

LAPORAN HASIL PENELITIAN

**EFEK ISOLATE KATEKIN TEH HIJAU KLON GMB4 TERHADAP APOPTOSIS
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 Apoptosis 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. 31.700.000;
- 2. Sumber Dana : Mandiri

Jember, 26 Desember 2019

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Jember



dr. Subangat 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. H. 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 (Risesdas) tahun 2013 adalah sebesar 1.8%, tertinggi di Provinsi Sulawesi Utara (3.7%) dan terendah di DKI Jakarta (0.9%) (KEMENKES, 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 (Hosoi & Ozawa., 2010; Palsamy *et al.*, 2014).

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; 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; Sheng *et al.*, 2014). 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. Aswaty *et al* (2018), 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.*, 2011).

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 apoptosis sel epitel lensa.

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka diperlukan penelitian untuk membuktikan pengaruh isolat katekin teh hijau klon GMB4 dapat melindungi sel epitel lensa terhadap apoptosis (Caspase 3, Uji Tunel) sehingga dapat menunda timbulnya katarak.

1. 2. Rumusan Masalah

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

1. 2. 2 Permasalahan Khusus

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

1. Bagaimana ekspresi Caspase-3, Uji Tunel dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit?
2. Bagaimana pengaruh Katekin terhadap ekspresi Caspase-3, gambaran Tunel dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit?
3. Berapa dosis katekin yang mampu menghambat kekeruhan lensa, peningkatan ekspresi Caspase-3, Uji Tunel dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi Sodium Selenite ?
- 4.

1. 3 Tujuan Penelitian

1. 3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui katekin dapat menghambat katarak dengan mengurangi apoptosis pada sel epitel lensa

1. 3. 2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui ekspresi Caspase-3, Uji Tunel dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi Sodium selenit.
2. Mengetahui pengaruh Katekin terhadap ekspresi Caspase-3, Uji Tunel dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit.
3. Mengetahui dosis katekin yang mampu menghambat kekeruhan lensa, peningkatan ekspresi Caspase-3 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 Apoptosis.

1. 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 Caspase 3 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 di sebut aksis lensa (Zorab *et al.*, 2010; Addepalli *et al.*, 2012).

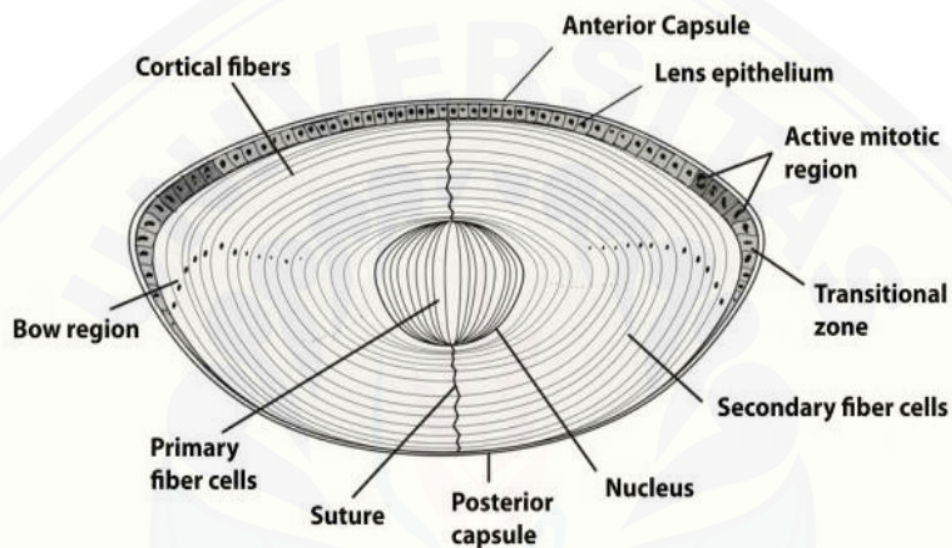
Secara struktural lensa dapat dibedakan atas:

- 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 (Shen *et al.*, 2016).

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 (Sharma dan Santhoshkumar, 2009).

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 (Petrash., 2013).

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, glutation, ion anorganik, Na, K, Asam Askorbat, glukosa dan hasil metabolisme. Asam amino masuk lensa secara tranport 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 (Chandler *et al.*, 2010; 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 (Dubey *et al.*, 2014).

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 (Abenggossar *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 (Sharma & Santhoshkumar., 2009; Lim *et al.*, 2014).

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 glutathion. 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 mengembang, 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^\bullet), radikal peroksil (ROO^\bullet), radikal lipid peroksil (LOOH), oksigen tunggal (O^2), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Akharaiyi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Mekanisme kerusakan yang diakibatkan oleh spesies oksigen reaktif adalah peroksidasi lipid membran membentuk malondialdehida, 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; Abenggosar *et al.*, 2015).

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. Ketransparanan 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 (Palsamy *et al.*, 2012; Lan Li *et al.*, 2016).

Kombinasi transport aktif dan permeabilitas membran di lensa disebut 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 (Gupta *et al.*, 2016).

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; Sheng *et al.*, 2016)

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; Sheng *et al.*, 2016).

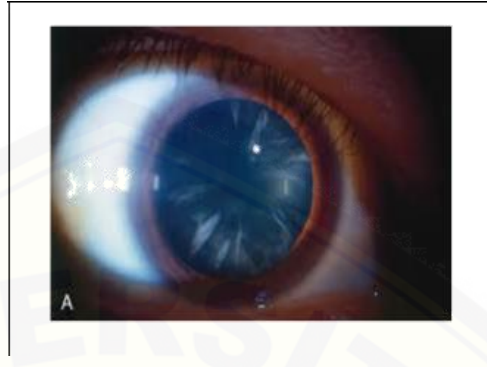
Berdasarkan lokasi katarak dibagi menjadi :

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 diplopia monokular juga dapat dikeluhkan penderita (Kyselova., 2010; Chen *et al.*, 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

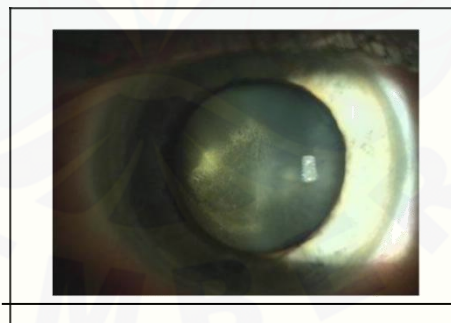
ke sentral, kekeruhan ini tampak gelap apabila dilihat menggunakan retroiluminasi (AAO., 2011).



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)

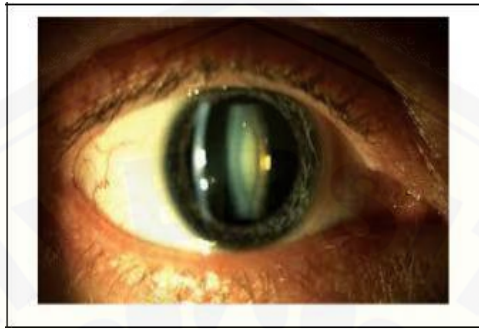


Gambar 3. Katarak nuklearis (Dikutip dari jurnal Cataract: Clinical Types of 1 Chapter 73).

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, diploia 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 refleks 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 & Stebiiovsk., 2018).

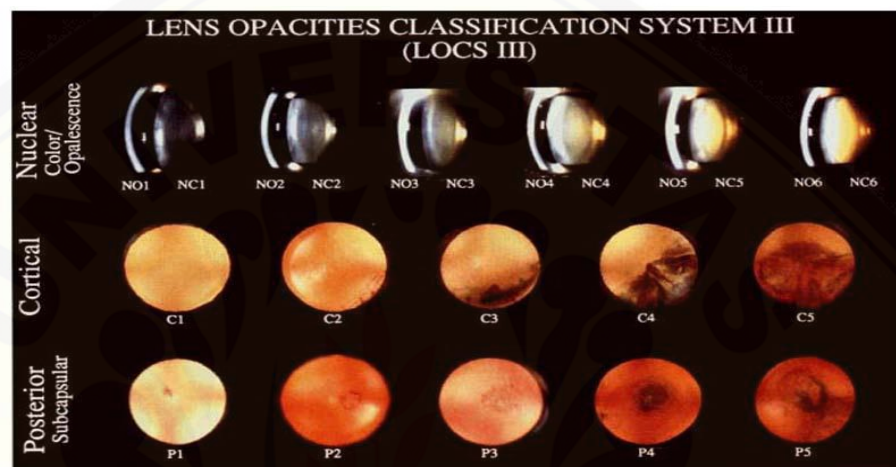
Katarak berdasarkan morfologi menurut *Lens Opacity Classification System (LOCS) III* :

- Nuklear
- Kortikal
- *Posterior Sub Capsular (PSC)*

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 (Kyselova., 2010; 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 *et al.*, 2016; Le *at al.*, 2017).

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 dysplasia 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 (Li *et al.*, 2010; Palsamy *et al.* 2014; Kroeger *et al.*, 2018).

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., 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. 3. 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 *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; Marek *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 (Javadzadeh *et al.*, 2009; 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 *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, menghasil, 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 (Michael *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., 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 *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 & Schamidt., 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, 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 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, 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; Mahalingan *et al.*, 2016; Madirrala *et al.*, 2017).

