peroxiredoxin 6; PSSC, protein terikat sistein; PSSG, glutathionated protein; SOD, dismutase superoksida; TrxR-1, thioredoxin reduktase 1; TTase, thioltransferase (Berthoud & Beyer, 2009).

ROS dapat berasal dari berbagai organel sel (seperti mitokondria, peroksisom, dan sitoplasma) sebagai hasil dari metabolisme sel melalui aktivitas enzim lipooksigenase, NADPH oksidase, sitokrom P450, dan transport elektron mitokondria sebagai respon terhadap sinyal parakrin. ROS juga bisa berasal dari faktor eksogen seperti radiasi UV, radiasi ion, juga berasal dari interaksi antara metal dengan H_2O_2 melalui reaksi fenton, khususnya pada lensa katarak yang mempunyai konsentrasi redox-active besi dalam jumlah tinggi. Transport elektron dan aktivitas sitokrom P450 dapat menyebabkan terbentuknya $\bullet O_2^-$. Komplek

NADPH oksidase dengan partisipasi dari Rac GTPase dan asosiasinya dengan reseptor membran plasma yang teraktivasi karena adanya sinyal ekstraseluler juga dapat menyebabkan terbentuknya $\bullet\text{O}_2^-$ (Berthoud & Beyer, 2009) (Disajikan di Gambar 10).



Gambar 10. Pembentukan ROS pada lensa. Keterangan: Transpor elektron normal dan aktivitas sitokrom P450 (P450) menghasilkan O_2^- . Kompleks oksidase NADPH dan Rac GTPases berhubungan dengan aktivasi reseptor membran plasma (R) karena sinyal ekstraseluler (misalnya, faktor pertumbuhan), juga dapat menghasilkan O_2^- . Reseptor faktor pertumbuhan diaktifkan oleh radiasi UV menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS). H_2O_2 dalam sel dapat diproduksi oleh aktivitas superoksida dismutase (SOD) pada O_2^- atau dapat berasal dari difusi melalui membran plasma dari aqueous humor. H_2O_2 juga dapat dihasilkan oleh askorbat dan molekul oksigen dengan bantuan ion besi. Reaksi H_2O_2 dengan ion logam (M^+) dapat menghasilkan ROS lainnya termasuk OH atau O_2^- melalui reaksi fenton. H_2O_2 dapat terurai secara enzimatis oleh peroksidase GSH-dependent (GSHPx) atau katalase, dan nonenzimatis oleh glutation tereduksi (GSH)(Berthoud & Beyer, 2009).

Reseptor dari faktor pertumbuhan yang diaktivasi oleh radiasi UV juga dapat menyebabkan terbentuknya ROS. H_2O_2 di dalam sel dapat diproduksi melalui aktivitas superoksida dismutase (SOD) pada $\bullet O_2^-$ atau bisa juga berasal dari aqueous humor yang berdifusi melalui membran plasma (Garner *et al.*, 2000). H_2O_2 juga berasal dari askorbat dan oksigen molekuler ketika terdapat ion asam besi. Reaksi H_2O_2 dengan ion metal (M^+) dapat juga menghasilkan ROS jenis lain seperti $\bullet OH$ atau $\bullet O_2^-$ melalui reaksi fenton. H_2O_2 dapat didekomposisi secara enzimatis oleh GSH-dependent peroxidase (GSHPx) atau katalase, atau secara non-enzimatis dengan reduksi level glutathion (GSH) (Berthoud & Beyer, 2009).

Konsentrasi GSH yang sedikit pada awal kelahiran menyebabkan terjadinya kerusakan sel pada sel-sel epitel dan sel serat (Lee *et al.*, 2007). Berkurangnya konsentrasi GSH dapat dicegah melalui terapi dengan ester glutathion. Pembentukan dari ikatan disulfida berkontribusi terhadap pembentukan katarak karena stres oksidatif (Ma'sum & Wibowo., 2013).

Sistem oksidase NADPH diduga berpartisipasi dalam pembentukan ROS di dalam lensa. Berbagai komponen yang berbeda dari kompleks NADPH oksidase (termasuk $p22^{phox}$, $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $gp91^{phox}$, Rac1, dan Rac2) diekspresikan pada lensa (Rao, *et al.*, 2004). Komplek oksidase fagosit aktif dibentuk karena translokasi $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ dan GTPase Rac dari sitosol menuju membran plasma, Komplek ini selanjutnya akan berinteraksi dengan $p22^{phox}$ dan $gp91^{phox}$. Fosforilasi ujung C-terminal dari $p47^{phox}$ oleh protein kinase C (PKC), Akt, dan MAPK akan menghalangi autoinhibisi dari $p47^{phox}$ dan menginduksi aktivasinya (Berthoud & Beyer, 2009).

2. 7. Degradasi ROS

Fungsi lensa yaitu untuk mengirimkan cahaya menuju retina, sehingga lensa secara terus menerus terpapar oleh sinar dan radiasi. Lensa mata merupakan organ yang paling mudah mendapat stres oksidatif yang diproduksi sebagai respon terhadap paparan UV. Lensa mempunyai beberapa mekanisme non-enzimatis maupun enzimatis untuk melindungi dirinya dari stres oksidatif dan untuk memperbaiki komponen sel karena kerusakan oksidatif (Ayala *et al.*, 2007).

Mekanisme non-Enzimatis termasuk tingginya konsentrasi asam askorbat, reduksi GSH, kristalin (yang berfungsi sebagai protein chaperon), dan filter sinar UV (turunan tryptophan) (Berthoud & Beyer, 2009). ROS juga dapat didegradasi melalui aktivitas enzimatis dari SOD, katalase, dan peroksidase (glutation peroksidase, peroksiredoksin, dan mikroperoksidase). SOD mengkatalisis konversi $\bullet\text{O}_2^-$ menjadi H_2O_2 , sedangkan H_2O_2 dapat didegradasi secara enzimatis dengan katalase, yaitu suatu enzim yang secara spesifik menggunakan H_2O_2 sebagai substrat, atau dengan enzim glutation peroksidase (GSHPx-1) yaitu enzim yang mereduksi peroksida dan membutuhkan GSH. Mikroperoksidase yang merupakan derivat enzim heme peptida peroksidase juga dapat meghidrolisis peroksida (Pendyala *et al.*, 2008).

H_2O_2 dapat juga didegradasi secara non-enzimatis dengan reduksi jumlah GSH. Sintesis GSH diperantarai oleh enzim glutamyl cysteine sythetase dan glutathione synthase. Dalam reaksi biokimia yang membutuhkan GSH, GSH dikonversi menjadi bentuk yang teroksidasi yaitu GSSG, selanjutnya GSSG akan dikonversi menjadi bentuknya yang tereduksi oleh perantara GSSG reduktase. GSSG reduktase merupakan enzim yang membutuhkan NADPH sebagai kofaktor (Purboyo, 2009).

2. 8. Sodium Selenite

Sodium selenit menghasilkan radikal bebas superoksida dan hidroksil sebagai berikut:



Radikal bebas superoksida dan hidroksil selanjutnya menyebabkan kerusakan terhadap lipid dan protein membran sel yang tersimpan pada permukaan lensa, menyebabkan kekeruhan pada lensa, penurunan kadar plasma askorbat, karoten, dan peningkatan pembentukan kejadian katarak. Sodium selenite dapat menyebabkan kerusakan pertahanan oksidatif dan merusak membran sel sehingga memicu pembentukan katarak. Oksidasi membran epitel dan pembentukan agregat protein yang tidak larut merupakan awal terjadinya kekeruhan pada lensa. oleh karena itu diperlukan senyawa antioksidan untuk mencegahnya (Varma S *et al.*, 2010; Palsamy *et al.*, 2014).

Katarak selenite adalah model katarak nuklir yang sangat cepat dan nyaman pada tikus *in vivo*. Sodium selenite adalah agen katarakogenik yang umum digunakan dalam penelitian eksperimental sejak 1978. Selenite katarak biasanya dibuat oleh injeksi subkutan tunggal 19-30 μM / kg berat badan natrium selenit (Na_2SeO_3) ke dalam tikus yang berusia 10-14 hari, waktu sebelum selesainya periode pematangan kritis lensa di sekitar Usia 16 hari. Suntikan berulang dari dosis selenite yang lebih kecil atau pemberian oral juga bersifat katarakogenik (Nagao *et al.*, 2009; Maddirala *et al.*, 2017).

Katarak nuklir bilateral yang berat diproduksi dalam waktu 4-6 hari. Tahap prekursor meliputi: katarak subkapsular posterior (hari 1), serabut bengkak (hari 2–3), dan cincin refraksi perinuklear (hari ke 3). Meskipun model telah digunakan secara luas sebagai model untuk katarak nuklir, katarak kortikal transien juga terbentuk 15-30 hari setelah injeksi. Katarak kortikal kemudian menghilang setelah beberapa bulan, tetapi katarak nuklirnya permanen (Miyoshi *et al.*, 2015; Okda *et al.*, 2016).

Setelah satu suntikan natrium selenite pada 30 μM / kg bb, katarak nuklir muncul dengan cepat dalam waktu 3-5 hari dan bersifat permanen, sementara katarak kortikal berkembang 15–30 hari setelah injeksi dan berangsur menghilang dalam beberapa bulan. Katarak kortikal selenit muncul dari kerusakan epitel awal yang mengganggu fibrogenesis normal dan mengganggu kontrol ion normal, menghasilkan masuknya air, kehancuran sel dan opasitas. Hebatnya, katarak kortikal selenit secara spontan sembuh setelah beberapa bulan, memulihkan sel-sel normal pada epitelium dan korteks luar dan tengah (Pescosolido *et al.*, 2016). Mekanisme utama untuk membersihkan mungkin terlibat: (1) penghapusan protein yang rusak dari lensa dengan proteolisis ekstensif; dan (2) penggantian serat dengan memulai kembali fibrogenesis normal. Data tersebut menekankan potensi reparatif luar biasa dari lensa untuk mengembalikan kejelasan setelah kerusakan parah (Varma S *et al.*, 2010; Maddirala *et al.*, 2017).

Sodium selenite memanifestasikan efeknya pada lensa dengan menginduksi stres oksidatif terutama di jaringan lensa. Namun, tindakannya yang tepat masih terbuka untuk diperdebatkan. Pembentukan katarak nuklir yang diinduksi selenite adalah hasil dari hilangnya GSH dari lensa. Setelah itu, kapasitas GSH untuk menyangga status oksidasi/ reduksi metabolisme lensa

berkurang, dan kepekaan lensa tikus terhadap stres oksidatif ditingkatkan. Sebagai konsekuensi dari perawatan selenite, profil metabolik lensa tikus secara dramatis berubah. Antara 24 dan 96 jam setelah injeksi selenit, total pool asam amino bebas (tidak termasuk taurin) meningkat dan tetap meningkat selama 8 hari (Maddirala *et al.*, 2017). Kandungan air dalam lensa tetap stabil selama periode ini, sehingga perubahan konsentrasi asam amino spesifik mencerminkan metabolisme yang diubah pertama kali. Selanjutnya, metabolisme energi di lensa terganggu. Reaksi selenit dengan GSH meningkatkan persyaratan untuk senyawa energi seperti mengurangi nukleotida dinukleotida adenin nicotinamide dan permintaan yang ditingkatkan dipenuhi oleh aktivasi jalur pentosa fosfat dalam lensa, menghasilkan, dakan akumulasi dari tiga metabolit karbon (Beebe *et al.*, 2010; Miyoshi *et al.*, 2015).

Pembentukan katarak nuklir yang diinduksi selenite disebabkan oleh berbagai mekanisme, termasuk hidrolisis yang dipicu calpain dan pengendapan protein lenticular. Calpains adalah keluarga protease sistein non-lisosom dengan pH netral optimal dan kebutuhan kalsium untuk aktivasi (Michhael *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011).

Perubahan yang terdokumentasi dalam metabolisme sel-sel epitel lentikular selama selenit cataractogenesis (biasanya jauh sebelum munculnya opacitates yang terlihat) termasuk penekanan mitosis dan masuknya sel epitel ke profase, fragmentasi nuklir, penurunan tingkat epitel diferensiasi sel, peningkatan kerusakan pada DNA, dan hilangnya homeostasis kalsium. Bahkan, lensa katarak normal dan selenit telah ditemukan berbeda dalam ekspresi 91 gen yang berbeda, dengan perbedaan yang paling jelas dicatat dalam sitokrom c oksidase subunit I (COX-I) dan gen polipeptida penghambatan lambung (ekspresi gen ini).

ditemukan menurun pada lensa selenit katarak) dan pada gen respon-1 respon awal gen-1 (EGR-1) (ekspresi gen ini ditemukan meningkat pada lensa katarak selenite. Menariknya, dua dari tiga gen ini, yaitu EGR-1 dan COX-I, terlibat dalam apoptosis (Green D., 2011; Palsamy *et al.*, 2014).

Apoptosis yang dipercepat (kematian sel terprogram) dapat dianggap sebagai mekanisme tambahan untuk katarak selenite. Sebagai contoh, apoptosis pada sel-sel epitel lensa dapat menyebabkan hilangnya homeostasis lensa, memungkinkan masuknya kalsium ke dalam sel-sel serat yang mendasari. Baru-baru ini apoptosis pada epitel lensa diusulkan sebagai berkontribusi pada katarak yang diinduksi kalsium dan katarak yang diinduksi UVB. Selama perkembangan normal mata, apoptosis diperlukan untuk pemisahan lensa dari epitel kornea masa depan dan untuk menghilangkan tunica vasculosa lentis dan membran pupil anterior (Ji Y *et al.*, 2014; Pescosolido *et al.*, 2016).

Penghapusan sel bermanfaat bagi organisme, tetapi apoptosis dapat dipicu secara prematur, seperti pada neuron yang mengalami kondisi iskemik akibat serangan jantung atau stroke atau selama kematian sel ganglion retina pada glaukoma. Calpain dan protease lainnya, seperti caspases, terlibat dalam kematian sel di jaringan lain, dan enzim ini mungkin juga diaktifkan setelah kerusakan oksidatif pada lensa yang disebabkan oleh selenit. Apoptosis meningkat pada katarak selenit dan bahwa aktivitas m-calpain dan caspase diaktifkan, sehingga apoptosis mungkin merupakan peristiwa yang cukup awal pada katarak selenite (Pollreisz & Schamdt., 2010). Apoptosis dalam sel epitel lensa telah dilaporkan dalam model katarak lainnya. Sel-sel epitel lensa dari pasien katarak manusia menunjukkan tingkat apoptosis yang jauh lebih tinggi daripada kontrol yang sesuai usia. Lensa bergantung pada lapisan epitel sel

untuk mempertahankan homeostasis metabolik. Pada lensa tikus kultur yang mengalami peroksida, apoptosis epitel lensa mendahului pembentukan katarak. Penginduksi serupa pembentukan katarak, seperti radiasi sinar UV juga diketahui menginduksi apoptosis. Ada kemungkinan bahwa beragam jenis katarak dapat dimulai melalui mekanisme umum yang melibatkan apoptosis di epitel lensa (Kimball J, 2009; Kronschlager *et al.*, 2015) .

Dari semua proses biokimia yang disebutkan di atas yang berkontribusi terhadap katarakogenesis, homeostasis ionik tampaknya menjadi faktor pengintegrasikan untuk pemeliharaan transparansi lensa. Hilangnya homeostasis Ca^{2+} telah terlibat dalam kebanyakan jenis katarak. Tingkat Ca^{2+} dipertahankan dalam kisaran sub- μM di sitoplasma oleh membran pompa Ca^{2+} , membran plasma penukar Na^+/Ca^{2+} , dan endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps. Peningkatan penyerapan Ca^{2+} dilakukan sehubungan dengan selenite cataractogenesis, ditemukan menjadi yang tertinggi dalam nukleus. Konsekuensi penting dari peningkatan kalsium pada lensa adalah aktivasi calpains.

Studi pada katarak eksperimental telah menunjukkan proteolisis yang diinduksi calpain β -crystallin sebagai mekanisme utama dalam pematangan lensa serta katarakogenesis. Lp82 adalah isoform dominan calpain pada lensa hewan pengerat, menunjukkan bahwa itu mungkin bertanggung jawab untuk proteolisis yang dikaitkan dengan calpains di katarak eksperimental. Perubahan pada protein membran, integritas lipid, dan peningkatan permeabilitas selaput membran dari sel serat lensa telah dilaporkan dalam berbagai kondisi patologis. Dengan demikian, stres oksidatif yang diinduksi selenit dan hilangnya homeostasis Ca^{2+} bertanggung jawab untuk aktivasi calpains lensa, yang

menghasilkan pengendapan proteolitik dan agregasi protein terlarut ke protein yang tidak larut (Zorab *et al.*, 2010; Madirrala *et al.*, 2017).

