

**PENGARUH PEMBERIAN GLUTATHION TEREDUKSI (GSH) DAN
NIASIN TERHADAP KATARAK PADA KEADAAN HIPERGLIKEMIA
MELALUI JALUR REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS), UNFOLDING
PROTEIN RESPONS (UPR) DAN POLIMERISASI α KRISTALIN**

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Doktor



Oleh:

NINA HANDAYANI

NIM. 147070100111006

PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

BIDANG MINAT BIOMEDIK

PROGRAM PASCA SARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

RINGKASAN

Nina Handayani, NIM 147070100111006. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 2018. Pengaruh Pemberian Glutathione Tereduksi (GSH) dan Niasin terhadap Katarak pada Keadaan Hiperglikemia melalui jalur Reactive Oxygen Species (ROS), Unfolding Protein Response (UPR), dan Polimerisasi α kristalin. Komisi Pembimbing Ketua : Prof. Dr. dr. Ahmad Rudijanto, SpPD-KEMD, Anggota : dr. Hidayat Sujuti, SpM, PhD., drg Nur Permatasari, MKes.

Diabetes Melitus merupakan salah satu faktor resiko terjadinya katarak. Beberapa jalur patogenesis yang dianggap berperan terhadap munculnya katarak pada kondisi diabetes adalah jalur polyol atau jalur aldosa reduktase dan sorbitol, teori glikasi non enzimatis, stress oksidatif, *Unfolding Protein Response* (UPR), maupun jalur apoptosis. Jalur polyol akan mengaktifkan terjadinya stress oksidatif, dan kondisi hiperglikemia akan meningkatkan terjadinya glikosilasi protein dan pembentukan radikal bebas. Stress oksidatif dapat memicu terbentuknya UPR dan akan menyebabkan penurunan antioksidan glutathione serta semakin meningkatnya terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Katarak merupakan kekeruhan pada lensa mata yang menyebabkan penurunan penglihatan dan menjadi penyebab utama kebutaan di dunia. Stress oksidatif masih dianggap sebagai salah satu faktor utama penyebab katarak. Glutathione tereduksi (GSH) merupakan salah satu antioksidan terbesar di dalam lensa yang mempunyai fungsi proteksi terhadap oksidasi tersebut. Glutathione diharapkan dapat menjadi mekanisme pertahanan terhadap lensa terhadap proses kataraktogenesis. Pada kondisi hiperglikemia kronis seperti diabetes melitus, didapatkan penurunan kadar GSH yang disebabkan oleh penurunan sintesisnya maupun regenerasi dari GSSG karena kofaktor NADPH digunakan dalam perubahan glukosa menjadi sorbitol. Penurunan GSH ini dianggap dapat meningkatkan stress oksidatif yang dapat memicu timbulnya katarak. Karena itu dalam kondisi hiperglikemia kronis perlu dipertimbangkan pemberian GSH dan niasin pada sel untuk mengatasi terjadinya penurunan GSH dan niasin yang diperlukan dalam sintesis NADPH dan penting dalam proses regenerasi GSSG

menjadi GSH, sehingga kadar GSH dalam sel dapat dipertahankan serta tidak terjadi penumpukan GSSG dalam sel yang kemungkinan dapat menjadi suatu pro oksidan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk pada sel kultur epitel lensa mengetahui pengaruh pemberian glutathione tereduksi (GSH) dan niasin dalam upaya pencegahan katarak yang diawali dengan adanya agregasi kristalin karena proses stress oksidatif dengan melihat kadar protein carbonyl content sebagai penanda oksidasi pada protein lensa, GRP 78/Bip sebagai penanda stress retikulum endoplasma, dan *Advanced Glycation End Products* (AGE's) untuk mengetahui peningkatan glikasi protein pada lensa kristalin, serta polimerisasi α kristalin sebagai tanda terjadinya proses agregasi protein di dalam lensa. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa terdapat penurunan kadar MDA, PCC, GRP78/BiP, AGEs dengan pemberian GSH, niasin, maupun kombinasi GSH dan niasin. Pemeriksaan agregasi α kristalin menunjukkan adanya peningkatan dari berat molekul kristalin menjadi 76 kDA yang mengindikasikan terjadi agregasi protein. Dosis kombinasi yang dianggap cukup efektif dalam menurunkan variabel diatas adalah GSH 10 μ m+niasin 25 μ M.



SUMMARY

Diabetes mellitus is a risk factor for cataract. Few theories has described the pathogenesis of cataract development in diabetics includes the polyol pathway or aldose reductase and sorbitol pathway, the theory of non-enzymatic glycation, oxidative stress, Unfolding Protein Response (UPR), and apoptotic pathways. Polyol pathway activates the oxidative stress, and conditions of hyperglycemia would increase the glycosylation of proteins and the formation of free radicals. Oxidative stress itself will trigger the formation of the UPR and this will cause a decrease in antioxidant glutathione and the increasing formation of Reactive Oxygen Species (ROS).

Cataracts are opacities in the lens that causes loss of vision and is a major cause of blindness in the world. Oxidative stress is still regarded as one of the main factors associated with cataracts. Reduced glutathione (GSH) is one of the greatest antioxidant in the lens which has the function of protection against oxidation. Glutathione is expected to be a defense mechanism against the lens against cataractogenesis process. Decreased level of reduced glutathione (GSH) in the lens due to hyperglycemia is considered to increase the progression of cataract. Decreased levels of GSH also caused by a decrease in the synthesis and regeneration of GSSG as a cofactor NADPH is used in the conversion of glucose to sorbitol. In that condition, GSH and niacin are required in the synthesis of NADPH is important in the process of regeneration of GSSG into GSH, so that the levels of GSH in cells can be maintained and no excess of GSSG in the cells that are likely to become a pro-oxidant.

The aim of this study is to determine the effect of reduced glutathione (GSH) human epithelial cell culture in the prevention of cataracts which begins with the aggregation of crystalline and the process of oxidative stress by examining the levels of protein carbonyl content as a marker of oxidation of lens proteins, GRP 78 / Bip as a marker of endoplasmic reticulum stress, and Advanced glycation End Product to determine the increase glycation of proteins in the crystalline lens, and polymerization of α crystalline as an early sign of protein aggregation process in the lens. The results of the study showed that there were decreases in levels of MDA, PCC, GRP78 / BiP, AGEs with GSH, niacin, and combination of GSH and niacin. Western Blott examination shows an increase of crystalline molecular weight to 76

KDA which indicates protein aggregation. The combination dose that is considered to be effective in reducing the variables above is GSH $10\mu\text{M}$ + $25\mu\text{M}$ niacin.



DAFTAR ISI

Judul Disertasi	i
Ringkasan	ii
Summary	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	6
1.3 Sub Masalah	7
1.4 Tujuan Penelitian	7
1.4.1 Tujuan Umum	7
1.4.2 Tujuan Khusus	8
1.5 Manfaat	8
1.5.1 Manfaat Akademis	8
1.5.2 Manfaat klinis	8
BAB II LANDASAN TEORI	9
2.1 Definisi dan Beberapa Tipe Katarak Diabetika	9
2.1.1 Katarak Nuklearis	9
2.1.2 Katarak Kortikal	10
2.1.3 Katarak Subkapsularis Posterior	11
2.1.4 Katarak pada Diabetes Mellitus	13
2.2 Patogenesis Terjadinya Katarak	14
2.2.1 Jalur Aldosa Reduktase dan Sorbitol	15
2.2.2 Teori Glikasi	19
2.2.3 Stres Oksidatif	22
2.2.4 <i>Unfolding Protein Response (UPR)</i> pada katarak diabetika	28
2.2.5 Jalur Apoptosis	31
2.3 Lensa Kristalin dan Katarak	34
2.3.1 Protein <i>misfolding</i> dan agregasi pada katarak	35
2.3.2 α Kristalin Sebagai Chaperon	37
2.3.3 Perubahan Lensa Kristalin pada Diabetes Mellitus	40
2.3.4 Oksidasi Protein pada Katarak	44
2.4 Proses Protein Folding	44
2.4.1 Protein folding di dalam Retikulum Endoplasma	46
2.4.2 Stres Retikulum Endoplasma	50
2.4.3 <i>Unfolded Protein Response (UPR)</i>	53
2.4.3.1 Sinyaling UPR	54
2.4.3.2 Sinyaling IRE1	55
2.4.3.3 PERK (PKR-like ER Kinase)	56

2.4.3.4.	Sinyaling ATF6.....	59
2.4.4.	<i>Unfolded Protein Response</i> (UPR) dan Apoptosis	63
2.4.5.	UPR pada kondisi katarak dan katarak diabetika	66
2.5.	<i>Glutathione</i> tereduksi (GSH).....	70
2.5.1.	Homeostasis dan Sintesis <i>Glutathione</i> tereduksi (GSH).....	70
2.5.2.	Fungsi Biologi <i>Glutathione</i>	73
2.5.3.	<i>Glutathione</i> dan Stres Oksidatif	76
2.5.4.	<i>Glutathione</i> pada Lensa	81
2.5.4.1.	<i>Glutathione</i> pada Lensa serta Peran dalam Terjadinya Katarak	84
2.5.4.2.	<i>Glutathione</i> pada Katarak Diabetika	93
2.5.4.3.	<i>Glutathione</i> Transporter	96
2.6.	Niasin (Nicotinic Acid)	99
2.6.1.	Formula dan Bentuk Dasar Niasin	99
2.6.2.	Farmakodinamik Niasin	101
2.6.3.	Niasin dan Katarak	102
2.6.4.	Niasin dan Pentosephosphate Pathway	103
	BAB III KERANGKA TEORI , KONSEPTUAL, DAN HIPOTESIS	105
3.1.	Kerangka Teori	105
3.2.	Kerangka Konsep	108
3.3.	Hipotesa Penelitian	111
	BAB IV METODE PENELITIAN	112
4.1.	Desain Penelitian	112
4.2.	Tempat dan Waktu Penelitian	112
4.3.	Tahapan Penelitian	112
4.4.	Sampel Penelitian	113
4.4.1.	Perkiraan Besar Sampel	113
4.5.	Variabel Penelitian	114
4.5.1.	Variabel Bebas (<i>Independent</i>)	114
4.5.2.	Variabel Tergantung (<i>Dependent</i>)	114
4.6.	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	114
4.6.1.	Kriteria Inklusi	114
4.6.2.	Kriteria Eksklusi	114
4.7.	Definisi Operasional	114
4.8.	Alat Penelitian	115
4.9.	Bahan Penelitian	116
4.10.	Cara Kerja Penelitian	116
4.10.1.	Kultur Sel Epithel Lensa	117
4.10.2.	Perlakuan Kultur Sel Epithel Lensa	118
4.10.3.	Metode Pengukuran Kadar PCC dengan ELISA (MyBio Source)	118
4.10.3.1.	Persiapan Reagen	118
4.10.3.2.	Prosedur Pemeriksaan <i>Protein Carbonyl Content</i> (PCC)	119
4.10.4.	Metode pengukuran GRp78/Bip dengan Elisa (<i>My Bio</i>	119

	Source)	120
4.10.4.1.	Pengumpulan Sampel Kultur Sel Lysate	120
4.10.4.2.	Prosedur Pemeriksaan	121
4.10.5.	Metode Pengukuran <i>Advance Glycation End Product</i> (AGEs) dengan ELISA (MyBioSource)	122
4.10.5.1	Pengumpulan Sampel (Sel Lysate)	122
4.10.5.2.	Prosedur Pemeriksaan	122
4.10.6.	Metode Pemeriksaan Polimerisasi α Kristalin dengan <i>Western Blott</i>	123
4.10.6.1	Persiapan Lisat dari Sel Kultur	124
4.10.6.2.	Persiapan Sampel untuk pemeriksaan <i>Western Blotting</i>	124
4.10.6.3.	Persiapan Gel SDS-PAGE	125
4.10.6.4.	Transfer Protein dari Gel ke Membran	125
4.10.6.5.	Pewarnaan dengan Antibodi	126
4.11.	Rancangan Analisa Data	126
BAB V PENELITIAN TAHAP I PENENTUAN DOSIS AWAL GLUTATHIONE TEREDUKSI (GSH) DAN NIASIN DENGAN MENGGUNAKAN VARIABEL MALONDIALDEHYDE (MDA).....		
5.1.	Latar Belakang	128
5.2.	Rumusan Masalah	130
5.3.	Tujuan Penelitian Tahap I	131
5.3.1.	Tujuan Umum	131
5.3.2.	Tujuan Khusus	131
5.4.	Metode Penelitian	132
5.4.1.	Waktu Penelitian	132
5.4.2.	Tempat Penelitian	132
5.4.3.	Sampel Penelitian	132
5.4.4.	Variabel Penelitian	132
5.4.5.	Prosedur Pemeriksaan	133
5.4.5.1.	Perlakuan Kultur Sel Epithel Lensa	133
5.4.5.2.	Metode Pengukuran MDA dengan menggunakan TBARS Assay	134
5.5.	Alur Kerja Penelitian	136
5.6.	Analisa Data	138
5.7.	Hasil dan Analisa Data	138
5.7.1.	Hasil Pemeriksaan MDA setelah Pemberian GSH	139
5.7.2.	Analisa Statistik	140
5.7.3.	Data Hasil Pemeriksaan Kadar MDA dengan Pemberian Niasin	143
5.7.4.	Analisa Statistik	145
5.8.	Pembahasan Penelitian Tahap I.....	148
BAB VI PENELITIAN TAHAP II PENGARUH PEMBERIAN		

GLUTATHIONE TEREDUKSI (GSH) DAN NIASIN TERHADAP PROSES TERJADINYA KATARAK PADA KONDISI HIPERGLIKEMIA MELALUI JALUR STRESS OKSIDATIF DAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR)

6.1.	Latar Belakang	152
6.2.	Rumusan Masalah	154
6.2.1.	Sub Masalah	155
6.3.	Tujuan Penelitian Tahap II	155
6.3.1.	Tujuan Umum	155
6.3.2.	Tujuan Khusus	156
6.4.	Metode Penelitian	156
6.4.1.	Waktu Penelitian	156
6.4.2.	Tempat Penelitian	156
6.4.3.	Sampel Penelitian	156
6.4.4.	Variabel Penelitian	156
6.4.5.	Prosedur Pemeriksaan	157
6.4.5.1.	Perlakuan Kultur Sel Epithel Lensa	157
6.4.5.2.	Metode Pengukuran PCC dengan ELISA	158
6.4.5.3.	Metode pengukuran GRp78/Bip dengan ELISA	158
6.4.5.4.	Metode Pengukuran AGE dengan ELISA	158
6.4.5.4	Metode Pemeriksaan Polimerisasi α Kristalin dengan Western Blotting	158
6.5.	Alur Kerja Penelitian	159
6.6.	Analisa Data	161
6.7.	Hasil dan Analisa Data	161
6.7.1.	Data Hasil Pemeriksaan PCC dengan Pemberian GSH.....	162
6.7.2.	Analisa Statistik.....	163
6.7.3.	Data Hasil Pemeriksaan GRP78 dengan Pemberian GSH	166
6.7.4.	Analisa Statistik.....	167
6.7.5.	Data Hasil Pemeriksaan PCC dengan Pemberian Niasin...	170
6.7.6.	Analisa Statistik.....	172
6.7.7.	Data Hasil Pemeriksaan GRP78 dengan Pemberian Niasin.....	175
6.7.8.	Analisa Statistik.....	176
6.7.9.	Pembahasan Penelitian Tahap 2.....	180

BAB VII PENELITIAN TAHAP III PENGARUH PEMBERIAN GLUTATHIONE TEREDUKSI (GSH) DAN NIASIN TERHADAP PROSES TERJADINYA KATARAK PADA KONDISI HIPERGLIKEMIA MELALUI JALUR STRESS OKSIDATIF, UPR, DAN POLIMERISASI α KRISTALIN.

7.1.	Latar Belakang	187
7.2.	Rumusan Masalah	189
7.3.	Tujuan Penelitian	190
7.3.1.	Tujuan Umum	190
7.4.2.	Tujuan Khusus	190
7.4.	Metode Penelitian	191



7.4.1.	Waktu Penelitian	190
7.4.2.	Tempat Penelitian	191
7.4.3.	Sampel Penelitian	191
7.4.4.	Variabel Penelitian	192
7.4.5.	Prosedur Pemeriksaan	192
7.4.5.1.	Perlakuan Kultur Sel Epithel Lensa	192
7.4.5.2.	Metode Pengukuran Kadar PCC dengan ELISA	193
7.4.5.3.	Metode pengukuran GRp78/Bip dengan ELISA	193
7.4.5.4.	Metode Pengukuran AGE dengan ELISA	193
7.4.5.5.	Metode Pemeriksaan Polimerisasi α Kristalin dengan <i>Western Blotting</i>	193
7.5.	Alur Kerja Penelitian	194
7.6.	Rancangan Analisa Data	195
7.7.	Hasil Penelitian Tahap III	194
7.7.1.	Data Hasil Pemeriksaan PCC dengan Pemberian Kombinasi GSH dan Niasin	196
7.7.2.	Analisa Statistik	197
7.7.3.	Data Hasil Pemeriksaan GRP78 dengan Pemberian kombinasi GSH dan Niasin	199
7.7.4.	Analisa Statistik	201
7.7.5.	Data Hasil Pemeriksaan AGEs dengan Pemberian kombinasi GSH dan Niasin	203
7.7.6.	Analisa Statistik	205
7.7.7.	Data Hasil Pemeriksaan Agregasi α Kristalin dengan metode <i>Western Blotting</i>	207
7.7.8.	Pembahasan Penelitian Tahap III.....	209
BAB VIII PEMBAHASAN UMUM		214
BAB IX KESIMPULAN DAN SARAN		225
9.1	Kesimpulan	225
9.2	Saran	226
DAFTAR PUSTAKA		227
LAMPIRAN		242



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Katarak Nuklearis 10

Gambar 2.2. Katarak kortikal diperiksa menggunakan (A) *direct illumination*..... 11

Gambar 2.3. Katarak Subkapsularis Posterior..... 12

Gambar 2.4. Perbedaan tampilan dari *sugar cataracts* berdasarkan spesies yang berbeda..... 14

Gambar 2.5. Tampilan dari katarak diabetika dari pasien dengan diabetes melitus tipe 1 dan tipe 2..... 15

Gambar 2.6. Jalur Aldosa Reduktase pada Hiperglikemia 16

Gambar 2.7. Aktivitas dari jalur enzimpolyol 19

Gambar 2.8. Pembentukan Formasi *Advanced Glycation End Products* (AGE's)..... 20

Gambar 2.9. Hambatan GAPD..... 24

Gambar 2.10. ROS, PARP, dan GAPDH..... 25

Gambar 2.11. Mekanisme kerusakan selular yang disebabkan hiperglikemia..... 26

Gambar 2.12. Jalur stres oksidatif pada diabetes melitus..... 27

Gambar 2.13. Analisis protein blot dari kultur Lens Epithelial Cells dengan konsentrasi H₂O₂ yang berbeda..... 29

Gambar 2.14. Hubungan antara hiperglikemia, glikolisis, formasi AGE, aktivasi protein kinase, dan pembentukan ROS..... 31