2. 4 Apoptosis

2. 4. 1 Definisi dan penyebab Apoptosis

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terprogram, diatur secara genetik, bersifat aktif, ditandai dengan adanya kondensasi kromatin, fragmentasi sel dan fagositosis sel tersebut oleh sel tetangganya (Green., 2011., Fabienne *et al.*, 2013). Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang merupakan proses penting dalam pengaturan homeostasis normal, proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis untuk memelihara fungsi jaringan tetap

normal. Apoptosis merupakan suatu bentuk kematian sel yang didesain untuk menghilangkan sel-sel host yang tidak diinginkan melalui aktivasi serangkaian peristiwa yang terprogram secara internal melalui serangkaian produk gen (Acrani *et al.*, 2010; Jiang., 2011).

2. 4. 2. Morfologi Apoptosis

Morfologi apoptosis ini memiliki ciri yang khas seperti Pengerutan sel, kondensasi kromatin, pembentukan tonjolan sitoplasma dan fagositosis badan apoptosis (Green., 2011) antara lain:

1. Pengerutan sel

Sel berukuran lebih kecil, sitoplasmanya padat, meskipun organella masih normal tetapi tampak padat.

2. Kondensasi Kromatin (piknotik)

Merupakan gambaran apoptosis yang paling khas. Kromatin mengalami agregasi diperifer dibawah selaput dinding inti menjadi massa padat yang terbatas dalam berbagai bentuk dan ukuran.

Intinya sendiri dapat pecah membentuk 2 fragmen atau lebih (karyorhexis).

1. Pembentukan tonjolan sitoplasma dan apoptosis.

Sel apoptotik mula-mula menunjukkan "*blebbing*" permukaan yang luas kemudian mengalami fragmentasi menjadi sejumlah badan apoptosis yang berikatan dengan membran yang disusun oleh sitoplasma dan organella padat atau tanpa fragmen inti (Lombardo *et al.*, 2015).

2. Fagositosis badan apoptosis.

Badan apoptosis akan difagositosis oleh sel-sel sehat disekitarnya, baik sel-sel parenkim maupun makropag. Badan apoptosis dapat didegradasi di dalam lisosom dan sel-sel yang berdekatan bermigrasi atau berproliferasi untuk menggantikan ruangan Bre sebelumnya diisi oleh sel apoptosis yang hilang (Dorjgochoo *et al.*, 2013).

Apoptotik *bodies* yang muncul di jaringan secara cepat diserap (*ingested*) oleh sel di dekatnya dan dihancurkan oleh sel lisosomnya. Tidak ada hubungan inflamasi dengan adanya fagosit khusus dalam jaringan seperti terjadi dengan nekrosis dan tipe sel yang beragam dari sel tetangga, termasuk sel epitel yang berpartisipasi dalam sipatnya. Pada tumor-tumor, sel-sel neoplastis yang viabel biasanya terlibat adalah makrofak sekitarnya. Akan tetapi bentukan apoptotic *bodies* pada kultur sel kebanyakan hilang oleh fagositosis dan bahkan degenerasi (Kimbal., 2009; Del Puerto *et al.*, 2011).

Awal kejadian seluler dalam apoptosis diselesaikan dengan cepat dengan hanya beberapa menit berlalu antara perjalanan proses dan pembentukan suatu kelompok apoptotik *bodie* (Lin *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2014). Oleh karena itu tunas-tunas sel dan garis besar yang kusut jarang diamati pada potongan jaringan. Ukuran kecil dari apoptosis *bodies* membuat mereka secara relatif tak dikenal dengan mikroskop cahaya. Setelah fagositosis, pencernaan mereka lengkap dalam beberapa jam. Kenyataan ini telah melahirkan pikiran kapan apoptosis dapat ditentukan secara histologi (Kim & Koh, 2011; Del Puerto *et al.*, 2011).

Nekrosis berlanjut sampai kromatin menghilang. Sitoplasma sel nekrotik menjadi pembengkakan yang mencolok, plasma dan membran organella secara progresif disintegrasikan. Keterlibatan kelompok sel berdekatan dan adanya suatu eksudat inflamasi biasanya didapatkan tambahan konfirmasi bukti-bukti kategorisasi kematian sel yang ada disekitarnya sebagai nekrosis (Basova *et al.*, 2010). Tumor, seperti fokus dari nekrosis cenderung terlokasi di pusat nodul (Wlodkowic *et al.*, 2011).

Perbedaan antara apoptosis dan nekrosis dengan tegas terlihat pada penelitian dengan mikroskop elektron (Lee *et al.*, 2010) dan secara praktis, dua proses dapat dikenali dengan memakai mikroskop cahaya. Pematangan kromatin inti terjadi pada stadium awal nekrosis, tetapi kromatin tidak secara radikal terdistribusi kembali, sebagai mana dalam apoptosis, dan sudut gumpalan kromatin cenderung irregular dan terlihat dengan jelas. Sebagai tambahan, inti sel nekrotik tidak pernah terpisah menjadi berlainan, membran disertai fragmen-fragmen (Indran *et al.*, 2011).

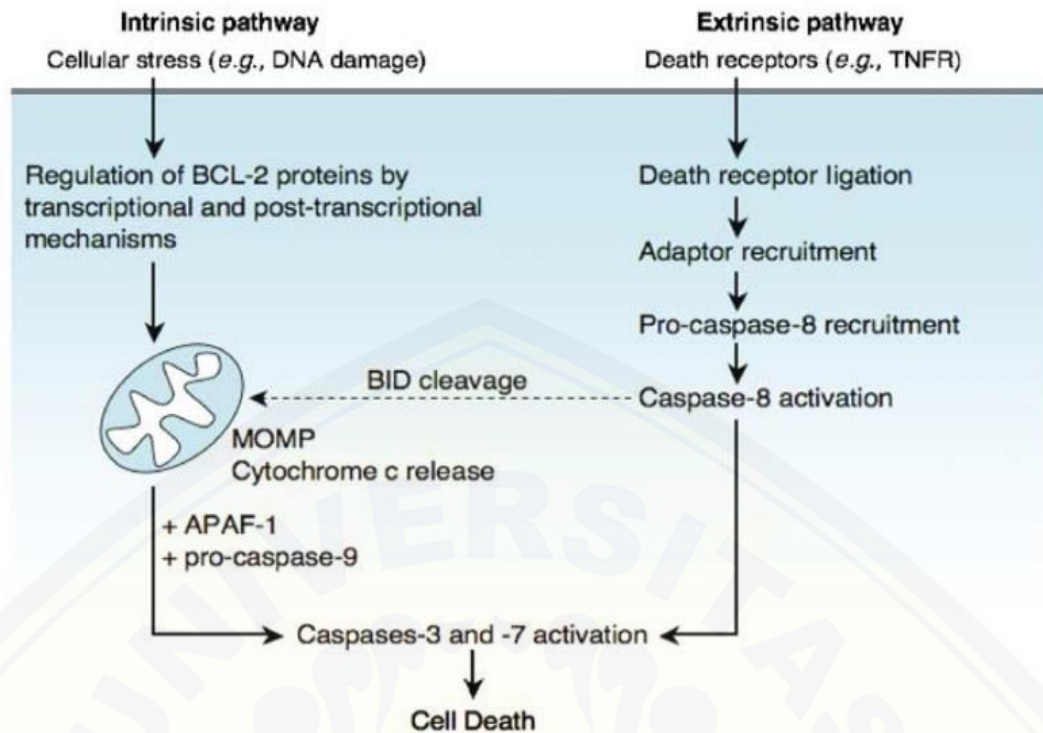
2.4.3 Proses Apoptosis

Proses apoptosis dikendalikan oleh berbagai tingkat sinyal sel, yang dapat berasal dari pencetus ekstrinsik maupun intrinsik. Yang termasuk pada sinyal ekstrinsik antara lain hormon, faktor pertumbuhan, nitric oxide dan cytokine. Semua sinyal tersebut harus dapat menembus membran plasma ataupun transduksi untuk dapat menimbulkan respon (Santoso., 2013; Zhu *et al.*, 2016).

Jalur intrinsik dilibatkan oleh tekanan seluler, seperti kerusakan DNA atau penarikan faktor pertumbuhan, dan berdampak langsung pada keluarga protein

pro-dan anti-apoptosis BCL-2 (Savitskaya *et al.*, 2015). Anggota keluarga protein ini dapat dikenai transkripsi, ditranskripsi secara transkripsi atau mengalami modifikasi pasca translasi yang berfungsi untuk menekan atau meningkatkan fungsinya. Begitu repertoar protein BCL-2 yang sesuai telah dilibatkan, mereka memperoleh permeabilisasi membran luar mitokondria (MOMP), pelepasan sitokrom c dan aktivasi pro-Caspase-9 bergantung APAF-1. Pelaku Caspase-3 dan -7 kemudian diaktifkan oleh pembelahan Caspase-9-dependent. Jalur ekstrinsik memerlukan ligasi reseptor kematian oleh ligan kematian, yang menghasilkan perakitan molekul adaptor dan aktivasi pro-Caspase-8. Sekali lagi, caspases eksekusi-3 dan -7 kemudian diaktifkan oleh caspase-8 (Aude *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2009; Selvaraj *et al.*, 2013).

Sinyal intrinsik apoptosis merupakan suatu respon yang diinisiasi oleh sel sebagai respon terhadap stress dan akhirnya dapat mengakibatkan kematian sel. Pengikatan reseptor nuklear oleh glukokortikoid, panas, radiasi, kekurangan nutrisi, infeksi virus dan hipoksia merupakan keadaan yang dapat menimbulkan pelepasan sinyal apoptosis intrinsik melalui kerusakan sel yaitu melalui mitokondria dan penghantaran sinyal secara langsung melalui adapter protein (Kim & Koh., 2011; Ji *et al.*, 2014) disajikan dalam Gambar 6 yakni:



Gambar 6. Perbandingan dari kaskade apoptosis intrinsik dan ekstrinsik (Kate L & Jonathan., 2012).