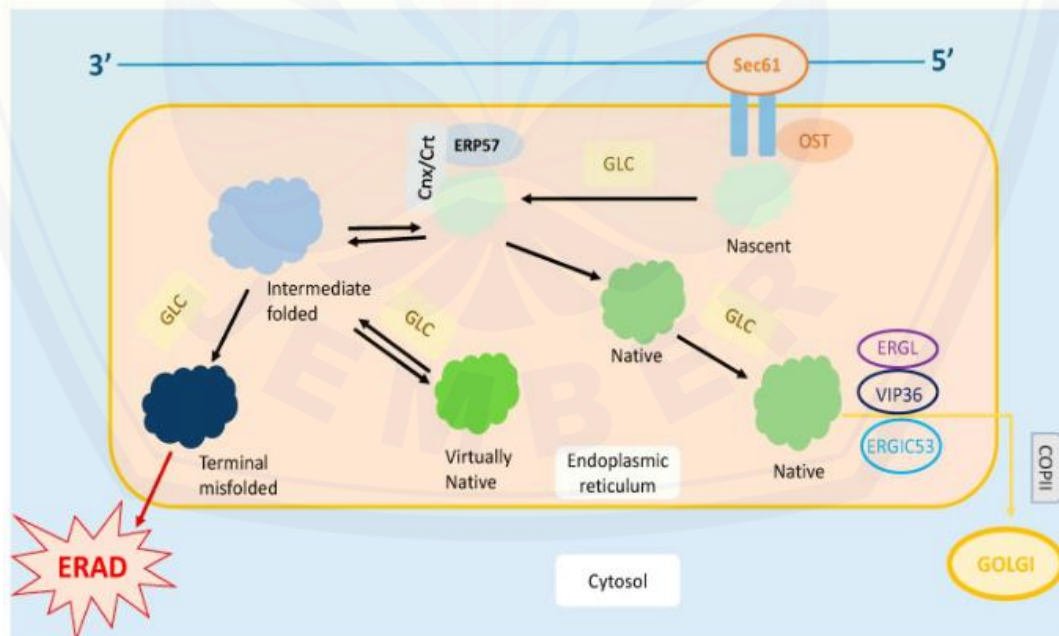
2. 9. Retikulum Endoplasma

Retikulum Endoplasma adalah organel utama pada eukariota yang bertanggung jawab untuk biosintesis protein dan modifikasi, termasuk ترجمahan asam ribonukleat pembawa (mRNA), glikosilasi protein, ikatan disulfida, dan modifikasi pasca-translasi. Selain biosintesis protein, retikulum endoplasma juga memainkan peran penting dalam penyimpanan kalsium, biosintesis lipid, detoksifikasi, dan metabolisme energi, serta sinyal nukleus-sitosol (McGuckin *et al.*, 2010; Back, 2012;).

Retikulum endoplasma juga bertanggung jawab untuk pengendalian kualitas protein yang dihasilkan. Beberapa mekanisme kompleks mengatur ketat perjalanan protein di Retikulum Endoplasma, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6. Di bawah mekanisme kontrol kualitas ini, hanya protein yang dilipat dengan benar yang dapat diangkut keluar dari Retikulum Endoplasma, sementara protein yang gagal melipat baik dilipatgandakan atau menjalani retikulum endoplasma - Degradasi Terkait (ERAD). Oleh karena itu, sangat penting bagi retikulum endoplasma untuk membedakan protein yang gagal melipat dari protein yang dilipat dengan benar dan baru lahir. Protein yang baru lahir menunjukkan penambahan N-acetylglucosamine-mannose-glucose (Wang *et al.*, 2015). Hanya protein yang dilipat dengan benar mengalami pembelahan glukosidase dan ditranslokasi ke kompleks Golgi. Sementara itu, protein yang gagal melipat diakui oleh ikatan hidrofobik abnormal mereka melalui chaperone yang berada di dalam retikulum endoplasma Protein yang gagal melipat ini dicegah keluar dari

retikulum endoplasma oleh Calnexin (McGuckin *et al.*, 2010; Baldrige & Repoport., 2016; Schwarz *et al.*, 2016)

Untuk memastikan bahwa protein fungsional dan matang sedang diproduksi, retikulum endoplasma mengandung beberapa chaperones molekul yang mendukung biosintesis protein. Chaperone ini termasuk Heat Shock Proteins (HSP) seperti HSP33, HSP60, HSP70, HSP90, dan lain-lain. HSP33 memegang dan mencegah agregasi protein dan Protein Disulfide Isomerase (PDI), yang mengatur ikatan disulfida dalam polipeptida (Grootjant *et al.*, 2016). Penelitian ini telah menunjukkan bahwa gangguan pada sifat fungsional chaperone dapat menyebabkan dampak yang signifikan pada homeostasis sel. Misalnya, penghambatan kimia *in vitro* dari chaperone (menggunakan tunikamisin) menghasilkan penghambatan aktivitas N-glikosilasi dalam protein, menyebabkan akumulasi protein yang gagal terlipat (McGuckin *et al.*, 2010).



Gambar 11. Proses perjalanan protein di retikulum endoplasma (Chong *et al.*, 2017). Keterangan: Protein yang baru jadi dipindahkan ke retikulum endoplasma melalui saluran Sec61, diikuti oleh penambahan residu N-asetilglukosamin pada protein yang

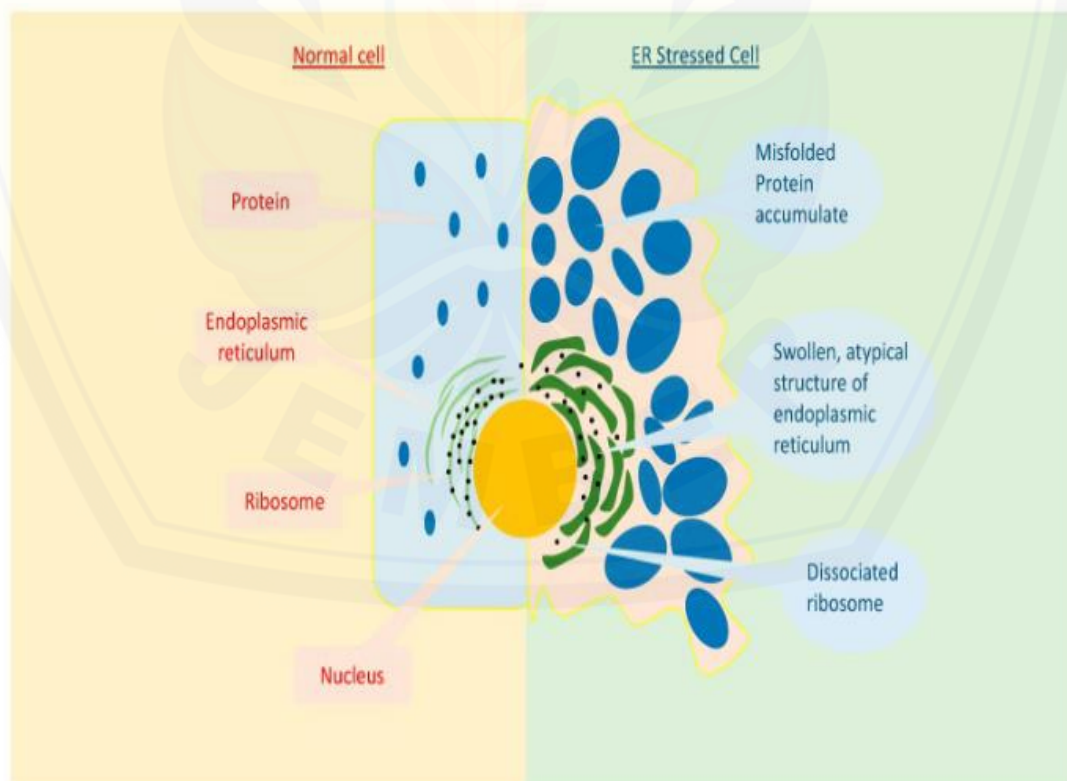
dimediasi OST. Glukosa yang ada pada inti oligosakarida mengalami glikosilasi. Protein kemudian dilipat, dan ikatan disulfida terbentuk di dalam protein untuk menstabilkan strukturnya. Selanjutnya, protein yang dilipat dengan benar dibelah dan diangkut ke aparat Golgi untuk modifikasi lebih lanjut. Di sisi lain, protein yang gagal melipat kembali ke Cnx Calnexin; COPII, Coat Protein II; Crt, Calreticulin; EDEM, retikulum endoplasma Degradation Enhancer- α -Mannosidase; ERGIC53, ER-Golgi Intermediate Compartment 53 kDa Protein; ERGL, ERGIC53-like Protein; Erp57, Protein PDI 57 kDa yang terletak di retikulum endoplasma; GlcI, Glucosidase I; GlcII, Glucosidase II; OST, Oligosaccharide transferase; UGTI, Uridine Diphosphate Glucose: glycoprotein Glycosyltransferase; VIP36, Protein membran Integral Vesikuler 36.

2. 9. 1 Stres Retikulum Endoplasma

Proses pelipatan protein di Retikulum Endoplasma sangat penting dan sangat sensitif terhadap rangsangan intraseluler dan ekstraseluler, seperti ion kalsium retikulum endoplasma, penyimpanan energi dan homeostasis redoks, peningkatan translasi mRNA, sitotoksitas, dan peradangan (Cao & Kaufman *et al.*, 2014; Sharkey *et al.*, 2015). Beberapa protein yang gagal melipat umumnya ditemukan di retikulum endoplasma (Hasnain *et al.*, 2012). Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa setiap gangguan dalam biosintesis protein, seperti peningkatan abnormal dalam biosintesis protein, penghambatan pembentukan ikatan disulfida, deplesi energi metabolik, dan gangguan pada N-glikosilasi, dapat menyebabkan pembentukan protein yang gagal melipat (Hasnain *et al.*, 2012; Grootjans *et al.*, 2016). Tingkat misfolding protein yang terpenting berbanding lurus dengan kompleksitas dan jumlah protein yang disintesis. Sebagai contoh, sel goblet memiliki jumlah protein misfold yang lebih tinggi dan lebih rentan terhadap akumulasi protein yang gagal melipat dibandingkan dengan sel lain, karena sel goblet mengeluarkan sejumlah besar protein MUC2 yang kompleks. Dalam kondisi normal, retikulum endoplasma memiliki mekanisme kontrol kualitas protein canggih untuk melipatgandakan dan menghilangkan protein yang salah lipat. Namun, homeostasis retikulum endoplasma masih dapat dikompromikan jika tingkat misfolding protein melebihi ambang normal refolding, menyebabkan

akumulasi protein yang gagal melipat, dan mengarah ke fenomena yang tidak biasa yang dikenal sebagai stres retikulum endoplasma (Hasnain *et al.*, 2012; Boyce *et al.*, 2017).

Retikulum endoplasma tidak hanya mempengaruhi homeostasis seluler, tetapi juga morfologi seluler. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7, sel-sel yang mengalami Stres retikulum endoplasma memiliki perubahan morfologi retikulum endoplasma, seperti pembengkakan luminal dan struktur atipikal (Akamatsu *et al.*, 2009). Stres retikulum endoplasma memiliki dampak besar pada proses seluler secara keseluruhan. Hal ini dikenal untuk mengurangi transkripsi fungsional dan proses penerjemahan, serta jalur sinyal intraseluler dan ekstraseluler. Akibatnya, dapat menyebabkan berbagai penyakit (Back & Kauman., 2012;; Garg *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012).

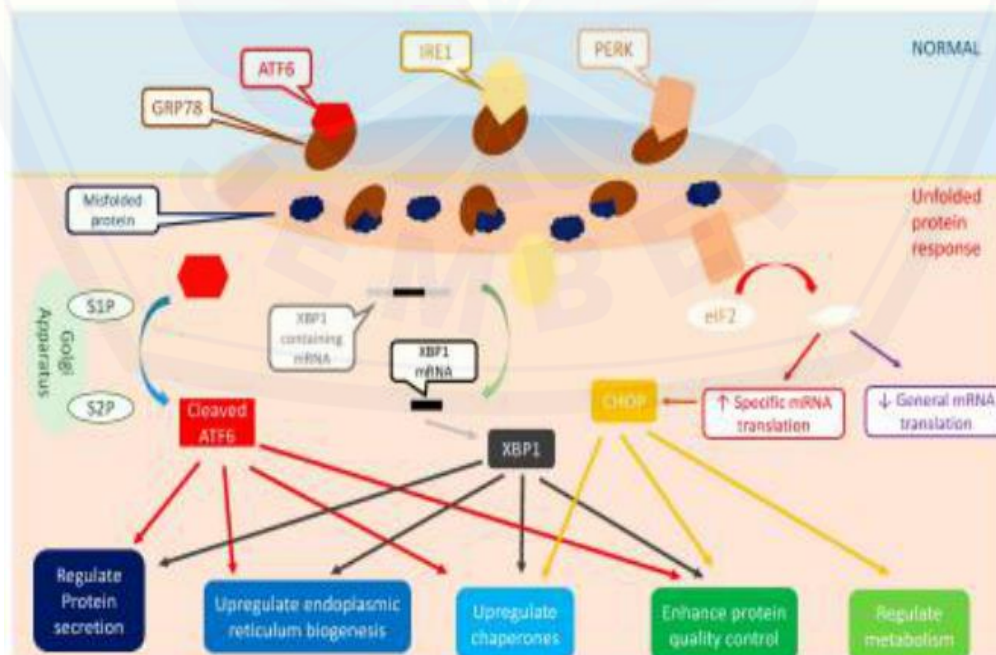


Gambar 12. Perbandingan antara sel normal dan sel dengan stres retikulum Endoplasma (Chong *et al.*, 2017) Keterangan: Dibandingkan dengan sel normal, retikulum endoplasma menekankan sel menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam

struktur retikulum endoplasma, termasuk pembengkakan luminal dan ribosom yang terurai.

2.9.2 Unfolded Protein Response (UPR)

Untuk membantu menyelesaikan stres retikulum endoplasma, sel mengembangkan jaringan jalur sinyal dan transkripsi paralel, independen, dan multifaktorial yang dikenal sebagai UPR. Unfolded Protein Response terdiri dari berbagai faktor transkripsi dan enzim, yang telah berhasil ditemukan dan dipelajari dengan baik selama beberapa dekade (Eri *et al.*, 2011; Dicks *et al.*, 2015). Unfolded Protein Response ditujukan untuk menghilangkan stres retikulum endoplasma dengan mengurangi translasi dan transkripsi protein umum, mempercepat pelipatan protein retikulum endoplasma dan kemampuan refolding, dan meningkatkan ERAD untuk menghilangkan dan mengurangi akumulasi protein yang gagal melipat di retikulum endoplasma. Jika kondisi stres terlalu parah, atau UPR terganggu dan UPR gagal maka mekanisme sinyal apoptosis dipicu (Back & Kauman., 2012; Lu *et al.*, 2016).



Gambar. 13 Jalur pensinyalan downstream UPR (Chong *et al.*, 2017). Keterangan: Transduser sinyal UPR, PERK, IRE1, dan ATF6, dibatasi oleh GRP78 dalam kondisi normal. Akumulasi protein yang gagal melipatgandakan memicu GRP78 untuk melepaskan dan mengaktifkan transduser sinyal UPR untuk berikatan dengan protein yang gagal melipat, sehingga mengaktifkan jalur pensinyalan downstream UPR. Pada jalur IRE1, IRE1 memotong dan melepaskan XBP1 mRNA, yang diterjemahkan ke protein XBP1 aktif yang meningkatkan ekspresi gen target UPR. Sementara itu, PERK memfosforilasi eIF2 dan menghambat terjemahan mRNA umum, sementara meningkatkan ekspresi gen protein retikulum endoplasma, sehingga mengurangi beban kerja retikulum endoplasma untuk mengurangi stres retikulum endoplasma. Di sisi lain, ATF6 bermigrasi ke aparat Golgi dan dibelah oleh protein S1P dan S2P, untuk mengekspos domain bZIP-nya. Activated ATF6 ditranslokasi ke nukleus dan bertindak sebagai faktor transkripsi untuk meningkatkan ekspresi gen dari beberapa protein retikulum endoplasma yang berkontribusi pada protein lipat, sekresi, modifikasi, dan proses ERAD. bZIP, Ritsleting Leusin Dasar; eIF2, Faktor Inisiasi Eukariotik 2; ERAD, Degradasi terkait retikulum endoplasma; S1P, Sphingosine-1-Phosphate; S2P, Sphingosine-2-Phosphate.

Inisiator proses UPR adalah GPR78, yang juga bertanggung jawab dalam pengendalian kualitas biosintesis protein, termasuk sintesis protein, pelipatan, dan perakitan (Kaira *et al.*, 2015). Telah ditetapkan bahwa ada tiga transduser sinyal transmembran retikulum endoplasma-lokal yang memulai UPR. Transduser ini dikenal sebagai IRE1, PERK dan ATF. Ini secara konstitutif diekspresikan dalam sel, tetapi dibatasi secara ketat oleh GRP78, dan karenanya, tidak aktif dalam kondisi normal (Cullinal & Diehl., 2016; Bhat *et al.*, 2017). Setelah protein misfolded terbentuk di retikulum endoplasma, GRP78 unbinds dan melepaskan transduser ini untuk mencari dan mengikat protein yang gagal melipat. Peristiwa ini mengaktifkan transduser dan menghasilkan jalur pensinyalan downstream UPR (Kaira *et al.*, 2016; Palsamay & Shinohara., 2017), seperti yang digambarkan pada Gambar 8.

2. 9. 3 Hubungan Stres oksidatif dan Stres Retikulum Endoplasma

Stres oksidatif adalah bentuk stres seluler dan kerusakan karena ketidakseimbangan antara mekanisme pertahanan antioksidan dan Reactive Oxygen Species (ROS) (Henriksen *et al.*, 2011). Ini biasanya timbul karena akumulasi ROS, menggerakkan reaksi oksidatif yang mengalahkan aktivitas antioksidan dalam tubuh. Sejumlah ROS yang terbatas umumnya ditemukan dalam tubuh sebagai produk sampingan dari metabolisme seluler. Beberapa faktor diketahui menyebabkan produksi abnormal ROS, termasuk iradiasi. Upregulation dalam berbagai proses enzimatik, seperti respirasi mitokondria, reaksi asam arakidonat, sintesis Nitric Oxide, oksidasi glukosa, dan reaksi Fenton, juga meningkatkan kadar ROS dalam tubuh (Jiang *et al.*, 2012; Kober *et al.*, 2012).