Gambar 2.15. Polimerisasi dari γ D kristalin manusia menggunakan simulasi komputer..... 35

Gambar 2.16. Katarak terjadi karena agregasi protein..... 39

Gambar 2.17. Modulasi fungsi chaperone α kristalin..... 42

Gambar 2.18. Sensor pada saat terjadi stres RE..... 54

Gambar 2.19. Kondisi sel ditentukan oleh besar dan durasi sinyaling stres *RE*..... 62

Gambar 2.20. Jalur apoptosis yang diatur oleh *UPR*..... 63

Gambar 2.21. Pengaturan homeostasis antara *UPR* dengan apoptosis 65

Gambar 2.22. Analisis protein blot dari kultur Lens Epithelial Cells dengan konsentrasi H₂O₂ yang berbeda 69

Gambar 2.23. Biosintesis dari Glutathion Tereduksi (GSH) 72

Gambar 2.24. Fungsi Biologi dari GSH..... 74

Gambar 2.25. Sintesa Glutathion di dalam Lensa 88

Gambar 2.26. Metabolisme Hidrogen Peroksida oleh Glutathione..... 90

Gambar 2.27. Jalur Polyol, Sistem Antioksidan dan *G6PD Coupling* 96

Gambar 2.28. Biosintesis Niasin..... 100

Gambar 4.1. Contoh Persiapan Stack..... 126

Gambar 5.1. Grafik Rerata Kadar MDA pada Kultur Sel Epithel Lensa Pada Kelompok Kontrol Negatif, Kelompok kontrol Positif dan Kelompok Perlakuan dengan Pemberian *Glutathione* tereduksi (GSH)..... 140

Gambar 5.2.	Grafik rerata kadar MDA pada Kultur Sel Epithel Lensa pada Kelompok Kontrol Negatif, Kelompok Kontrol Positif dan Kelompok Perlakuan dengan Pemberian Niasin	145
Gambar 6.1.	Grafik rerata kadar PCC pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian glutathione tereduksi (GSH)	163
Gambar 6.2.	Grafik rerata kadar GRP78 pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian glutathione tereduksi (GSH)	167
Gambar 6.3.	Grafik rerata kadar PCC pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian niasin	172
Gambar 6.4.	Grafik rerata kadar GRP pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian niasin	176
Gambar 7.1.	Grafik rerata kadar PCC pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian glutathione tereduksi (GSH) dan Niasin	197
Gambar 7.2.	Grafik rerata kadar GRP78 pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian glutathione tereduksi (GSH) dan niasin	201
Gambar 7.3.	Grafik rerata kadar AGEs pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian glutathione tereduksi (GSH) dan niasin.	205
Gambar 7.4.	Hasil pemeriksaan protein α Kristalin dengan metode <i>western blotting</i>	208
Gambar 7.5.	Grafik densitas pixel	208

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Parameter Oksidatif, Antioksidatif, dan Tipe Katarak	26
Tabel 2.2.	Chaperone Residen Molekuler RE, Foldase, dan Lectins	49
Tabel 2.3.	Percobaan pada Katarak Kortikonuclear dan Matur	86
Tabel 2.4.	GR (<i>glutathione reductase</i>), GST (<i>Glutathione Stransferase</i> , dan GTP (<i>glutamyl trans peptidase</i>) pada Lensa Manusia Normal MenurutUsia yang Berbeda	92
Tabel 2.5.	Aktivitas GR, GST, dan GTP pada Lensa Manusia Normal dan Katarak	92
Tabel 4.1.	Ukuran Protein dan Persentase Gel	125
Tabel 5.1.	Rerata Kadar MDA pada Kultur Sel Epithel Lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan <i>Glutathione</i>	139
Tabel 5.2.	Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka MDA	142
Tabel 5.3.	Rerata Kadar MDA pada Kultur Sel Epithel Lensa Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan Niasin	144
Tabel 5.4.	Hasil Uji Lanjut Ujian Berganda terhadap Angka MDA	147
Tabel 6.1.	Rerata kadar PCC pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi dan diberikan glutathion	162
Tabel 6.2.	Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka PCC	165
Tabel 6.3.	Rerata Kadar GRP78 pada Kultur Sel Epithel lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan <i>Glutathione</i>	166
Tabel 6.4.	Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78	169
Tabel 6.5.	Rerata kadar PCC pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi dan diberikan niasin	171
Tabel 6.6.	Rerata kadar GRP78 pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi dan diberikan niasin.....	175
Tabel 6.7.	Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78	178
Tabel 7.1.	Rerata kadar PCC pada kultur sel epithel lensa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi dan diberikan glutathion dan glutathione kombinasi niasin	196
Tabel 7.2.	Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka PCC	199
Tabel 7.3.	Rerata kadar GRP78 pada kultur Sel Epithel Lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan Glutathion Kombinasi Niasin....	200



Tabel 7.4.	Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78	203
Tabel 7.5.	Rerata kadar GRP78 pada kultur Sel Epithel Lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan Glutathion Kombinasi Niasin....	204
Tabel 7.6.	Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Kadar AGES	207



DAFTAR SINGKATAN

AARE	= Amino Acid Response Element
AGES	= Advanced Glycation End Product
AOPP	= Advanced Oxidation Protein Products
AR	= Aldosa Reduktase
ARI	= Aldosa Reduktase Inhibitor
ASCT ₂	= Alanin-Serinecysteine Transporter
ASK	= Apoptosis signal-Regulating Kinase
ATCC	= American Type Culture Collection
ATF	= Activating Transcription Factor
ATP	= Adenosin Trifosfat
BIP	= Binding Immunoglobulin Protein
BSP	= Bromosulphophthalein
bZIP	= Basic Leucine Zipper
CAT	= Catalase
CONH ₂	= grup karboksamid
COOH	= grup karboksil
CRE	= Camp Response Element
CuSOD	= Copper Superoxide Dismutase
DM	= Diabetes Melitus
DMPTB	= Dimethylthiazolium Bromide
DNA	= Deoxyribo Nucleic Acid
DNP	= Dinitropheny
DPNH	= Dinitrophenylhydrazine
EAAT	= Excitatory Amino Acid Transporter
eLF ₂ α	= Eukaryotic Initiation Factor 2
ELISA	= Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERAD	= ER-Associated Degradation
ERSE	= ER Stres Response Element
FADH	= Flavin Adenine Denucleotide Hydrogen
FBS	= Fetal Bovain Serum
GAPDH	= Glyceraldehydes-3 Phosphate Dehydrogenase
GCLy	= Glutamate-Cysteine Ligase
GCSy	= Glutamyl-Cyteine Synthethase
GPX	= Glutathione Peroxidase
GR	= Glutathione Reductase
GRP	= Glucose-Regulated Protein
GS	= Glutathione Synthase
GSH	= Reduced Glutathione
GSSG	= Oxidized Glutathione
GST	= Glutathione-S-Transferase
G6PD	= Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase



HAS	= Human Serum Albumin
HEL	= Human Epithel Lens
HMW	= High Molcular Weight
H ₂ O ₂	= Hidrogen peroksida
IRE-1	= Inositol-Recquiring Kinase 1
IRS	= Insulin Receptor Substrat
KP	= Kontrol Positif
JNK	= Jun N-Terminal Protein Kinase
LDL	= Low Density Lipoprotein
MDA	= Malondyaldehyde
MGO	= Methylglyoxal
MgSOD	= Magnesium Superoxide Dismutase
MnSOD	= Manganase Superoxide Dismutase
MPTP	= Mitochondrial Permeability Transition Pore
NA	= Nicotinic Acid
NAD	= Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADP	= Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NO	= Nitric Oxide
OH ⁻	= Hidroksil
O ₂ ⁻	= Superoksida
PARP	= Poly (ADP-ribose) Polymerase
PBSA	= Phosphate Buffer Saline-A
PCC	= Protein Carbonyl Content
PERK	= PKR-like ER kinase
PLD	= Phospolipase D
PSSG	= Protein GSH
r-GCS	= r-Glutamyl-Cyteine Synthethase
RE	= Retikulum Endoplasma
ROOH	= Peroksida Organik
ROS	= Reactive Oxygen Species
SB	= Schiff Base
SDH	= Sorbitol Dehidrogenase
SH	= grup Sulfhydryl
SOD	= Superoksida Dismutase
S1P	= Site-1 Protease
S2P	= Site-2 Protease
TCA	= Tricarboxylic Acid
TOS	= Total Oxidant Status
UCP	= Uncoupling Proteins
UPR	= Unfolding Protein Response
UV	= Ultraviolet
VLDL	= Very Low Density Lipoprotein
-SH	= sulfhydryl

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Analisa Statistik Kadar MDA dengan pemberian GSH
- Lampiran 2. Analisa Statistik Kadar MDA dengan Pemberian Niasin
- Lampiran 3. Analisa Statistik Kadar PCC dan GRP dengah Pemberian Niasin
- Lampiran 4. Output SPSS Uji Perbedaan Rata-Rata
- Lampiran 5. Analisa Korelasi Regresi Kadar PCC dan GRP
- Lampiran 6. Analisa Statistik Kadar PCC dan GRP dengan pemberian GSH dan kombinasi GSH niasin
- Lampiran 7. Hasil Analisa Kadar AGE dengan pemberian GSH dan kombinasi GSH niasin
- Lampiran 8. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda Penelitian Tahap 1
- Lampiran 9. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda Penelitian Tahap 2
- Lampiran 10. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda Penelitian Tahap 3
- Lampiran 11. Hasil Analisa Statistika Tahap 1
- Lampiran 12. Hasil Analisa Statistika Tahap 2
- Lampiran 13. Hasil Analisa Statistika Tahap 3







BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Lensa adalah suatu struktur yang transparan di dalam mata yang mempengaruhi refraksi dari cahaya yang masuk ke mata. Lensa mata dapat mengalami katarak, yaitu kekeruhan lensa mata dan merupakan penyebab utama masalah sosial-medis dan kebutaan di seluruh dunia (Gupta, 2014). Pada tahun 2002, *World Health Organization (WHO)* memperkirakan katarak adalah sebagai penyebab utama terjadinya kebutaan di seluruh dunia, yang terjadi pada lebih dari 17 juta penduduk dunia dan sebagian besar berada pada daerah Asia Tenggara (Resnikoff, 2004). Faktor usia dan diabetes melitus termasuk dalam faktor resiko utama terjadinya katarak. Penelitian yang dilakukan oleh *Wisconsin Beaver Dam Study, the Australian Blue Mountains Eye Study, the France Pathologies Oculaires Liees a l'AGE (POLA) Study* dan *the West African Countries (Ghana dan Nigeria) Study*, prevalensi terjadinya katarak kortikal atau posterior subkapsular meningkat hingga lima kali lipat pada penderita diabetes (Delcourt, 2000; Rotimi, 2003; Saxena, 2004; Hennis, 2005; Klein, 2005; Mukesh, 2006).

Pada pasien dengan diabetes, katarak dapat mengalami maturitas sepuluh tahun lebih awal dibandingkan pada pasien tanpa diabetes (Pokupec, 2003). Beberapa jalur patogenesis yang dianggap berperan terhadap munculnya katarak pada kondisi diabetes adalah jalur polyol atau jalur *aldosa reduktase* dan sorbitol, teori glikasi non enzimatik, stres oksidatif, *Unfolding Protein Response (UPR)*, maupun jalur apoptosis. Jalur polyol akan mengaktifasi terjadinya stres oksidatif,

dan kondisi hiperglikemia akan meningkatkan terjadinya glikosilasi protein dan pembentukan radikal bebas. Stres oksidatif sendiri akan memicu terbentuknya UPR dan UPR akan menyebabkan penurunan antioksidan glutathion serta semakin meningkatkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species*(ROS).

Terjadinya peningkatan produksi ROS yang terus menerus dan ketidakmampuan sistem biologi untuk melakukan detoksifikasi terhadap ROS menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Kristalin yang merupakan protein utama dalam lensa yaitu sekitar 90% dari kandungan lensa dapat menunjukkan beberapa perubahan yang terjadi karena oksidasi. Kadar protein carbonyl yang didapatkan dari asam amino selama oksidasi protein dengan metal katalisa baik invitro maupun invivo menunjukkan pengukuran langsung dari terjadinya kondisi oksidasi dari molekul tersebut (Boscia, 2000). Protein sulfhyhidril diketahui dapat mempengaruhi struktur dan fungsi dari lensa kristalin dan kadarnya akan menurun jika terjadi oksidasi. Pengukuran grup protein carbonyl sebagai biomarker dari stress oksidatif mempunyai kelebihan dibandingkan dengan pengukuran dari produk oksidasi lainnya yaitu antara lain bahwa protein carbonyl terbentuk pada awal terjadinya oksidasi dan relatif stabil untuk mengetahui protein yang mengalami carbonylasi (Boscia, 2000).

Penelitian pada katarak senilis maupun katarak diabetika menunjukkan bahwa peningkatan glikasi dari protein kristalin, reaksi maillard, memainkan peranan penting dalam terjadinya katarak (Mulhern, 2006). Glikasi non enzimatik menyebabkan terbentuknya formasi *Advanced Glycation End Product* (AGE). Akumulasi dari AGE ini pada lensa kristalin merupakan salah satu patogenesis

munculnya katarak pada usia tua maupun pada pasien dengan diabetes melitus, dimana lensa juga merupakan organ yang rentan terhadap proses glikasi protein karena sedikit atau tidak adanya proses daur ulang protein di dalam lensa. Dengan demikian, protein lensa akan menjadi mudah mengalami agregasi dan membentuk partikel dengan berat molekul tinggi yang menyebabkan gangguan pada kejernihan lensa dan menyebabkan terjadinya katarak (Pokupec, 2003).

Dalam proses sintesis dan modifikasi protein di dalam lensa, protein dapat mengalami *unfolding*, *misfolding*, atau *incomplete folding*. Protein – protein yang tidak sempurna ini dapat terakumulasi di dalam *Retikulum Endoplasma* (RE) dan akan menyebabkan stres RE. Pada kondisi ini akan dikirimkan sinyal yang beraksi terhadap stres R yaitu *Unfolding Protein Response* (UPR). Aktivasi UPR akan memicu respon transkripsi secara luas yang akan mengatur kapasitas protein folding dalam RE sesuai dengan kebutuhan. Hiperglikemia kronis pada penyakit diabetes mellitus juga dapat memperburuk kondisi stres RE karena pada kondisi ini akan terjadi glikasi protein lensa serta peningkatan stres oksidatif. Salah satu penanda pada kondisi stres RE adalah *Binding Immunoglobulin Protein/ Glucose-Regulated Protein 78* (BiP/GRP 78). GRP78/BiP mempunyai fungsi sebagai chaperone dan ekspresinya juga didapatkan pada sel serat lensa (Mulhern, 2006).

Glutathione tereduksi (GSH) yang merupakan peptide thiol kecil memiliki peran yang penting sebagai proteksi terhadap stres oksidatif di dalam lensa dan konsentrasi, serta aktivitas GSH yang menurun sejalan dengan usia dianggap sebagai faktor utama terbentuknya katarak terkait usia (*AGE related cataract*) (Berthoud, 2009; Michael, 2011; Holm, 2013). *Glutathione* tereduksi (GSH) berfungsi

sebagai substrat pada reaksi enzimatik yang menyediakan donor elektron untuk molekul yang tidak stabil dan reaktif (Hayes, 1999; Holm, 2013), dan juga berperan untuk melindungi grup *thiol* pada membran protein dan kristalin intraseluler dari modifikasi post translasi yang menyebabkan *cross linking* (Holm, 2013).

Glutathione teroksidasi (GSSH) bereaksi secara non enzimatik dengan grup protein *thiol* untuk membentuk Protein GSH(PSSG) yang bercampur dengan *disulfide* yang berfungsi sebagai penyimpanan GSH dan melindungi dari terjadinya *disulfide cross linking of proteins* (PSSP) (Holm, 2013). Peningkatan *disulfide-linkages* menyebabkan terjadinya agregasi protein dengan berat molekul tinggi dan secara langsung akan menyebabkan gangguan kejernihan lensa (Liang, 2000; Holm, 2013).

Glutathione (GSH) ditemukan dalam konsentrasi yang tinggi dalam lensa dan memainkan peranan penting dalam melindungi lensa dengan cara detoksifikasi obat – obatan, menurunkan ROS dan peroksida, termasuk disulfida dan radikal bebas.

GSH membantu mempertahankan status *thiol-disulfida* dari sel, transport asam amino melalui siklus *gamma glutamyl*, dan membuang *elektrofili xenobiotik* dari sel (Mathew, 2006).

Telah diketahui bahwa kadar GSH yang rendah pada lensa yang mengalami katarak dapat disebabkan oleh sinar *Ultraviolet*(UV), kandungan zat toksik, gangguan metabolik, penuaan, ataupun defek genetik/bawaan (Mathew, 2006).

Kondisi hiperglikemik seringkali dihubungkan juga dengan terjadinya katarak, dan beberapa penelitian pada hewan coba menunjukkan hasil bahwa terdapat hubungan antara kadar GSH lensa yang rendah dengan katarak (Gao, 2011).

Suplementasi GSH terhadap lensa kemungkinan dapat membantu mempertahankan kemampuan protektifnya dalam menghadapi stres oksidatif dan dianggap dapat menghambat penurunan aktivitas antioksidan lensa pada kondisi penuaan dan diharapkan dapat menghambat munculnya katarak (Zhang, 2008). Karena pentingnya peranan GSH ini maka saat ini dikembangkan beberapa penelitian tentang bagaimana cara meningkatkan kadar GSH dalam sel sehingga dapat mencegah terjadinya katarak.

Berdasarkan penelitian dari *Blue Mountain Study*, didapatkan adanya hubungan antara katarak dengan makro dan mikronutrien, termasuk vitamin antioksidan. Sebanyak 2900 populasi dengan usia 49-97 tahun di Australia menjadi subyek dalam penelitian ini dan didapatkan hasil bahwa asupan niasin yang tinggi dapat menurunkan prevalensi terjadinya katarak nuklearis dengan odd ratio 0.6 (95% CI, 0,4-0,9) (Cumming 2000). Niasin atau dikenal juga dengan nama *nicotinic acid* (nicotinamide) adalah bagian dari struktur kimia dari koenzim *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD) dan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADP). Enzim-enzim yang memerlukan NAD/NADP terlibat dalam proses reaksi oksidasi, reduksi pada produksi energi, metabolisme kolesterol, oksidasi asam lemak, degradasi glukosa dan *pentose phosphate pathway*, sintesis asam amino dan degradasinya, perlawanan terhadap bakteri patogen (produksi ROS yang bergantung pada NADPH dan regenerasi GSH dari GSSG), sintesis glukokortikoid serta hormone seks (Kirkland 2009).