1) Jalur ekstrinsik (diinisiasi oleh kematian reseptor)

Jalur ini diinisiasi oleh pengikatan reseptor kematian pada permukaan sel pada berbagai sel. Reseptor kematian merupakan bagian dari reseptor faktor tumor nekrosis yang terdiri dari domain sitoplasma, yang berfungsi untuk mengirim sinyal apoptotik. Reseptor kematian yang diketahui antara lain TNF reseptor tipe 1 yang dihubungkan dengan protein Fas (CD95). Pada saat Fas berikatan dengan ligandnya, membrane menuju ligand (FasL). Tiga atau lebih molekul Fas bergabung dan *cytoplasmic death domain* membentuk binding site untuk adapter protein, FADD (*Fas-associated death domain*). FADD ini melekat pada reseptor kematian dan mulai berikatan dengan bentuk tidak aktif dari caspase 8. Molekul procaspase 8 tidak aktif ini kemudian dibawa keatas dan kemudian pecah menjadi caspase 8 aktif (Xiao *et al.*, 2012).

Enzim ini kemudian mencetuskan cascade aktivasi caspase dan kemudian mengaktifkan procaspase lainnya dan mengaktifkan enzyme untuk mediator pada fase eksekusi. Jalur ini dapat dihambat oleh protein FLIP, tidak menyebabkan pecahnya enzyme Procaspase-8 dan tidak menjadi aktif (Xiao *et al.*, 2012).

2) Jalur Intrinsik (Mitokondria)

Jalur ini terjadi oleh karena adanya permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis ke dalam sitoplasma, tanpa memerlukan reseptor kematian. Faktor pertumbuhan dan sinyal lainnya dapat merangsang pembentukan protein antiapoptosis BCL-2, yang berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein anti apoptosis yang utama adalah: BCL-2 dan BCL-X, yang pada keadaan normal terdapat pada membran mitokondria dan sitoplasma (Indran *et al.*, 2011).

Pada saat sel mengalami stress, BCL-2 dan Bcl-x menghilang dari membrane mitokondria dan digantikan oleh pro-apoptosis protein, seperti Bak, Bax, dan Bim. Sewaktu kadar BCL-2, BCL-X menurun, permeabilitas membran mitokondria meningkat, beberapa protein dapat mengaktifkan cascade caspase. Salah satu protein tersebut adalah cytochrome-c yang diperlukan untuk proses respirasi pada mitokondria. Di dalam cytosol, cytochrome-c berikatan dengan protein Apaf-1 (apoptosis activating factor-1) dan mengaktivasi Caspase-9. Protein mitokondria lainnya, seperti Apoptosis Inducing Factor (AIF) memasuki sitoplasma dengan berbagai inhibitor apoptosis yang pada keadaan normal untuk menghambat aktivasi caspase (Lee *et al.*, 2010)

P53 mengatur transkripsi berbagai protein yang terlibat dalam apoptosis. P53 secara langsung mengatur ekspresi Apaf-1, protein perancah untuk caspase-9 aktivasi, serta survivin, anggota dari keluarga IAP protein. P53 juga mengontrol apoptosis sebagian melalui peraturan transkripsi berbagai anggota BCL-2 keluarga, keluarga penting protein yang anggotanya terlibat baik dalam pelaksanaan dan penghambatan apoptosis pada mitokondria, termasuk BCL-2, P53 diregulasi modulator apoptosis (PUMA) dan Bax (Vaseva *et al.*, 2009).

Kaspase (*caspase*) merupakan akronim dari cysteine aspartate-specific protease, adalah kelompok enzim protease sistein yang berperan penting dalam mengatur dan mengeksekusi kematian sel secara apoptosis. Di dalam sel, kaspase diekspresikan dalam bentuk zimogen yang tidak aktif dan menjadi aktif melalui proses-proses proteolitik bila di dalam substrat terdapat residu aspartat. Beberapa anggota kaspase ini tidak terlibat dalam apoptosis, namun lebih berperan dalam proses-proses yang memerantarai sitokin (Lim, *et al.*, 2014).

Pada mamalia, telah diidentifikasi 14 anggota kaspase, namun pada manusia, fungsi fisiologis dan sel target dari beberapa anggota kaspase (kaspase-11 hingga kaspase-14), belum diidentifikasi dengan baik. Kaspase mempunyai tiga domain yaitu ujung amino terminal, domain besar dan domain kecil. Ujung amino terminal berperan dalam mengatur aktivitas enzim, domain besar atau kaspase hulu (Kaspase-2, 8, 9, dan 10) berperan sebagai inisiator (pemicu) apoptosis yang terdiri lebih dari 100 asam amino. Domain kecil atau kaspase hilir (kaspase-3, 6, dan 7) yang berperan sebagai efektor atau eksekutor apoptosis, adalah bagian yang terlibat langsung dalam penghancuran sel (Lim *et al.*, 2014; McIlwain *et al.*, 2015).

Kaspase hilir kurang dari 30 asam amino. Kaspase-12 selain memediasi aktivitas sitokin, juga berperan dalam apoptosis pada jalur retikulum endoplasma dengan mekanisme yang belum jelas. Aktivasi kaspase terjadi ketika ketiga domain mengalami pemotongan residu asam aspartat yang menghilangkan domain amino terminal sehingga terjadi penggabungan domain besar dan domain kecil yang membentuk heterodimer kemudian diikuti oleh proses proteolitik. Dua heterodimer kemudian bergabung menjadi tetramer yang merupakan bentuk aktif dari kaspase (Mohan *et al.*, 2010; Tebibzadeh *et al.*, 2014).

Aktivasi proteolitik dari efektor kaspase dapat memecah substrat tertentu, misalnya protein lamin yang menyebabkan pengerutan nukleus dan pembentukan budding. Pemecahan protein sitoskeleton (fodrin, gelsolin, plectin, actin, dan sitokeratin) menyebabkan perubahan bentuk sel. Demikian pula dengan pemecahan menyebabkan fragmentasi DNA. Apoptosis yang dimediasi oleh kaspase, dibagi menjadi dua jalur yaitu jalur reseptor kematian dan jalur mitokondria. Pada jalur reseptor kematian, protein yang bertindak sebagai reseptor adalah kelompok tumor necrosis factor receptor (TNF-R) yang meliputi CD95 (APO-1/Fas), TNF-R1, DR4 (TRAIL-R1) dan DR5 (TRAIL-R2). Reseptor-reseptor di atas berikatan dengan ligan yang sesuai seperti CD95-L (APO-1-L/Fas-L), TNF- α , dan TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Ikatan antara reseptor dan ligan bisa bergantung atau tidak bergantung pada protein p53 (McIlwain *et al.*, 2015).

Disamping mengaktifkan reseptor, protein p53 juga mengaktifkan protein PERP sebagai penyebab apoptosis bila terjadi kerusakan DNA. Rangsangan ligan terhadap reseptor menyebabkan trimerisasi dan menginduksi pembentukan

death-inducing signaling complex (DISC) yang mengandung adaptor sitoplasma spesifik dan kaspase-8. Beberapa protein adaptor misalnya Fas-associated death domain (FADD) berikatan dengan reseptor CD95 dan DR4/5, sedangkan TNF-R-associated death domain (TRADD) berasosiasi dengan TNF-R1. Protein adaptor FADD mengandung domain kedua, tempat mengikat kaspase-8/kaspase-10 yang disebut death effector domain (DED). Selanjutnya kaspase 8 diaktifkan oleh proses-proses proteolitik sehingga dapat memecah beberapa protein termasuk prokaspase 3 yang akan membawa ke program kematian (Khalil *et al.*, 2015)

Apoptosis ditekan oleh kelompok protein inhibitor apoptosis (IAP) yang berinteraksi dengan enzim-enzim yang menghambat aktivitas kaspase inisiator maupun efektor. Pada kultur sel, telah diidentifikasi beberapa IAP pada mamalia yaitu XIAP, c-IAP1, dan c-IAP2. Selama apoptosis, hambatan IAP dilawan oleh kelompok protein Smac yang disebut juga DIABLO. Protein Smac disintesis di dalam sitosol intermembran mitokondria. Stimulasi apoptosis, menyebabkan Smac dibebaskan kembali ke dalam sitosol bersama-sama dengan sitokrom-c (Adam & Jerry., 2015).

Data menunjukkan bahwa banyak obat antikanker yang mekanisme kerjanya melalui apoptosis. Hal ini disebabkan sifat senyawa karsinogenik baik kimia maupun radiasi adalah menghambat pertumbuhan dan mampu menginduksi kematian sel. Peningkatan kaspase apoptosis dengan bermacam-macam rangsangan tersebut meningkatkan protein-protein pengatur yang melibatkan aktivitas kaspase, degradasi DNA, dan fragmentasi sel. Obat antikanker akan menginduksi sinyal apoptosis dengan mengubah aktivitas kaspase intraseluler. Beberapa penelitian telah dilakukan, antara lain dengan

menggunakan lini sel (cell line) karsinoma hepar Hep G2 di dalam kultur yang diberi manumycin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mitomycin dapat menghentikan siklus sel pada fase G2/M dan menginduksi apoptosis dengan meningkatkan protein P53 dan p21. Penelitian lain menggunakan Doxorubicin, Methotrexate, atau Bleomycin dapat menginduksi ekspresi CD95 dan CD95L pada membran sel yang diikuti oleh peristiwa apoptosis, baik secara autokrin maupun parakrin (Lim *et al.*, 2014; Khalil *et al.*, 2015).