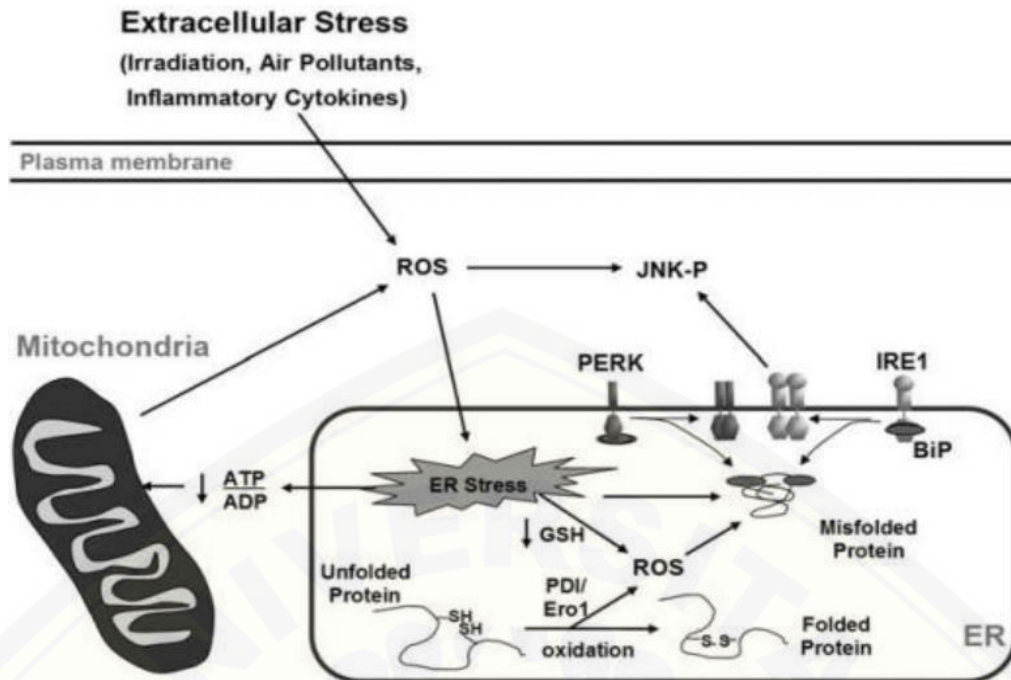
Akumulasi ROS memiliki efek merugikan pada fungsi seluler dan homeostasis. Studi telah menunjukkan bahwa ROS dapat memicu banyak jalur sinyal seluler dan menyebabkan kerusakan pada DNA, protein, dan sel. Paparan yang terus-menerus terhadap ROS meningkatkan produksi asam nukleat, protein, dan lipid yang dimodifikasi secara oksidatif, yang mengarah pada perkembangan penyakit. Untuk melawan gangguan yang disebabkan oleh ROS, sel-sel mengembangkan mekanisme antioksidan canggih untuk mengais dan mengurangi produksi ROS. Mekanisme antioksidan terdiri dari reaksi enzimatik dan non-enzimatik dan diatur oleh superoksida dismutase (SOD), glutathione. Dalam kondisi fisiologis normal, mekanisme antioksidan mempertahankan homeostasis redoks (Henriksen *et al.*, 2011; Ozcan L *et al.*, 2012; Hafiz *et al.*, 2016).

Dalam proses pelipatan protein, pembentukan ikatan disulfida sangat penting untuk produksi protein tersier fungsional, matang, dan unik tersier, untuk menstabilkan struktur protein. Pembentukan ikatan disulfida adalah proses reversibel untuk pertukaran tiol-disulfida dan dikatalisis oleh banyak oksidoreduktase retikulum endoplasma, seperti *Endoplasmic Reticulum Protein* (ERP) 57 dan ERP72. Proses pelipatan protein sangat sensitif terhadap homeostasis redoks, maka status redoksnnya dimodulasi dengan ketat oleh berbagai mekanisme redoks seperti GSSG. Siklus GSH dan reaksi *Protein Disulfide Isomerase* (PDI) (Santos *et al.*, 2009; Hasanain *et al.*, 2015).

Siklus GSSG memiliki peran penting dalam mengatur proses pelipatan protein di retikulum endoplasma GSH adalah tiol non-protein yang dapat mengalami oksidasi dan diubah dalam GSSG. Keseimbangan antara GSH dan GSSG sangat penting dalam mempertahankan homeostasis redoks. Rasio GSH untuk GSSG adalah sekitar 1:1 dalam lumen retikulum endoplasma; sementara itu, kira-kira 50:1 di sitoplasma. Oleh karena itu, disarankan bahwa lingkungan yang sangat teroksidasi mengoptimalkan pembentukan ikatan disulfida. Namun, ini juga menciptakan lingkungan yang tidak menguntungkan untuk mekanisme antioksidan, karena interaksi antara GSH dan ROS sangat penting dalam mempertahankan homeostasis retikulum endoplasma redoks. Selain itu, lingkungan juga mengganggu aktivitas protein retikulum endoplasma-residen, sehingga meningkatkan produksi protein yang gagal melipat dan menyebabkan stress retikulum endoplasma. Dalam proses pelipatan protein, ikatan disulfida sangat penting untuk memodifikasi dan menghasilkan protein yang matang, stabil, dan fungsional. Masalah dalam ikatan disulfida, seperti sistein mispairing dan ikatan disulfida yang tidak tepat, dapat menghasilkan protein gagal melipat (Chong *et al.*, 2017).

GSH dapat bereaksi dan mengurangi ikatan disulfida non-pribumi, memungkinkan protein yang gagal melipat untuk kembali lagi. Protein dapat diisomerisasi untuk pelapisan protein, teroksidasi untuk ikatan disulfida, dilipat oleh GSH, atau menjalani ERAD. Namun, proses protein refolding lambat karena membutuhkan akseptor elektron dan juga sangat tergantung pada reaksi redoks. Dalam kondisi stress retikulum endoplasma, lingkungan mikro retikulum endoplasma sangat terdistorsi. Sejumlah besar protein gagal melipat terakumulasi di Retikulum Endoplasma. GSH membantu dalam proses protein unfolding dan refolding. Oleh karena itu, ketika mekanisme antioksidan GSH dikompromikan, peningkatan produksi ROS mengarah ke stress retikulum endoplasma (Back & Kaufman., 2012)

Selain GSH Proses ini meningkatkan produksi ROS dan mengubah keseimbangan redoks di Retikulum Endoplasma. Selain itu, ketidakseimbangan redoks mengganggu protein lipat jalur, mengarah ke peningkatan regulasi dan akumulasi protein yang gagal melipat, dan dengan demikian menginduksi stres retikulum endoplasma. Menariknya, beberapa enzim retikulum endoplasma-residen lain memainkan peran yang serupa dengan ERO1, termasuk quiescin sulfhydryl oxidase, peroxiredoxin, dan vitamin K epoxide reductase (Hagiwara & Nagata., 2012; Zhang *et al.*, 2015).



Gambar 14. Jalur produksi ROS di sel (Kezhong Z., 2010). Keterangan: ROS dihasilkan oleh eksposur ke beberapa tekanan seperti iradiasi dan polutan lingkungan dan juga karena respirasi mitokondria. Perubahan dalam status redox atau generasi ROS secara langsung atau tidak langsung mempengaruhi homeostasis retikulum endoplasma dan pelipatan protein. Stres oksidatif dapat menyebabkan akumulasi diaktifkannya JNK terfosforilasi. Stres retikulum endoplasma juga dapat mengaktifkan protein kinase JNK melalui aktivasi IRE1. Pembentukan ikatan disulfida tergantung pada status redoks di dalam retikulum endoplasma. Pembentukan ikatan disulfida dirangsang oleh PDI yang didaur ulang oleh ERO1. PDI teroksidasi selanjutnya dapat mengoksidasi substrat polipeptida, sehingga terbentuklah ROS.

Meskipun agregasi protein yang tidak terungkap terjadi baik di retikulum endoplasma dan sitoplasma, di bawah kondisi stres retikulum endoplasma, agregat protein kecil terkait ROS lebih berbahaya daripada yang lebih besar karena mereka mengikat protein pengikat TATA dan protein respon elemen pengikat cAMP (CREB) (faktor transkripsi) dan merusak jalur ubiquitin-proteasome. Sebaliknya, agregat protein yang lebih besar dan pengunyah molekul, misalnya, kompleks cincin TCP1 (TRiC) dan Heat Shock Protein 70 (HSP70), bertindak dalam sitoproteksi melalui penekanan lebih lanjut dari pembentukan agregat (Wang & Li., 2014).

2. 10. Katekin Teh Hijau

2. 10.1 Teh hijau

Teh, produk dari daun dan tunas tanaman *Camellia sinensis* (Theaceae), dikonsumsi di seluruh dunia. *Camellia sinensis* umumnya tumbuh di daerah yang beriklim tropis dengan ketinggian antara 200-2000 meter di atas permukaan laut dengan suhu cuaca antara 14-25°C. Teh secara luas dapat diklasifikasikan berdasarkan metode produksi sebagai tidak difermentasi (teh hijau), setengah fermentasi (teh oolong), sepenuhnya difermentasi (teh hitam) (Allipour & Rad., 2012).

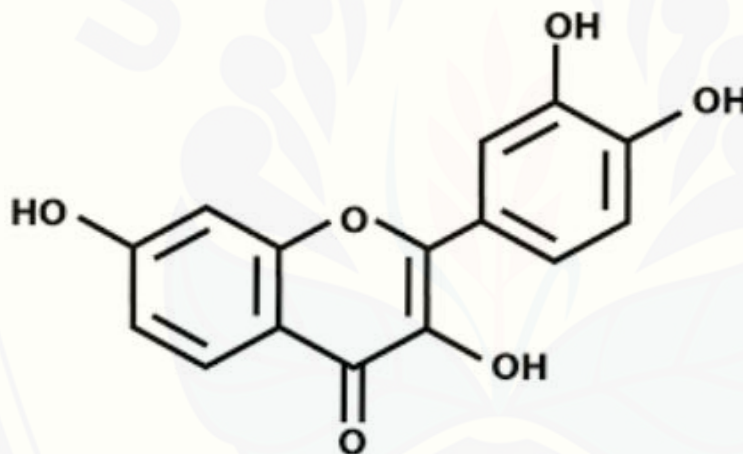
Teh hijau mengandung berbagai bahan yang bermanfaat untuk kesehatan tertentu. Misalnya, teh polifenol katekin teh diyakini mengerahkan efek protektif terhadap penyakit seperti kanker, obesitas, diabetes, arteriosklerosis, penyakit neurodegeneratif, dan kerusakan gigi (Khan & Muhkhtar., 2013). Di antara katekin, epigallocatechin gallate (EGCG) menunjukkan bioaktivitas yang paling kuat. Kandungan EGCG dalam teh hijau lebih tinggi daripada teh hitam dan teh oolong, yang dapat menjelaskan keunggulan teh hijau dalam hal manfaat kesehatan. Kafein menginduksi kebangkitan, menurunkan sensasi kelelahan, dan memiliki efek diuretik (Maki *et al.*, 2009; Segneanu *et al.*, 2012). Theanine dan γ -aminobutyric acid menurunkan tekanan darah dan mengatur fungsi otak. Vitamin C menunjukkan aktivitas antiscorbutic, mencegah katarak, dan mungkin meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Ji *et al.*, 2014; Jayakerthana., 2016).

Sejumlah besar bukti ilmiah telah mengungkap mekanisme yang digunakan teh hijau dan EGCG bermanfaat untuk kesehatan. Sebagian besar bukti ilmiah berdasarkan eksperimen seluler dan hewan menunjukkan bahwa teh

hijau dapat memberikan efek kesehatan yang menguntungkan (Schneider & Segre., 2009). Minuman teh hijau yang biasanya diseduh (misalnya 2,5 g daun teh dalam 250 mL air panas) mengandung 240–320 mg katekin, dimana 60%–65% adalah EGCG (Syakir., 2010; Taylerson K., 2012).

2. 10. 2 Struktur kimia katekin

Katekin merupakan kelompok golongan senyawa yang terdiri dari Epicatechin (EC), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin Gallate (EGC), Epigallocatechin Gallate (EGCG), catechin, Gallocatechin, Catechin gallate, gallocatechin gallate dengan rumus struktur sebagai berikut:



Gambar 15. Struktur kimia senyawa katekin (Lee *et al.*, 2010)

Struktur dasarnya terdiri atas sebuah inti Flavan (2-fenil-benzo-piran) yang mengandung dua cincin benzen. Inti flavan dikombinasikan dengan oksigen yang mengandung cincin piran C. Adanya substitusi dalam cincin C menegaskan perbedaan kelas dalam flavanoid (Lagha & Daniel., 2016).

Struktur dasarnya terdiri atas sebuah inti flavan (2-fenil-benzo-piran) mengandung dua cincin benzen. Inti flavan dikombinasikan dengan oksigen

yang mengandung cincin piran C. Adanya Substansi dalam cincin C menegaskan perbedaan kelas dalam flavonoid. Flavonoid terdiri atas flavon-3-ol, mengandung cincin jenuh C dengan metil pada 4 posisi (misalnya katekin dengan OH dalam posisi 5,7,3,4). Flavonoid dikenal mempunyai aktifitas antioksidan flavonoid meningkat dengan bertambahnya group hidroksi. Polifenol diproduksi sebagai hasil metabolit sekunder tanaman tinggi. Polifenol tanaman dapat dibagi dalam dua kelompok besar yaitu proantosianidin dan poliester berdasarkan asam galik dan atau asam heksahidroksidifenik dan turunan-turunannya. Polifenol teh hijau merupakan kelasflavanol yang mempunyai komponen C15. Turunannya dibentuk dari dua inti fenolik yang dihubungkan dengan tiga unit karbonpada posisi 2,3, dan 4. Struktur Flavonol dari katekin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavan) mengandung dua atom karbon asimetrik pada C2 dan C3. Polifenol teh hijau dapat dengan mudah di ekstrak dengan etil asetat menghasilkan (+)-katekin disingkat menjadi C, (-)-epikatekin (EC),(-)-galokatekin (GC), (-)epigalokatekin (EGC), (-)-epikatekin galat (ECG), (-)-galokatekin galat (GC), dan (-)-epigalokatekin galat(EGCG) (Lee *et al.*, 2010; Kazuki *et al.*, 2018).

2. 10. 3 Sifat Biokimia Katekin

Teh katekin adalah antioksidan kuat dan mengikat protein, lipid, asam nukleat, dan logam.¹ Percobaan menggunakan EGCG yang diimobilisasi pada agarose telah menunjukkan bahwa EGCG mengikat protein serum seperti fibronectin, fibrinogen, glikoprotein yang kaya histidin, dan protein permukaan sel, Fas.1, 5 Baru-baru ini, EGCG ditunjukkan untuk mengikat kuat ke reseptor laminin 67 kDa, 8 limfoma sel B 2 (BCL-2) protein, vimentin, dan peptidil prolyl cis / trans isomerase (Xianzhen *et al.*, 2014). Karenanya, protein-protein ini telah diusulkan untuk menjadi target EGCG dan dianggap sebagai mediator dari

aktivitas antikankernya. Dengan demikian, EGCG mungkin menunjukkan beberapa efek biologis dengan mengikat biomolekul ini (Yuliani S., 2012).

2. 10. 4 Sifat farmakologis katekin

Sifat Farmakologis katekin menunjukkan bahwa 60 menit setelah pemberian EGCG oral tunggal pada tikus (500 mg / kg berat badan), kadar EGCG adalah 12,3 μM dalam plasma, 48,4 nmol/g di hati, 0,5 nmol / g di otak, 565 nmol / g di mukosa usus kecil, dan 68,6 nmol/g di mukosa usus. Relawan yang mencerna 1,5 g ekstrak teh hijau tanpa kafein (GTE) mengandung 73 mg EGCG, 68 mg epigallocatechin, 22 mg epicatechin gallate, dan 25 mg epicatechin per g, menunjukkan kadar plasma catechin puncak dalam 1,5-2,5 jam, dan rata-rata puncak plasma konsentrasi EGCG, epigallocatechin, dan epicatechin masing-masing 0,71, 1,8, dan 0,65 μM . Ketika dosis ditingkatkan dari 1,5 hingga 3,0 g, nilai-nilai ini meningkat 2,7 menjadi 3,4 kali lipat (Thielecke & Boschmann., 2009; Varma & Kevin ., 2010).

Katekin dapat terdegradasi oleh mikroorganisme (di saluran usus) menjadi berbagai metabolit fisi cincin yang dapat ditemukan dalam urin manusia dan sampel plasma beberapa jam setelah konsumsi teh hijau (Kanwar *et al.*, 2012).

2. 10. 5 Stabilitas katekin

Katekin teh mengalami banyak perubahan kimia seperti oksidasi dan epimerasi selama proses pengolahan dan penyeduhan. Pada proses penyeduhan, epimerasi berlangsung lebih mudah pada air ledeng daripada air murni (Hemalatha & Venkatesan., 2011). Teh yang diseduh dengan air murni terepimerasi pada suhu 80 C; sedangkan dengan air ledeng terepimerasi pada suhu 40 C (Martinus *et al.*, 2014). Katekin teh stabil dalam air pada suhu kamar.

Katekin terdegradasi sebesar 20% ketika dipanaskan pada suhu 98 C selama 20 menit. Saat dipanaskan dalam autoclave pada suhu 120 C selama 2 jam maka katekinakan terdegradasi sampai dengan 50%. Penyeduhan menyebabkan kandungan senyawa epistruktur seperti EGCG (Epigallocatechin gallat) dan ECG (Epicatechin Gallat) menjadi turun, sedangkan kandungan non epistruktur seperti GCG (Galocatechin Gallat) dan CG (Catechin Gallat) meningkat. Meskipun secara kuantitas kandungan katekin total tidak mengalami penurunan, namun secara kualitas dengan terjadinya epimerasi ini maka potensinya terhadap kesehatan menjadi berkurang (Ratnawati *et al.*, 2009; Chacko *et al.*, 2010)

2. 10. 6 Isolasi Katekin dari Teh Hijau

Tehnik pemisahan fraksi katekin dilakukan dengan menggunakan tehnik Kromatografi kolom fase normal dengan silica gel sebagai fase diam. Analisis dan penentuan struktur senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan High Performance Liquid Chromatograph (HPLC). data spektroskopi IR dan data Spektroskopi 1H - NMR (Gupta *et al.*, 2009; Ratnawaty *et al.*, 2009).