Pada kondisi hiperglikemia kronis seperti diabetes melitus, didapatkan penurunan kadar GSH yang disebabkan oleh penurunan sintesisnya maupun

regenerasi dari GSSG karena kofaktor NADPH digunakan dalam perubahan glukosa menjadi sorbitol. Penurunan GSH ini dianggap dapat meningkatkan stres oksidatif yang dapat memicu timbulnya katarak. Karena itu dalam kondisi hiperglikemia kronis perlu dipertimbangkan pemberian GSH dalam sel untuk mengatasi terjadinya penurunan GSH dan niasin yang diperlukan dalam sintesa NADPH yang penting dalam proses regenerasi GSSG menjadi GSH, sehingga kadar GSH dalam sel dapat dipertahankan serta tidak terjadi penumpukan GSSG dalam sel yang kemungkinan dapat menjadi suatu pro oksidan.

Berdasarkan latar belakang di atas diperlukan penelitian tentang peran GSH dan niasin dalam menghambat terjadinya katarak melalui hambatan terjadinya stres oksidatif dengan mengukur kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC), *Glucose Reactive Protein* (GRP 78/Bip) formasi *Advanced Glycation End Products* (AGEs), serta polimerisasi α Kristalin di dalam kultur sel epitel lensa.

1.2. Permasalahan

Berdasarkan uraian pada latar belakang tersebut di atas, yang menjadi masalah utama penelitian ini adalah :

Apakah Glutathion tereduksi (GSH) dan niasin dapat mencegah proses terjadinya katarak melalui hambatan terjadinya stres oksidatif serta pembentukan agregasi protein pada kultur sel epitel lensa dengan medium glukosa tinggi?

1.3. Sub Masalah

Untuk menjawab rumusan masalah di atas, maka perlu dijabarkan dengan menjawab beberapa masalah yang terkait sebagai berikut :

1. Apakah terdapat perbedaan kadar Malondyaldehyde (MDA), *Protein Carbonyl Content* (PCC), GRP/Bip 78, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan glutathione dan niasin dengan yang tidak mendapatkan glutathione dan niasin?
2. Apakah terdapat perbedaan kadar Malondyaldehyde (MDA), *Protein Carbonyl Content* (PCC), GRP/Bip 78, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi glutathione dan niasin dengan berbagai dosis?

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Mengetahui apakah *glutathione* tereduksi (GSH) dan niasin dapat mencegah proses terjadinya katarak melalui hambatan pembentukan agregasi protein lensa.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian GSH dan niasin terhadap kadar Malondyaldehyde (MDA), *Protein Carbonyl Content* (PCC), GRP/Bip 78, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui adanya perbedaan kadar Malondyaldehyde (MDA), *Protein Carbonyl Content* (PCC), GRP/Bip 78, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan glutathione dan niasin dengan yang tidak mendapatkan glutathione dan niasin.
2. Untuk mengetahui perbedaan kadar Malondyaldehyde (MDA), *Protein Carbonyl Content*(PCC),GRP/Bip 78, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi yang mendapatkan glutathione dan niasin dengan berbagai dosis.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat akademis

Dapat menambah konsep dasar patogenesis penggunaan glutathione dan niasin sebagai pencegahan terhadap proses terjadinya katarak melalui beberapa jalur yaitu stres oksidatif, stres retikulum endoplasma, pembentukan formasi produk glikasi, serta agregasi protein kristalin.

1.4.2. Manfaat klinis

Diharapkan dengan mempelajari efek pemberian glutathione dan niasin terhadap proses patogenesis katarak, maka akan diperoleh dasar teori terapi yang potensial untuk pencegahan maupun progresivitas terjadinya katarak.

BAB II

LANDASAN TEORI

2.1. Definisi dan Beberapa Tipe Katarak Diabetika

Katarak adalah kondisi dimana lensa mata mengalami kekeruhan sehingga mengganggu penglihatan. Kekeruhan pada lensa dapat terjadi karena peningkatan dari massa lensa dan ketebalan lensa. Nukleus lensa akan semakin mengalami kompresi dan mengeras seiring dengan tumbuhnya lapisan – lapisan korteks yang baru. Perubahan kimiawi dan protein lensa yang mengalami proteolisis akan menyebabkan protein dengan berat molekul yang tinggi mengalami agregasi. Agregasi protein lensa ini semakin lama akan semakin membesar dan menyebabkan fluktuasi dari indeks refraksi lensa dan menyebabkan kejernihan lensa berkurang. Modifikasi kimiawi juga dapat menyebabkan peningkatan pigmentasi dan perubahan warna menjadi kekuningan atau kecoklatan pada usia tua. Perubahan lensa pada usia tua lainnya adalah penurunan konsentrasi dari glutathione dan kalsium serta peningkatan konsentrasi natrium dan kalsium pada sel sitoplasma lensa sehingga mengganggu kejernihan lensa (Cantor, 2014). Ada tiga tipe katarak sesuai dengan lokasi kekeruhannya yaitu katarak nuklearis, katarak kortikal, dan katarak subkapsularis posterior (West, 2013).

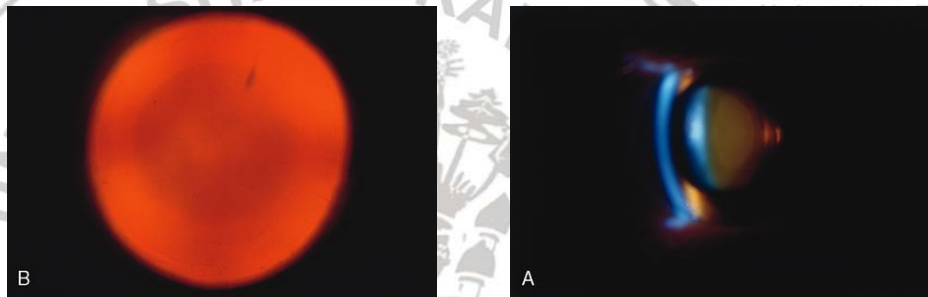
2.1.1. Katarak Nuklearis

Pada katarak ini, kekeruhan tampak di bagian nukleus, dan pada katarak jenis ini, penglihatan jauh akan lebih terganggu dibandingkan dengan penglihatan dekat.

Pada fase awal, lensa akan mengeras sehingga menyebabkan peningkatan dari indeks refraksi yang akan menyebabkan mata cenderung mengalami miopisasi.

Apabila lensa semakin lama menjadi berwarna kekuningan atau kecoklatan, maka akan mengganggu dalam hal diskriminasi warna, terutama daerah spectrum biru.

Pada kasus yang lanjut, maka bagian nukleus lensa akan semakin mengeras dan berwarna coklat yang disebut katarak *brunescent* (West, 2013).



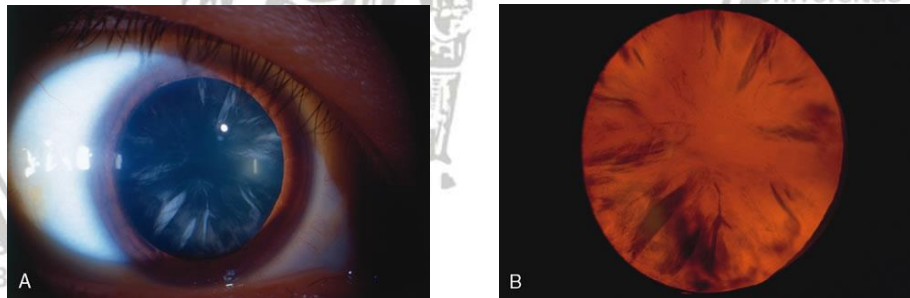
Gambar 2.1. Katarak Nuklearis. Katarak nuklearis yang disebut *brunescent* (brown) cataract ini diperiksa menggunakan (A) *narrow beam slit illumination* dan (B) *retroillumination*. Pada katarak tipe ini, gangguan penglihatan akan lebih cepat terjadi meskipun di fase awal, karena kekeruhan lensa bermula dari bagian sentral atau nukleus (Datiles, 2006).

2.1.2. Katarak Kortikal

Katarak kortikal berhubungan dengan adanya kerusakan dari struktur serat lensa. Apabila integritas membran terganggu, maka metabolit yang esensial akan keluar dari sel yang terkena, dan menyebabkan presipitasi dan oksidasi protein yang berlebihan. Penurunan penglihatan terjadi bervariasi tergantung apakah daerah di

aksis visual sudah terkena. Tanda awal dari katarak jenis ini adalah vakoula maupun timbunan air di daerah korteks anterior maupun posterior (Vislisel, 2013).

Katarak ini terjadi bermula pada daerah ekuator dari serat sel, karena perjalanannya yang mengikuti arah serat anterior ke posterior. Pada tahap berikutnya, seluruh lapisan korteks mengalami kekeruhan. Pada tahap lanjut, materi korteks yang mengalami degenerasi dapat keluar melalui kapsul sehingga kapsul akan mengecil dan mengkerut yang disebut katarak hiper matur, dan apabila pencairan korteks berlanjut, maka nukleus akan tampak bergerak bebas di dalam kapsul yang disebut sebagai katarak morgagnian. Secara histologi, katarak kortikal ditandai dengan pembekakan yang lokal dan kerusakan serat sel lensa (Vislisel, 2013).



Gambar 2.2. Katarak kortikal diperiksa menggunakan (A) *direct illumination* dan (B) *retroillumination*. Kekeruhan lensa pada katarak kortikal seringkali dimulai dari tepi dan menuju ke aksis visual hanya pada fase lanjut dan akan mempengaruhi penglihatan sentral. (Datiles, 2006).

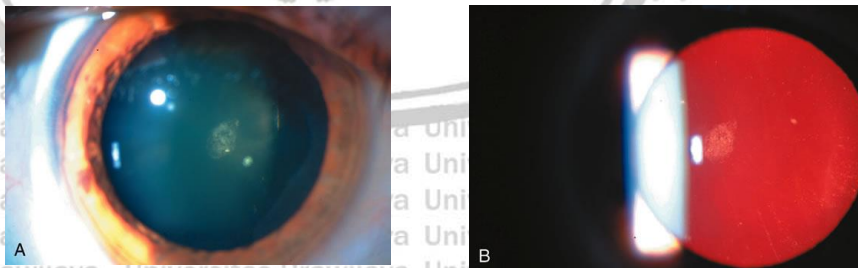
2.1.3. Katarak Subkapsularis Posterior

Katarak ini sering dijumpai pada usia yang lebih muda, dimana lokasi kekeruhan adalah terletak di lapisan korteks bagian posterior dan biasanya aksial.

Katarak subkapsularis posterior ini seringkali ditandai dengan adanya kekeruhan berbentuk menyerupai plak (*plaquelike*) di daerah korteks subkapsularis posterior (Birkholz, 2011).

Pasien yang menderita katarak ini akan mengeluh silau dalam kondisi cahaya yang terang, karena kekeruhan di daerah ini akan menutupi aperture pupil pada kondisi miosis karena cahaya yang terang. Gejala lain adalah penurunan penglihatan untuk melihat dekat lebih dikeluhkan pasien daripada untuk penglihatan jauh. Katarak jenis ini seringkali dikaitkan dengan kondisi trauma, kelainan sistemik, penggunaan kortikosteroid, peradangan, paparan radiasi, disamping faktor penuaan itu sendiri (Birkholz, 2011).

Secara histologis, akan tampak sel epitel lensa yang mengalami migrasi dari daerah ekuator lensa ke daerah permukaan dalam kapsul posterior, selama migrasi, sel-sel ini mengalami perbesaran ukuran yang disebut sebagai sel *wedl* atau *bladder* (Birkholz, 2011).

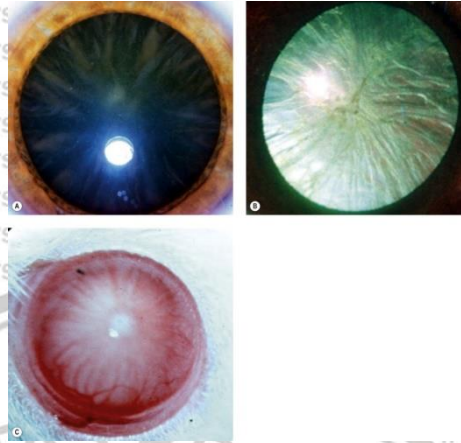


Gambar 2.3. Katarak Subkapsularis Posterior. Dilihat menggunakan (A) *direct illumination* dan (B) *retroillumination*. Kekeruhan lensa pada katarak ini seringkali dimulai dari bagian sentral dan akan meluas ke daerah perifer, sehingga pada tahap awal dapat mempengaruhi fungsi penglihatan yaitu rasa silau (*glare*) (Datiles, 2006).

2.1.4. Katarak pada Diabetes Melitus

Hiperglikemia merupakan faktor yang menyebabkan terjadinya katarak pada DM tipe 1 dan tipe 2, namun tampilan dari katarak pada pasien – pasien ini berbeda – beda tergantung usia tiap individu dan keparahan hiperglikemia. Pada beberapa literatur, katarak pada diabetes melitus disebut juga katarak diabetika atau *sugar cataract* (Mulhern, 2006;Pollreisz, 2010;Raman, 2010).

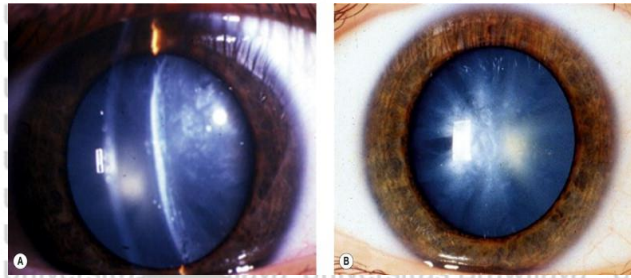
Studi eksperimental menyebutkan bahwa tampilan dari katarak diabetika juga dipengaruhi perbedaan spesies (gambar 2.4). Pada katarak diabetika, bentuk katarak yang sering terjadi adalah kortikal dan atau katarak subkapsularis posterior, pada anak – anak dan dewasa muda dengan DM tipe 1, lensa mengandung banyak *flaky white deposit* pada daerah korteks sehingga memberikan gambaran seperti badai salju dan juga sering disebut *snow flake*. Bentuk lainnya adalah kekeruhan di subkapsular posterior dengan garis radial yang meluas dari zona ekuator. Ketika kekeruhan semakin lanjut, serat lensa menjadi berubah dengan pembentukan vakuola dan celah. Kekeruhan ini sering disebut sebagai *true diabetic cataract* karena terjadi bilateral dan prosesnya terjadi karena gangguan osmotik (gambar 2.5) (Kador, 2010).



Gambar 2.4. Perbedaan tampilan dari *sugar cataracts* berdasarkan spesies yang berbeda. (A) Katarak matur dari manusia dengan DM tipe 1 (B) Katarak pada anjing yang diberi diet 30% galaktosa selama 38 bulan, (C) katarak pada tikus yang diberi diet galaktosa 50% selama 3 minggu (Kador, 2010).

Perkembangan katarak pada diabetes tipe 1 muncul secara primer dan lebih tergantung dari keparahan serta kontrol yang buruk dari hiperglikemia dibandingkan durasi DM (Kador, 2010). Pada dewasa, katarak karena diabetes seringkali sulit dibedakan dengan pasien non diabetes. Katarak sklerosis nuklearis tipikal terjadi pada individu non diabetes (Kador, 2010).

Perbandingan antara katarak subkapsular posterior dari individu lanjut usia dengan diabetes tipe 2 dan non diabetes menunjukkan perubahan morfologi yang mirip. Perubahan morfologi yang mirip juga telah diteliti terdapat juga pada bagian sel serat nukleus lensa bagian dalam dari pasien diabetes dan nondiabetes dengan nuklear sklerosis. Perbedaan yang tampak pada densitas sel epitel yang lebih rendah pada lensa dengan diabetes dibandingkan nondiabetes (Kador, 2010).



Gambar 2.5. Tampilan katarak diabetika dari pasien dengan diabetes melitus tipe

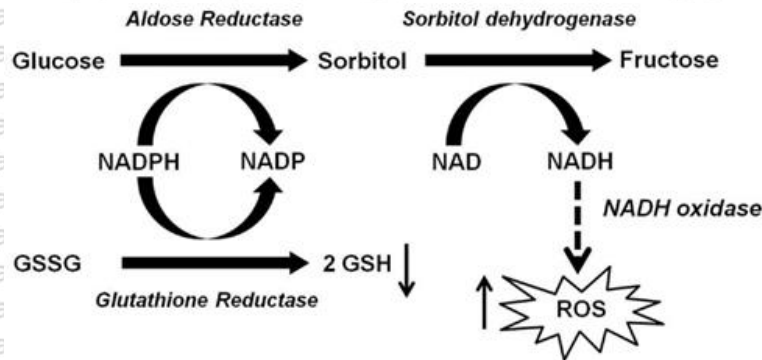
1 dan tipe 2. (A) Tampilan katarak diabetika pada pasien perempuan 15 tahun dengan DM tipe 1 dan glukosa darah puasa 450 mg/dl. Pemeriksaan dengan slit lamp menunjukkan adanya pembengkakan lensa dengan kekeruhan korteks yang rata dan terdiri dari *water clefts*, *vacuola*, serta serat lensa yang mengalami pencairan. (B) Tampilan katarak pada wanita usia 45 tahun dengan DM tipe 2 menunjukkan adanya kekeruhan pada korteks anterior dan posterior dengan bentuk radier (Kador, 2010).

2.2. Patogenesis Terjadinya Katarak

2.2.1. Jalur Aldosa Reduktase dan Sorbitol

Jalur sorbitol akan mengubah glukosa menjadi fruktosa. Langkah pertama, *Aldosa Reduktase* (AR) memanfaatkan NADPH untuk mereduksi glukosa menjadi sorbitol, kemudian *Sorbitol Dehidrogenase* (SDH) menggunakan NAD untuk mengoksidasi sorbitol menjadi fruktosa (gambar 2.6) (Kador, 2010; Hashim, 2012).

Di dalam lensa, glukosa secara cepat difosforilasi oleh heksokinase dan mengalami glikolisis. Hiperglikemia dapat menyebabkan peningkatan kadar glukosa di dalam lensa karena pengambilannya di dalam lensa tidak tergantung insulin. Sebagai hasilnya, heksokinase mengalami saturasi saat AR diaktivasi melalui ekspresi gen oleh perubahan hipertonisitas yang berhubungan dengan kelebihan glukosa (Kador, 2010).



Gambar 2.6. Jalur Aldosa Reduktase pada Hiperglikemia. Terlihat bahwa glukosa akan direduksi menjadi sorbitol dengan bantuan enzim *aldosa reduktase* (Tang, 2012).

Glukosa akan mengalami penurunan yang cepat dibanding oksidasi sorbitol, sehingga akan menyebabkan akumulasi sorbitol intraseluler. Enzim AR juga mereduksi galaktosa menjadi gula alkohol galaktitol (Kador, 2010; Hashim, 2012). Dalam satu penelitian juga disebutkan bahwa akumulasi dari sorbitol atau galaktitol menyebabkan lensa membengkak (*swelling*), permeabilitas membran, pembentukan celah dan vakuola, perubahan biokimia intraseluler, modifikasi atau agregasi protein. Hal ini dikenal sebagai hipotesa osmotik, hipotesa aldose reduktase atau hipotesa sorbitol. Hipotesa ini didukung oleh studi menggunakan AR *inhibitors*, hewan coba, dan kultur lensa *in vitro* (Hashim, 2012).