Pada lini sel yang resisten terhadap CD95, obat antikanker menginduksi apoptosis tetapi melalui jalur lain yang belum jelas. Misalnya pada leukemia sel T, obat-obat antineoplastik seperti daunorubicin, doxorubicin, etoposide, dan mitomycin C dapat menginduksi apoptosis, baik yang sensitif maupun resisten terhadap CD95. Dari beberapa penelitian kemudian diketahui bahwa aktivasi Kaspase-8 yang diinduksi oleh zat antikanker, menyebabkan apoptosis yang tidak bergantung pada ikatan antara ligan CD95L dan reseptor CD95. Penelitian menggunakan lini sel limfoma B dengan zat antineoplastik Rubicin dan Taxol baik pada mencit maupun manusia juga menunjukkan bahwa apoptosis yang terjadi adalah independen reseptor maupun ligan (Li *et al.*, 2009).

Pada jalur mitokondria, protein kelompok BCL-2 berperan penting dalam mengatur apoptosis. Protein kelompok BCL-2 terdiri atas dua kelompok, yaitu protein antiapoptosis (BCL-2 dan BCL-XL), dan protein proapoptosis yaitu Bax, Bok, Bak, Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, dan PUMA. Telah dilaporkan bahwa obat antikanker menginduksi pro-apoptotik dan menghambat Anti-apoptotik. Ekspresi berlebih dari BCL-2 atau BCL-XL, dapat mencegah pelepasan sitokrom-c dari mitokondria, aktivasi kaspase, dan fragmentasi DNA. Sedangkan protein sitosol Bid dapat dipecah dan diaktifkan oleh Kaspase-8 yang

aktif, sehingga translokasi Bid ke mitokondria akan menginduksi pelepasan sitokrom-c. Pelepasan sitokrom-c dari mitokondria selain disebabkan oleh kemoterapi, juga oleh faktor-faktor lainnya seperti radiasi ultraviolet, penurunan faktor tumbuh, dan ligasi Fas dan TNFR (Shen *et al.*, 2016).

Pada jalur mitokondria tersebut di atas, protein P53 sebagai faktor transkripsi, berperan menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi beberapa gen yang akan meningkatkan apoptosis seperti Fas, DR5, Bax, Noxa, IGFBP3, PIG3, dan PAG608. Protein Bax dan Noxa akan membebaskan sitokrom-c dari mitokondria (Veseva *et al.*, 2009). Pembebasan sitokrom-c dari ruang intermembran mitokondria ke dalam sitosol, merupakan kunci untuk mengaktifkan kaspase-9. Sitokrom-c akan berinteraksi dengan apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1), A TP/dA TP, dan Kaspase-9, dengan membentuk badan yang disebut apoptosom. Apoptosom ini bertindak sebagai aktivator pada inisiator kaspase. Kaspase-9 bentuk aktif ini kemudian mengaktifkan kaspase-3, kaspase-6, dan kaspase-7 yang menyebabkan program kematian sel melalui proses-proses proteolitik berbagai target. Penelitian ini membuktikan bahwa pemaparan cisplatin di dalam kultur sel kanker payudara MCF-7, menyebabkan apoptosis dengan terjadinya perubahan pada nukleus dan fragmentasi DNA. Dalam hal ini cisplatin mempengaruhi kaspase-3 untuk mengamplifikasi pembebasan sitokrom-c dari mitokondria (Basova *et al.*, 2010; Indran *et al.*, 2011).

2. 5 Katekin Teh Hijau

2. 5. 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) (Allipoor & Rad., 2012; Peristiowati., 2017).

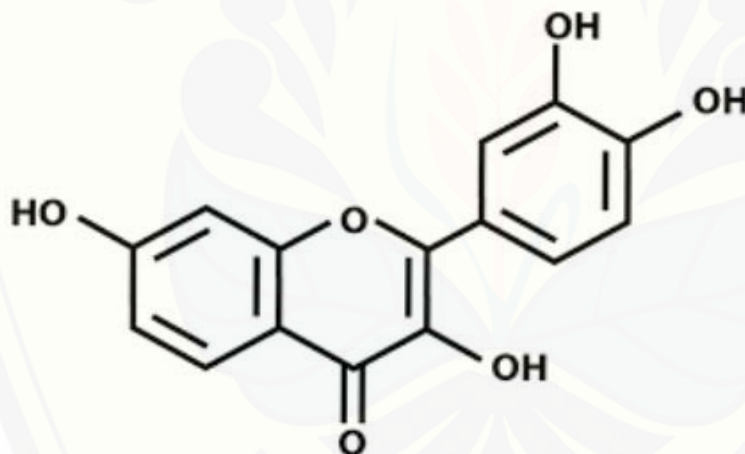
Teh hijau mengandung berbagai bahan yang bermanfaat untuk kesehatan tertentu. Misalnya, teh polifenol katekin teh diyakini mengerahkan efek protektif terhadap penyakit seperti kanker, obesitas, diabetes, arteriosklerosis, penyakit neurodegeneratif, dan kerusakan gigi (Schneider & Segre., 2009; Khan & 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., 2012).

2. 5. 2 Struktur kimia katekin

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



Gambar 7. 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 (Miyoshi *et al.*, 2015).

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 karbon pada 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. 5. 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 fibronektin, 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., 2012; Monira *et al.*, 2018).

2. 5. 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 μ M 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 μ M. 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 J *et al.*, 2012).

2. 5. 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., 2010; Chacko *et al.*, 2010)

2. 5. 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., 2010).

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 lainnya seperti epicatechin dalam pelarut 5% etanol (4) untuk pemurnian EGCG dilakukan ekstraksi cair-cair dengan pelarut etil asetat kemudian dievaporasi dengan rotavapor pada suhu 50-55⁰ C sehingga didapatkan bentuk padatnya (De Meija *et al.*, 2009; Brahma S *et al.*, 2011).

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. 5. 7 Penelitian manfaat Katekin pada katarak

Penelitian manfaat Katekin pada Katarak masih belum banyak, diantaranya:

1. Lee SM *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 (Uji 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 V 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,

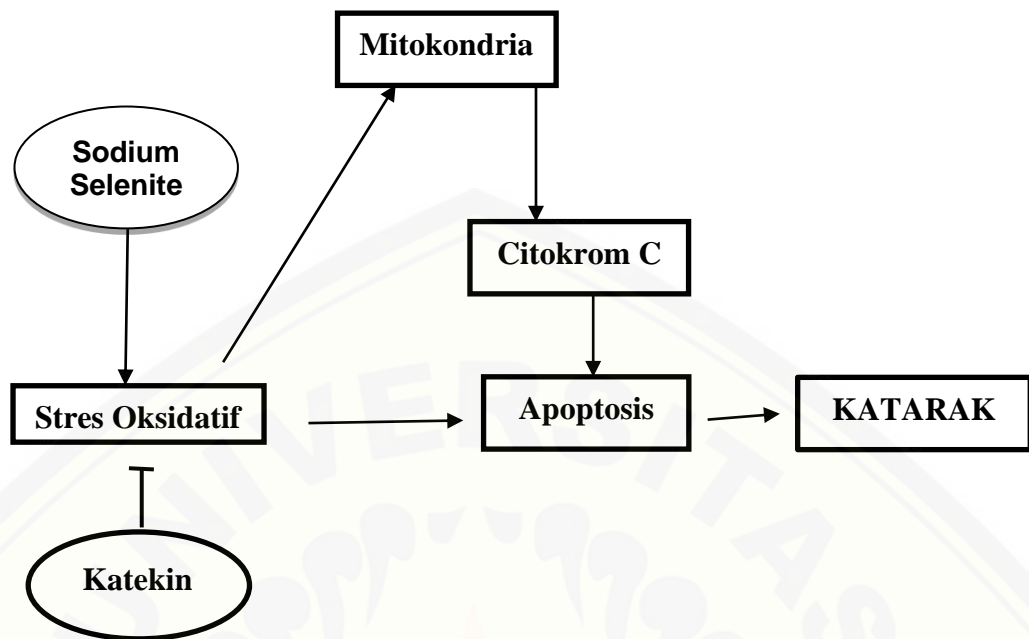
penghambatan agregasi α A (66-80) mungkin merupakan strategi yang menarik untuk pencegahan katarak.

-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. 5. 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 gambaran TUNNEL, Caspase-3 (apoptosis), tingkat kekeruhan lensa dan dosis katekin.

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 saline 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. Jenis kelamin betina
- c. Umur 9 hari

- d. Warna bulu putih
- e. 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/kgBB, 100 mg/kgBB, 200mg/kgBB
2. Variabel Dependen/tergantung yaitu ekspresi Caspase-3, gambaran TUNNEL 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 Caspase-3: dengan pewarnaan imunohistokimia, ekspresi Caspase-3 dinilai berdasarkan persentasinya dengan menghitung sel-sel epitel lensa yang terwarnai berwarna coklat pada sitoplasmanya.
3. Uji Tunel, dengan mikroskop cahaya dihitung berapa % sel epitel lensa yang mengalami apoptosis.
4. 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 19 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 19 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 19 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 19 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 15 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/kgBB)
Klp 3	Katekin 50 mg/KgBB	Na ₂ SeO ₃ (25 µmol/kgBB) + katekin 50 mg/kgBB
Klp 4	Katekin 100 mg/KgBB	Na ₂ SeO ₃ (25 µmol/kgBB) + Katekin 100mg/kgBB
Klp 5	Katekin 200mg/KgBB	Na ₂ SeO ₃ (25 µmol/kgBB) + Katekin 200mg/kgBB

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 15) 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 15, 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 prilysin, kemudian dikeringkan pada 37 °C semalam dalam oven. Enam bagian slide dikumpulkan rata-rata untuk setiap lensa.