Proses ekstraksi dilakukan dengan tambahan sebagai berikut:

- (1) Ekstrak teh hijau dalam air dipisahkan terlebih dahulu dengan klorofil dengan pelarut heksan.
- (2) Fraksi Air yang telah dipisahkan klorofilnya tersebut di pisahkan dalam kolom poliamida dengan tujuan untuk memisahkan kafein dan katein dengan pelarut alkohol 10%, Katekin akan tetap berada pada kolom, sedangkan kafein dikeluarkan dari kolom dan berada pada Fraksi Alkohol.
- (3) Katekin yang telah bebas kafein di lakukan pemisahan pelahan untuk mendapatkan EGCG dengan pelarut 12% etanol dan kelompok katein lainya

seperti epicatechin dalam pelarut 5% etanol (4) untuk pemurnian EGCG dilakukan ekstraksi cair-cair dengan pelarut etil asetat kemudian dievaporasi dengan rotavapor pada suhu 50-55^o C sehingga didapatkan bentuk padatnya (Ratnawaty *et al*, 2009; De Mejia *et al.*, 2009)

Katekin sebagai komponen bioaktif, selama pengolahan teh hijau dipertahankan jumlahnya dengan cara menginaktivasi enzim polifenol oksidase, baik melalui proses pelayuan maupun pemanasan. Pada proses pengolahan lain, Katekin dioksidasi menjadi senyawa Orthoquinon, bisflavanol, tehaflavin dan tehharubigin yang kemampuannya tidak sehebat katekin (Thielecke & Boschmann., 2009; Chandler *et al.*, 2010).

2. 10. 7 Penelitian manfaat Katekin pada katarak

Penelitian manfaat Katekin pada Katarak masih belum banyak, diantaranya:

1. Lee *et al* tahun 2010 mempublikasi penelitiannya tentang efek protektif dari Katekin terhadap apoptosis epitel lensa pada tikus Wistar dengan katarak yang diinduksi N-Methyl-N-Nitrosourea di Korea.

- Tujuan penelitian: untuk mengetahui pengaruh Katekin pada kematian sel apoptosis pada epitel lensa tikus dengan Katarak yang diinduksi dengan N-Methyl-N-Nitrosourea.

- Metode Penelitian : Katarak diinduksi dengan injeksi intraperitoneal 100 mg / kg N-methyl-N-nitrosourea (MNU) pada tikus Sprague-Dawley usia sepuluh hari. Tikus dibagi secara acak menjadi lima kelompok (n = 15 pada masing-masing kelompok): kelompok kontrol, dan empat kelompok induksi katarak, diobati

dengan katekin 0, 50, 100, 200 mg / kg. dilakukan analisis biomisotopik lampu celah, pelabelan akhir penonaktifan DUTP akhiran deoxynucleotidyl transferase-mediated (TUNEL), Western-blot untuk Bcl- 2 dan Bax, dan imunohistokimia untuk caspase-3

- Hasil: Kematian sel apoptosis pada sel epitel lensa yang meningkat setelah pembentukan katarak pada tikus ditekan oleh katekin.

- Kesimpulan: Katekin menghambat kematian sel apoptosis akibat katarak pada lensa epitel dan mungkin berguna untuk pencegahan perkembangan katarak.

2. Pengaruh Polifenol Epigallocatechin-3-gallate Teh Hijau pada Agregasi α A (66-80) Peptide, Fragmen Utama dari α A-crystallin yang Terlibat dalam Pengembangan Katarak

Kumar et al., 2017

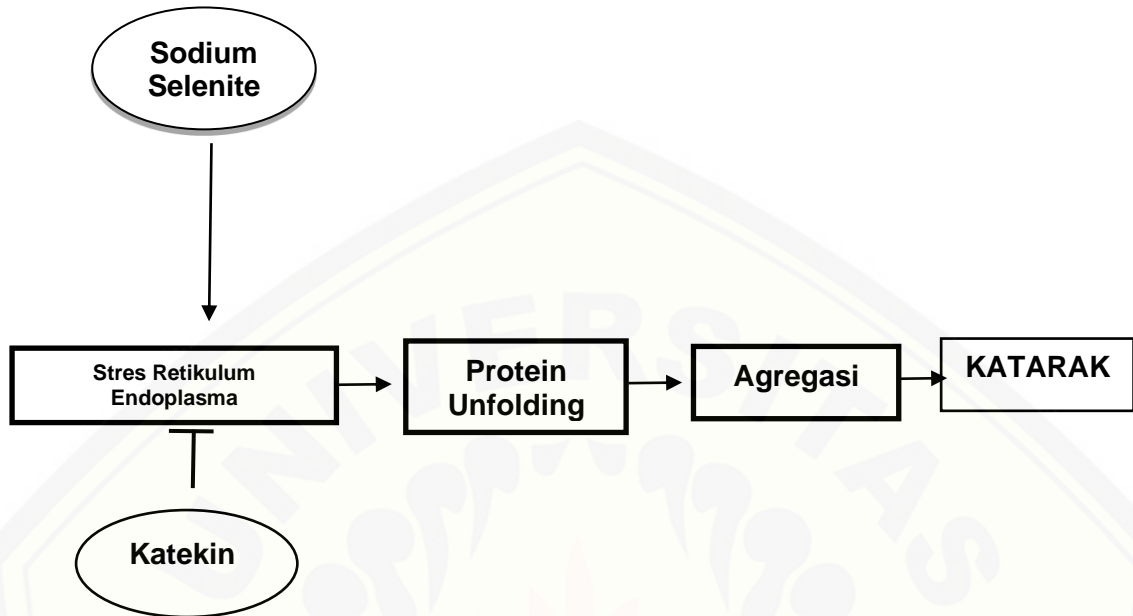
-Tujuan: Crystallin adalah protein utama yang ada di lensa mata. Fragmen peptida α A (66-80) yang berasal dari α Acrystallin memiliki kecenderungan agregasi yang tinggi dan membentuk struktur seperti amiloid. Agregat α A (66-80) diketahui berinteraksi dengan kristal yang larut dan mengganggu kestabilan struktur asli yang selanjutnya menjalani agregasi. Agregasi kristal dalam lensa mata mengarah pada pengurangan kekeruhan lensa, kondisinya umumnya disebut sebagai katarak. Dengan demikian, agregasi α A (66-80) tampaknya menjadi peristiwa penting selama pengembangan katarak, dan karenanya, penghambatan agregasi α A (66-80) mungkin merupakan strategi yang menarik untuk pencegahan katarak.

-Bahan dan Metode: α A (66-80) peptida yang berasal dari α A-kristalin memiliki potensi agregasi yang tinggi dan memiliki peran penting dalam pengembangan katarak. Untuk menghambat agregasi α A (66-80) peptida, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), unsur aktif utama teh hijau, digunakan. Itu efek penghambatan dinilai dengan uji pergeseran spektral Kongo Merah (CR), uji ikatan Thioflavin-T, mikroskop elektron transmisi dan mikroskop fluoresensi.

- Hasil: Potensi penghambatan EGCG terhadap α A-crystallin jelas diamati seperti di hadapan EGCG, agregasi α A (66-80) sangat terhambat dan agregat pra fibrillary -terbentuk dari α A (66-80) ditemukan dihambat.

- Kesimpulan: Dalam penelitian ini, EGCG secara efisien berhasil memblokir agregasi α A (66-80) peptida dengan cara yang tergantung konsentrasi. EGCG terbukti mampu memisahkan agregat α A (66-80) yang telah terbentuk sebelumnya. Studi ini menunjukkan bahwa EGCG bisa menjadi molekul potensial yang dapat mencegah inisiasi katarak serta membantu dalam pencegahan katarak.

2. 10. 8 Kerangka Teori



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah eksperimen yang memberikan perlakuan berupa katekin pada tikus dengan katarak karena diinduksi dengan selenit. Peneliti akan melihat perubahan parameter yang terjadi pada lensa selama pemberian katekin dalam berbagai dosis setelah diinduksi dengan sodium selenite. Desain penelitian ini adalah *Randomized Control Trial (RCT)* yaitu perlakuan pada tikus dengan memberikan katekin sebelum diinduksi dengan sodium selenite, sehingga masing-masing tikus mendapatkan peluang yang sama terhadap perlakuan. Parameter pada penelitian ini adalah BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa.

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan ANOVA. Hasilnya dinyatakan sebagai rata-rata \pm standar error dari mean. Signifikansi dianalisa dengan varian satu arah diikuti oleh Student t-test, chi square test, korelasi dan regresi linier. Nilai $p \leq 0,01$ dinyatakan signifikan.

3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Penelitian akan dilaksanakan pada Mei 2019 sampai dengan Juni 2019.

3.3. Sampel dan Metode Pengambilan Sampel

Subjek dalam penelitian ini adalah :

1. Kelompok kontrol negative yaitu kelompok tikus yang diinjeksi subcutan dengan salin tanpa diberi sodium selenite
2. Kelompok kontrol positive yaitu kelompok tikus yang diinduksi katarak dengan menyuntikkan sodium selenite 25 mikromol/kg BB dosis tunggal subcutan tanpa diberikan katekin
3. Kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok tikus yang diinduksi katarak dengan menyuntikkan sodium selenite 25 mikromol/kg BB subcutan dosis tunggal dengan diberikan injeksi katekin 50 mg/kg BB intraperitoneal
4. Kelompok perlakuan 2 yaitu kelompok tikus yang diinduksi katarak dengan menyuntikkan sodium selenite 25 mikromol/kg BB subcutan dosis tunggal dengan diberikan injeksi katekin 100 mg/kg BB intraperitoneal
5. Kelompok perlakuan 3 yaitu kelompok tikus yang diinduksi katarak dengan menyuntikkan sodium selenite 25 mikromol/kg BB subcutan dosis tunggal dengan diberikan injeksi katekin 200 mg/kg BB intraperitoneal

3.3.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus percobaan berjumlah 25 ekor sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria Inklusi:

- a. Tikus jenis *Rattus Norvegicus Strains Wistar*
- b. Umur 9 hari
- c. Warna bulu putih

d. Tikus sehat

Kriteria Eksklusi:

- a. Tikus dengan katarak
- b. Tikus yang mengalami penurunan keadaan fisik atau mati

3. 3. 2 Metode Pengambilan sampel

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

Metode Pengambilan Sampel penelitian ini menggunakan hewan percobaan menggunakan rumus Frederer sebagai berikut

Dimana n adalah banyaknya jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. Pada penelitian ini didapatkan 5 kelompok penelitian, maka jumlah replikasi yang diperlukan pada tiap kelompok adalah 5 kali. Dengan demikian banyaknya sampel yang diperlukan pada penelitian ini adalah sebanyak 25 ekor tikus untuk keseluruhan sampel penelitian.

3. 4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

1. Alat pemeliharaan binatang coba: kandang dari anyaman kawat, tempat pakan, dan botol air diletakkan dalam kandang dari kotak plastik.
2. Alat untuk pemeriksaan Imunohistokimia
3. Mikroskop cahaya

3.4.2 Bahan

1. Sodium selenite
2. Katekin
3. Salin

3.5 Variabel Penelitian

Penelitian ini memiliki 2 variabel, terdiri dari:

1. Variabel Independen/bebas yaitu isolat katekin dengan dosis 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200mg/kg
2. Variabel Dependen/tergantung yaitu ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa

3.6 Definisi Operasional Variabel

1. Katekin yang digunakan adalah isolat golongan senyawa katekin dalam bentuk serbuk yang diperoleh dari hasil isolasi teh hijau klon GMB4 (lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung, Bandung) yang dilakukan di laboratorium Kimia F. MIPA ITB, Bandung
2. Ekspresi BiP/GRP78: Pewarnaan Imunostokimia BiP/GRP78 dideteksi dengan menggunakan anti bodi monoklonal dengan Pengenceran (1:100). Skor ekspresi BIP/GRP78 dinilai berdasarkan tingkat pewarnaan sebagai berikut: 1. $\leq 10\%$ dari area kekeruhan lensa, 2. 11-25% dari area kekeruhan lensa, 3. 26-50% dari area kekeruhan lensa, 4. $\geq 51\%$ dari area kekeruhan lensa.
3. Tingkat kekeruhan lensa Tingkat kekeruhan lensa dinilai sebagai berikut: (Javadzadeh *et al.*, 2009)

- Tingkat 0 adalah lensa bening normal,
- Tingkat 1 adalah kekeruhan subkapsular;
- Tingkat 2 adalah katarak nuklir;
- Tingkat 3 adalah katarak nuklir yang kuat dengan kekeruhan di daerah perinuklear
- Tingkat 4 adalah kekeruhan padat matang di semua bagian lensa.

3.7 Pemberian Katekin Pada Tikus

Katekin yang diberikan adalah isolate golongan senyawa katekin dari teh hijau klon GMB 4 (lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung, Bandung).

Pengenceran katekin dilakukan dengan cara:

- Menyiapkan 5 tempat dengan memberikan label untuk 5 Kelompok sesuai dengan subyek penelitian.
- Menimbang katekin untuk tiga dosis perlakuan dengan cara menghitung berat badan rata-rata masing-masing tikus kelompok perlakuan dalam satuan gram kemudian dikaitkan dengan dosis 50 mg/kg, 100mg/kg, 150 mg/kg.
- Katekin hasil perhitungan dilarutkan dengan 1 ml aquades sehingga didapatkan larutan yang homogen kemudian diberikan ke masing-masing tikus sebanyak 1 ml dengan cara injeksi intraperitoneal.

3. 8 Prosedur Penelitian

3. 8.1 Protokol penelitian

Dua puluh lima anak tikus Wistar-albino, ditampung bersama induknya, dibagi menjadi lima kelompok (tiga percobaan dan dua kontrol), masing-masing

terdiri dari lima anak tikus. Kelompok kontrol negative yaitu kelompok tikus yang diinjeksi subcutan dengan salin pada hari ke 10. Kelompok kontrol positive yaitu kelompok tikus yang diinduksi katarak dengan menyuntikkan sodium selenite 25 mikromol/kg BB (Sigma Chem. Co., St Louis, USA) dosis tunggal subcutan pada hari ke 10 tanpa diberikan katekin. Kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok tikus yang diinduksi katarak dengan menyuntikkan sodium selenite 25 mikromol/kg BB subcutan dosis tunggal pada hari ke 10 dan diberikan injeksi intraperitoneal katekin 50 mg/kg BB. Kelompok perlakuan 2 yaitu kelompok tikus yang diinduksi katarak dengan menyuntikkan sodium selenite 25 mikromol/kg BB subcutan dosis tunggal pada hari ke 10 dengan diberikan injeksi intraperitoneal katekin 100 mg/kg BB. Kelompok perlakuan 3 yaitu kelompok tikus yang diinduksi katarak dengan menyuntikkan sodium selenite 25 mikromol/kg BB subcutan dosis tunggal pada hari ke 10 dengan diberikan injeksi intraperitoneal katekin 200 mg/kg BB. Pemberian Katekin pertama dimulai hari ke 9 (1 hari sebelum diberikan sodium selenite) sekali sehari dan dilanjutkan tiap hari selama 5 hari (sampai hari ke 13). Injeksi katekin diberikan tiap pagi, sedangkan khusus hari ke 10 diberikan 1 jam sebelum injeksi sodium selenite. (Tabel 1). Katarak dinilai setelah pemeriksaan dengan mikroskop slit lamp pada hari ke 17 sebelum mengorbankan tikus. Semua tikus dibius dengan injeksi ketamin intraperitoneal (80 mg/kg) dan xylazine (15 mg/kg). Lensa segera diambil setelah eutanasia, dan ditempatkan di es kering. Sampel disimpan pada suhu -80°C untuk analisis lebih lanjut ada di tabel 1.

Tabel 1. Kelompok dalam penelitian

Kelompok percobaan (n = 5)	Injeksi pada hari 9,11,12,13	Injeksi pada hari 10
Klp 1/Kontrol (-)	Salin	Salin
Klp 2/Kontrol (+)	Salin	Na ₂ SeO ₃ (25 µmol/kg)
Klp 3	Katekin 50 mg/Kg	Na ₂ SeO ₃ (25 µmol/kg) + katekin 50 mg/kg
Klp 4	Katekin 100 mg/Kg	Na ₂ SeO ₃ (25 µmol/kg) + Katekin 100mg/kg
Klp 5	Katekin 200mg/Kg	Na ₂ SeO ₃ (25 µmol/kg) + Katekin 200mg/kg

3. 8. 2 Analisa morfologi katarak

Satu jam sebelum pemeriksaan, setetes 2,5% fenilefrin hidroklorida dan 1% larutan tetes mata tropikamid (PT.Cendo Farma, Bandung, Indonesia) setiap 30 menit sambil menempatkan tikus di ruangan gelap selama 2 jam. Mata itu dilihat di bawah biomicroscope slit-lamp dengan perbesaran 12 kali. Pada pemeriksaan akhir (hari 17) perkembangan katarak yang terjadi dinilai dan difoto.

Tingkat kekeruhan lensa dinilai sebagai berikut: (Javadzadeh *et al.*, 2009)

- Tingkat 0 adalah lensa bening normal,
- Tingkat 1 adalah kekeruhan subkapsular;
- Tingkat 2 adalah katarak nuklir;
- Tingkat 3 adalah katarak nuklir yang kuat dengan kekeruhan di daerah perinuklear
- Tingkat 4 adalah kekeruhan padat matang di semua bagian lensa.