Terdapat hubungan antara akumulasi sorbitol dengan katarak yaitu bahwa akumulasi sorbitol menyebabkan stres osmotik dan menginduksi apoptosis di sel epitel lensa. Tikus *transgenic hyperglycemic* dengan over ekspresi gen AR dan *Phospholipase D (PLD)* menjadi lebih rentan untuk terjadinya katarak diabetika dibandingkan dengan tikus yang hanya mengalami *over ekspresi* gen PLD saja.

Penelitian ini menunjukkan bahwa lensa rentan dengan peningkatan AR *mediated*

osmotik stres yang akan berpotensi munculnya katarak. Adanya ekspresi yang berlebihan dari AR juga menyebabkan penurunan GSH. Penelitian yang mendukung hal ini dilakukan dengan cara melakukan kultur lensa *transgenic mice* yang mengalami over ekspresi AR dengan medium *glyceraldehyde*. Kadar GSH dari lensa ini ternyata mengalami penurunan 50% yang mengindikasikan bahwa penurunan GSH banyak disebabkan oleh penurunan NADPH (Chandrasena, 2006; Huang, 2006).

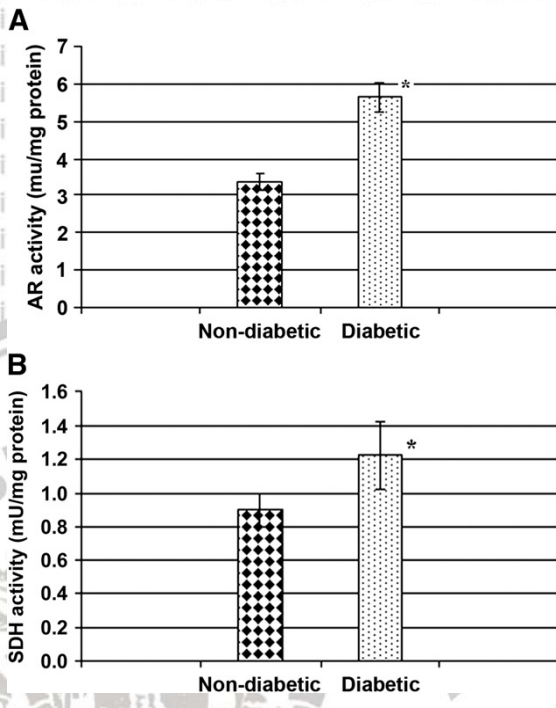
Jalur polyol telah dijelaskan sebagai mediator primer stres oksidatif yang diinduksi diabetes (*diabetes-induced oxidative stres*) di dalam lensa (Chung, 2003). Stres osmotik yang disebabkan oleh akumulasi sorbitol akan menginduksi stres di dalam retikulum endoplasma yang merupakan tempat utama untuk sintesis protein dan akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas (Hashim, 2012; Pollreis, 2010).

Stres RE juga dapat disebabkan karena adanya kadar glukosa yang berfluktuasi dan menginisiasi *Unfolded Protein Response* (UPR) yang akan membentuk ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan menyebabkan kerusakan pada serabut lensa karena stres oksidatif (Mulhern, 2006).

Peran AR pada pembentukan katarak telah diteliti dengan menggunakan ARI (*Aldose Reduktase Inhibitor*) dan didapatkan bahwa katarak diabetika dapat dihambat atau dicegah dengan dosis tertentu dari ARI. Studi pada hewan coba menunjukkan bahwa onset dan keparahan dari katarak diabetika berhubungan langsung dengan kadar aktivitas AR dalam lensa, dimana kadarnya akan menurun dengan adanya proses penuaan (Kumamoto, 2007).

Studi dengan menggunakan hewan coba menunjukkan bahwa katarak akan muncul lebih cepat dan lebih parah pada hewan coba muda dan terbentuk lebih cepat pada kondisi hiperglikemia ringan namun memiliki kadar AR yang tinggi dibandingkan dengan kondisi hiperglikemiyang memiliki kadar AR rendah. Ketika AR diberikan pada lensa *transgenic mice*, katarak diabetika akan terbentuk dengan cepat baik dalam kondisi diabetik dan galaktosemia (Kumamoto, 2007; Chung, 2003). Peningkatan AR sebagai penyebab terjadinya katarak secara langsung masih belum jelas, tetapi salah satu penelitian dengan menggunakan kultur lensa menunjukkan bahwa kekeruhan lensa tidak hanya dicegah dengan menurunkan jalur polyol menggunakan AR namun juga dengan pencegahan pembentukan osmotik gradien antara lensa dan medium (Pollreisz, 2010).

Penelitian oleh Hashim et al mendukung adanya peran AR dan SDH dalam patogenesis katarak diabetika. Dalam penelitian ini didapatkan adanya peningkatan aktivitas AR dan SDH pada pasien katarak dengan diabetika dibanding nondiabetik ($P < 0.001$). (Gambar 2.7).



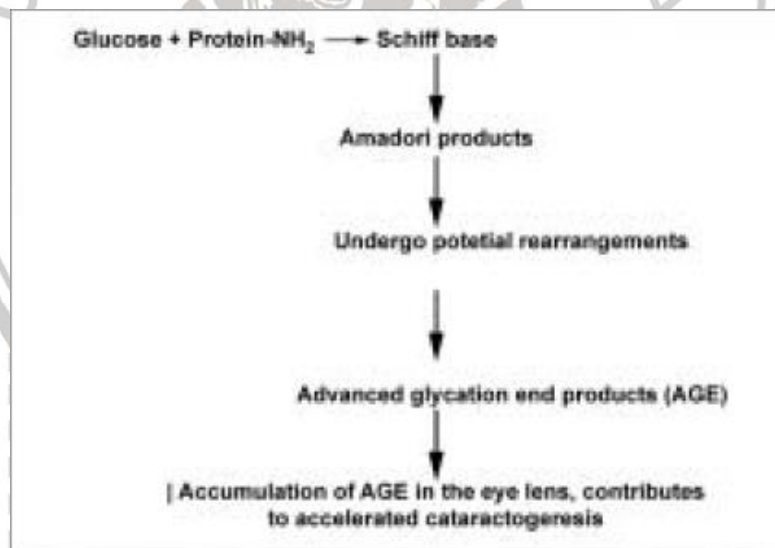
Gambar 2.7. Aktivitas dari jalur enzim polyol. (A) Aktivitas dari aldose reductase (AR) dan (B) Sorbitol dehydrogenase (SDH) pada lensa katarak dari pasien non-diabetes dan diabetes. ($p < 0.001$ pada pasien diabetes dibandingkan dengan non diabetes untuk AR dan $p < 0.001$ pada pasien diabetes dibandingkan dengan non diabetes untuk SDH) (Hashim, 2012).

Pendapat lain mengatakan bahwa aktivitas AR tidak dianggap secara langsung menyebabkan katarak namun berhubungan dengan jalur yang lain seperti stres oksidatif, RE stres maupun stres osmotik (Pollreisz, 2010).

2.2.2. Teori Glikasi

Studi eksperimental menduga bahwa glikasi dari protein lensa berhubungan dengan terbentuknya katarak. Glikasi dari protein lensa terjadi jika glukosa atau gula tereduksi lainnya bereaksi dengan e amino grup residu lisin atau termin amino dari

protein yang akan menghasilkan terbentuknya *Schiff Base* (SB) (Jansirani, 2004). SB akan melakukan penyusunan ulang Amadori melalui reaksi *Maillard* dan menghasilkan ketoamin yang lebih stabil atau produk amadori (*early glycation product*). Pada stadium lanjut, produk amadori mengalami dehidrasi dan pengaturan ulang untuk membentuk *cross-links* antara protein yang berdekatan, dan akhirnya akan menghasilkan agregat protein atau *Advance Glycation Product* (AGEs) (gambar 2.8). Protein lensa sangat rentan untuk mengalami modifikasi paska translasi seperti glikasi ini karena umur hidupnya yang panjang. Glikasidipercaya dapat mengubah *unfolding protein* baik perubahan terhadap kandungan fisikokimia dari protein lensa atau perubahan terhadap fungsinya (Jansirani, 2004).



Gambar 2.8. Pembentukan Formasi *Advanced Glycation End Products* (Gupta, 2009).

Peningkatan kadar glukosa dalam *humor aqueous* menginduksi glikasi pada lensa protein, dimana proses ini menghasilkan radikal superoksida (O_2^-) dan

pembentukan *Advanced Glycation endProducts* (AGE). Dengan adanya interaksi AGE dengan reseptor sel permukaan, seperti reseptor untuk AGE pada epitel lensa, maka O_2^- dan hidrogen peroksida (H_2O_2) akan semakin banyak terbentuk (Stitt, 2005).

Adanya glikasi pada protein lensa dapat menyebabkan peningkatan pewarnaan lensa dari kuning pucat pada katarak senilis menjadi coklat gelap pada katarak diabetika. Perubahan warna ini merefleksikan tingginya kadar fluoresensi dari protein yang disebabkan oleh glikasi (Jansirani, 2004).

Salah satu studi terdahulu menunjukkan bahwa *nonenzymatic glycated protein* pada nukleus lensa senilis ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan lensa diabetik. Hal ini memberikan data bahwa faktor yang berpengaruh terhadap glikasi protein lebih berperan pada katarak senilis daripada katarak diabetika (Jansirani, 2004).

Peningkatan AGEs dihubungkan dengan stres oksidatif dan sebagai hasil dari stres oksidatif. AGE dianggap berperan dalam pembentukan katarak diabetika karena AGEs terdapat banyak pada pasien diabetes dibandingkan dengan pasien tanpa diabetes (Gul, 2008). Proses glikasi ini juga disertai dengan pembentukan radikal bebas dan ROS. Glikasi protein lensa dan terbentuknya AGE memainkan peranan penting terhadap adanya modifikasi protein yang menyebabkan terbentuknya katarak. Banyak penelitian yang telah dilakukan, namun ternyata belum ada publikasi yang menunjukkan bahwa glikasi dari lensa atau aktivitas AGEs secara langsung dapat menginisiasi pembentukan *sugar cataract*. Terbentuknya AGE akan menyebabkan peningkatan ROS dan masuk ke jalur stres oksidatif untuk menyebabkan katarak (Jansirani, 2014).

Penelitian dengan menggunakan ARI's menunjukkan bahwa ARI's dapat menghambat terbentuknya katarak tanpa menurunkan hiperglikemia atau glikasi, dan tidak terjadi katarak pada kondisi *chronic diabetic animals* menunjukkan bahwa glikasi belum bisa dianggap memiliki peranan utama terhadap perkembangan katarak (Kador, 2007).

2.2.3. Stres Oksidatif

Beberapa publikasi terakhir menjelaskan perubahan serabut lensa karena stres oksidatif dan radikal bebas pada diabetes, namun demikian tidak disebutkan bahwa radikal bebas ini menginisiasi proses katarak, melainkan hanya mempercepat perkembangan menjadi katarak. Hidrogen peroksida (H_2O_2) meningkat di dalam humor aqueous pada kondisi diabetes dan menginduksi terbentuknya radikal hidroksil ($OH\cdot$) memasuki lensa melalui proses reaksi fenton. Radikal bebas Nitric Oxide (NO) juga meningkat pada lensa dan humor aqueous pada diabetes, sehingga akan menyebabkan peningkatan pembentukan *peroxynitrite* yang akan menginduksi kerusakan lensa melalui proses oksidasi (Ornek,2003;Pollreisz, 2010).

Pembentukan ROS berhubungan dengan adanya sorbitol atau galacticol pada lensa. Antioksidan di dalam lensa dilaporkan menurun pada pasien dengan diabetes melitus. *Cu, Zn, superoksida dismutase* dan aktivitas katalase lebih rendah secara signifikan pada katarak dengan diabetes, sedangkan penanda lipid peroksidase yaitu *malondialdehyde* meningkat (Pollreisz, 2010).

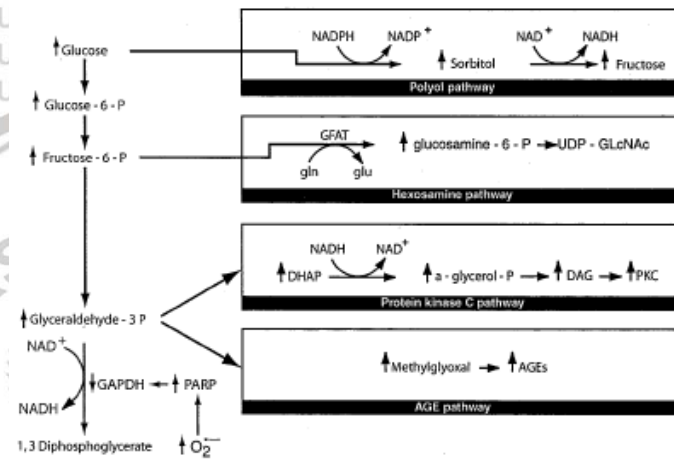
Peningkatan kadar radikal bebas dalam lensa diabetik akan semakin mempengaruhi kapasitas antioksidan dan semakin meningkatkan kerentanan lensa

tersebut terhadap stres oksidatif. Hilangnya antioksidan disebabkan oleh glikasi dan inaktivasi dari enzim antioksidan pada lensa seperti *superoksida dismutase* (Jansirani, 2004).

Copper zink Superoksida Dismutase-1 (SOD1) adalah isoenzyme superoksida dismutase yang dominan di dalam lensa, yang penting untuk degradasi radikal superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen. Pentingnya SOD1 sebagai proteksi terhadap perkembangan katarak pada kondisi diabetes melitus telah banyak diteliti in vitro dan in vivo pada studi dengan hewan coba (Behndig, 2001; Olofsson, 2005; Olofsson, 2009).

Disfungsi mitokondria yang terjadi karena kondisi hiperglikemia merupakan salah satu penyebab terbentuknya ROS seluler. Dalam kondisi hiperglikemia, semakin banyak glukosa yang masuk ke dalam siklus *Tricarboxylic Acid* (TCA) untuk mengalami oksidasi dan akan semakin banyak menghasilkan donor elektron (NADH dan *Flavin Adenine Denucleotide Hydrogen 2/FADH2*) ke dalam rantai transport elektron, sebagai hasilnya, akan terjadi peningkatan voltase gradient melewati membran mitokondria sehingga akan semakin banyak molekul oksigen yang terbentuk berupa superoksida. Dengan terbentuknya superoksida yang berlebihan, akan menyebabkan penurunan aktivitas dari enzim kunci glikolisis yaitu *Glyceraldehydes-3 Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH). Penurunan aktivitas enzim GAPDH ini akan menyebabkan aktivasi dari jalur AGEs dan jalur PKC. Lebih lanjut lagi, penurunan aktivitas enzim GAPDH juga akan menyebabkan kadar fruktosa 6 fosfat meningkat dan mengaktifkan jalur heksosamin, serta akan

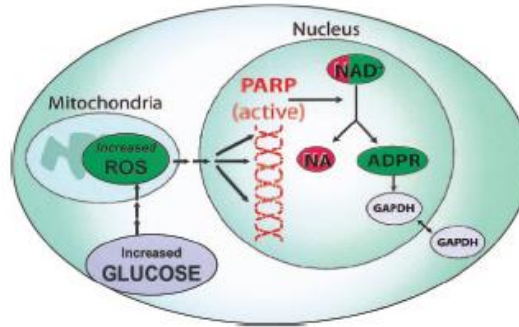
menyebabkan peningkatan glukosa intraseluler sehingga akan mengaktifasi jalur polyol (Gambar 2.9) (Brownlee, 2005).



Gambar 2.9. Hambatan GAPDH. Produksi superoksida yang berlebihan di mitokondria akan mengaktifasi empat jalur kerusakan karena hiperglikemia melalui hambatan GAPDH (Brownlee, 2005).

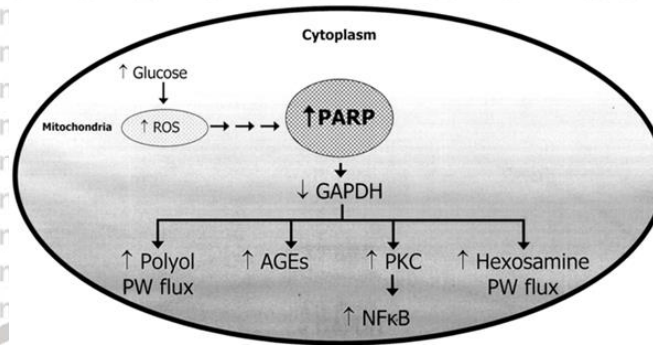
Reactive Oxygen Species (ROS) dapat menghambat aktivitas enzim GAPDH karena ROS dapat menyebabkan kerusakan pada *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) sehingga akan mengaktifkan *Poly(ADP-ribose) Polymerase* (PARP). PARP merupakan enzim yang dapat memperbaiki DNA saat mengalami kerusakan dan secara normal berada dalam nukleus sel dalam kondisi inaktif. Apabila PARP teraktivasi, maka akan dapat menyebabkan modifikasi aktivitas dari GAPDH sehingga aktivitasnya akan mengalami penurunan. Penelitian oleh Du menyebutkan bahwa kedua proses yang terjadi karena hiperglikemia tersebut dapat dihambat oleh

UCP-1 (*Uncoupling Proteins-1*) atau MnSOD (*Manganase Superoxide Dismutase*) (Gambar 2.10). (Du, 2003; Brownlee, 2005).



Gambar 2.10. ROS, PARP, dan GAPDH. ROS menginduksi kerusakan DNA sehingga akan mengaktifasi PARP dan menyebabkan modifikasi pada aktivitas GAPDH (Brownlee, 2005).

Ketika hiperglikemia intraseluler terjadi pada sel yang merupakan target dari komplikasi diabetes, hal tersebut dapat menyebabkan peningkatan produksi ROS oleh mitokondria. ROS akan menyebabkan kerusakan DNA nuclear yang akan mengaktifasi PARP. PARP kemudian akan menyebabkan penurunan GAPDH dan penurunan tersebut memberikan efek terjadinya aktivasi jalur polyol, peningkatan pembentukan AGE intrasel, mengaktifasi PKC dan NFκB seta jalur heksosamin (Gambar 2.11).



Gambar 2.11. Mekanisme kerusakan selular yang disebabkan hiperglikemia.

Sumber lain terbentuknya ROS adalah stres pada *Retikulum Endoplasma*(RE).

Di dalam lensa, mitokondria dan RE hanya terdapat pada sel epitel, karena itu ROS yang terbentuk karena disfungsi mitokondria dan RE stres oleh diabetes hanya terlokalisir pada epitel lensa dan daerah lengkung dimana sel endothel mengalami diferensiasi menjadi serat lensa (Pollreis, 2010).