3. 8. 7 Pemeriksaan imunohistokimia Caspase-3

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) Caspase-3, 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. 8 Pemeriksaan TUNEL

Sel dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan di inkubasi menggunakan proteinase-K 20 g/mL selama 15 menit pada suhu 37°C. Sel dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, kemudian diinkubasi pada H2O2 3% selama 15 menit. Sel dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 15 menit, kemudian diinkubasi dengan Tunel fragmentasi DNA *labeling* selama 60 menit pada suhu 37^o C. Sel dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, kemudian diinkubasi substrat DAB (Diamono Benzidine) selama 40 menit pada suhu 37°C. Sel dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Mayer hematoxillen dan diinkubasi selama 10 menit kemudian dicuci menggunakan tap water. Sel dibilas menggunakan dH2O dan dikeringkan. Dilakukan *mounting* pada sel

menggunakan entellen dan ditutup dengan cover glass. Sel ini dimati dengan miikroskop cahaya.

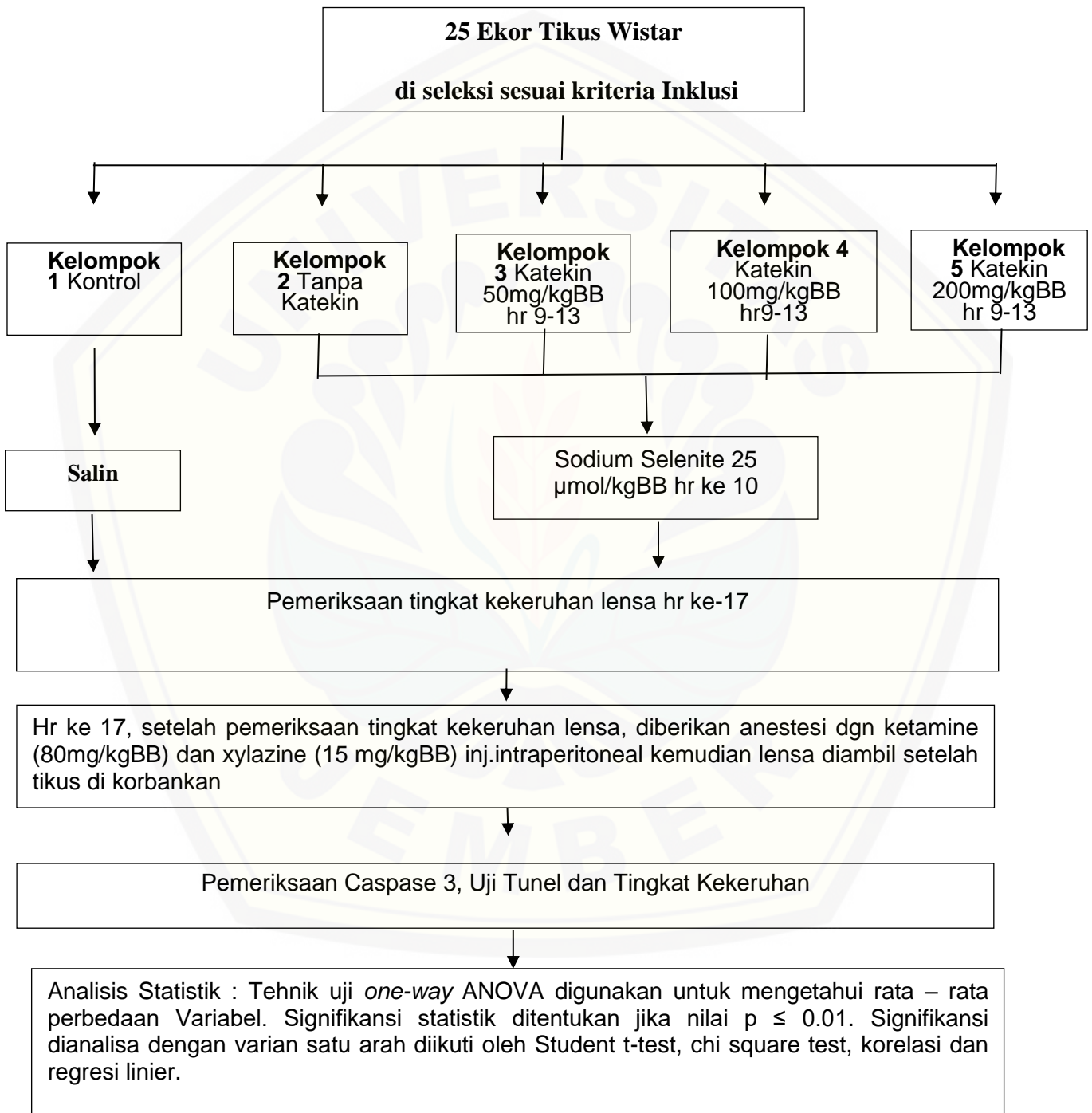
3.9 Analisa Statistik

Analisa statistik melalui tahapan sebagai berikut:

1. Tehnik uji *one-way* ANOVA digunakan untuk mengetahui rata – rata perbedaan ekspresi Caspase-3, gambaran uji TUNEL 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.

3.10 Alur Penelitian

3.10 Alur Penelitian



4.11 Rencana Biaya Penelitian

No	Keterangan	Biaya
1	Persiapan	
	- Administrasi	Rp. 200.000;
	- Hewan coba	Rp. 2.500.000;
	- Alat dan Bahan	Rp. 20.000.000;
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. 31.700.000;

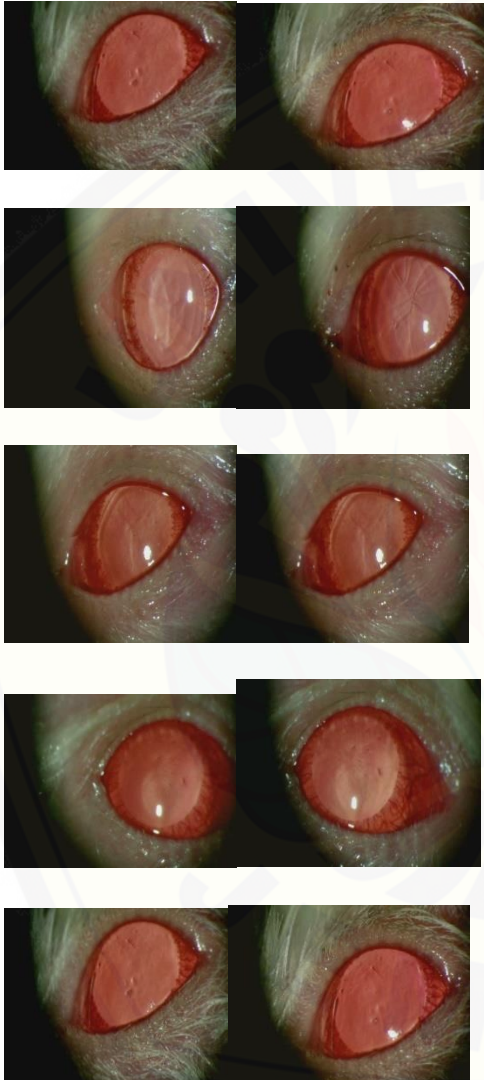
Terbilang : (tiga puluh satu juta tujuh ratus ribu rupiah)

BAB IV

HASIL PEMBAHASAN

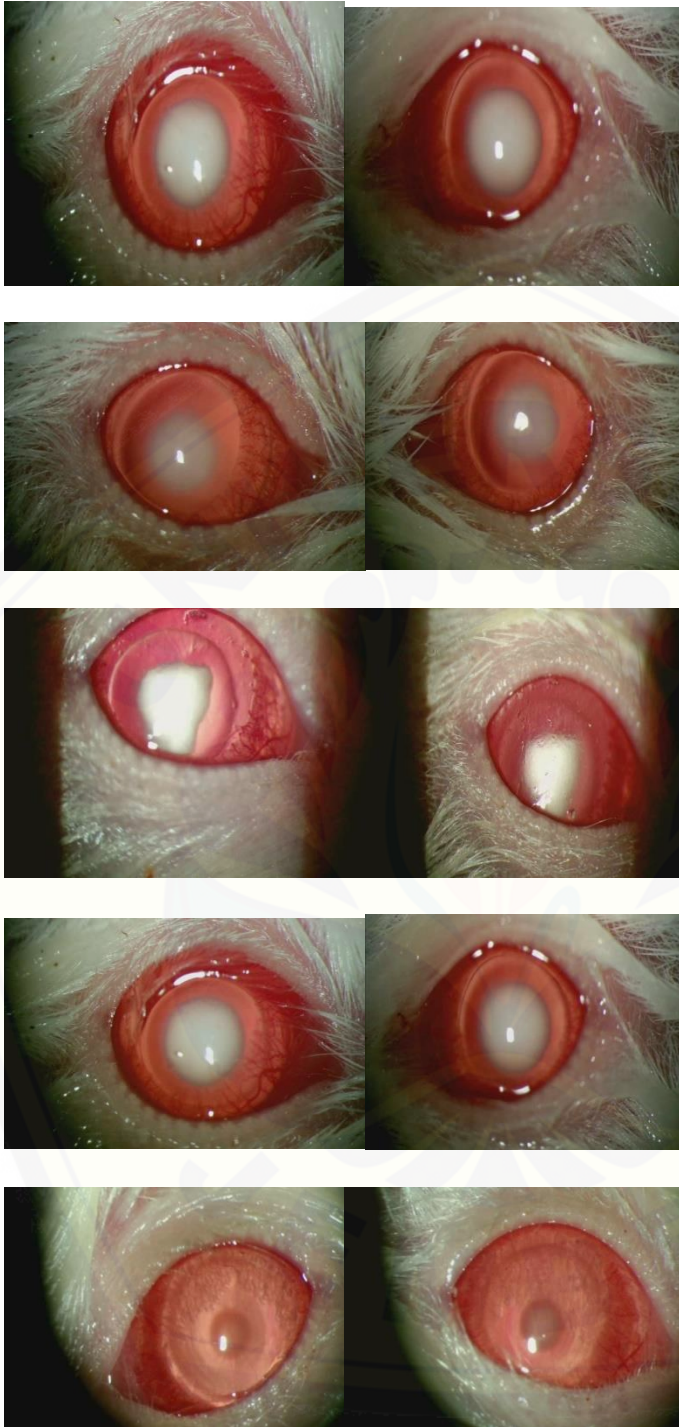
4 1 Hasil pemeriksaan Morfologi dengan Slit Lamp