3.8.3 Analisa biokimia lensa dan sampel darah dari tikus

Persiapan hemolisis untuk analisis

Setelah pemeriksaan morfologi pada hari 17, darah diambil dari anak-anak tikus dalam 5 kelompok. Dari setiap sampel darah, serum dipisahkan dan hemolisis disiapkan. Persiapan sampel dilakukan pada suhu 4 °C, dan semua sampel disimpan pada suhu -70 °C sampai analisis.

Persiapan lensa untuk analisis.

Setelah diambil darah, anak-anak tikus kemudian dibius dengan ketamine, kemudian dikorbankan dengan dislokasi serviks. Lensa kemudian dilakukan diseksi. Lensa kemudian ditempatkan pada Formalin 10%, dibersihkan dengan xylene, dan diblok dalam parafin. Dengan menggunakan mikrotom parafin bagian koronal dipotong dengan ketebalan 5 mm dan dipasang pada slide yang sudah dilapisi dengan prilysine, kemudian dikeringkan pada 37 °C semalam dalam oven. Enam bagian slide dikumpulkan rata-rata untuk setiap lensa.

3.8.4 Pemeriksaan imunohistokimia GRP78 / BiP

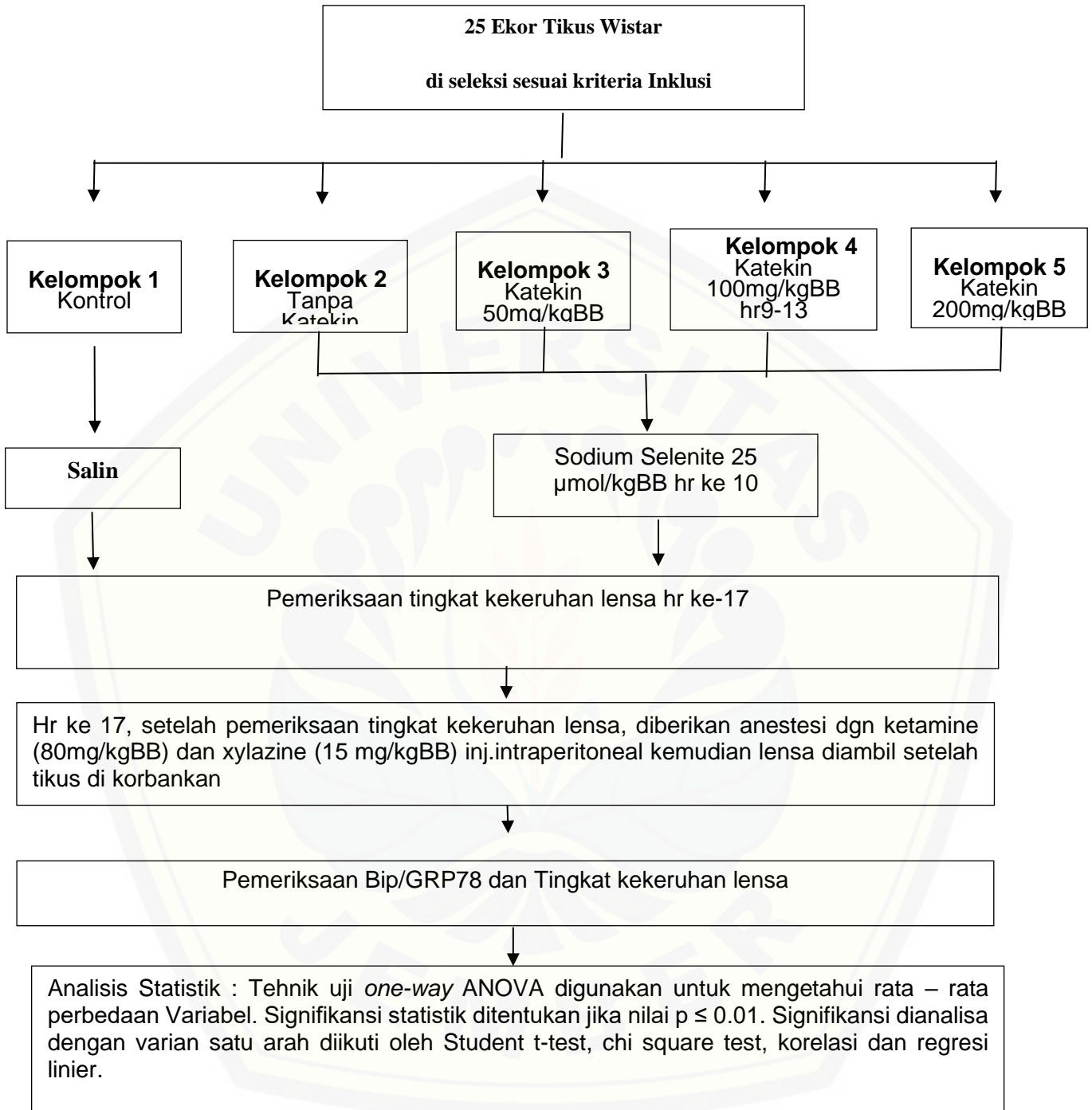
Sel-sel lensa pada kaca penutup, ditempatkan pada formaline 10% pada suhu normal selama 30 menit dan kemudian dicuci dengan PBS (pH 7,4). Dalam rangka meningkatkan permeabilitas, 0,1% sodium sitrat (pH 6,0), yang berisi 0,1% triton X-100, ditambahkan dan dibiarkan bereaksi selama 2 menit. Antibodi primer (mouse monoklonal antibodi), BiP/GRP78, dibiarkan bereaksi pada suhu kamar selama 120 menit dan sel-sel kemudian dicuci dengan PBS. Antibodi sekunder, biotin conjugate (anti mouse), dibiarkan bereaksi pada suhu kamar selama 60 menit, dicuci dengan PBS ditambahkan SA-HARP dan DAB, dan divisualisasikan di bawah mikroskop cahaya (Nikon E-700) dan selanjutnya difoto dengan menggunakan kamera Sony A (FE System).

3. 8.5 Analisa Statistik

Analisa statistik melalui tahapan sebagai berikut:

1. Tehnik uji *one-way* ANOVA digunakan untuk mengetahui rata – rata perbedaan ekspresi BiP/GRP78 dan tingkat kekeruhan lensa.
2. Signifikansi statistik ditentukan jika nilai $p \leq 0.01$.
3. Signifikansi dianalisa dengan varian satu arah diikuti oleh Student t-test, chi square test, korelasi dan regresi linier.

3.9 Alur Penelitian



3.10 Rencana Biaya Penelitian

No	Keterangan	Biaya
1	Persiapan	
	- Administrasi	Rp. 200.000;
	- Hewan coba	Rp. 2.500.000;
	- Alat dan Bahan	Rp. 25.000.000;
2	Proses Penelitian	Rp. 3.000.000;
3	Analisa Laboratorium	Rp. 3.500.000;
4	Penyusunan dan Pengadaan Laporan Hasil Penelitian	Rp. 1.000.000;
5	Seminar Hasil	Rp. 1.000.000;
6	Biaya Lain-lain	Rp. 500.000;
	Total Biaya	Rp. 36.700.000;

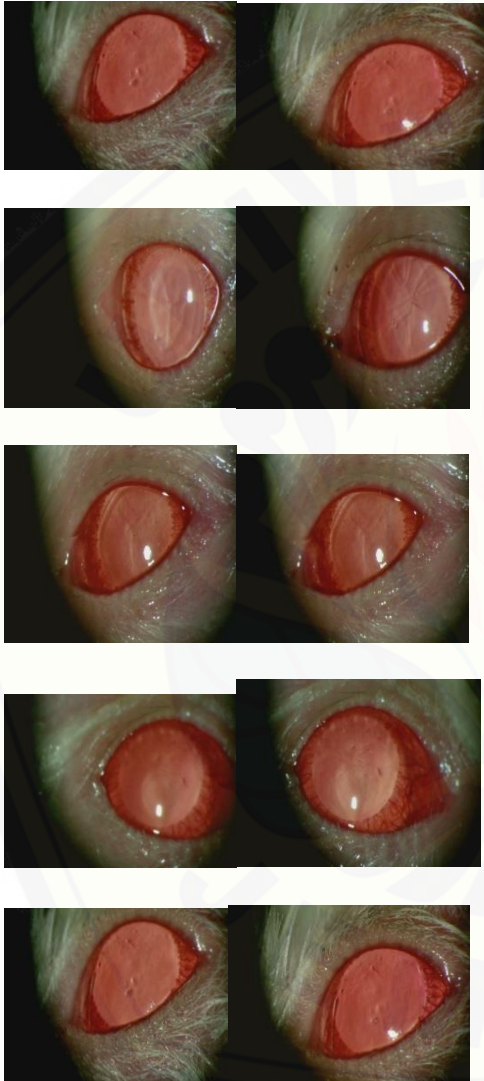
Terbilang : (tiga puluh Enam juta tujuh ratus ribu rupiah)

BAB IV

HASIL PENELITIAN

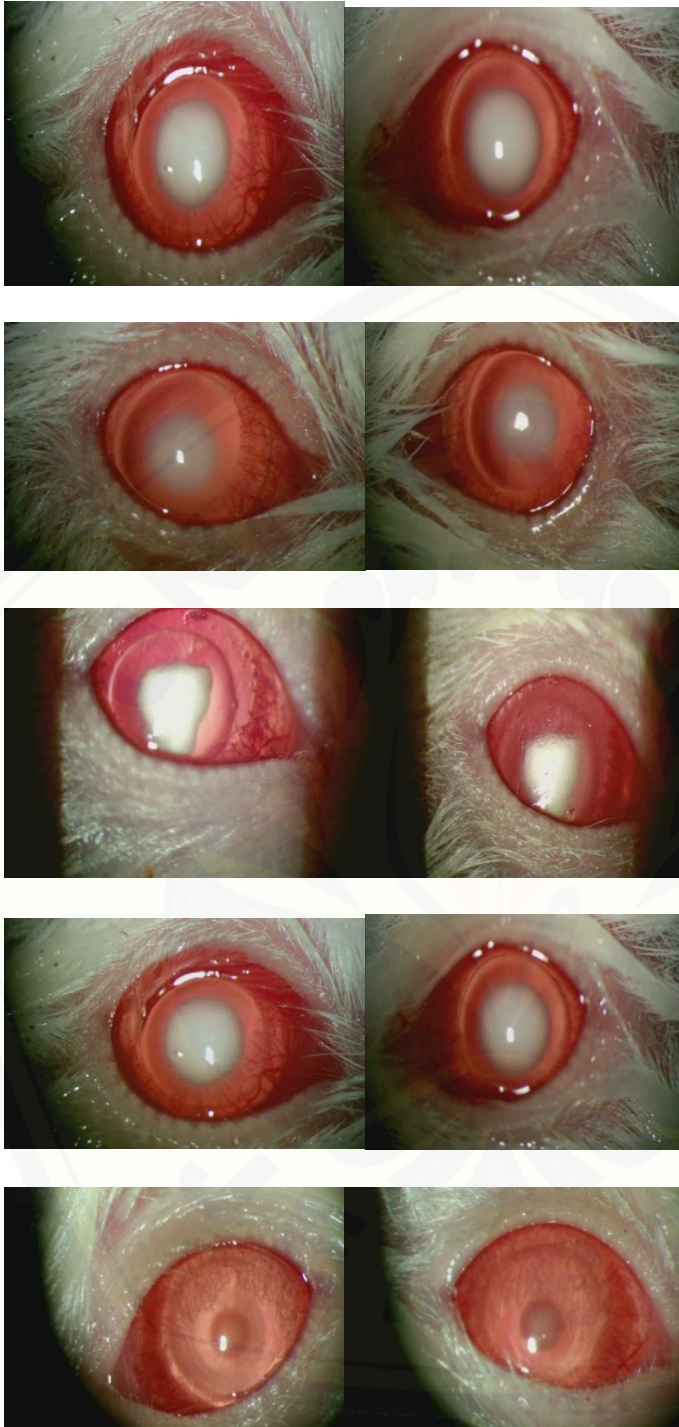
4.1 Hasil pemeriksaan Morfologi dengan Slit Lamp

Kelompok I



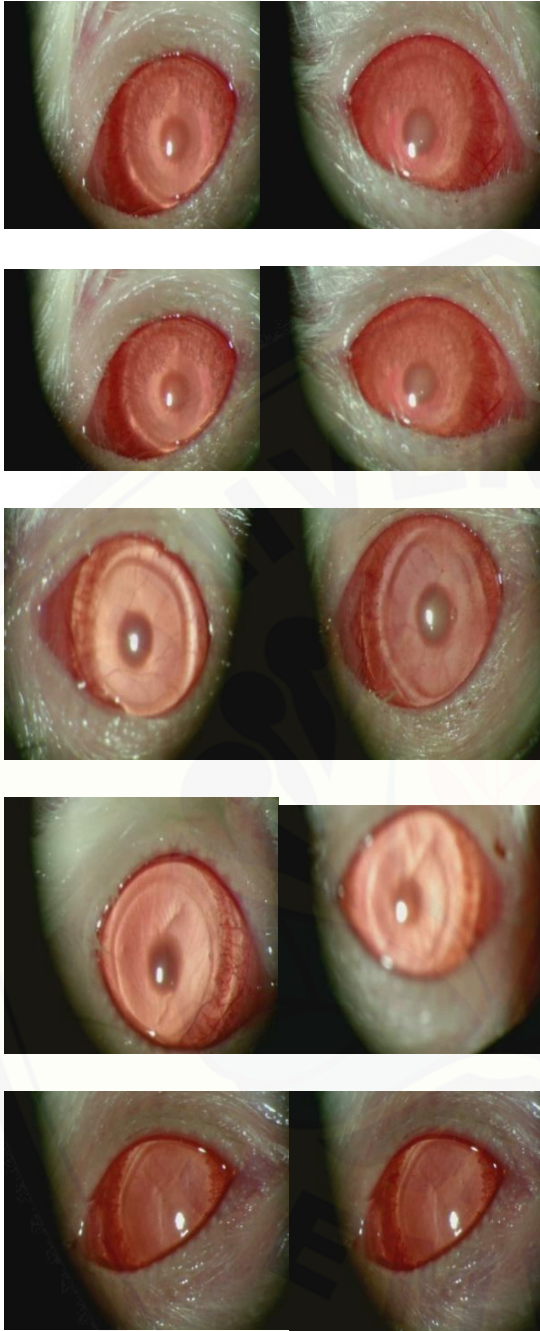
Gambar 4. 1 Semua lensa mata dalam Kelompok I. 100% jernih.

Kelompok II



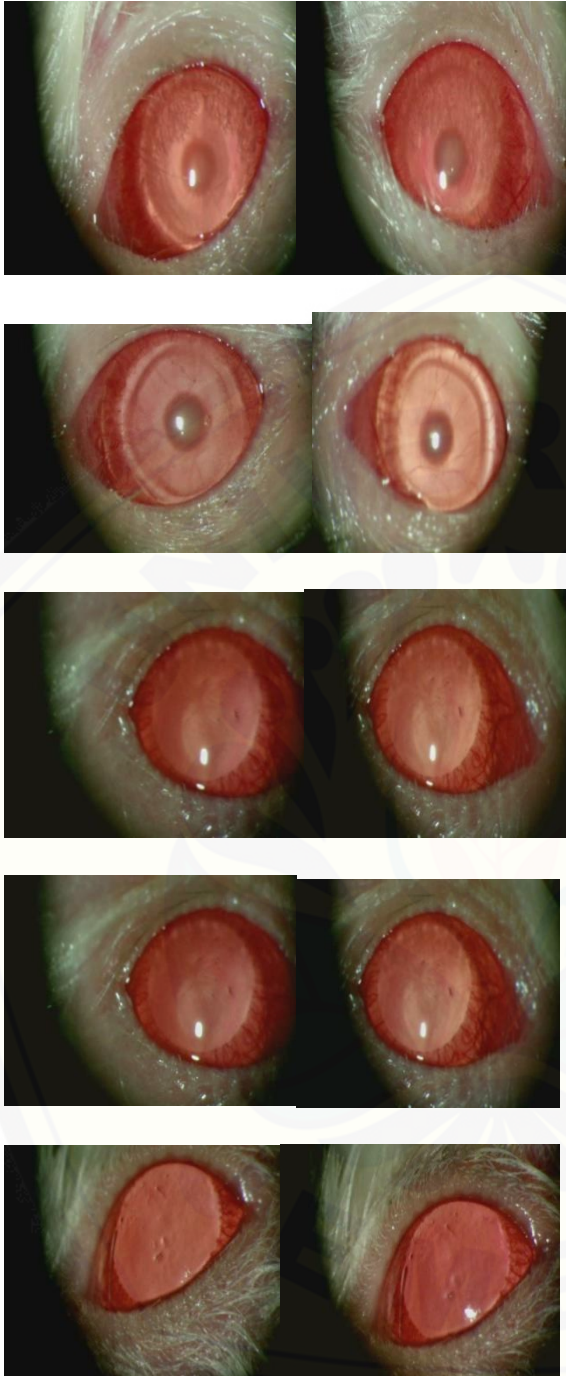
Gambar 4.2 Semua lensa keruh, yang 80% tingkat 4 dan 20% tingkat 3.