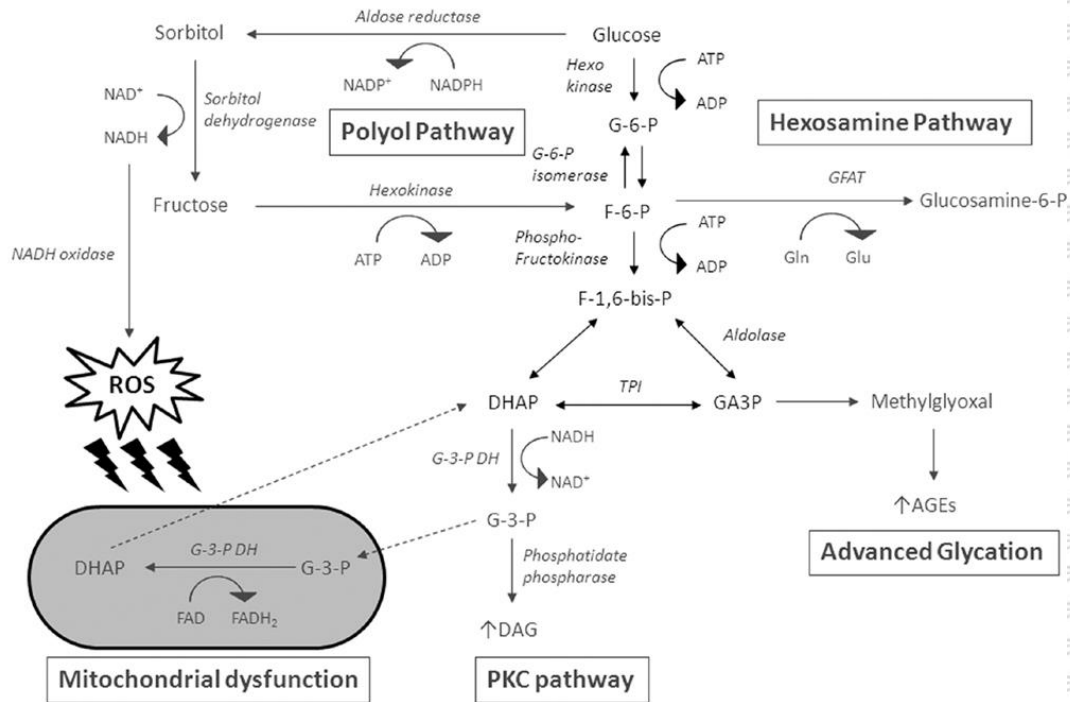
Studi yang dilakukan oleh Saygili et al menunjukkan bahwa kadar *Total Oxidant Status* (TOS) lebih tinggi secara signifikan pada katarak diabetika dibandingkan katarak senilis, begitu juga dengan *Oxidative Stres Index* pada katarak diabetika (Saygili, 2010).

Tabel 2.1. Parameter Oksidatif, Antioksidatif, dan Tipe Katarak (Saygili, 2010).

	Katarak Diabetika	Katarak Senilis	Nilai P
Total oxidant status($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	11.34 \pm 5.27	8.07 \pm 2.52	0.008
Total antiioxidant capacity(mmol Trolox Equiv/L)	1.03 \pm 0.37	1.16 \pm 0.32	0.17
Oxidative stres index(Arbitrary Units)	13.31 \pm 9.80	7.71 \pm 4.41	0.013
-SH group levels (mmol/L)	0.29 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03	0.54

Dari penelitian tersebut menunjukkan adanya peranan stres oksidatif terhadap terbentuknya katarak diabetika.

Salah satu penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa kadar *Malondial Dehyde*(MDA), *Protein Carbonyl Content*(PCC), *Reduced Glutathione*(GSH), *Advanced Oxidation Protein Products* (AOPP), dan aktivitas *Superoksida Dismutase* (SOD) meningkat pada katarak senilis dengan diabetes dibandingkan katarak senilis tanpa diabetes (Yildirim, 2009)



Gambar 2.12. Jalur stres oksidatif pada diabetes melitus. Glukosa yang masuk melalui jalur polyol dianggap berhubungan dengan patogenesis dari komplikasi diabetes melalui beberapa mekanisme. Akumulasi sorbitol intraseluler menyebabkan stres osmotik (Tang, 2012).

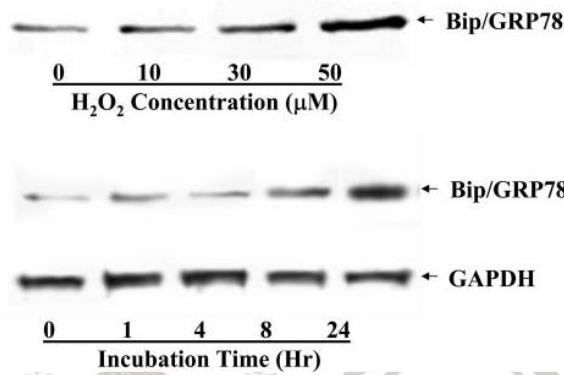
2.2.4. *Unfolding Protein Response (UPR)* pada katarak diabetika

Mulhern et al menunjukkan adanya hubungan yang cukup kuat dari peran UPR terhadap apoptosis LEC dan kataraktogenesis pada *galactose-Fed rat*. Jalur UPR dapat memproduksi ROS dan menginduksi apoptosis pada LEC dari *galactose-Fed rat lenses*. Hal ini menunjukkan bahwa UPR dianggap memiliki peranan terhadap terbentuknya katarak diabetika (Mulhern, 2006; Torres-Bernal, 2014).

Eksresi *Glucose Regulated Protein (GRP78)* dan *Activating Transcription Factor (ATF-G)* yang merupakan 2 faktor pada UPR terdapat pada serat lensa katarak diabetika. Penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi misalignment dan disorganisasi dari serabut lensa pada kondisi katarak senilis maupun diabetika, dan tidak terdapat pada lensa normal, hal ini menunjukkan peranan UPR terhadap kataraktogenesis (Mullhern, 2006).

Terbentuknya UPR sangat berhubungan dengan adanya stres osmotik dan oksidatif di dalam lensa. UPR juga dapat terjadi sebagai hasil dari protein kinase stres. Mulhern et al melakukan serangkaian penelitian untuk membuktikan hal tersebut. Pada kultur epitel lensa pada medium dengan MEM yang menjadi manitol, ternyata kadar ARI (sebagai penanda osmotik stres) dan kadar GRP78/BiP sebagai marker UPR meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa induksi UPR dan AR merupakan hasil dari stres osmotik ekstrasel pada kultur epitel lensa. Untuk menunjukkan UPR bisa diinduksi oleh *oxidative stres* dibuktikan penelitian dengan paparan H₂O₂ terhadap sel epitel lensa, didapatkan kematian sel yang meningkat serta kadar GRP78/BiP meningkat sesuai dengan waktu dan konsentrasi yang

semakin banyak (*time and concentration dependent*)(Gambar 2.13) (Mullhern, 2006).



Gambar 2.13. Analisis protein blot dari kultur Lens Epithelial Cells dengan konsentrasi H₂O₂ yang berbeda. (A) Protein blot dari GRP78/Bip pada LECs yang dikultur selama 24 jam dalam 10% FBS/DMEM 0,10,30, dan 50 μm dari H₂O₂. (B) Ilustrasi dari protein blot dari GRP78/Bip pada LECs dalam waktu 24 jam. Pada seluruh protein blot, jumlah protein dari setiap well adalah sama. Ekspresi dari GAPDH digunakan sebagai kontrol internal. Protein blot merepresentasikan hasil yang diperoleh dari tiga eksperimen independen.

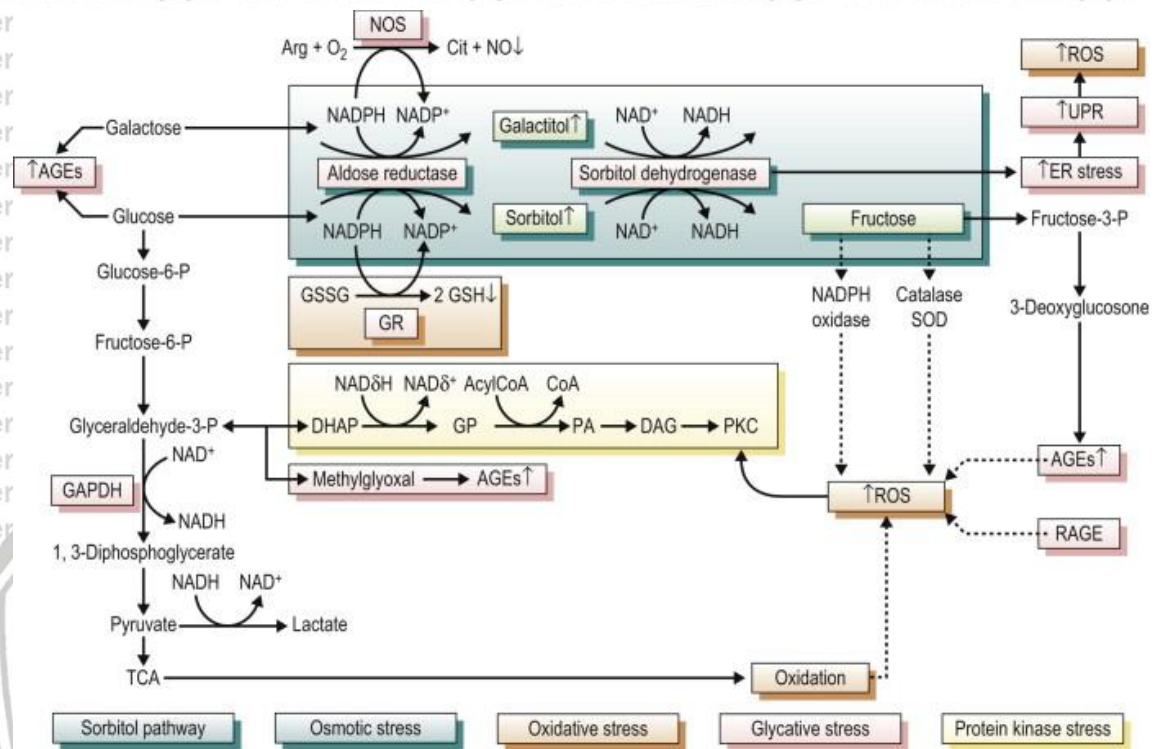
Pada percobaan dengan hewan yang diberikan galaktosa, maka stres osmotik dan oksidatif dapat menginduksi UPR. Konsentrasi plasma glukosa pada tikus muda yang diberi diet 50% galaktosa mencapai level 20 mM (320 mg/dL) cukup untuk menginduksi UPR dalam kurun waktu 7-15 hari dan katarak dalam waktu 13-15 hari (Mullhern, 2006).

Aldosa Reduktase (AR) mengkatalisa reduksi galaktosa menjadi galaktitol, sehingga terjadi akumulasi galaktitol intra seluler pada sel epitel lensa serta peningkatan osmolaritas instaseluler pada lensa tikus. Pemberian AR inhibitor

(ARI) pada kondisi ini dapat menurunkan akumulasi galaktitol sehingga mencegah peningkatan osmolaritas intraseluler.

Unfolding Protein Response (UPR) diketahui dapat membentuk ROS yang akan menurunkan GSH bebas dan berkurangnya *free* GSH ini menyebabkan kerusakan lebih lanjut pada fungsi mitokondria, sehingga ROS semakin banyak dihasilkan (O_2^-). Harding et al dalam penelitiannya menyebutkan bahwa ER stres dapat memicu produksi ROS akut (Harding, 2003; Arap, 2004; Haynes, 2004). Tu dan Weisman menduga bahwa sekitar 25% ROS seluler diproduksi selama sintesis protein (Tu, 2002). Penurunan GSH oleh UPR berakibat disfungsi mitokondria dan akumulasi ROS (Haynes, 2004; Fribley, 2004). ROS dari ER atau mitokondria juga dapat memberikan kontribusi terhadap produksi ROS oleh UPR. Munculnya ROS ini semakin lama akan menyebabkan penurunan GSH yang ada pada sel epitel lensa atau mungkin dapat berdifusi dari sel epitel lensa ke dalam sel serat korteks lensa dan dapat menyebabkan agregasi kristalin dan partikel yang menyebabkan perpendaran sinar (*light scattering*). Aktivasi UPR dianggap juga sebagai bentuk lain dari mekanisme kematian sel yang telah diobservasi terjadi pada katarak (Mullhern, 2006).

Gambar 2.14 berikut menunjukkan adanya hubungan antara jalur sorbitol, stres osmotik, dan pembentukan UPR.



Gambar 2.14. Hubungan antara hiperglikemia, glikolisis, formasi AGE, aktivasi protein kinase, dan pembentukan ROS (Kador, 2010).

2.2.5. Jalur Apoptosis

Lensa manusia terdiri satu lapisan tunggal-sel epitel pada permukaan anterior. Lapisan ini akan melindungi serabut – serabut lensa di bawahnya dari kerusakan, dan mempertahankan kejernihan lensa (Jung, 2013). Kerusakan dari sel epitel lensa (LECs) yang mungkin terjadi karena apoptosis menyebabkan terjadinya katarak.

Pada katarak dengan retinopati diabetika ternyata ditemukan lebih banyak sel yang mengalami apoptosis (Okamura, 2002). Kim dan kawan - kawan mendapatkan peningkatan kadar Bax dan penurunan kadar BCL-2 pada pasien

katarak diabetika yang dilakukan penelitian in-vivo. Dengan adanya penelitian – penelitian tersebut menunjukkan bahwa apoptosis dari sel epitel lensa meningkat pada kondisi diabetes dan mempunyai peranan penting dalam terjadinya katarak. Mekanisme apoptosis dari LEC masih belum jelas hingga saat ini.

Apoptosis merupakan program kematian sel yang teregulasi dan dapat melalui 2 jalur yaitu: jalur apoptosis intrinsik atau *mitochondria-mediated pathway* dan jalur apoptosis ekstrinsik yang disebut juga *death receptor mediated pathway* (Creagh, 2003; Jung, 2013). Pada jalur ekstrinsik, *fas ligand* akan berikatan dengan *fas death receptor* yang akan menarik *fass-associated death domain protein*. *Procaspase-8* akan diaktivasi oleh *caspase-8* (Mohamad, 2005; Santiago, 2007).

Pada jalur intrinsik bisa terjadi apoptosis karena adanya kerusakan DNA dan hilangnya faktor cell-survival, melepaskan sitokrom C dari mitokondria ketika dilepaskan kedalam sitosol, sitokrom C berikatan dengan *apoptosis protease-activating factor 1* untuk membentuk apoptosome dan menarik *procaspase-9*. *Caspase-9* akan teraktivasi dan akhirnya akan mengaktivasi *caspase 3* (Mohamad, 2005; Santiago, 2007).

Penelitian oleh Jung dan kawan – kawan menunjukkan bahwa adanya peningkatan dari ekspresi *caspase 3* dan *caspase 9* pada pasien dengan dan tanpa retinopati diabetika, sehingga memunculkan hipotesis bahwa mitokondria yang memediasi apoptosis berperan dalam kataraktogenesis pada pasien diabetes, penelitian ini serupa dengan Mishra Oshitari et al juga menunjukkan peningkatan ekspresi *Bax*, *caspase 3* dan *caspase 9* pada sel mesangial manusia setelah dipapar dengan glukosa tinggi (Mishra, 2005; dan Oshitari, 2008). Ekspresi dari

faktor apoptosis meningkat sesuai dengan durasi diabetes dan kadar HbA1C.

Menurut literatur, durasi dari diabetes dan kadar HbA1C merupakan faktor resiko utama yang dapat mempercepat perkembangan penyakit (Khalfaoui, 2010).

Caspase 8 mempunyai *death-effector domain* yang juga sebagai insiator caspase dari jalur apoptosis ekstrinsik. Caspase 8 dapat mengaktifasi caspase 3 pada jalur mitokondria, studi oleh Al-Mashat menunjukkan bahwa caspase 8 MRNA meningkat pada tikus diabetik (Al-Mashat, 2006). Penelitian terhadap ekspresi caspase 8 pada LEC masih sedikit diteliti. Penelitian oleh Lim dan kawan – kawan menunjukkan adanya peningkatan faktor apoptosis p53 dan caspase 8 pada pasien dengan DM dan ekspresi ini berhubungan juga dengan durasi DM dan kadar HbA1C (Lim, 2014).

Gen p53 merupakan faktor transkripsi yang berkaitan dengan DNA. Gen ini mengontrol siklus dan diferensiasi sel dan mempunyai kemampuan untuk mengaktifasi apoptosis. Secara normal, gen p53 akan menghentikan siklus sel ketika DNA mengalami kerusakan, dan siklus akan berjalan kembali jika DNA telah diperbaiki. Dengan kegagalan perbaikan DNA, maka p53 akan menginduksi apoptosis. P53 juga merupakan faktor utama untuk mengatur transkripsi dari faktor proapoptosis melalui jalur intrinsik. P53 juga meregulasi jalur ekstrinsik apoptosis, namun mekanismenya belum diketahui (Lim, 2014).

Ekpresi p53 berkorelasi positif dengan caspase-8 pada pasien dengan diabetes melitus. Pada penelitian ini juga didapatkan bahwa p53 tereksresi secara lemah pada non diabetes pasien namun tereksresi dengan kuat pada pasien

diabetes. Hal ini mendukung bahwa p53 mempunyai peranan terhadap patologi terjadinya katarak diabetika (Pokroy, 2002;Lim, 2014).

2.3. Lensa Kristalin dan Katarak

2.3.1. Protein *misfolding* dan agregasi pada katarak

Agregasi atau polimerisasi dari protein lensa menjadi kompleks dengan berat molekul tinggi sangat berperan dalam *light scattering*, kekeruhan lensa, serta penurunan penglihatan (Moreau dan King, 2012).

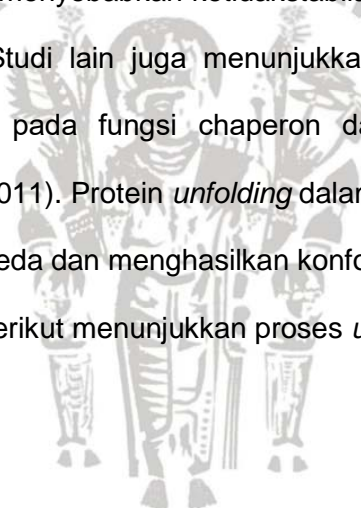
Secara analisis proteomik, modifikasi protein lensa yang berhubungan dengan kerusakan adalah deamidasi, oksidasi, glikasi dan trunkasi (Zhang, 2003; Hains dan Truscott, 2007; Hains dan Truscott, 2008). Deamidasi merupakan salah satu penyebab utama terjadinya kerusakan pada kristalin, yaitu terjadi *negative charge* pada protein dengan mengubah residu glutamin menjadi glutamat.