Kelompok I



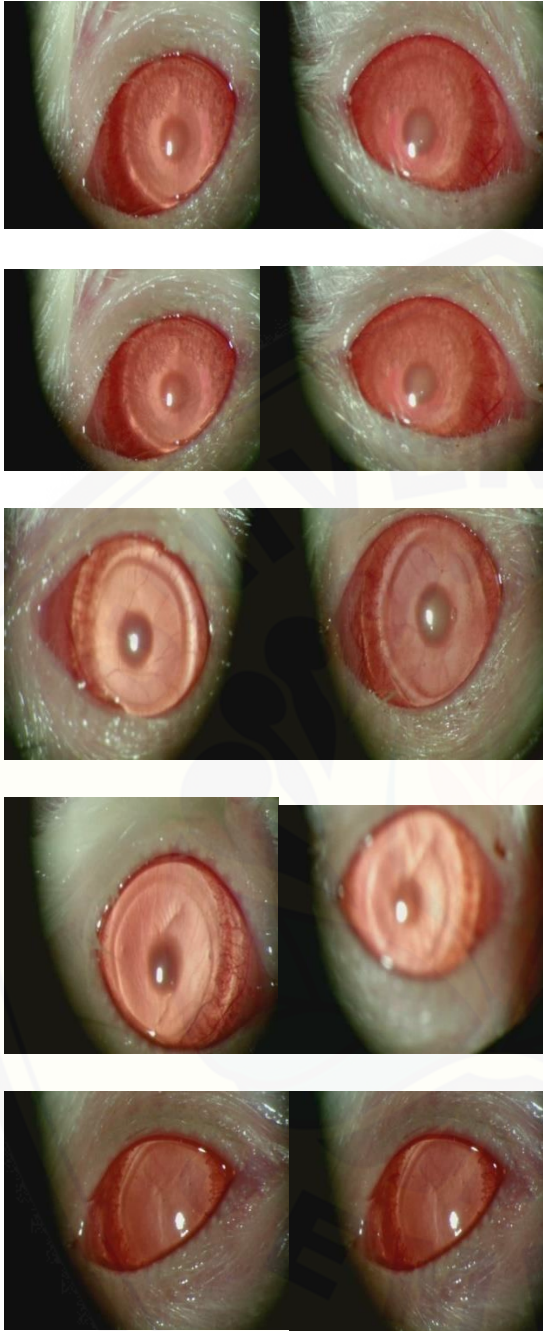
Gambar 4. 1 Semua lensa mata dalam Kelompok I. 100% jernih.

Kelompok II



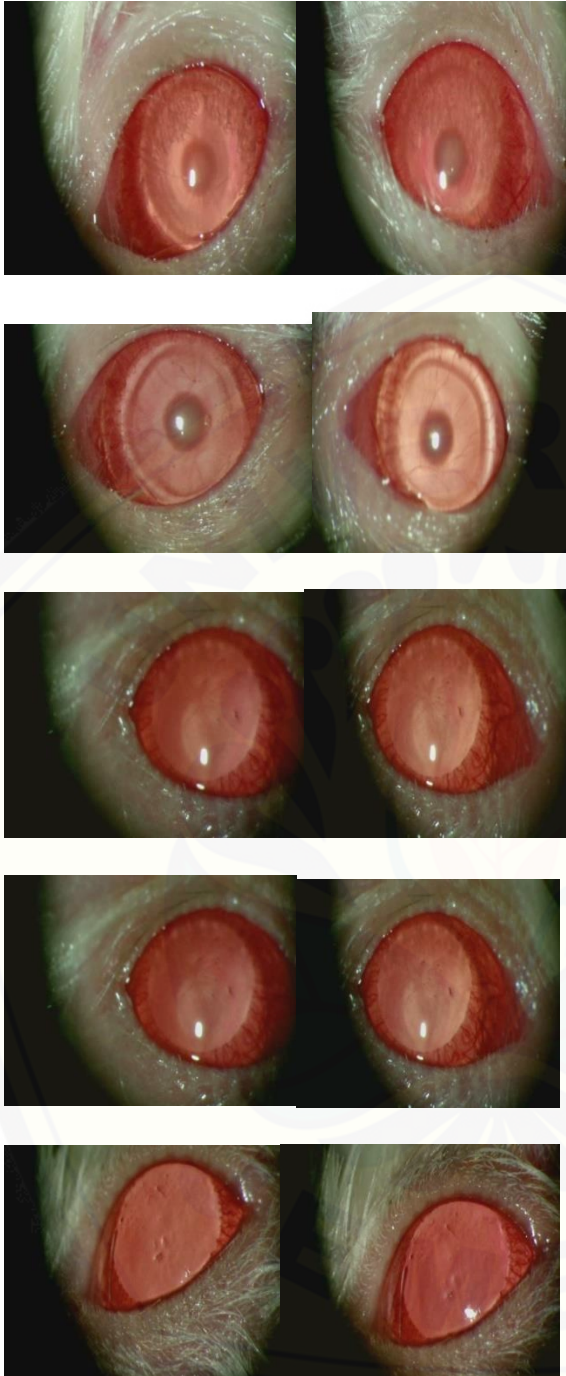
Gambar 4.2 Semua lensa keruh, yang 80% tingkat 4 dan 20% tingkat 3.

Kelompok III



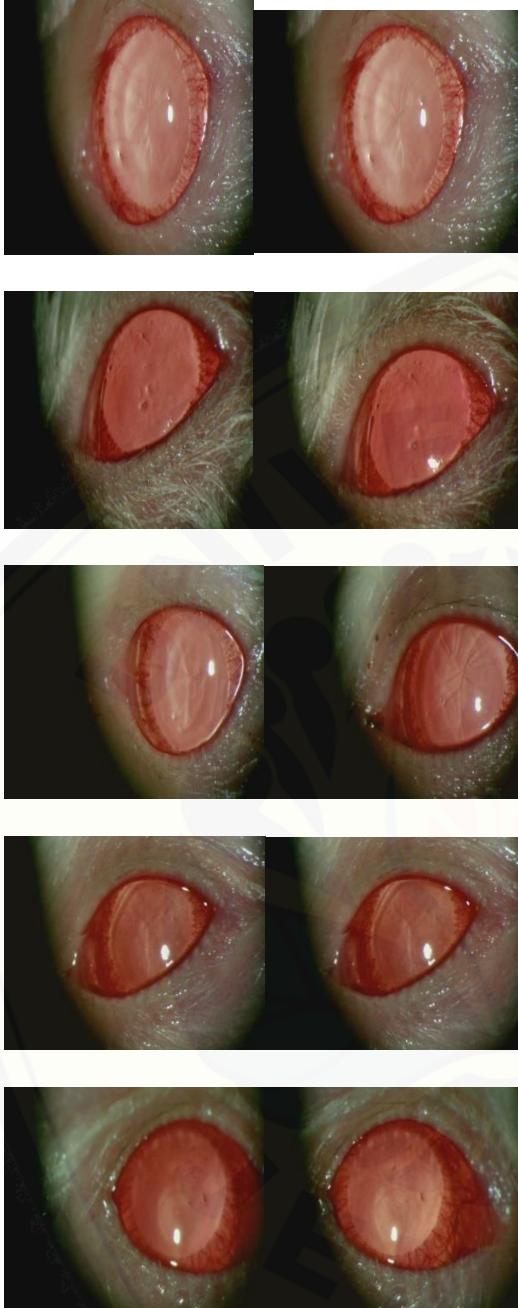
Gambar 4.3 Semua lensa keruh, 40% tingkat 3, 40% tingkat 2, 20% tingkat 1

Kelompok IV



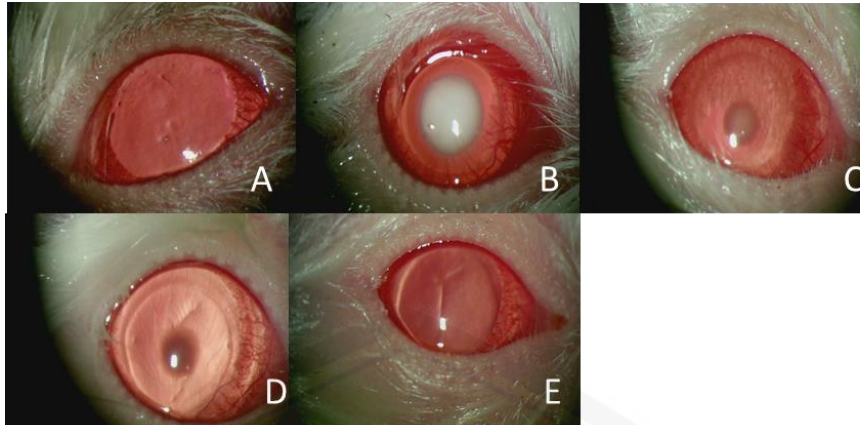
Gambar 4.4 Pada kelompok ini tingkat kekeruhan lensa berkurang; satu tikus dari 5 (20%) katarak tingkat 3, satu tikus dari 5 (20%), katarak tingkat 2 sementara tiga dari lima (60%) tidak terjadi katarak (tingkat 0).