Kelompok III



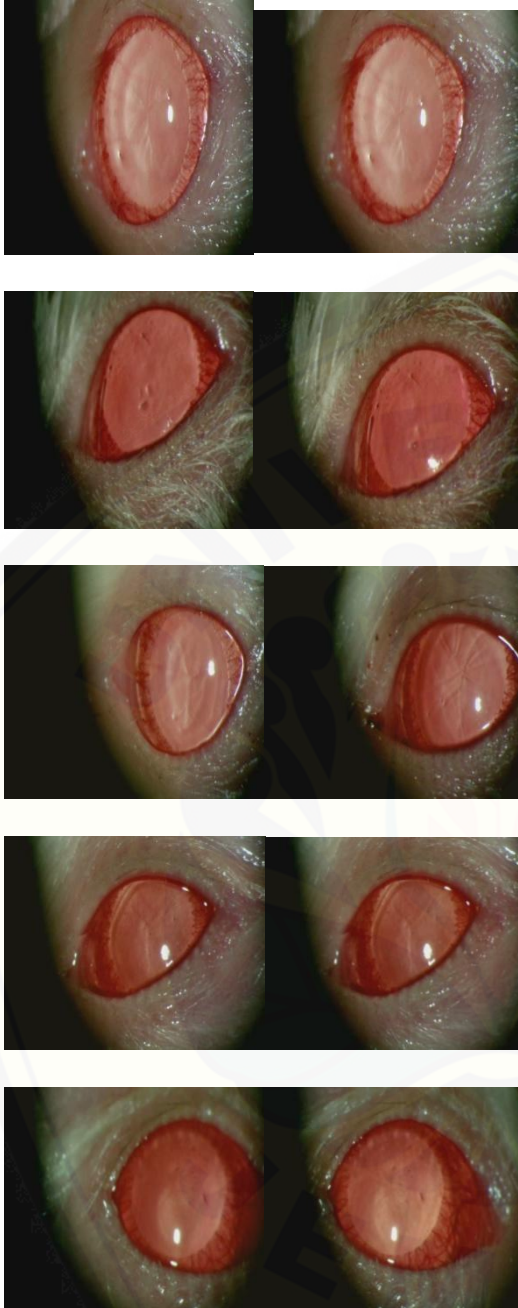
Gambar 4.3 Semua lensa keruh, 40% tingkat 3, 40% tingkat 2, 20% tingkat 1

Kelompok IV



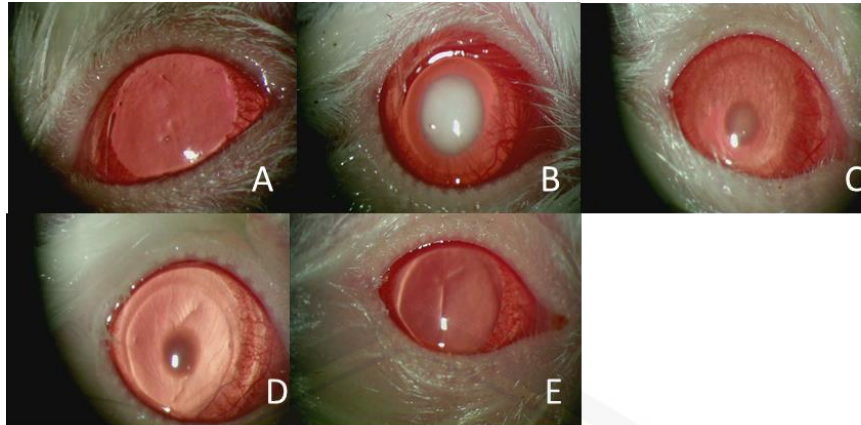
Gambar 4.4 Pada kelompok ini tingkat kekeruhan lensa berkurang; satu tikus dari 5 (20%) katarak tingkat 3, satu tikus dari 5 (20%), katarak tingkat 2 sementara tiga dari lima (60%) tidak terjadi katarak (tingkat 0).

Kelompok V



Gambar 4.5 Pada kelompok ini tingkat kekeruhan pembentukan katarak menurun; hanya satu tikus dari lima (20%) Katarak tingkat 1 sementara empat dari lima (80%) tidak terjadi katarak (tingkat 0).

Tingkat kekeruhan lensa meningkat pada kelompok tikus yang diinduksi katarak dan berkurang tingkat kekeruhannya pada kelompok dengan pemberian katekin. Perubahan kekeruhan lensa dapat diamati pada gambar 4.2. lensa mata pada tikus 4.2B mengalami katarak setelah diberi sodium selenite.



Gambar 4.6 Tingkat Kekeruhan Lensa yang diamati dari pemeriksaan Slit-Lamp

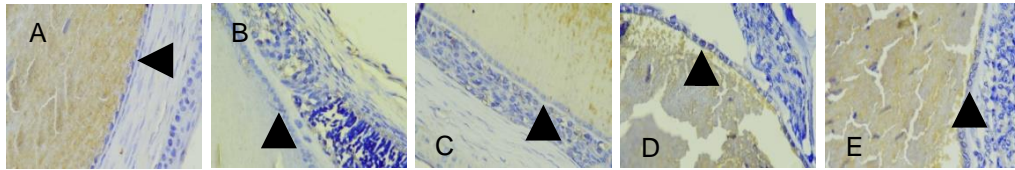
(A) lensa yg jernih (Grade 0) pada kelompok kontrol, (B) Grade IV dalam kelompok hanya diberi natrium-selenit, (C) Grade III dalam kelompok yang diberikan natrium-selenit dan isolat katekin 50 mg / kg kelompok berat badan, (D) kelas II dalam kelompok diberikan natrium-selenite dan isolat katekin 100 mg / kg kelompok berat badan, (E) Grade kelas I dalam kelompok diberikan natrium-selenit dan isolat katekin 200 mg / kg kelompok berat badan. Perbandingan mata kanan dan mata kiri dengan metode korelasi sampel berpasangan tidak signifikan ($p = 0,749$) dan uji sampel berpasangan ($p = 1,00$).

Tabel 4.1. Tingkat kekeruhan lensa di semua kelompok

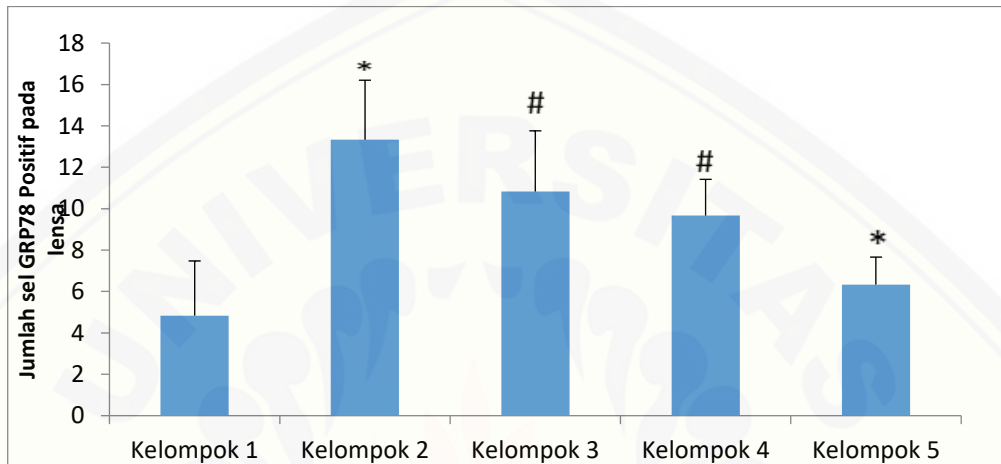
Kelompok Percobaan	Jumlah tikus	Jumlah tikus dengan perbedaan tingkat kekeruhan					Jumlah tikus yang terjadi katarak
		0	+	++	+++	++++	
Kelompok 1 (Normal)	5	5	-	-	-	-	0
Group II (hanya sodium selenite 19 $\mu\text{mol/kg}$)	5	-	-	-	1	4	5 (100%)
Group III (sodium selenite 19 $\mu\text{mol/kg}$ + katekin 50 mg/kg)BB	5	-	1	2	2	-	5 (100%)
Group 1V (sodium selenite 19 $\mu\text{mol/kg}$ + katekin 100 mg/kg)BB	5	2	1	1	1	-	3 (60%)
Group V (sodium Selenite 19 $\mu\text{mol/kg}$ + katekin 200 mg/kg)BB	5	4	1	-	-	-	1 (20%)

Lensa di kedua mata semua tikus kelompok kontrol (Kelompok 1) tetap jernih (Gbr. 4.6.A). Injeksi Na_2SeO_3 subkutan ($19 \mu\text{mol/kg}$) pada hari ke-10 cukup untuk menginduksi pembentukan katarak, yang terlihat pada saat tikus membuka mata. Pemeriksaan morfologi lensa mata tikus dengan mikroskop slit lamp menunjukkan bahwa semua hewan yang disuntikkan hanya dengan Na_2SeO_3 terjadi katarak: satu dari lima (20%) katarak tingkat 3 (Gbr. 4.6 C) dan sisanya dari lima (80%) katarak grade 4 (Gbr. 4.6.B), sedangkan injeksi dengan Na_2SeO_3 dan suntikan katekin 50mg/kg menunjukkan bahwa keparahan pembentukan katarak menurun; dua tikus dari 5 (40%) katarak grade 3 (Gbr. 4.6 C), dua tikus dari 5 (40%) katarak grade 2 (Gbr. 4.6 D) dan satu dari lima (20%) katarak grade 1 (Gbr. 4.6 E) sementara katarak grade 4 (Gbr. 4.6 B) tidak ditemukan. Pada kelompok yang diinjeksi Na_2SeO_3 dan Katekin 100mg / kg tingkat kekeruhan katarak berkurang; satu tikus dari 5 (20%) katarak grade 3, satu tikus dari 5 (20%), katarak grade 2 sementara tiga dari lima (60%) tidak terjadi katarak (grade 0). Pada kelompok yang diinjeksi Na_2SeO_3 dan Katekin 200mg / kg tingkat kekeruhan pembentukan katarak menurun; hanya satu tikus dari lima (20%) Katarak grade 1 sementara empat dari lima (80%) tidak terjadi katarak (Grade 0). Hasil ini menunjukkan bahwa katekin khususnya dosis 200 mg/kg BB , berhasil mencegah pembentukan katarak. Tingkat kekeruhan lensa pada semua kelompok ditabulasikan dalam Tabel 4.1, dan gambaran tingkat kekeruhan dari lampu celah yang diamati dari setiap kelompok ditunjukkan pada Gambar. 2. Tidak ada efek toksik pada kornea atau konjungtiva mata. Perbandingan antar kelompok secara statisti signifikan. Perbandingan antara kelompok 1 dengan kelompok 2 dan 3 adalah signifikan ($p = 0,000, 0,001$) sedangkan kelompok 4 dan 5 tidak signifikan ($p = 0,122, 0,993$). Perbandingan antara kelompok 2 dengan kelompok 1, 4, dan 5 adalah signifikan ($p = 0,000, 0,000, 0,000$) sedangkan kelompok 3 tidak signifikan ($p = 0,022$).

4.2 Hasil Pemeriksaan GRP78



Gambar 4.7 Hasil pemeriksaan GRP78 (A) Kelompok 1, (B) kelompok 2, (C) Kelompok 3, (D) Kelompok 4, (E) Kelompok 5



Keterangan: * Signifikan terhadap kelompok 1, # signifikan terhadap kelompok 2

Gambar 4.8 jumlah sel dengan GRP78 positif rata-rata 7 hari setelah injeksi dalam lima kelompok percobaan

Tingkat rata-rata GRP78 lensa pada kelompok tikus II ($13,33 \pm 2,875$) secara signifikan ($P < 0,001$) lebih tinggi daripada tingkat dalam lensa Kelompok I ($4,833 \pm 2,639$), lensa Kelompok III ($10,833 \pm 2,926$), Kelompok IV ($9,667 \pm 1,751$), dan Kelompok V ($6,333 \pm 1,329$) (Gambar 4.7). Perbedaan yang signifikan juga diamati pada tingkat GRP78 dalam lensa ($P < 0,001$) antara kelompok III dan kelompok I. Tingkat GRP78 pada lensa menurun dan peningkatan tingkat kekeruhan lensa pada kelompok II. Selanjutnya, tingkat GRP78 menurun secara bertahap dan tingkat kekeruhan menurun sesuai dengan pemberian dosis katekin (kelompok III, IV, dan V).

Kadar GRP78 dalam lensa dari kelompok Na_2SeO_3 ditemukan secara signifikan ($p < 0,01$) lebih tinggi daripada lensa dari kelompok kontrol dan kelompok katekin. Pengobatan dengan katekin pada kelompok katekin + Na_2SeO_3 (Gambar 5.6) secara signifikan ($p < 0,01$) menurunkan kadar GRP78.

Dalam penelitian ini pemberian katekin menurunkan kadar BIP/GRP78 yang berarti katekin dapat mencegah katarak dengan menekan atau mengurangi stres retikulum endoplasma.



BAB. V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan antara kadar BiP/GRP78, dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit.
2. Penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh katekin terhadap dosis BiP/GRP78, dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit.
3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa:
 - a. Pemberian dosis 100 mg/BB dan 200 mg/BB Isolat golongan senyawa katekin teh hijau GMB4 terbukti dapat menghambat tingkat kekeruhan lensa;
 - b. Pemberian dosis 50 mg/BB, 100 mg/BB dan 200 mg/BB Isolat golongan senyawa katekin teh hijau GMB4 terbukti dapat meningkatkan ekspresi GRP78;
 - c. Pemberian dosis 100 mg/BB dan 200 mg/BB Isolat golongan senyawa katekin teh hijau GMB4 terbukti dapat menurunkan ekspresi GRP78
 - d. Pemberian dosis 200 mg/BB Isolat golongan senyawa katekin teh hijau GMB4 terbukti dapat menurunkan ekspresi GRP78.

5.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut tentang efektivitas katekin dan profil farmakokinetik dalam mencegah pembentukan katarak.
2. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat membantu mencegah dan mengobati katarak sehingga menurunkan prevalensi katarak dan mengurangi perlunya intervensi bedah. Hal ini akan mengurangi kebutaan dan beban sosial ekonomi di seluruh dunia

DAFTAR PUSTAKA

Addepalli U.K, Khanna R, Rao G.N. 2012. Damage of the ultraviolet on the lens.

International Review of Ophthalmic Optics.

Akharaiyi, F.C, Boboye, B, and Adetuyi, F.C. 2012. Antibacterial, Phytochemical and Antioxidant Activities of the leaf Extracts of *Gliricidia sepium* and *Spathodea Campanulate*. *World Applied Sciences Journal*; 16(4):523530.

Abenggosar A, Arrooyo V.C, Reinoso R, Amelia S, Corell A & Garcia. 2015. In Vitro Model for Predicting the Protective Effect of Ultraviolet- Blocking Contact Lens in human Corneal Epithelial Cell. *Corrent Eye Research*, 40(8) : 792-799.

Adhikary B, Kumar Yadav S, Roy K, Sandip K B & Subrata C. 2011. Black Tea and Theaflavins Assist Healing of Indomethacin-Induced Gastric Ulceration in Mice by Antioxidative Action. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011:1-11

Akamatsu K., Shibata M.-A., Ito Y., Sohma Y., Azuma H., Otsuki Y. 2009. Riluzole induces apoptotic cell death in human prostate cancer cells via endoplasmic reticulum stress. *Anticancer Res.* 29:2195–2204.

Alipoor & Rad. 2012. A Review on The Therapeutical Effects of Tea. *Asian Journal of Clinical Nutrition.* 4 (1):1-15.

American Academy Of Ophthalmology (AAO). 2011. Lensa and Cataract. *Basic and Clinical Science Course.*

Anggraini, H. 2011. Pengaruh Pemberian Jus Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L) Terhadap Nitric Oxide (NO) Dan Reactive Oxygen Intermediate (ROI) Makrofag Tikus Yang Terpapar Asap Rokok The Effect Of Noni Juice (*Morinda Citrifolia* L) On Nitric Oxide (NO) And Reactive Oxygen Intermediate (ROI) Macrophages On Mice Exposed To Cigarette Smoke Doctoral dissertation, Diponegoro University.

Aswaty Nur, Retty Ratnawati, Diana L. 2018. Catechin of GMB4 Inhibits Adipogenesis Throug PPARy and Adiponectin in Primary Culture of Viscerai Preadipocyte of *Rattus Norvegicus* Wistar. *Research Journal of life Science*. Vol 5 (54-65).

Aude Bressonot, Sophie M, Lina B, Julie G and Francois G. 2009. Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase 3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells and Spheroid and subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. *The Histochemical Society Inc*, Vol 57(4):2289-300.

Ayala, M., Strid, H., Jacobsson, U., & Söderberg, P. G. 2007. P53 Expression and Apoptosis in the Lens After Ultraviolet Radiation Exposure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48 : 4187–4191.

Back, S.H.; Kaufman, R.J. 2012. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Ann. Rev Biochem.* 81,767.

Baldrige R.D., Rapoport T.A. 2016. Autoubiquitination of the hrd1 ligase triggers protein retrotranslocation in erad. *Cell*. 166:394–407. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.048.

Banerjee A., Ahmed H., Yang P., Czinn S.J., Blanchard T.G. 2016. Endoplasmic reticulum stress and ire-1 signaling cause apoptosis in colon cancer cells in response to andrographolide treatment. *Oncotarget*.

Basova LV, Kurnikov IV, Wang L, Ritov VB, Belikova NA, Vlasova II, Pacheco AA, Winnica DE, Peterson J, Bayir H, Waldeck DH, Kagan VE. 2010. Evaluating Cytochrome C Diffusion In The Intermembrane Spaces Of Mitochondria During Cytochrome C Release. *Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London*, 21 (5): 618-626

Basova LV, Kurnikov IV, Wang L, Ritov VB, Belikova NA, Vlasova II, Pacheco AA, Winnica DE, Peterson J, Bayir H, Waldeck DH, Kagan VE. 2010. Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry*, 46:3423

Beebe, David C. Nancy M. Holekamp. Ying-Bo Shui. 2010. Oxidative Damage and The Prevention of Age Related Cataracts. Washington University: *Ophthalmology and Visual Science and Cell Biology and Physiology*.