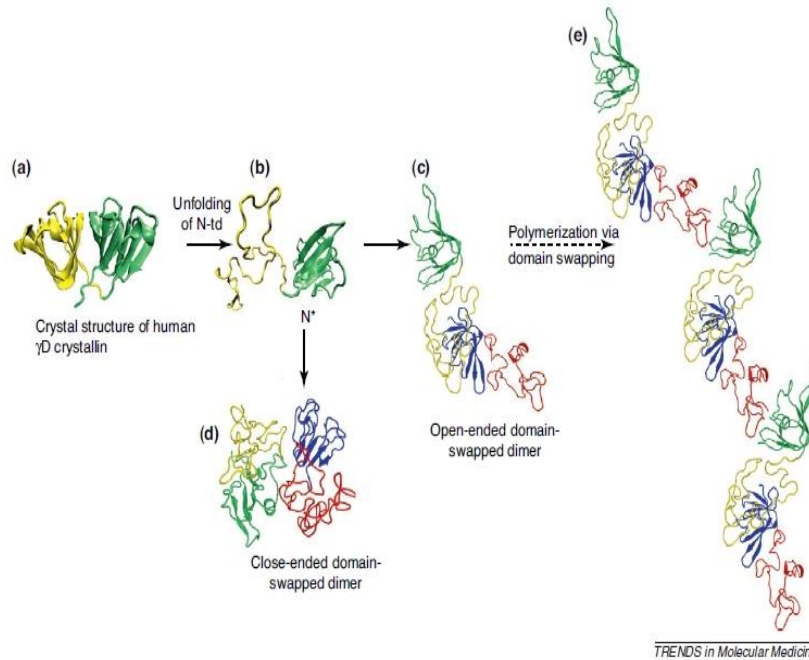
Asparagin sangat rentan terhadap deamidasi dan residunya dapat menjadi agregat pada katarak (Hains dan Truscott, 2010). Beberapa target lokasi oksidasi pada kristalin yaitu tryptophan, cystein dan methionin. Hains dan Truscott menunjukkan adanya peningkatan oksidasi Trp di beberapa tempat pada lensa yang mengalami katarak (Hains dan Truscott, 2007). Pada γ kristalin, 4 triptofan yang terdapat dalam inti dapat mengalami oksidasi menjadi *kynurenine aromatik* menyebabkan tidak stabil. Residu cystein spesifik pada β/γ kristalin ditemukan mengalami oksidasi pada lensa dengan katarak (Hains dan Truscott, 2008). Lebih dari 50% residu methionin juga teroksidasi pada katarak yang lanjut (Truscott, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa Met oksidasi menyebabkan agregasi yang besar pada katarak. Lampi dkk

menemukan bahwa deamidasi dapat menurunkan stabilitas β A3 dan β B-1 kristalin dan meningkatkan agregasi dibandingkan dengan wild type protein (Kim, 2002; Lampi, 2006; Takata, 2008). Deamidasi pada domain yang berhadapan juga menurunkan stabilitas termodinamik dan kinetik pada γ D kristalin manusia dan dianggap berperan dalam protein *unfolding* dan agregasi (Flaugh, 2006).

Pada fraksi *water insoluble* lensa dengan katarak, juga ditemukan protein dan segmen peptida dari kristalin yang mengalami trunkasi (Hanson, 2000). Trunkasi ini juga dianggap menyebabkan ketidakstabilan protein dan peningkatan agregasi β dan γ kristalin. Studi lain juga menunjukkan beberapa isolat peptida dari lensa ternyata berefek pada fungsi chaperon dari α kristalin (Santhoshkumar, 2008; Santhoshkumar, 2011). Protein *unfolding* dalam lensa dapat terjadi karena kerusakan yang berbeda – beda dan menghasilkan konformasi yang juga bervariasi.

Gambar berikut menunjukkan proses *unfolding* yang luas.





Gambar 2.15. Polimerisasi dari γ D kristalin manusia menggunakan simulasi

komputer. (a) Struktur kristal dari γ D kristalin (b) Prekursor agregasi monomerik simulasi yang sering disebut sebagai N* pada mekanisme umum agregasi protein (c) Struktur open ended domain swapped dimer secara simulasi (d) Simulasi bentuk struktur close-ended domain swapped dimer (e) Model dari γ D kristalin manusia yang dibentuk melalui domain swapping (Das, 2011).

Sistem chaperone α kristalin pada sel serat lensa yang matur dapat mengenali konformasi dari spesies yang mengalami *unfolding* parsial dan memisahkan satu dengan yang lainnya sehingga menurunkan terjadinya agregasi. (Bloemendal, 2004). Apabila seluruh α kristalin telah tersaturasi dengan kerusakan, masih dapat terjadi agregasi karena β - γ kristalin yang juga mengalami *unfolding* akan juga menyebabkan agregasi dan *light scattering* (Goulet, 2011).

Dengan semakin bertambahnya usia, α kristalin akan hilang dari fraksi soluble

protein lensa (Heys, 2007), sehingga kerusakan protein dan agregasi tidak lagi dapat dicegah. Modifikasi dan mutasi dari konformasi protein semakin menyebabkan α kristalin tidak dapat mengenalinya, dan protein ini terhindar dari aktivitas *chaperon*.

Pembentukan amyloid fibril berhubungan dengan terjadinya kerusakan fungsi protein. Amyloid fibril merupakan struktur yang dapat terbentuk oleh semua protein dan juga dapat terbentuk oleh protein pada in vivo (Garvey M, 2017). Hal penting yang membedakan antara agregasi pada katarak dari penyakit lain adalah morfologi mikroskopiknya. Misalnya agregasi plak amyloid pada penyakit Alzheimer's dan badan Lewi's pada parkinson dapat diobservasi dengan mikroskop elektron atau cahaya. Pada katarak, beberapa agregat tidak tampak meskipun telah terjadi perpendaran cahaya dan tekstur sitoplasma sudah berbeda.

Pembentukan amyloid fibril berhubungan dengan terjadinya kerusakan fungsi protein. Amyloid fibril merupakan struktur yang dapat terbentuk oleh semua protein dan juga dapat terbentuk oleh protein pada in vitro. Pembentukan amyloid fibril dianggap dapat menyebabkan agregasi. Struktur kristalin dapat mengalami destabilisasi dan menginduksi formasi dari amyloid fibril / *fibril formation* karena beberapa alasan. Dengan adanya pembentukan dari amyloid fibril, dianggap bahwa fungsi chaperone α kristalin dapat terganggu, walaupun ternyata ada penelitian yang tidak menunjukkan hal ini (Garvey M, 2017). Beberapa hal tersebut akan berkontribusi terhadap ketidakstabilan dari struktur kristalin, ditambah dengan aktivitas chaperone yang turun pada pH yang rendah (Nelson dan Eisenberg, 2006; Bayro, 2010). Dengan turunnya fungsi chaperone maka kemampuan untuk

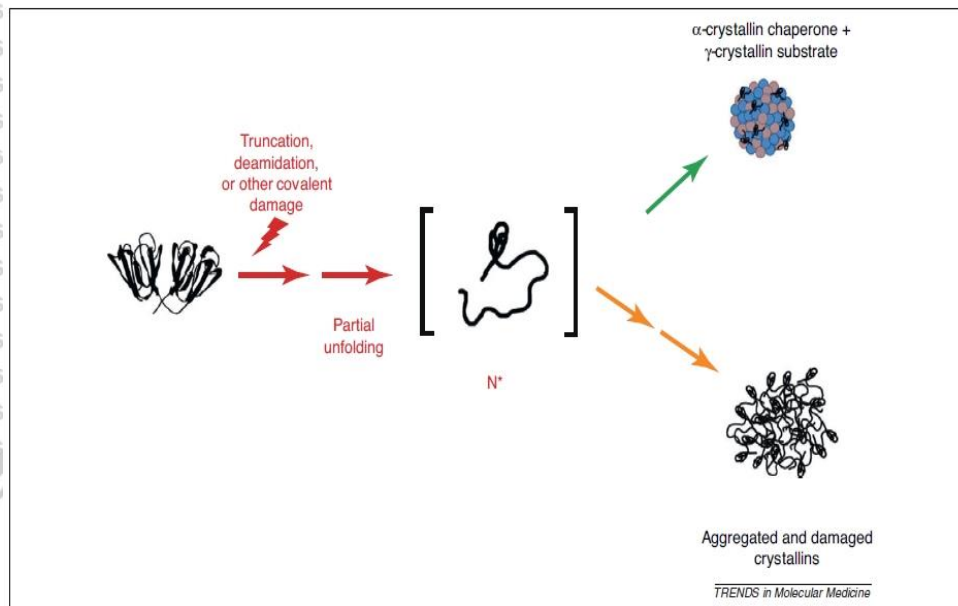
mencegah agregasi juga berkurang sehingga secara tidak langsung dapat memicu terbentuknya formasi fibril.

2.3.2. α Kristalin Sebagai Chaperon

α kristalin diketahui mempunyai aktivitas sebagai chaperon. Pada awalnya, aktivitas chaperon α kristalin adalah mencegah agregasi thermal dari protein lentikular protein *alcohol dehidrogenase* (Santhoshkumar, 2008). α kristalin juga mampu memproteksi klien protein seperti λ kristalin dan GgPD mencegah radiasi UV dan glikasi yang akan menyebabkan inaktivasi beberapa enzim. α kristalin tidak kebal terhadap berbagai modifikasi post translasi seperti trunkasi, deamidasi, oksidasi, glikasi, dan *racemization* selama penuaan dan kondisi yang menyebabkan katarak (Gambar 2.16) (Sandilands, 2002; Kosinski-Collins dan King, 2003; Marsili 2004; Meehan, 2004; Papanikolopoulou, 2008; Takata, 2009; Acosta-Sampson dan King, 2010; Wang, 2010, Banerjee, 2011; Das, 2011; Wang, 2011; Moran, 2012).

Oksidasi juga diketahui dapat mengubah struktur sekunder atau tersier dari α kristalin yaitu struktur αA kristalin αB kristalin sehingga akan menurunkan aktivitas chaperonnya (Sharma dan Santhoshkumar, 2009). Beberapa molekul biologi pada jalur metabolik yang umum seperti pantethine dan glutathion juga dapat memodulasi aktivitas chaperon α kristalin pada sapi (Varma, 2008). Dari studi ini diketahui bahwa pantethine dapat berinteraksi dengan α kristalin dan meningkatkan aktivitas antiagregasinya dalam *BL-aggregation assay*. Sedangkan glutathion dapat berinteraksi dengan *alcohol dehidrogenase* yang merupakan substrat dalam uji agregasi dan dapat menyebabkan peningkatan aktivitas chaperon dari α kristalin pada anak sapi (Varma, 2008).

Studi lain juga menunjukkan molekul kompatibel arginin hydrochloride dapat meningkatkan aktivitas chaperon dari calf α kristalin dan recombinant human α A dan α B crystallins. Arginin hydrochloride dapat menyebabkan perubahan struktur kuartar yang signifikan dan merubah sedikit struktur tersier α kristalin sehingga aktivitas chaperon akan meningkat. Fungsi chaperon dari α B crystallin mencegah agregasi dari bentukan amyloid fibril α synuclein A53T dapat meningkat dengan adanya molekul kecil yang bermuatan positif seperti arginin, Lisin, dan guanidin (Ferreira, 2011). Ion metal divalent ternyata memiliki efek yang berbeda pada aktivitas chaperon α kristalin. Tembaga dan Zinc pada konsentrasi 0.1 dan 1 mM dapat meningkatkan aktivitas chaperon α kristalin secara signifikan (Meng, 2010). Permukaan hidrofobik α kristalin meningkat 50% karena ikatan dengan Zn^{2+} dan stabilitas α kristalin meningkat dalam 36 kJ/mol, dan menjadi lebih resistan terhadap celah tryptic (Gong, 2010). Peningkatan stabilitas dan hidrofobik dari α kristalin menjelaskan mengapa terjadi peningkatan aktivitas chaperon saat berkaitan dengan zinc (Gong, 2010).



Gambar 2.16. Katarak terjadi karena agregasi protein. Protein kristalin, terutama pada nukleus lensa terbentuk sejak lahir dan dengan berjalannya waktu akan mengalami akumulasi dari terjadinya modifikasi dan kecenderungan mengalami agregasi intermediet pada populasi. Pada lensa mata yang muda, α kristalin secara efektif mengenali dan menggabungkan intermediet yang mengalami destabilisasi (panah atas). Dengan bertambahnya usia, kompleks α kristalin yang mengalami saturasi dengan substrat dan protein lensa akan beragregasi dan menyebabkan perendaran cahaya (light scatter) dan hilangnya tajam penglihatan (panah bawah) (Acosta-Sampson, 2010).

Chaperon family akan mendampingi proses folding pada protein yang baru terbentuk dengan adanya ATP (Knee, 2011). Lebih lanjut lagi, ATP dapat menyebabkan transisi konformasional dari α kristalin yang berhubungan dengan paparan pada situs hidrofobik-nya dan dapat meningkatkan aktivitas chaperon α kristalin. Studi ini menyebutkan ATP dapat meningkatkan stabilitas α A kristalin pada

4.5 kJ/mol. Ikatan dengan ATP juga menyebabkan α kristalin lebih resisten terhadap celah *tryptic* (Takata, 2007). Beberapa agen yang berhubungan dengan modulasi dari aktivitas chaperon α kristalin adalah curcumin, cumin, glutamine, pantethine, carnitine, carnosine, zinc, ibuprofen, arginine, lysine, phenacyl-4,5-dimethylthiazolium bromide (DMPTB) (Kumar dan Reddy, 2009).

2.3.3. Perubahan Lensa Kristalin pada Diabetes Mellitus

Hiperglikemia kronis adalah penyebab utama terjadinya komplikasi sekunder seperti diabetik katarak. α kristalin yang berfungsi sebagai chaperone pada kondisi hiperglikemia dapat mengalami gangguan fungsi, sehingga akan dapat mempengaruhi kejernihan lensa. Karena itu perlu dipahami tentang fungsi chaperone dan α kristalin pada kondisi diabetes sehingga fungsinya dapat dipertahankan atau dimodulasi sehingga dapat tetap bekerja dengan baik.

Beberapa penelitian berusaha untuk mengetahui bahan yang dapat memodulasi peran chaperone dari α kristalin, yaitu salahsatunya adalah curcumin. Pada tikus yang disuntikkan stz untuk menginduksi terjadinya katarak diabetika, ternyata terdapat penurunan fungsi aktivitas chaperone. Dengan pemberian diet curcumin, aktivitasnya dapat dimodulasi dan dapat menghambat progresifitas dan maturitas katarak. Jalur yang dianggap berperan dalam hal ini adalah curcumin mempunyai efek antioksidan sehingga menurunkan stres oksidatif dan aktivitas α kristalin sebagai chaperone dapat dipertahankan (Suryanayarana, 2005).

Beberapa komplikasi diabetes termasuk katarak merupakan hasil dari akumulasi *Advanced Glycation End Product* (AGE) yang terbentuk dari modifikasi

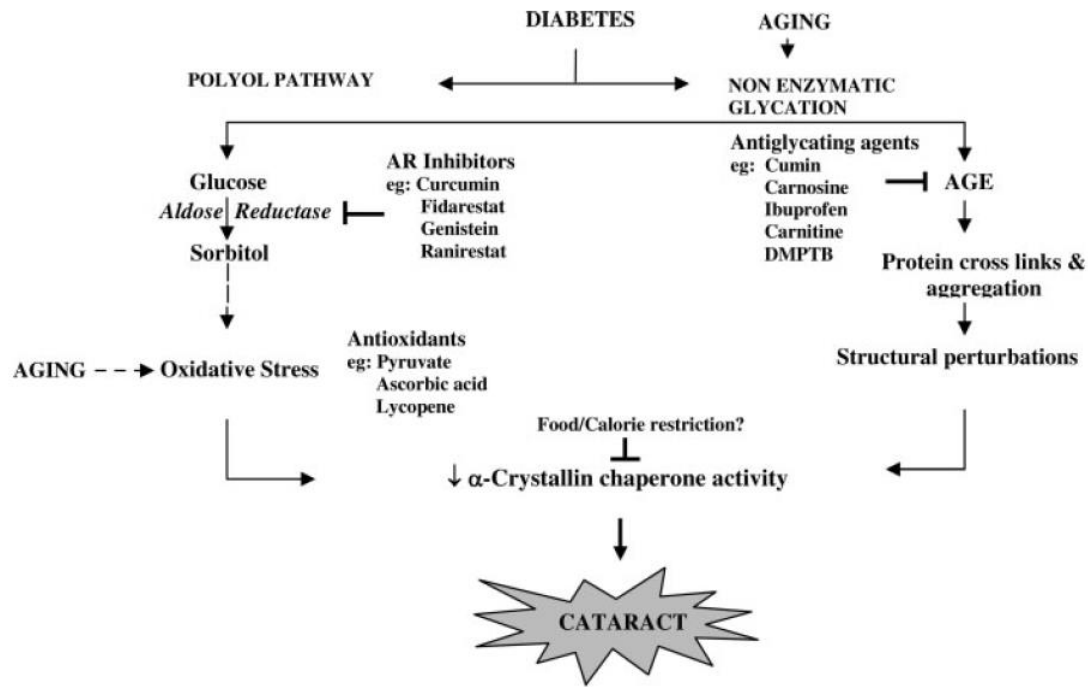
terhadap protein oleh agen glikasi yang berbeda. *Methylglyoxal* (MGO) adalah komponen dicarbonyl yang utama yang terdapat dalam lensa dengan konsentrasi yang tinggi dibandingkan pada jaringan lain, dan konsentrasinya akan semakin meningkat dalam kondisi diabetes.

Methylglyoxal (MGO) memiliki afinitas yang tinggi terhadap protein dan dapat bereaksi dengan Arg, Lys, His, dan Cys untuk membentuk AGE. α kristalin sebagai chaperon yang mempunyai masa hidup yang panjang dan kaya akan asam amino menjadi lebih rentan untuk mengalami reaksi non enzimatis dengan MGO.

Methylglyoxal (MGO) dapat menghambat α kristalin dalam uji agregasi, aktivitas chaperon dan menurunkan stabilitasnya serta menyebabkan terjadinya *unfolding* sehingga bagian proteolitik akan terpapar dan akan meningkatkan degradasi proteolitik (Derhamdan Harding, 2002; Kumar, 2004) tapi tidak efektif dalam mencegah inaktivasi enzim (Kumar, 2004).

Alpha kristalin yang mengalami modifikasi akan menyebabkan penurunan hidrofobitasnya, berubah struktur sekunder dan tersier dan mengalami peningkatan ukuran digomerik (Kumar, 2004). Lensa mata memiliki kadar ATP yang tinggi (Nagaraj, 2003) yaitu 3-5mM dan ikatannya dapat melindungi α kristalin dari proteolisis.

Namun penelitian menunjukkan bahwa ATP tidak dapat mencegah α kristalin yang terlikasi untuk terhindar dari degradasi proteolitik, jika dibandingkan kristalin alami yang tidak terlikasi.



Gambar 2.17. Modulasi fungsi chaperone α kristalin. Bagan yang menunjukkan secara molekuler kemungkinan kejadian yang mempengaruhi fungsi chaperone dari α kristalin selama proses penuaan dan diabetes serta target potensial untuk memodulasi fungsi chaperone α kristalin (Kumar, 2009).