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 5.2. lensa mata pada tikus 5.2B mengalami katarak setelah diberi sodium selenite.



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

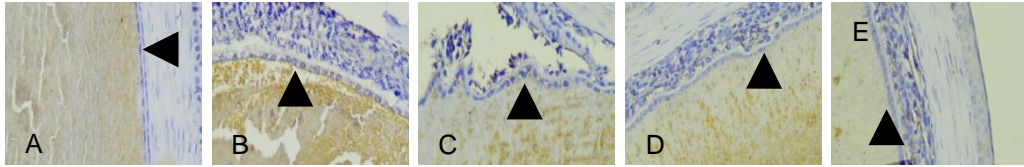
(A) lensa yg jernih (Grade 0) pada kelompok kontrol, (B) Grade IV dalam kelompok hanya diberi natrium-selenit, (C) Grade III dalam kelompok yang diberikan natrium-selenit dan isolat katekin 50 mg / kg kelompok berat badan, (D) kelas II dalam kelompok diberikan natrium-selenite dan isolat katekin 100 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

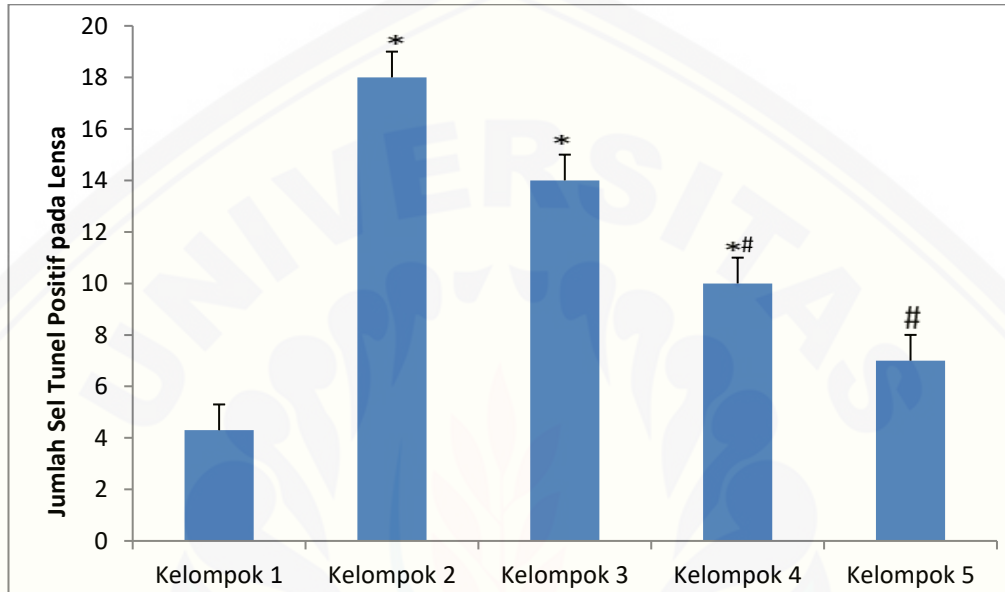
Kelompok Percobaan	Jumlah tikus	Jumlah tikus dengan perbedaan tingkat kekeruhan					Jumlah tikus yang terjadi katarak
		0	+	++	+++	++++	
Kelompok 1 (Normal)	5	5	-	-	-	-	0
Group II (hanya sodium selenite 19 $\mu\text{mol/kg}$)	5	-	-	-	1	4	5 (100%)
Group III (sodium selenite 19 $\mu\text{mol/kg}$ + katekin 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. 2A). Injeksi Na₂SeO₃ subkutan (19 µmol/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 Na₂SeO₃ terjadi katarak: satu dari lima (20%) katarak tingkat 3 (Gbr. 2C) dan sisanya dari lima (80%) katarak grade 4 (Gbr. 2B), sedangkan injeksi dengan Na₂SeO₃ dan suntikan katekin 50mg/kg menunjukkan bahwa keparahan pembentukan katarak menurun; dua tikus dari 5 (40%) katarak grade 3 (Gbr. 2C), dua tikus dari 5 (40%) katarak grade 2 (Gbr. 2D) dan satu dari lima (20%) katarak grade 1 (Gbr. 2E) sementara katarak grade 4 (Gbr. 2B) tidak ditemukan. Pada kelompok yang diinjeksi Na₂SeO₃ 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 Na₂SeO₃ 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 3, 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 ($p = 0,022$).

4.5.4 Hasil Pemeriksaan Uji Tunel



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



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

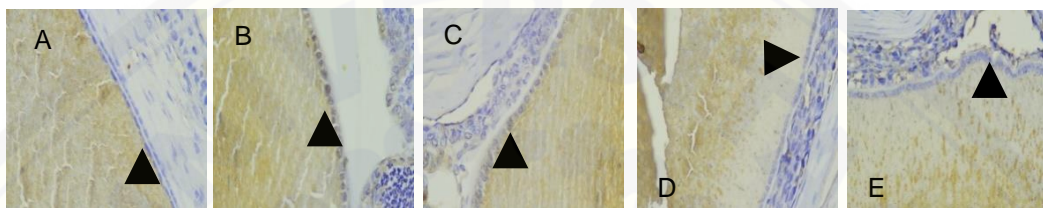
Gambar 4.8 Jumlah sel tunel positif rata-rata 7 hari setelah injeksi dalam lima kelompok percobaan

Jumlah rata-rata sel Tunel pada kelompok tikus II ($18 \pm 1,264$) secara signifikan ($P < 0,001$) lebih tinggi daripada jumlah sel Tunel Kelompok I ($4,3 \pm 2,136$), Kelompok III ($14 \pm 2,562$), Kelompok IV ($10 \pm 2,136$), dan Kelompok V ($7 \pm 2,097$) (Gambar 5.4). Perbedaan yang signifikan juga diamati pada jumlah sel Tunel dalam lensa ($P < 0,001$) antara kelompok III dan kelompok IV. Jumlah sel Tunel pada lensa menurun dan peningkatan tingkat kekeruhan lensa pada kelompok II. Selanjutnya, jumlah sel Tunel menurun secara bertahap dan tingkat kekeruhan menurun sesuai dengan pemberian dosis katekin (kelompok III, IV, dan V).

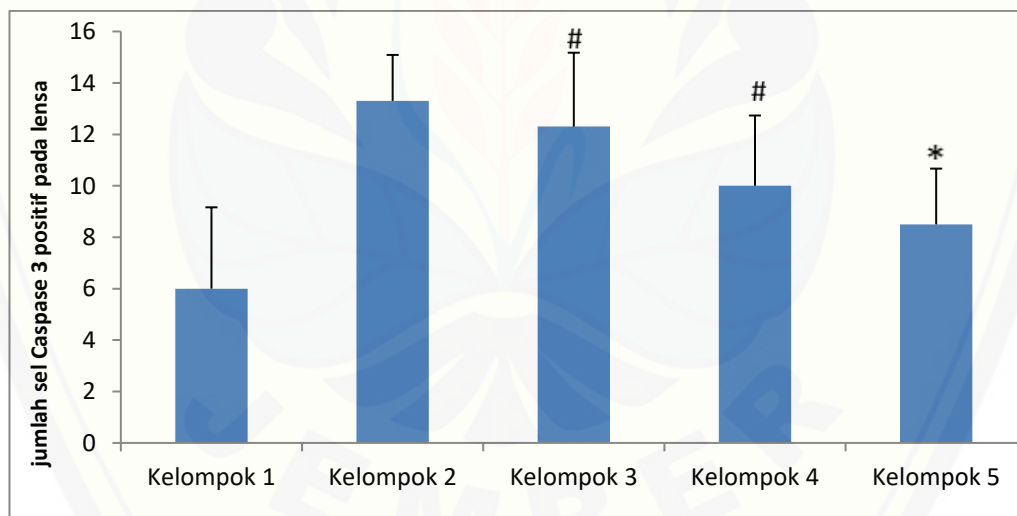
Kadar Tunel dalam lensa dari kelompok Na_2SeO_3 ditemukan secara signifikan ($p < 0,01$) lebih tinggi daripada lensa dari kelompok kontrol dan kelompok katekin. Pengobatan dengan katekin pada kelompok katekin + Na_2SeO_3 (Gambar 5.4) secara signifikan ($p < 0,01$) menurunkan kadar Tunel.

Pemberian katekin dalam kelompok katechin + Na_2SeO_3 (Gambar 5.4) secara signifikan ($p < 0,01$) menurunkan jumlah sel TUNEL-positif dibandingkan dengan kelompok Na_2SeO_3 .