Belyaeva E & Nils-Erik L. 2011. Mechanism (s) of Toxic Action of Zn²⁺ and Selenite: A Study on As-30D Hepatoma Cell and Isolated Mitochondria. *Hindawi Publishing Corporation*. Doi:10.1155/387297

Berthoud V. M & Beyer E. C. 2009. Oxidative Stress, Lens Gap Junctions, and Cataracts. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11(2): 339-353

- Bezkorovaina, I.M & Steblovska. 2018. Assessing the efficacy of surgical treatment for age-related cataract through risk factor analysis. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*, Number 1 (480).
- Bhat T, Ajay K, Chaudhary, Sandeep K, Jordan O & Josep I. 2017. Endoplasmic Reticulum-mediated Unfolded Protein response and Mitokondrial apoptosis in cancer. *Biochim Biophys Acta*;56-66.
- Bintang, M. 2018. Biokimia Teknik Penelitian. Edisi Kedua. Penerbit Erlangga:PT. Gelora Aksara Pratama.
- Boyce M, Marta M, Benedicte And junying Y. 2017. Endoplasmic Reticulum stress Response In Cell Death and Cell survival. *Pennsylvania State Universty*:doi.10.1017/CB09780511976094.006.
- Brahma S, Sharmila S, & Rakesh.2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*; 82(12): 1807–1821.
- Cao S.S., Kaufman R.J. 2014. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid. Redox Signal.* 21:396–413.
- Cao S.S., Zimmermann E.M., Chuang B.M., Song B., Nwokoye A., Wilkinson J.E., Eaton K.A., Kaufman R.J. 2013. The unfolded protein response and chemical chaperones reduce protein misfolding and colitis in mice. *Gastroenterology.* 989–1000.
- Castillero E., Akashi H., Pendrak K., Yerebakan H., Najjar M., Wang C., Naka Y., Mancini D., Sweeney H.L., Jeanine D. 2015. Attenuation of the unfolded

protein response and endoplasmic reticulum stress after mechanical unloading in dilated cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309:H459–H470.

Cedric O, Erik D, Carlson, Teresa, Tanja F, Michael C & alexander. 2015. Protein synthesis by ribosomes with terhered subunits. *Researchgate Letter:doi:10.1038/nature14862.*

Chong W C, Madhur D Shastri, and Rajaraman E. 2017. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology. *Int J Mol Sci*; 18(4): 771 doi: 10.3390/ijms18040771.

Chacko, Sabu M, Priya T. Tambi, Ramadasan Kutan, Ikuo Nishigaki. 2010. Beneficial Effects of Green Tea: A Literature Review. *Chacko et al. Chinese Medicine* 5:13.

Chapple IL, Matthews JB. 2007. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology* 2000.43:160–232.

Chandler H. L, Reuter K. S, Sinnott L. T & Nichols J. J. 2010. Prevention of UV-Induced Damage to the Anterior Segment Using Class I UV-Absorbing Hydrogel Contact Lenses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51 (1): 172-178

Chen B Y, Cheng Lin, Chen S, Ling C, Yung W, Hsin C. 2011. Dietary zerumbone prevents against ultraviolet B-Induced Cataractogenesis in the mouse. *Molekular Vision*. 17: 723-730.

- Chong W., Gundamaraju R., Vemuri R., Scotti M., Scotti L. 2017. Momordicacharantia: A new strategic vision to improve the therapy of endoplasmic reticulum stress. *Curr Pharm Des*.
- Cullinan SB, Diehl JA. 2016. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 38:317–332.
- Del Puerto HL, Martins AS, Milsted A, Souza-Fagundes EM, Hissa B, Andrade LO, Alves F, Rajão DS, Leite RC, and Vasconcelos AC, 2011. Canine distemper virus induces apoptosis in cervical tumor derived cell lines. *Virology Journal*, 8 (334): 1-7.
- De Mejia, E. G., Ramirez-Mares, M. V. and Puangpraphant, S. 2009. Bioactive components of tea: Cancer, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*. 23:721–731.
- Demir,L,Togar, B. Turkez H, Sozio, Aslan A & Stefano A.D. 2015. The Investigation of Cytogenetic and Oxidative Effects Of Diffractaic Acid on Human Lymphocyte Cultures. *Braz Arch Biol.Technol*, 58(1):75-81.
- Dewi MR, Santyowibowo S, dan Yuliyani. 2010. Constraints and Supporting Factors to Access Free Cataract Surgery. *Journal Oftalmologi Indonesia*. 7(4): 144-149
- Dicks N., Gutierrez K., Michalak M., Bordignon V., Agellon L.B. 2015. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. *Front. Oncol*. 5:11.

Dubey, S., Sudipta S and Shubhini A. 2014. In Vitro anti-cataract Evaluation of standardised Abies pindrow leaf extract using isolated goat lenses. *Natural Product Research*:10.1080/14786419.19.2014.980250.

Dorjgochoo, T, Bing Xiang, Y., Long J, Shi Jiajun, Deming S & Ou Shu X. 2013. Association of Genetic Markers in the BCL-2 Family of Apoptosis-Related Genes with Endometrial Cancer Risk in A Chinese Population. *Plos ONE*, 8(4):1-9.

Dong X. 2005. Safety limit estimation for cataract induced by ultraviolet radiation. Theses. *Universits servise US AB*. Sweden

Elanchezhian R, Palsamy P, Madson CJ, Lynch DW, Shinohara T. 2012. Age-related cataracts: homocysteine coupled endoplasmic reticulum stress and suppression of Nrf2-dependent antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 200:1–10.

Elanchezhian R, Palsamy P, Madson CJ, Mulhern ML, Lynch DW, Troia AM, Usukura J, Shinohara T. 2012. Low glucose under hypoxic conditions induces unfolded protein response and produces reactive oxygen species in lens epithelial cells. *Cell Death Dis*. 3:e301.

Eri R., Adams R., Tran T., Tong H., Das I., Roche D., Oancea I., Png C.W., Jeffery P., Radford-Smith G.L. 2011. An intestinal epithelial defect conferring ER stress results in inflammation involving both innate and adaptive immunity. *Mucosal Immunol*. 4:354–364.

Fabienne H, Francois H, Mouboul A, Sylvie F, Dominique A, Vuitton, Jean Luc P, & Christiane M. 2013. Isoliquiritigenin Induces Caspase-Dependent

Apoptosis Via Downregulation Of HPV16 E6 Expression in Cervical Cancer Ca Ski Cells. *Planta Med*;79:1628-1635.

Galichanin, K., Löfgren, S., Bergmanson, J., & Söderberg, P. 2010. Evolution of damage in the lens after in vivo close to threshold exposure to UV-B radiation: Cytomorphological study of apoptosis. *Experimental Eye Research*, 91(3) : 369–377.

Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Vandenabeele P., Krysko D.V., Agostinis P. 2012. ER stress-induced inflammation: Does it aid or impede disease progression? *Trends Mol. Med.* 18:589–598.

Goyal MM, Vishwajeet P, Mittal R, and Sune P. 2010. A Potential Correlation between Systemic Oxidative Stress and Intracellular Ambiance of the Lens Epithelia in patients with cataract. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* :4: 2061-2067.

Green, Douglas. 2011. Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.* ISBN 978-0-87969-888-1.(5th ed.). p. 1115;*Garland Science.*

Grootjan, J.; Kaser, A.; Kaufman, R.J.; Blumberg, R.S. 2016. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 469-484.

Guan L, Han B, Li Z, Hua F, Huang F, Wei W, Yang Y, Xu C. 2009. Sodium selenite induces apoptosis by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Springer Link Apoptosis*; 14:218–225.

Gullapalil N, Khanna R, Payal A. 2011. The Global burden of cataract. *Curr Opin Ophthalmol*: 22:4-9.

Gupta, J., Siddique, Y. H., Beg, T., Ara, G. and Afzal, M. 2009. Protective role of green tea extract against genotoxic damage induced by anabolic steroids in cultured human lymphocytes. *Biol. Med.* 1(2):87–99.

Gupta Varun B, Rajagopala M & Ravishangkar B. 2016. Etiopathogenesis of cataract An appraisal. *Indian Journal Of Ophthalmology*: 62 (2): 103–110

Hagiwara M., Nagata K. 2012. Redox-dependent protein quality control in the endoplasmic reticulum: Folding to degradation. *Antioxid. Redox Signal.* 16:1119–1128.

Hafiz M, Geum H, Hyung R & Han J. Edoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. 2016. *International Journal of Molecular Sciences*:327;doi:3390/ijms17030327.

Halliwell B & Gutteridge, J.M.C., 2015. Free Radical in Biologi and Medicine, fifth edition. Oxford University Press, ISBN: 9780198717485, page:1-15. *Great Clarendon Street, Oxford, OX2 6DP:United Kongdom.*

Halliwell B. 2007. Biochemistry of Oxidative Stress. *The Authors J Complilation: Biochemical Society Transactions*, 35(5):1147-1150

Handayani, N. Hidayat S., Permatasari N., & Achmad R. 2019. Niacin Regulates Glucose Reactive Protein (GRP78), Protein Carbonyl Cotent (PCC) and Malondialdehyde (MDA) in the Hyperglycemic Human Lens Epithelial Cell. *Pharmacogn J*; 11 (1):08-11.

Hasanain M., Bhattacharjee A., Pandey P., Ashraf R., Singh N., Sharma S., Vishwakarma A., Datta D., Mitra K., Sarkar J. 2015. A-solanine induces ROS-mediated autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress and inhibition of akt/mTOR pathway. *Cell Death Dis.* 6:e186.

Hasnain S.Z., Lourie R., Das I., Chen A.C., McGuckin M.A. 2012. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunol. Cell Boil.* 90:260–270.

Hayes JD, McMahon M. 2009. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci.* 34:176–188.

Hemalatha, K. and S. Venkatesan, 2011. Impact of iron toxicity on certain enzymes and biochemical parameters of tea. *Asian J. Biochem.*, 6: 384-394.

Henriksen E.J., Diamond-Stanic M.K., Marchionne E.M. 2011. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 51:993–999.

Hosoi T., Ozawa K. 2010. Endoplasmic reticulum stress in disease: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin. Sci.* 118:19–29.

Huang F, Nie C, Yang Y, Yue W, Ren Y, Shang Y, Wang X, Jin H, Xu C, Chen Q. 2009. Selenite induces redox-dependent Bax activation and apoptosis in colorectal cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 46:1186–1196.

Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (6): 735–45.

- Jamwal. V S, Saurabh M, Singh A, Kumar R. 2014. Free Radical Scavenging and Radioprotective Activities of Hydroquinone in Vitro. *Journal of Radioprotection Research*: 3 : 37-45.
- Jayakerthana, S. 2016. Benefits of Green Tea: A Review. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. Vol 8(10): 1184-1187.
- Javadzadeh, A., Amir, G., Somayeh, B., Mohammad, R. R., Mehran, M., Nadereh, R., and Hassan, A. 2009. Preventive Effect of onion juice on selenite-induced experimental cataract. *Indian J Ophthal Mol*:57. 185-189.
- Ji, Y., Rong, X., Li, D., Cai, L., Rao, J., & Lu, Y. 2016. Inhibition of Cartilage Acidic Protein 1 Reduces Ultraviolet B Irradiation Induced-Apoptosis through P38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Jun Amino-Terminal Kinase Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39 (6) : 2275–2286.
- Ji Y, Cai L, Zheng T, Ye H, Rong X, Rao J, Lu Y, 2014. The Mechanism of UVB Irradiation Induced-Apoptosis In Cataract. *Med Cell Bioshem*, 401 : 87-95.
- Jiang, Lijing. 2011. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications n Tissue Kinetics," by J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie and A. R. Currie. *Embryo Project Encyclopedia*.
- Jiang, Licheng., Shengyun H., Wengang I., Dongsheng Z., Shinzhou Z., Weidong Z Peihui Z And Zhanwei C. 2012. Expression of autophagy and ER stress-relatedbproteins in primary salivaryadenoid cystic carcinoma. *Pathology- Research and Practice*:635-641.

Kanwar J, Tasken M, Mohammad, Huo, Chan. 2012. Recent advances on Tea Polyphenols. Qing Pinq Dou, The Developmental Therapeutics Program, Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, Departement of Oncology, school of Medicine, Wayne State Universty: *Front Biosci (Elite Ed)* :4 :111-131.

Kate L, Moreau & Jonathan A king. 2012. Protein Misfolding and Aggregation in Cataract Disease and Prospects for Prevention. *Trends Mol Med.* 273-282.

Kaira, Kyoichi, Minoru Toyoda, Akira Shimiza, Massato S, Koichi S, Yukihiro T, Katsumasa T. 2015. Expression of ER Stress marker (GRP78/BiP and PERK) In Adenoid cystic carcinoma. *Acta OTO- Laryngologica*:1-7.

Kaira, Kyoichi, Minoru Toyoda, Akira Shimiza, Moris, Shino, Sakakura, Takayasu, Takahashi, Oyama, Asaoi, 2016. Expression of ER Stress marker (GRP78/BiP and PERK) In Patients with tongue cancer. *Neoplasma*:63, doi 10.4149/neo_412.

Kadiiska, MB., Gladen, BC., Baired, DD., Germalee, D., Graham, LB., Parker, CE. 2005. Biomarker oxidative stress study II : are oxidation products of lipids, proteins, proteins and DNA markers of CCI 4 poisoning?. *Free Radic Biol Med.* 38 (6) : 698-710.

Kazuki I, Norihiro M, Hiroshi Y, Daisuke F And Koji K. 2018. Effects of Tea Catechins on Alzheimer's Disease. *Recent Updates and Perspectives. Molecules*: 2357; doi:10.3390.

- Khairallah M, Kahlount R, Bourne R, Flaxman & Taylor H. 2016. Number of People Blind or Visually Impaired by Cataract Worldwide and in world Regions, 1990 to 2010. *Invest Ophthalmol Vis Sci*:56 : 6762-6769.
- Khalil, M. I. M., Ibrahim, M. M., El-Gaaly, G. A., & Sultan, A. S. 2015. Trigonella foenum (Fenugreek) induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line, HepG2, mediated by upregulation of p53 and proliferating cell nuclear antigen. *BioMed Research International*,1-11.
- Khan N & Mukhtar H. 2013. Tea and health: studies in humans. *Curr Pharm.* 19: 6141–6147.
- Kim M.-K., Kim H.-S., Lee I.-K., Park K.-G. 2012. Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: A review. *Exp. Diabetes Res.*
- Kimball J. 2009. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. Faculty of Medicine, Laboratory of Experimental Hematology, Antwerp University Hospital, University of Antwerp; Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN.
- Kim, S. & Koh, J. 2011. Mechanisms of apoptosis on human lens epithelium after ultraviolet light exposure. *Korean Journal Ophthalmology.* 25(3): 196-201.
- Kober L., Zehe C., Bode J. 2012. Development of a novel ER stress based selection system for the isolation of highly productive clones. *Biotechnol. Bioeng.* 109:2599–2611.
- Kroeger, H., Chieh, C., Julia., F. Amanda, N., and Jonathan, H. 2018. ER stress and unfolded protein response in ocular health and disease. *The FEB Journal*:399-412.

Kronschläger, M., Talebizadeh, N., Yu, Z., Meyer, L. M., & Löfgren, S. 2015. Apoptosis in Rat Cornea After In Vivo Exposure to Ultraviolet Radiation at 300 nm. *Cornea*, 34 (8), 945–949.

Kronschlager, M., Talebizadeh, N, Yu,Z, Meyer, LM, And Löfgren. 2012. Protective Effect of the Thioltransferase Gene In vivo UVR-300 nm Induced Cataract. *IOVS*.53(1) :248-252.

Kroemer G & Eileen W. 2010. Autophagy for the avoidance of degenerative, inflammatory, infectious, and neoplastic disease. *Curr opin Cell biol*; 121-123.

Kyselova, Z. 2010. Different Experimental approaches In modelling Cataractogenesis. *Interdisc Toxicology*. Vol 3(1) 3-14.

Lan Li, Q. Yang Zhang H, Jie Q. Y, Li Meng Q, Lei Yao & Ke Guo H. 2016. MicroRNA-34a promoting apoptosis of human lens epithelial cells through down-regulation of B-cell lymphoma-2 and silent information regulator. *Int J Ophthalmol*. 9(11): 1555–1560

Lee, C.M., and Afshari, N.A., 2017, The global state of cataract blindness, *Curr Opin Ophthalmol*. 28(1):98-103.

Lee, SM, Il-Gyu Ko, Eun Kim, Hee Kim, Nam Kang. 2010. Protective Effect of catechin on Apoptosis of Lens Epithelium in Rats with N-methyl-N-nitrosourea-induced Cataracts. *Korean Journal Ophthalmol*. 24(2):101-107.

Lee W, Wells T, and Kantorow M. 2007. Localization and H₂O₂- specific induction of PRDX3 in the eye lens. *Mol Vis*. 13: 1469–1474.

- Li G., Scull C., Ozcan L., Tabas I. 2010. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and p38 activation to induce apoptosis. *J. Cell Biol.* 191:1113–1125.
- Lim, S. A., Joo, C. K., Kim, M. S., & Chung, S. K. 2014. Expression of p53 and caspase-8 in lens epithelial cells of diabetic cataract. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 40 (7) :1102–1108.
- Lin, H., Wang, H., Ding, H., Chen, Y. L. & Li, Q. Z. 2009. Prediction of Subcellular Localization of Apoptosis Protein Using Chou's Pseudo Amino Acid Composition. *Acta Biotheoretica*. 57: 321-330.
- Liu H, Smith AJ, Lott MC, Bao Y, Bowater RP, Reddan JR, Wormstone IM. 2013. Sulforaphane can protect lens cells against oxidative stress: implications for cataract prevention. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54:5236–5248.
- Lombardo Bedran TB, Morin M-P, Palomari Spolidorio D, Grenier D. 2015. Black Tea Extract and Its Theaflavin Derivatives Inhibit the Growth of Periodontopathogens and Modulate Interleukin-8 and β -Defensin Secretion in Oral Epithelial Cells. *PLoS ONE* 10 (11): 1-11.
- Lu W., Hagiwara D., Morishita Y., Tochiya M., Azuma Y., Suga H., Goto M., Banno R., Sugimura Y., Oyadomari S. 2016. Unfolded protein response in hypothalamic cultures of wild-type and *atf6 α* -knockout mice. *Neurosci. Lett.* 612:199–203.
- Madany, J. 2016. Serum malondialdehyde level and activity of total antioxidant status of dogs with age-related cataract. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19 (2):429–431.