Telah diketahui sebelumnya bahwa oksidasi dapat mengubah struktur sekunder dan tersier dari α kristalin dan juga struktur oligomerik αA dan αB kristalin sehingga menurunkan aktivitas chaperonennya (Rajan, 2006). Studi oleh kumar menyebutkan bahwa pada tikus diabetes didapatkan perubahan struktur sekunder dan tersier dari α kristalin, namun pemberian curcumin dapat menghambat stres oksidatif, menghambat maturasi katarak dan mencegah perubahan struktur tersier pada hewan coba tersebut. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa curcumin dianggap berperan dalam modulasi α kristalin dan mencegah terjadinya katarak.

2.3.4. Oksidasi Protein pada Katarak

Kristalin yang merupakan protein utama dalam lensa yaitu sekitar 90% dari kandungan lensa dapat menunjukkan beberapa perubahan yang terjadi karena oksidasi. Yang termasuk dalam oksidasi ini adalah pembentukan disulfide, cross linking inter dan intra molekuler, serta oksidasi methionin yang akan menyebabkan terjadinya agregasi dari molekul dengan berat molekul yang tinggi (Boscia 2000,2).

Redoks protein dianggap sebagai suatu hal yang penting dalam menjaga fungsi dan kejernihan lensa. Beberapa kondisi lokal atau sistemik yang dapat mempengaruhi redoks protein antara lain adalah myopia, diabetes, dan penuaan (*aging*) (Boscia 2000).

Pengukuran dari protein carbonyl dan sulfhydryl merupakan salah satu indeks yang penting untuk mengetahui status redoks protein di dalam lensa (Altomare 1997, Boscia 2000). Kadar protein carbonyl yang didapatkan dari asam amino selama oksidasi protein dengan metal katalisa baik invitro maupun invivo menunjukkan pengukuran langsung dari terjadinya kondisi oksidasi dari molekul tersebut, (Boscia 2000). Protein sulfhyhidril diketahui dapat mempengaruhi struktur dan fungsi dari lensa kristalin dan kadarnya akan menurun jika terjadi oksidasi.

Pengukuran dari kadar protein-protein tersebut akan menunjukkan oksidasi protein yang terjadi yang selanjutnya dapat menyebabkan agregasi protein. Kadar protein carbonyl pada korteks lensa diketahui berbanding lurus dengan usia, yaitu akan meningkat seiring dengan peningkatan usia. Pengukuran grup protein carbonyl sebagai biomarker dari stress oksidatif mempunyai kelebihan dibandingkan dengan pengukuran dari produk oksidasi lainnya yaitu antara lain bahwa protein carbonyl

terbentuk pada awal terjadinya oksidasi dan relatif stabil untuk mengetahui protein yang mengalami carbonylasi. Pemeriksaan untuk mendeteksi grup protein carbonyl memerlukan derivatisasi dari grup carbonyl dengan 2,4-dinitrophenylhydrazine (DPNH) yang akan membentuk produk dinitrophenyl (DNP) hydrazone yang stabil yang kemudian dapat dideteksi menggunakan pemeriksaan spektrofotometri, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dan elektroforesis satu atau dua dimensional yang diikuti dengan pemeriksaan western blotting. Saat ini pemeriksaan grup protein carbonyl yang telah diderivatisasi dengan DPNH merupakan metode pengukuran yang paling banyak digunakan (Dalle 2003).

2.4. Proses Protein Folding

Protein folding merupakan suatu proses yang terjadi di dalam retikulum endoplasma. RE sendiri merupakan kompartemen utama pada sel eukariotik dimana protein akan mengalami folding. Untuk mengetahui tentang protein folding dan mengapa protein folding sangat mudah mengalami kerusakan maka harus dipahami tentang termodinamik dan kinetik protein. Konformasi dari protein yang terdiri dari protein asli dan total interaksinya dengan residunya ditentukan oleh sekuens asam amino protein tersebut. Setiap konformasi akan memiliki energi bebas, dan pola antara energi bebas ini dengan konformasinya akan menghasilkan permukaan energi yang khas. Pada permukaan ini, protein akan melipat sepanjang jalur tersebut menuju ke konformasi dengan energi bebas yang menurun hingga mengalami transisi yang bersilangan (Dobson, 2004). Lipatan akan berhenti ketika konformasi dengan energi terendah tercapai. Pada banyak kasus, konformasi ini identik dengan

konformasi protein asli. Sekuens asam amino primer merupakan penentu utama untuk terjadinya protein folding. Secara kinetik, protein folding diawali dengan adanya kolaps hidrofobik, dimana beberapa bagian rantai hidrofobik saling melindungi dari air yang ada disekitarnya (Stevens and Argon, 1999). Terpendamnya interaksi elektrostatik seperti *salt bridges* atau ikatan hydrogen di dalam inti hidrofobik akan membatasi jumlah konformasi yang memungkinkan untuk mengalami folding, dan hal ini akan merupakan penentu utama jalur folding (Stevens and Argon, 1999) untuk membentuk struktur elemen sekunder dan teriser pada residu yang berjauhan dalam sekuens interaksi asam amino, contoh β -sheets atau ikatan disulfide, maka residu yang awal harus disimpan dalam status folding hingga pasangan interaksinya ditambahkan dalam rantai polipeptida. Hal ini dapat dieksaserbasi dengan adanya simpanan protein yang tinggi in vivo.

2.4.1. Protein folding di dalam Retikulum Endoplasma

Pada sel eukariotik, sebagian besar plasma membran protein dan protein yang tersekresi sebelum memasuki jalur sekretori akan mengalami pemindahan dengan translokasi kedalam RE. Protein atau membran proteins domain, memasuki RE melalui translator sebagai rantai polipeptida yang unfolded dan akan mengalami folding dalam lumen RE tersebut (Wickner and Schekman, 2005). Protein folding di dalam RE akan difasilitasi oleh *RE-residen chaperones* yang akan melindungi protein yang baru terbentuk dari agregasi dan tidak mengarahkan ke jalur penurunan produksi folding protein. *Asparagine* yang berikatan dengan karbohidrat ditambahkan ke dalam banyak protein yang memasuki RE dan

pengolahan secara selektif kompleks karbohidrat akan memberikan sinyal status protein folding (Trombetta dan Parodi, 2003).

Mirip dengan sitosol, RE merupakan lingkungan yang mengalami oksidasi (*oxidizing environment*) yang dapat memfasilitasi formasi ikatan disulfide untuk mengalami maturasi protein dan menstabilisasi struktur protein. Sebelum melalui jalur sekretori, protein dan membran protein harus mengalami folding komplet dalam RE, sehingga RE merupakan suatu pabrik tempat protein folding dan harus mengontrol kualitas dan produknya sehingga hanya protein yang dirakit sempurna dan berfungsi baik yang akan dikirimkan ke tujuan yang sesuai (Ellgaard and Helenius, 2003).

Beban protein yang disimpan dalam RE bervariasi antara tipe sel dan lama hidupnya sel. Proses perkembangan, progresivitas siklus sel, dan perubahan pada lingkungan sekitar semuanya dapat mempengaruhi jumlah dan tipe protein yang perlu untuk mengalami folding di dalam RE. Karena itu, selama hidupnya, sel seringkali mengalami situasi yang menyebabkan kebutuhan protein melebihi kapasitas folding RE sehingga menimbulkan Stres RE. Stres RE dapat meningkat secara mendadak karena ekspresi gen dari sel – sel mengalami perubahan sebagai respons dari perubahan sinyal ekstraseluler atau karena mutasi sel yang mempengaruhi maturasi dari sekresi protein maupun membran protein.

Di dalam RE, pH adalah hampir netral. Pada sel mamalia, RE merupakan tempat utama untuk penyimpanan Ca^{2+} . Konsentrasi Ca^{2+} dalam lumen RE mencapai 5mM sedangkan dalam sitosol adalah 0.1Mm (Orrenius, 2003; Schroder and Kaufman, 2005). Ca^{2+} dalam RE dapat berfluktuasi secara cepat karena mobilisasi

during the intracellular signaling process (Webb and Miller, 2003). Sensitivity of protein folding in RE to changes in Ca^{2+} indicates that small changes in Ca^{2+} homeostasis can be an important factor in several human pathologies. Several diseases related to Ca^{2+} in RE are known to be associated with ER stress (Paredes, 2013). The main redox buffer in the cell is glutathione. In the cytosol, the ratio of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG) is 30:1 to 100:1, while in the ER it is 1:1 to 3:1 (Hwang, 1992). In resting cells, the GSH : GSSG molar ratio reaches 100:1, while under oxidative stress conditions it can drop to 10:1 or even 1:1 (Chai Yc, 1994; Zitka 2012). Disulfide bond formation in RE is catalyzed by *Protein Disulfide Isomerase* (PDI).

Protein Disulfide Isomerase (PDI) is recycled by *FAD-dependent oxidases* *Ero1p* (Tu, 2000; Tu and Weissman, 2002) and *Erv2p* (Gerber, 2001; Sevier, 2001). Disulfide bond formation in ER is promoted by *Ero1p*. *Ero1p* oxidizes PDI, which then oxidizes protein folding directly. *FAD-bound Ero1p* then passes electrons to molecular oxygen, which produces ROS (Tu, 2000; Tu and Weissman, 2004; Sevier, 2001). Peroxide and superoxide are electron acceptors for *Ero1p*. Because if *Ero1p* does not pair with electron acceptors such as in ER stress conditions, ROS will be formed (Tu and Weissman, 2002).

Protein folding dalam RE terdiri dari 3 kelas protein foldase, molecular chaperone, dan lectins clanexis, calreticulin dan EDEM (tabel 2.2).

Tabel 2.2. Chaperone Residen Molekuler RE, Foldase, dan Lectins.

Class and Name	Function
Chaperones, HSP70 class GRP78/BiP/Kar2p LhS1P/Cer1p/Ssi1p/GRP170	Chaperone, translocation, folding sensor Chaperone
Chaperones, DNA-J-like, HSP40 class ERdj1/MTJ1 ERdj3/HEDJ/Scj1p ERdj4 ERdj5 Jem1p Sec63p	Chaperone Co-chaperone regulating ATPase activity of BiP Co-chaperone regulating ATPase activity of BiP Co-chaperone regulating ATPase activity of BiP Co-chaperone regulating ATPase activity of BiP Co-chaperone regulating ATPase activity of BiP Co-chaperone regulating ATPase activity of BiP
Chaperones, GrpE-like BAP SIS1P/Sil1p	Nucleotide exchange factor for BiP Nucleotide exchange factor for BiP
Chaperones, HSP90 class GRP94/endoplasmin	Chaperone
Lectins Calnexin Calreticulin Mnl1p/Htm1p/EDEM	Glycoprotein quality-control Glycoprotein quality-control Glycoprotein degradation
Carbohydrate processing enzymes UGGT α -Glucosidase I α -Glucosidase II α -Mannosidase I α -Mannosidase II	Folding sensor Removal of terminal glucose residues from glycoproteins Removal of terminal glucose residues from glycoproteins, release of glycoproteins from calnexin Removal of terminal mannose residues, extraction of glycoproteins from calnexin cycle Removal of terminal mannose residues, extraction of glycoproteins from calnexin cycle
Foldases, subclass disulfide isomerases PDI ERp72 ERp61 ERp57 ERp44 Ero1p/Ero1 α , Ero1 β Erv2p	Oxidoreductase Oxidoreductase Oxidoreductase Oxidoreductase Retention of Ero1 α in ER Oxidoreductase for PDI Oxidoreductase for PDI
Foldases, subclass FAD-dependent oxidases Fmo1p	FAD-dependent oxidase
Foldases, peptidyl-prolyl isomerases FKBP13 FKBP65 S-Cyclophilin CCYLP Cyclophilin B	

Foldase merupakan enzim yang mengkatalisa langkah – langkah protein folding untuk meningkatkan lajunya, sebagai contoh yaitu *as-trans peptidyl-prolyl isomerases (PPI/Immuno Philins)* yang mengkatalisa *as-trans-isomerization* dari ikatan *peptidyl-prolyl* dan *PDIs*. Molekul chaperone akan memfasilitasi protein folding dengan melindungi daerah unfolded dari protein sekitar. Chaperone ini tidak meningkatkan laju protein folding (Schroder dan Kaufman, 2005).

2.4.2. Stres Retikulum Endoplasma

Dalam kondisi tertentu seperti seperti starvasi dari nutrien, anoksia dan iskemia, infeksi virus, panas yang menyebabkan denaturasi protein dapat memicu terjadinya stres RE (Ma dan Hendershot, 2004; Wu dan Kaufman, 2006). Dalam kondisi – kondisi ini kapasitas folding dari organela akan terganggu, dan seluruh sel harus beradaptasi dalam kondisi baru ini. Pada kondisi Stres RE, protein folding demand dalam RE akan melebihi kapasitasnya (Papa, 2012). Pada kondisi ini sinyal darurat akan ditransmisikan ke nukleus sehingga akan mengaktifasi transkripsi gen yang sesuai dalam biogenesis organel, dan memicu regulasi UPR (Yoshida, 2009).

Pada kondisi kelainan metabolik tertentu seperti diabetes tipe 2 terjadi resistensi insulin di lemak, otot dan Liver dan kegagalan kompensasi sel β pancreas untuk meningkatkan produksi insulin (Yoshida, 2009). Sinyaling insulin sangat sensitif dalam mempengaruhi perubahan homeostasis RE dan siklus redoks.

Stres RE menghambat sinyaling insulin melalui aktivasi dari protein kinase JNK (*Jun N-Terminal Protein Kinase*).

Fosforilasi SNK dari IRS-1 (*Insulin Receptor Substrat-1*) pada ser 307 menurunkan sinyaling insulin, induksi dari stres RE dapat mensupresi *insulin-receptor-signaling* melalui aktivasi *IRE1 α -dependent* pada jalur JNK. Penurunan jalur JNK dapat memperbaiki resistansi insulin kemungkinan karena dapat membalik efek yang merusak pada stres RE, oksidatif stres, asam lemak bebas dan sitokin pro inflamasi (Shimizu, 2004). Peran stres RE dalam insulin sinyaling juga diduga dengan penemuan bahwa ekspresi ektopik dari molecular chaperone ORP150/GRP170 dalam sel hepatosit dapat memperbaiki sensitivitas insulin (Zeevaert, 2008).

Retikulum Endoplasma (RE) dan mitokondria membentuk interaksi fisik yang dalam hal fungsi biologis termasuk bioenergetik mitokondrial dan sinyaling apoptotik. Untuk mengkoordinasi fungsi ini selama kondisi stres, sel harus mengatur RE dan mitokondria melalui jalur sinyaling stres bersama dengan respon tertentu seperti ER *Unfolded Protein Response* (UPR).

Terdapat kontak antara RE dengan mitokondria dan melalui kontak ini akan terjadi transport metabolik, termasuk lemak dan Ca^{2+} , selain itu RE dan mitokondria akan terlibat dalam regulasi fungsi biologi termasuk homeostasis lemak, metabolisme mitokondria, dan regulasi sinyaling apoptosis (Rainbolt, 2014). Kontak antara RE dan mitokondria merupakan tanda adanya komunikasi interorganela yang penting untuk koordinasi fungsi seluler. Mitokondria akan sensitif jika ada kondisi patologik yang menginduksi stres RE (Rainbolt, 2014).

Stres RE diidentifikasi sebagai peningkatan akumulasi misfolded protein dalam lumen RE. Stres RE dapat ditransmisikan ke mitokondria dengan adanya

perubahan transfer metabolit misalnya Ca^{2+} atau melalui jalur sinyaling *stress-responsive*, yang secara langsung akan mempengaruhi fungsi mitokondria. Sinyaling stres dari RE ke mitokondria akan menghasilkan fungsi adaptasi berupa *pro-survival* atau *pro-apoptosis* (Rainbolt, 2014).

Selama fase adaptasi awal saat terjadi stres RE, kontak RE-mitokondria akan meningkat, dan menyebabkan terjadinya transfer Ca^{2+} antara organel – organel tersebut (Bravo, 2011; Koo, 2012). Peningkatan Ca^{2+} kedalam mitokondria akan menstimulasi metabolisme mitokondria melalui aktivitas *Ca²⁺regulated dehydrogenases* dalam siklus TCA (*Tricarboxylic Acid*). Peningkatan aktivitas dehydrogenase akan meningkatkan aktivitas rantai pernafasan mitokondria dan menghasilkan peningkatan sintesa *Adenosin Trifosfat*(ATP) mitokondria sementara selama fase awal Stres RE. Lonjakan kapasitas bioenergi akan meningkatkan sumber energi yang tersedia untuk melangsungkan respon adaptasi dan menghindari stres. Selain itu, paparan kronis terhadap stres RE akan memberikan dampak negatif terhadap metabolisme seluler dengan menurunkan respirasi mitokondria dan menurunkan kadar ATP seluler (Bravo, 2011; Koo, 2012), sehingga terjadi penurunan simpanan Ca^{2+} dalam RE dan peningkatan Ca^{2+} dalam mitokondria (Rizzuto, 2012; Urra, 2013). Pada akhirnya, hasil sinyaling ini adalah fragmentasi mitokondria dan terbukanya *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP), yang menginisiasi sinyaling apoptosis intrinsik dan memprogram kematian sel.

Bervariasinya kadar stres RE dalam berbagai tipe sel juga dilaporkan dapat mempengaruhi fungsi mitokondria lain termasuk biogenesis DNA-mitokondria (*mtDNA*) (Zheng, 2012), transkripsi dari sub unit rantai respirasi (Koo

2012), dan peningkatan ROS mitokondria (Harding, 2003; Cullinan dan Diehl, 2004; Koo, 2012) yang akan mempengaruhi kapasitas stres RE sehingga mempengaruhi fungsi mitokondria.

Beberapa penyakit metabolik seperti *non alcoholic fatty acid Liver disease*, diabetes tipe 2 dan obesitas berhubungan dengan stres RE yang tidak terselesaikan sehingga diduga bahwa disfungsi mitokondria pada penyakit – penyakit tersebut terjadi karena adanya disregulasi mekanisme yang mengikutsertakan perubahan dalam komunikasi RE-mitokondria (Gentile, 2011; Lee dan Ozcan, 2014). Sebagai contoh dalam diabetes tipe 2, perubahan transfer Ca^{2+} RE-mitokondria diduga berkontribusi dalam patofisiologi diabetes tipe 2 dimana peningkatan kalsium sitosol akan menyebabkan sinyaling insulin menyimpang dalam pankreas dan merusak fungsi metabolik (contoh glukoneogenesis) dalam hepar (Lim, 2009). Peningkatan aktivasi dari sinyaling TOR juga dianggap berhubungan dengan terjadinya penyakit metabolik (Laplante dan Sabatini, 2012).