4.5.5 Hasil Pemeriksaan Caspase-3



Gambar 4.9 Hasil pemeriksaan Caspase-3 (A) Kelompok 1, (B) kelompok 2, (C) Kelompok 3, (D) Kelompok 4, (E) Kelompok 5



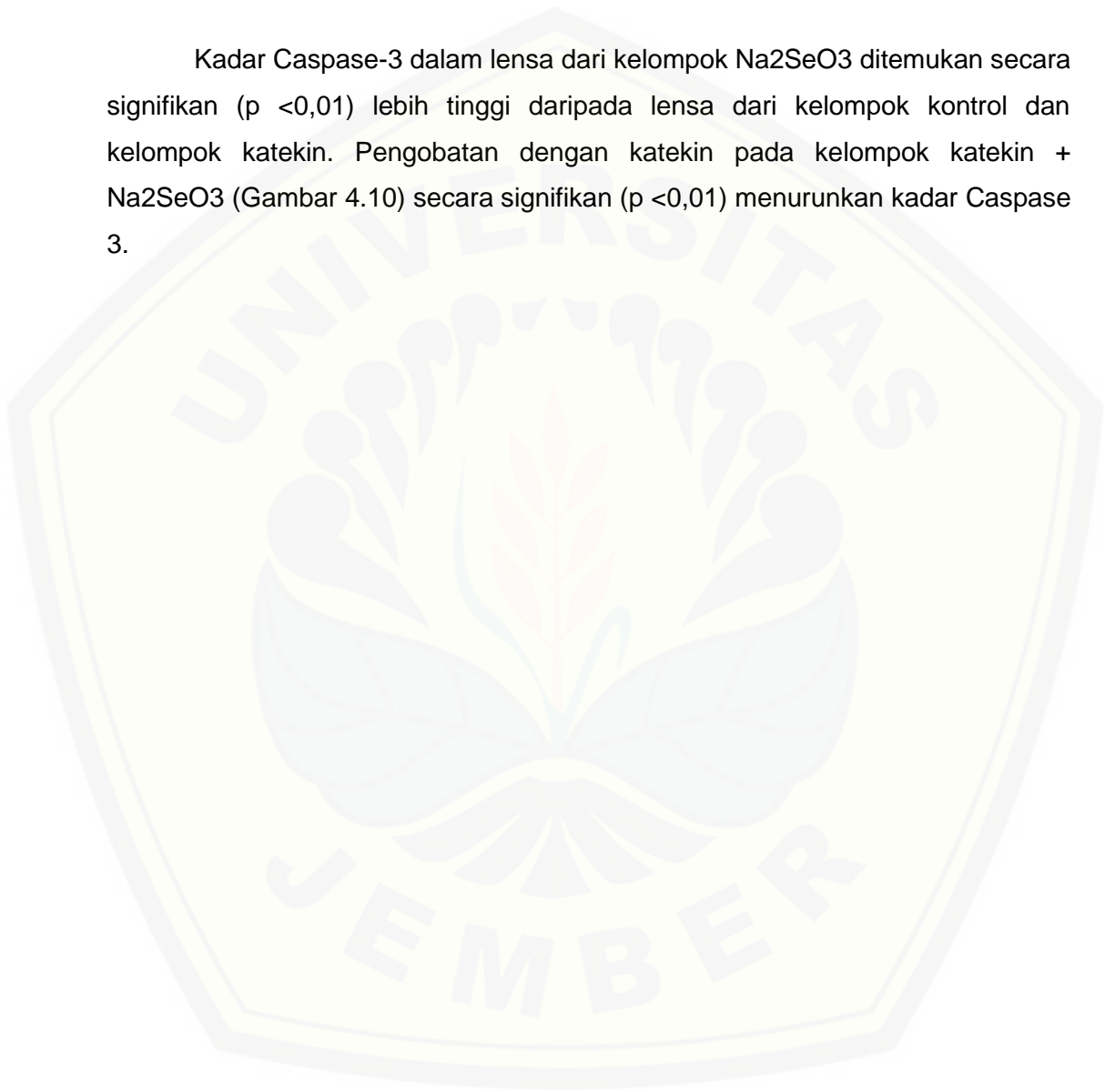
Keterangan: * Signifikan terhadap kelompok 1, # signifikan terhadap kelompok 2

Gambar 4.10 Jumlah sel dengan caspase-3 positif rata-rata 7 hari setelah injeksi dalam lima kelompok percobaan

Tingkat rata-rata caspase-3 lensa pada kelompok tikus II ($13,3 \pm 1,7888$) secara signifikan ($P < 0,001$) lebih tinggi daripada tingkat dalam lensa Kelompok I ($6 \pm 3,162$), lensa Kelompok III ($12,3 \pm 2,875$), Kelompok IV ($10 \pm 2,732$), dan

Kelompok V ($8,5 \pm 2,167$) (Gambar 4.10). Perbedaan yang signifikan juga diamati pada tingkat Caspase-3 dalam lensa ($P < 0,001$) antara kelompok II dan kelompok V. Tingkat Caspase-3 pada lensa meningkat dan peningkatan tingkat kekeruhan lensa pada kelompok II. Selanjutnya, tingkat caspase-3 menurun secara bertahap dan tingkat kekeruhan menurun sesuai dengan pemberian dosis katekin (kelompok III, IV, dan V).

Kadar Caspase-3 dalam lensa dari kelompok Na₂SeO₃ ditemukan secara signifikan ($p < 0,01$) lebih tinggi daripada lensa dari kelompok kontrol dan kelompok katekin. Pengobatan dengan katekin pada kelompok katekin + Na₂SeO₃ (Gambar 4.10) secara signifikan ($p < 0,01$) menurunkan kadar Caspase 3.



BAB. V

KESIMPULAN DAN SARAN

1. 1 Kesimpulan

1. Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan antara Caspase-3, Uji Tunel dan tingkat kekeruhan lensa pada tikus yang mengalami katarak setelah diinduksi sodium selenit.
2. Penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh katekin terhadap dosis Caspase 3, gambaran Tunel 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 100 mg/BB dan 200 mg/BB Isolat golongan senyawa katekin teh hijau GMB4 terbukti dapat menurunkan ekspresi gambaran Tunel (+);
 - c. Pemberian dosis 200 mg/BB Isolat golongan senyawa katekin teh hijau GMB4 terbukti dapat menurunkan ekspresi Caspase-3

6.2 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

- Acrani G.O, Gomes R, Proença-Módena J.L, da Silva A.F, Carminati P.O, Silva M.L, Santos R.I, and Arruda E, 2010. Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Res.* 149 (1): 56–63.
- Adam, Jerry M. 2015. Ways Of Dying: Multiple Pathways to apoptosis. *Genes & Development.* 17:2481-2495.
- 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.*
- Aswaty Nur, Retty Ratnawati, Diana L. 2018. Catechin of GMB4 Inhibits Adipogenesis Throug PPAR γ and Adiponectin in Primary Culture of Visceral Preadipocyte of *Rattus Norvegicus* Wistar. *Research Journal of life Science.* Vol 5 (54-65).
- 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
- 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*.
- 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 Mitochondrial 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.
- 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
- 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.

- 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, Mourboul 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. Endoplasmic 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 Kingdom.*
- 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.
- 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.
- 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 Ophthalmol*:57. 185-189.
- 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 Ping 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.
- 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.
- Kumar, V; Shalini G,Ocan S.P;Shraddha G; Pankaj G; Janmejay P. 2017. Effect of Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate on the Aggregation of α A(66-80) Peptide, a Major Fragment of α A-crystallin Involved in Cataract Development; *Jurnal Current Eye Research*: 1368-1377.
- 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.
- 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
- Li G., Scull C., Ozcan L., Tabas I. 2010. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and p53 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.
- Kezhong Zhang. 2010. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int J Clin Exp Med*. ; 3(1): 33–40.
- Martinus, BA, Arel A & Gusman A. 2014. Perbandingan Kadar Fenolat Total Dan Aktivitas Antioksidasi 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.
- 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, NoriyukiM& Yoriyuki. 2018. Benefical Effect of Gren 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.
- 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. Department 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.
- 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.
- Pollreisz, A and Schmidt-Erfurth, U. 2010. Review Article Diabetic Cataract Pathogenesis, Epidemiology and Treatment, *Journal of Ophthalmology*; 2010:1-8.
- Ratnawati, R. 2010. Pemanfaatan Isolat Epigallocatechin gallate (EGCG) Teh Hijau klon GMB4 pada Adiptosis : Studi in Vitro dan In Vivo. Laporan Program Insentif Riset Peningkatan kapasitas iptek sistem Produksi TA. 2010: Lembaga Penelitian Dan Pengembangan Pengabdian Masyarakat Universitas Brawijaya.
- 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

- 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.
- 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.
- 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.
- Shafi, G. Munshi, A, Hasan, T.N, Alshatwi, A. A., Ajoythy². Lei, D. K. 2009. Induction of Apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer Cell International*, 9 (29), 1-8
- 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.
- Shen Y, Feng Dong. L, Mei Zhou, R, Jin Y, Chen song Y, Yang H, Jiang Q & Biao Yan. 2016. Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis, and migration of lens epithelial cells: a clinical and in vitro study. *J Cell Mol Med.* 20 (3) : 537-548.
- 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.

Suprpto, J. 2009. Statistik Teori dan Aplikasi Edisi Ketujuh. Penerbit Erlangga:PT. Gelora Aksara Pratama.

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

Syakir. 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.

- 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 diseases, 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.
- 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.
- 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:Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014:1-11.
- 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.
- Zhu, Lili, Ke Zhao & Dinghua Lou. 2016. Apoptosis Factors of lens epithelial cells Responsible for Cataractogenesis in Vitrectomized eyes with silicone oil Tamponade. *Medical Science Monitor*. 22:788-796.
- 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