- Maddirala Y, Skakila T, Humeyra, & Nuran E. 2017. Prevention and reversal of selenite-induced Cataract by N-acetylcysteine amide in Wistar rats. *BMC Ophthalmology*;1186-12886.
- Maki, K. C., Reeves, M. S., Farmer, M., Yasunaga, K., Matsuo, N., Kat-suragi, Y., Komikado, M., Tokimitsu, I., Wilder, D., Jones, F., Blumberg, J. B. and Cartwright, Y. 2009. Green tea catechin consumption enhances exercise-induced abdominal fat loss in overweight and obese adults. *J. Nutr.* 139:264–270.
- Mahalingan S, Philip A, Archana Teresa, Muniyandi A Pitchairaj G. 2016 Regulatory effect of Regulatory effect of chrysin on expression of lenticular calcium transporters, calpains, and apoptotic-cascade components in selenite-induced cataract: *Molecular Vision.* 22:401-423.
- Martinus, BA, Arel A & Gusman A. 2014. Perbandingan Kadar Fenolat Total Dan Aktivitas Antioksidasin pada Ekstrak Daun teh (*Camelia Sinensis*) L .O.K dari Kayu Aro dengan produksi teh hitamnya yang telah beredar. Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Perintis Padang: *Scientia.4 (2): 75-80* Vol. 4 no. 2
- Marek K, Boguslaw L & Stanislaw B. 2017. Application of Sodium Selenite in the Prevention and Treatment of Cancers. *Cells*;doi:10.3390/cells6040039.
- Mazzanti, G., Menniti-Ippolito, F., Moro, P. A., Cassetti, F., Raschetti, R., Santuccio, C. and Mastrangelo, S. 2009. Hepatotoxicity from green tea: A review of the literature and two unpublished cases. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 65:331–341

McGuckin, M.A.; Eri, R.D.; Das, I.; Lourie, R.; Florin, T.H. 2010. Er stress and the unfolded protein response in intesnital inflamation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G820-G832.

Mcllwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. 2015. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4):1-28.Characterization and Genetic Modulation of Lens Sensivity to Oxidative Stress.

Michael, R. Bron, A. J. 2011. The Ageing Lens and Cataract: A Model of Normal and Pathological Ageing. *Phill Trans R. Soc. B.* 366:1278-1292.

Mirzayans, R., Andrais, B., Kumar, P., & Murray, D. 2016. The Growing Complexity of Cancer Cell Response to DNA-Damaging Agents : Caspase 3 Mediates Cell Death or Survival ?. *Int J Mol Sci.* 17(5):1-17

Miyoshi N, Monira Pervin, Takuji S, Keiko U, Mamoru, and Nakamura. 2015. Green tea catechins for well-being and therapy:prospect and opportunities.*Botanics: Targets and Therapy*, 85-96..

Mohan S, Bustamam A, Abdelwahab SI, Al-Zubairi AS, Aspollah M, Abdullah R, Elhassan MM, Ibrahim MY, Syam S. 2010. Typhonium flagelliforme induces apoptosis in CEMss cells via activation of caspase-9, PARP cleavage and cytochrome c release: Its activation coupled with G0/G1 phase cell cycle arrest: *Journal of ethnopharmacology.* 131(3):592-600.

Mo'otapu S. 2015. Faktor-Faktor yang Berhubungan Dengan Kejadian Penyakit Katarak Di Poli Mata RSUP Prof. Dr. R.D KANDOU MANADO. *e-Journal Keperawatan.* 3(2): 1-6

Monira P, Keiko U, Tomokazu O, Hiroki T, Noriyuki M & Yoriyuki. 2018. Beneficial Effect of Green Tea Catechin on Neurodegenerative Disease. 2018 . *Molecular*; doi. 3390/molecular23061297.

Nagao, T., Meguro, S., Hase, T., Otsuka, K., Komikado, M., Tokimitsu, I., Yamamoto, T. and Yamamoto, K. A. 2009. Catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)*. 17:310–317.

Nurhidayah bt. Pazil, S. 2009. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Pisang Raja (*Musa AAB 'Pisang Raja'*) dengan Vitamin A, Vitamin C dan Katekin Melalui Penghitungan Bilangan Peroksida. *Fakultas Kedokteran: Universitas Indonesia*.

Okda, E. A. El, M.M.Mohamed, E.B, Shaheed, A.R. Abdel Moemin. 2016. Switching to Instan Black Coffee Modulates Sodium Selenite-Induced Cataract in Rats. *GMS German Medical Science*; Vol. 14.

Ozcan L., Tabas I. 2012. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Ann. Rev. Med.* 63:317.

Palsamy P, Ayaki M, Elanchezhian R, Shinohara T. 2012. Promoter demethylation of Keap1 gene in human diabetic cataractous lenses. *Biochem Biophys Res Commun.* 423:542–548.

Palsamy P, Bidasee KR, Ayaki M, Augusteyn RC, Chan JY, Shinohara T. 2014. Methylglyoxal induces endoplasmic reticulum stress and DNA demethylation in the Keap1 promoter of human lens epithelial cells and age-related cataracts. *Free Radic Biol Med.* 72C:134–148.

Palsamy P, Bidasee KR, Shinohara T. 2014. Valproic acid suppresses Nrf2/Keap1 dependent antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap1 promoter DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res*.

Palsamy P, Keshore R and Toshimichi S. 2014. Selenite Cataract: Activation of endoplasmic reticulum stress and loss of Nrf2/keap1-dependent stress Protection. Departement of Ophthalmology and Visual Science, Biochim Biophys Acta:1794-1805.

Pasikova,NV., Bikbulatova & Bikbov. 2015. Phacoemulsification of Cataract in Patients Undergone Anterior Radial Keratotomy. *clinical medicine*;DOI: 10.17691/8.2.09

Palsamy P & Shinohara T. 2017. Age-related cataracts: Role of unfolded protein response, Ca²⁺ mobilization, epigenetic DNA modifications, and loss of Nrf2/Keap1 dependent cytoprotection. *Progress in retinal and Eye Research*.1-19.

Peristiowati, Y. 2017. Protective Effects Of Catechin Isolate From GMB4 Clone Green tea Against EPC In Type 2 Diabetes Mellitus. STIKes Surya Mitra Husada Kediri: Jurnal Ners Vol 12 No. 2, 247-252.

Petrash JM. 2013. Aging and age-related diseases of the ocular lens and vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54 ORSF54-59.

Pendyala G, Biju Thomas, & Suchetha Kumari. 2008. The Challenge Of Antioxidants to Free Radicals In Periodontitis. *Journal of Indian Society Of Periodontology*.12(3) : 79-83.

Pescosolido N, Barbato A, Giannotti, Chiara K, Lenarduzzi. 2016. Age-related change in the kinetics of human lenses: prevention of the cataract. *Int J Ophthalmol.* 9 (10) :1506-1517.

Plaisance, V.; Brajkovic, S.; Tenenbaum, M.; Favre, D.; Ezanno, H.; Bonnefond, A.; Bonner, C.; Gmyr, V.; Kerr-Conte, J.; Gauthier, B.R. 2016. Endoplasmic reticulum stress links oxidative stress to impaired pancreatic β -cell function caused by human oxidized ldl. *PLoS ONE.* e0163046.

Pollreisz, A and Schmidt-Erfurth, U. 2010. Review Article Diabetic Cataract Pathogenesis, Epidemiology and Treatment, *Journal of Ophthalmology*; 2010:1-8.

Purboyo A. 2009. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (Psidium guajava L.) pada kelinci yang dibebani glukosa. Tesis: Surakarta

Rafansson V, Olafsdottir E, Hrafnkelsson J, Sasaki H, Arnarsson A, Jonasson F. 2005. Cosmic radiation increases the risk of nuclear cataract in airline pilots: a population-based case-control study. *Arch Ophthalmol.* 123:1102–1105.

Rajan E, Palsamy P, Christian J, Madson, Micheal L, Mulhern, David W, Lynch M, Thomas W, Toshimichi. 2011. Age-Related Cataracts: Decrease in Nrf2/Keap 1 Mediated Antioxidant Protection by Unfolded Protein Response or Epigenetic Repression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* Vol. 52, 5289. doi.

Renyi Wu, Jin Wang, Mitchell P, Ecosse L, Yingfeng Z, Elena R, Tien Yin W. 2010. Smoking, Socioeconomic Factors, And Age-Related Cataract. *American Medical Association.* 128(8):1029-1035.

Roberts, Joan E. 2011. Ultraviolet Radiation as a Risk Factor for Cataract and Macular Degeneration. *Eye & Contact Lens*. 37: 246-249

Rong Hu, Nan Chen, Jing Yao, Qing Zhao, Fengji Z, Zhi-Yu, Qi-Dong Y, and Qing Long G. 2012. The Role of Nrf2 and Apoptotic Signaling Pathways in Oroxylin A-Mediated responses In HCT-116 Colorectal Adenocarcinoma cell and xenograft tumor. *Wolters Kluwer Health*; 651-658.

Santos C.X., Tanaka L.Y., Wosniak J., Jr., Laurindo F.R. 2009. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: Roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and nadph oxidase. *Antioxid. Redox Signal*. 11:2409–2427.

Santoso, D. 2013. Apoptosis index between females and males in regular hemodialysis. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 19 (3):22-32.

Sardiello, M. 2016. Transcription factor EB: from master coordinator of lysosomal pathways to candidate therapeutic target in degenerative storage diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*:doi:10.1111/nyas.13131.

Savitskaya, M. A., & Onishchenko, G. E. 2015. Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80 (11) :1393-1405.

Schneider, C. and Segre, T. 2009. Green tea: Potential health benefits. *Am. Fam Physician*. 79:591–594.

Schwarz, Dianne & Michael B. 2016. The Endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular Signaling. *Cell Mol Life Sci.* 73:79-94.

Selenius M, Rundlof AK, Olm E, Fernandes AP, Bjornstedt M. 2010. Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer. *Antioxid Redox Signal.* 12:867–880.

Sergio Montes, Daniel J, Rebollar, Concepcion Nava-Ruiz, Aurora S, Yesica H, Camilo Rios and Marisela. 2009. Immunohistochemical Study of of Nrf2 response element as Indicator of Oxidative stress Induced by Cadmium in developing Rats. Hindawi Publishing Corporation: ID 570650/10.1155/570650

Selvaraj V, Tomblin J, Yeager Armistead M, Murray E. 2013. Selenium (sodium selenite) causes cytotoxicity and apoptotic mediated cell death in PLHC-1 fish cell line through DNA and mitochondrial membrane potential damage. *Ecotoxicol Environ Saf.* 87:80–88.

Sharkey L., Davies S., Kaser A., Woodward J. 2015. The role of endoplasmic reticulum stress in intestinal failure associated liver disease. *Clin. Nutr. ESPEN.* 10:e178.

Sharma KK dan Santhoshkumar P. 2009. Lens aging: effects of crystallins. *Biochim Biophys Acta.*: 1095–1108. doi:10.1016/j.bbagen.05.008.

Sheng Y, Fan He2, Jun Fen L, Wei-Qiu Y. 2016. Tea and Risk of Age-Related Cataract: A Cross-Sectional Study in Zhejiang Province, China. *J Epidemiol.* 26 (11): 587-592.

Sheng Zheng J, Jing Y, Qing Fu Y, Huang T, Jing Huang Y & Li Duo. 2014. Effects of Green Tea Black Tea and Coffee Consumption on the Risk of Esophageal cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrition and Cancer*: 65 (1):1-16.

Styskal J, Van Remmen H, Richardson A & Salmon A. 2012. Oxidatif Stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutan mouse model. *Free Radic Bio Med*. 52(1):46-58. Susanti, Erna. 2011. Pada Aorta Tikus Wistar Jantan dengan Diet Tinggi Lemak. Tesis: Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pascasarjana Universitas Brawijaya.

Susanti Erna, Rudijanto A, Retty R. 2012. Catechins Inhibit atherosclerosis in male rats on a higt fat diet. *Universa Medicina*; Vol 31- No. 2.

Syagir. 2010. Budidaya dan Pascapanen Teh. Bogor. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.

Tana, Lusianawaty. 2010. Hubungan Antara Faktor Trauma Tumpul Pada Mata dengan Katarak Pada petani Di empat Desa Kecamatan Teluk Jambe Barat Kabupaten Karawang. *Media Litbang Kesehatan*. XX (3):124-130.

Tana, Lusianawaty, Rif'ati & Yudi Kristanto. 2009. Determinan Kejadian Katarak di Indonesia Riset kesehatan Dasar 2007. *Pusat penelitian dan Pengembangan*. 37 (3) : 114-115.

Talebizadeh, N., Yu, Z., Kronschläger, M., & Söderberg, P. 2014. Modelling the time evolution of active caspase-3 protein in the rat lens after in vivo exposure to ultraviolet radiation-B. *PLoS ONE*. 9 (9):1-6.

Taylorson, Katie. 2012. The Health Benefits of Tea Varieties from *Camellia Sinesis*. *The Plymouth Student Scientist*. 5(1):304-312.

Thiagrajan R, Manikandan R. 2013. Antioxidants and Cataract. Departement of Bioengineering, School of Chemical and Biotechnology. 47 (5): 337-345

Thielecke, F. and Boschmann, M. 2009. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome—a review. *Phytochemistry*. 70:11–24.

Varma Sd, Hegde Kevin. 2010. Prevention of Oxidative Damage to lens by Caffeine. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 26 (1-11).

Varma SD, Hagde KR, Kovtun S. 2010. Inhibition of selenite-induced cataract by caffeine. *Acta Ophthalmol*:88 (7) e245-9.doi:'10.1111/376

Vaseva, V. Angelina, Ute M.Moll. 2009. The Mitochondrial p53 Pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1787: 414-420.

Vandewynkel, Y.P., Debby L., Eliene B., Annelies P., Anja V.B., Xavier V., Christophe V.S, Benedicte D., Chiris V, Louis L., Riet D., Bart N., Anja G., Sophie J., Hans V. 2015. Modulation of the unfolded protein response impedes tumor cell adaptation to proteotoxic stress: a PERK for hepatocellular carcinoma therapy. *Hepatology Int* (9):93-104.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman.ZN. 2010. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows." *Ann Hematol*. 84(10):627-639

- Wang Q., Groenendyk J., Michalak M. 2015. Glycoprotein quality control and endoplasmic reticulum stress. *Molecules*. 20:13689–13704.
- Wang Q.G, Xi Bai Z, Jing S, Sang L, Fa Chang H, & Yong, Sai X. 2013. Prevalence and risk factors for eye disiases, blindness, and low vision in Ihasa, Tibet. *Int J Ophthalmol*: Vol. 6 (2): 237–241.
- Wang L & Li J. 2014. BRCA1 And Estrogen/Estrogen Receptor In Breast Cancer: Where They Interact?. *Int J Biol Sci*. 2014; 10(5): 566–575.
- Wang MY, Peng L, Lutfiyya MN, Henley E, Hoper VW, Anderson G. 2007. Morinda citrifolia (Noni) fruit juice lowers cancer risk in current smokers by reducing Malondialdehyde (MDA)-DNA adducts. AACR Annual Meeting : Los Angeles, CA
- Wlodkowic. D, William T, Skommer J & Zbigniew. 2011. Apoptosis and Beyond: Cytometry in studies of programmed Cell Death. *Methods Cell Biol*: 103; 55-98.
- Wu H, Zhang H, Li P, Gao T, Lin J, Yang J, Wu Y, Ye J. 2014. Association between dietary carbohydrate intake and dietary glycemic index and risk of age-related cataract: A meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. IOVS-13-13695.
- Xiao, F, Song Zhang, Yue Zhao, Di Wu. 2012. Regulation of Eaf2 in mouse lens cell apoptosis induced by ultraviolet radiation. *Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China*. *Int J Ophthalmol*. 5(5): 570–575.

Xiang N, Zhao R, Zhong W. 2009. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 63:351–362.

Xianzhen M, Guo D, Hongshen Bi, Yan Cui. 2014. Protective Effect of Tea Polyphenol Ophthalmic Gel lens Epithelial Cell in Rabbit with silicone oil Tamponade after vitrectomy. *Hindawi Publishing Corporation:Evidenci-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2014:1-11.

Xiinghua W, Yukum Y, Hening Z And Ju L. 2017. Safety Assesment and Comparison of sodium selenite and Bioselenium Obtained from yeast in Mice. *Biomed Research International*:doi.org/101155/3980972.

Xiu F, Ji long, Tian X, Tayyab H, Cheng B, Cong L, Cheng W, & Dan Z. 2017. Nrf2 as a target for prevention of age-related and diabetic cataracts by against oxidative stress. *Aging Cell*:DOI.10.1111/accel.12645

Yuliani, Sapto. 2012. Efek Protektif Ekstrak etanol Herba Pegagan (*Cantella asiatica*) L Urban Terhadap Pembentukan katarak tikus wistar yang diinduksi sodium Selenit. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian.* 2(1):31-40.

Zhang H.-S., Chen Y., Fan L., Xi Q.-L., Wu G.-H., Li X.-X., Yuan T.-L., He S.-Q., Yu Y., Shao M.-L. 2015. The endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 α in intestinal epithelial cells is essential for protecting against colitis. *J. Biol. Chem.* 290:15327–15336.

Zorab, A. R, Straus H, Dondrea L. C, Arturo C, Mordic R, Tanaka. 2010. Basic and Clinical Science Course: Lens and Cataract. Section 11. *American Academy of Ophthalmology.*, p 5-9