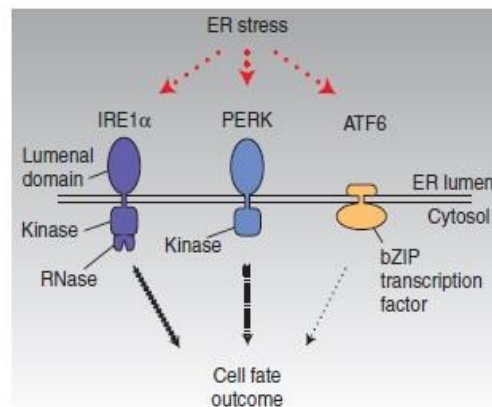
2.4.3. *Unfolded Protein Response*

Jalur UPR teraktivasi jika terdapat akumulasi di dalam RE dan akan terjadi respon terhadap stres dengan cara (1) upregulasi kapasitas RE folding melalui peningkatan kadar *RE-resident molecular chaperone* dan ekspansi dari RE. (2) Menurunkan kebutuhan dalam RE dengan menekan sintesa protein. (3) peningkatan pembersihan unfolded protein dari RE melalui peningkatan degradasi (*ER-Associated Degradation/ERAD*). Apabila semua mekanisme ini tidak dapat

memperbaiki stres, maka jalurUPR akan mengaktivasi apoptosis (Rutkowski and Kaufman, 2004; Ron and Walter, 2007).

2.4.3.1. Sinyaling UPR

Saat ini telah diketahui bahwa dalam respon terhadap Stres RE, tiga *RE-localized transmembrane* sinyal transduksi teraktivasi untuk mengawali respon adaptasi. Dua sinyal transduksi ini yaitu potein kinaseIRE-1 (*inositol-requiring kinase 1*) (Yoshida, 2001) dan PERK (*double started RNA-activated protein kinase-like ER-kinase*) (Harding, 2000) dan faktor transkripsi ATF6 (*activating transcription factor 6*)(Gambar 2.18) (Yoshida, 2000; Yoshida, 2001).



Gambar 2.18. Sensor pada saat terjadi stres RE. Saat terjadi stres RE, akan mengaktivasi tiga sensor transmembran yaitu *IRE1α*, *ATF6*, dan *PERK*. Ketiga sensor ini akan terintegrasi untuk menentukan apa yang terjadi pada sel saat terdapat stres RE (Papa, 2012).

2.4.3.2. Sinyaling IRE1

Jalur IRE1 akan meregulasi chaperone, ERAD dan memperluas respon RE terhadap stres RE. Secara evolusi, jalur ini merupakan jalur yang paling tua dan terdapat pada seluruh sel eukariot. IRE1 merupakan sensor RNase yang berlokasi di dalam membran RE (Tirasophon, 2000; Urano, 2000; Iwawaki, 2001).

Pada kondisi stres RE, IRE1 akan mengkonversi pre-mRNA dari XBP1 menjadi mRNA matur melalui mekanisme splicing mRNA sitoplasma, dan menyebabkan translasi dari faktor transkripsi aktif pXBP1(s) (Yoshida, 2001; Calton, 2002). pXBP1(s) akan mengaktivasi transkripsi dari chaperone RE dan gen ERAD sehingga homodimer atau heterodimer dengan ATF6 dimana pXBP1(s) yang merupakan protein yang ditranslasi dari XBP1 pre-mRNA akan meningkatkan degradasi dari pXBP1(s) (Yoshida, 2003; Yoshida, 2006; Yoshida, 2007; Adachi, 2008; Yoshida, 2009).

Penelitian dari Firtina, 2011 dengan menggunakan analisis RT-PCR mendapatkan bahwa terdapat kadar basal XBP1s splicing selama perkembangan lensa tikus. Untuk mengukur kuantitas XBP1 splicing, digunakan analisis RT-PCR seperti yang dideskripsikan oleh Back et al (Yoshida, 2009), hasilnya bahwa bentuk “*spliced*” dari XBP1 transkripsi diproduksi dalam lensa selama masa perkembangan dengan kadar 17% dari total XBP1 transkrip pada embrio dan 32% dari total XBP1 transkrip dalam usia 2,5 bulan. Dengan menggunakan *western blotting*, lensa embriotik memiliki kadar protein yang tinggi yang dihasilkan dari *spliced* XBP1 mRNA (54 kDA), dimana lensa post natal memiliki kadar protein yang juga relatif tinggi yang dihasilkan oleh *unspliced* XBP1 mRNA (33 kDA). Diduga bahwa fungsi

XBP1(u) porotein adalah untuk menurunkan regulasi XBP1(s) pada lensa post natal sehingga sesuai dengan pernyataan bahwa XBP1(u) adalah merupakan regulator negatif XBP1(s) melalui ikatan langsung dan akan mengarahkannya ke degradasi proteasomal (Yoshida, 2006). Aktivasi yang kuat atau berkepanjangan dari jalur IRE1 berhubungan dengan aktivasi jalur pro apoptotik *c-jun N-terminal kinase* (JNK) dan atau aktivasi caspase 12 yang dapat menyebabkan apoptosis (Urano, 2000; Szegezdi, 2003). Jalur ini kemungkinan diregulasi secara ketat selama proses perkembangan lensa selama untuk mencegah terjadinya apoptosis.

XBP1(s) merupakan *basic leucine zipper* (bZIP) faktor transkripsi yang dapat meregulasi chaperon RE, ER *associated degradation* (ERAD), dan biogenesis RE (Friedlander, 2000; Lee, 2003; Srinburi, 2004). Saat ini, XBP1(s) telah diidentifikasi sebagai faktor transkripsi yang diperlukan secara spesifik untuk diferensiasi terminal Limfosit B ke dalam plasma sel (Reimold, 2001; Iwakoshi, 2003). Ketika masuk dalam garis sel B, XBP1(s) dapat menginisiasi diferensiasi lensa dan dapat menginduksi proliferasi RE, golgi, mitokondria dan Lisosom (Shaffer, 2004). Karena diferensiasi melibatkan sintesis dari banyak membran protein, fungsi XBP1(s) pada lensa juga mungkin melibatkan kenaikan regulasi kapasitas RE folding melalui induksi terhadap chaperone RE, enzim folding RE, dan biogenesis RE pada proses diferensiasi sel serat lensa.

2.4.3.3. PERK (*PKR-like ER Kinase*)

PERK merupakan sensor kinase yang berlokasi pada membran RE dan memfosforilasi subunit α dari faktor inisiasi translasi eukariotik (eIF₂ α) sehingga

respon terhadap stres RE dapat melemahkan translasi dan menghambat akumulasi dari unfolded protein lebih lanjut (Harding, 2000). PERK juga menginduksi ekspresi dari faktor transkripsi ATF4 yang berikatan dengan elemen pengurainya yang disebut *Amino Acid Response Element* (AARE) dan bertanggung jawab dalam induksi enzim antioksidatif dan protein yang berhubungan dengan translasi (Harding, 2000, Harding, 2003). PERK merupakan domain protein transmembran. Pada lumennya terdapat sensor terhadap Stres RE dan domain sitoplasmiknya secara langsung memfosforilasi *eukaryotic initiation factor 2* (eIF 2α) pada serine 51 dan menyebabkan inaktivasi (Firtina, 2011). Hal ini menyebabkan hambatan terhadap inisiasi translasi pada kebanyakan mRNA seluler dan penurunan kebutuhan protein folding pada RE (Harding, 2000). Untuk dapat teraktivasi, PERK mengalami oligomerisasi dan autofosforilasi pada beberapa tempat. Pada suatu penelitian oleh Firtina digunakan antibodi yang spesifik untuk membentuk PERK fosforilasi pada Thr980 untuk mendeteksi PERK aktif pada lensa tikus. Imonoreaktivitas p-PERK ditemukan pertama kali pada embrio tikus usia 12.5 bulan (E12,5) dan berlokasi pada bagian ujung dari sel serat lensa (Firtina, 2011). Pada fase apikal embrional selanjutnya, ekspresi p-PERK dipertahankan pada kadar yang tinggi terutama pada bagian apikal dan sel serat lensa yang baru pertama kali terbentuk dan menurun pada bagian tengah sel serat lensa. Pada lensa, elemen dari RE terkonsentrasi pada bagian posterior dan apikal dari sel serat lensa yang mengalami elongasi. Lokasi p-PERK yang spesifik terdapat pada apikal tipis dari sel serat lensa.

Pada pankreas, laju regulasi translasi oleh PERK diperlukan untuk mengatur laju sintesis insulin sesuai dengan kadar gula darah (Scheuner, 2001). Pada lensa,

ketika epitel mengalami transformasi menjadi sel serat lensa terjadi peningkatan produksi protein membran yang drastis, sehingga PERK kemungkinan diperlukan untuk mencegah mesin folding RE untuk bekerja berlebihan selama proses transformasi ini. Selain itu, PERK diduga memiliki peran lain pada lensa yaitu PERK dapat meningkatkan sintesis Lipid dengan cara memicu aktivasi SREBP1 melalui deplesi terhadap protein inhibitor, insig1. Insig1 merupakan protein dengan masa hidup yang pendek maka *eLF₂-mediated translational inhibition* secara cepat akan mendepleksi protein ini. Jika insig1 tidak ada, maka SREBP1 dapat bertranslokasi menuju golgi dimana akan dipisahkan oleh S1/S2P protease untuk menghasilkan faktor transkripsi yang dapat menginduksi enzim lipogenik (Bobrovnikova-Marjon, 2008). Mekanisme ini diduga dapat terjadi pada lensa karena membran plasma lensa kaya kolesterol dan fosfolipid (Borchman dan Yappert, 2010).

Aktivasi PERK pada daerah apikal sel serat lensa menunjukkan kemungkinan bahwa PERK dapat meregulasi produksi lipid membran yang dibutuhkan untuk berinteraksi menjadi elongasi membran tip pada sel serat lensa tersebut. Yang menarik, pada lensa tikus dengan usia 3 bulan, ekspresi p-PERK tidak lagi terlihat pada ujung apikal dari serat lensa, dan ekspresi p-PERK berhubungan dengan degradasi nukleus pada sel serat yang matur. Hubungan antara ekspresi p-PERK dengan nukleus menimbulkan dugaan bahwa p-PERK terlibat dalam proses degradasi. Sinyaling PERK juga dianggap berperan dalam mengkoordinasi degradasi organela dengan denukleasi. Yang menarik, pada penelitian didapatkan bahwa dengan adanya aktivasi UPR yang menetap pada sel serat lensa bagian sentral, maka akan terjadi retensi nucleus dan organela (Firtina,

2009), sehingga meskipun sinyal PERK diperlukan untuk meregulasi proses ini, namun berhentinya UPR pada sel serat bagian sentral diperlukan untuk terjadinya denukleasi. Aktivasi jalur PERK yang berkepanjangan dan kuat berhubungan dengan apoptosis, namun jalur ini diduga tersupresi atau berada pada kadar aktivasi yang rendah selama proses perkembangan lensa untuk mencegah terjadinya apoptosis.

2.4.3.4. Sinyaling *Activating Transcription Factor* (ATF6)

*Activating Transcription Factor*6 (ATF6) merupakan sensor faktor transkripsi yang terdapat di dalam membran ER. Saat terjadi stres RE, ATF6 akan ditransportasikan ke golgi aparatus dan dibelah secara berurutan oleh protease yang disebut S1P dan S2P (Ye, 2000; Haze, 2001). Bagian sitoplasmik dari ATF6 yang dilepaskan dari aparatus golgi bertranslokasi ke dalam nukleus, berikatan dengan elemen penguat yang disebut ERSE (*ER Stress response element*), dengan urutan (CAAT(Ng)CCACG) dan mengaktifasi transkripsi dari gen chaperon RE dan gen *ERAD* (Yoshida, 2000; Yoshida, 2001; Yoshida, 2003; Yamamoto, 2007). *bZIP* yang mengandung *activating transcription factor 6* (ATF6) telah diidentifikasi sebagai protein regulator lain yang seperti XBP1 dia mengikat elemen ERSE1 pada daerah promoter gen UPR -responsive (Yoshida, 2009). Dua alel dari ATF6, yaitu ATF6 α (90kDA) dan ATF6 β (110kDA) disintesa pada seluruh tipe sel sebagai protein transmembran RE. Pada kondisi tidak stres, ATF6 berlokasi pada membran RE dan terikat dengan Bip.

Ketika terjadi Stres RE, disosiasi Bip menyebabkan transport ATF6 kedalam kompleks golgi, dimana ATF6 akan dibelah secara berurutan oleh 2 protease (Li, 2000, Yoshida, 2001). *Serin protease site-1 protease*(S1P) membelah ATF5 pada domain luminal, dan *metalloprotease site-2 protease*(S2P) membelah ATF6 pada daerah N-terminal (Ye, 2000). Bentuk ATF6 α dan ATF6 β yang telah diproses ditranslokasikan kedalam nukleus dan berikatan dengan ATF/cAMP response element (CRE) dan dengan ER-stres response element (ERSE-1) untuk mengaktifasi gen target (Yoshida, 2001). ATF6 α dan ATF6 β memerlukan faktor transkripsi CBF (CAAT binding faktor yang juga disebut disebut NF- γ) untuk mengikat ERSE1 (Li, 2000, Yoshida, 2001).

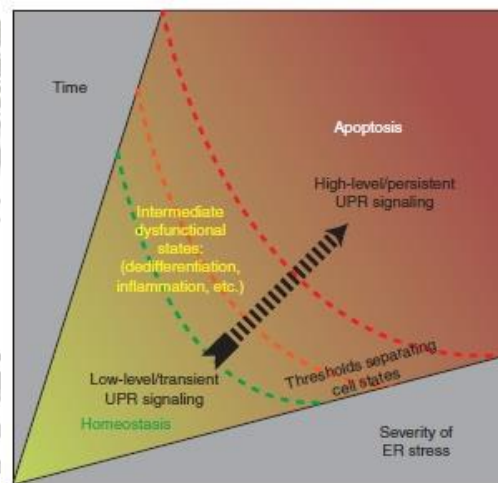
Dengan menggunakan pemeriksaan *Western blotting* ditemukan bahwa protein pro ATF6 α/β pada lensa dibelah menjadi ~50 kDA dan ditemukan pada lensa embrionik maupun newborn sehingga menunjukkan bahwa jalur ATF6 diperlukan sebagai sinyaling adaptif untuk menginduksi penuh kapasitas folding dari RE. ATF6 α/β juga dapat menginduksi transkripsi dari komponen ERAD melalui heterodimerisasi dengan XBP(s) (Yamamoto, 2007). Penemuan terbaru menunjukkan bahwa ekspresi ATF6 α menyebabkan ekspansi RE dalam kondisi ketidak ada anXBP1(s) (Bommiasamy, 2009). Hal ini menunjukkan bahwa ATF6 α dan XBP1(s) dapat bersama – sama meregulasi kapasitas folding RE melalui peningkatan regulasi dari mesin folding RE dan biogenesis RE, 2 protein ini juga dapat bersama – sama menyebabkan perluasan dari protein folding apparatus dengan meningkatkan regulasi terhadap ekspresi chaperone RE, enzim folding RE

dan komponen ERAD dalam mendeferensiasikan sel serat lensa yang perlu mensintesa protein membran dalam jumlah besar (Firtina dan Duncan, 2011).

Activating Transcription Factor(ATF6) ini mengalami regulasi oleh Bip mirip dengan jalur PERK atau Ire1(Shen, 2002; Schroder, 2004). Hilangnya ikatan BiP berkorelasi dengan translokasi ATF6 ke Golgi, yang ditandai dengan ekspresi BiP yang berlebihan di dalam sel. Dua sinyal lokalisasi Golgi (GLSs) diidentifikasi dalam ATF6. Hilangnyabinding site BiP dari ATF6, saat mempertahankan GLS, mengakibatkan translokasi konstitutifnya ke Golgi. Hasil ini menunjukkan bahwa BiP mempertahankan ATF6 di ER dengan menghambat GLSs dan terpecahnya BiP selama stress RE memungkinkan ATF6 untuk diangkut ke Golgi (Shen J,2002).*Activating Transcription Factor*(ATF6) juga tetap berada dalam RE karena adanya interaksi dengan lectin calreticulin (Hong, 2004). Pada kondisi stres RE, ATF6 yang baru disintesa berada dalam kondisi *underglycosylated* sehingga akan memutuskan interaksinya dengan calreticulin.

Dengan adanya kombinasi antara ketiga sinyal di atas yaitu IRE1 α , PERK, dan ATF6 maka sel akan mengetahui adanya unfolded protein di dalam RE, sehingga *Unfolded Protein Response* akan diaktifkan. UPR akan meningkatkan kapasitas sel untuk mempertahankan sekresi protein ketika dibutuhkan dalam jumlah besar. UPR juga akan menyebabkan hambatan translasi yang sementara selama terjadi RE stres, sehingga akan mengkonsentrasikan sumber daya yang ada untuk melakukan protein folding terhadap protein-protein yang sudah ada terlebih dahulu sebelum protein yang baru terbentuk. Apabila fungsi adaptasi UPR ini berhasil, maka penurunan *unfolding* protein akan menyebabkan sinyaling protein

juga menurun dan homeostasis akan tercapai. Hal ini menunjukkan kemampuan fisiologis dalam mengelola stres RE pada kadar rendah atau kondisi singkat. Jika terjadi kondisi stres RE dengan kadar yang tinggi maka UPR akan mengubah adaptasi fisiologisnya menuju ke destruksi atau apoptosis. Destruksi sel atau proses apoptosis ini terjadi sebagai akibat UPR yang kronis atau stres dengan kadar yang tinggi. UPR pada kondisi ini disebut juga sebagai terminal UPR. Sebelum masuk ke dalam sinyaling terminal UPR, sel akan melalui kondisi disfungsi intermediate. Pada kondisi ini, beberapa sel akan mengalami gangguan diferensiasi atau inflamasi kronis (Gambar 2.19) (Zhang, 2006, Papa, 2012,). Kondisi apoptosis yang kuat dan lama akan menyebabkan kerusakan organ karena fungsi sel yang berkurang (Papa, 2012).



Gambar 2.19. Kondisi sel ditentukan oleh besar dan durasi sinyaling stres RE.

Hasil akhir adaptasi UPR dapat mengandung kadar stres RE yang rendah dengan menurunkan konsentrasi unfolded protein di dalam RE. Aktivasi yang berlanjut dari sensor UPR mengindikasikan ketidak mampuan untuk mempertahankan homeostasis. Bila stres

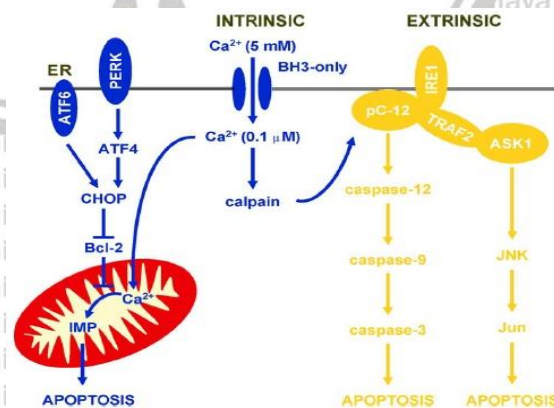
tidak pulih maka sinyaling UPR akan menuju status terminal, menyebabkan berhentinya diferensiasi sel dan inflamasi dan memicu apoptosis (Papa, 2012).

2.4.4. Unfolded Protein Response dan Apoptosis

Dua jalur utama yang mengontrol apoptosis adalah intrinsik dan ekstrinsik.

Jalur intrinsik berespon terhadap kerusakan intraseluler contoh kerusakan DNA, dan jalur ekstrinsik berhubungan dengan stimulus ekstraselulaer.

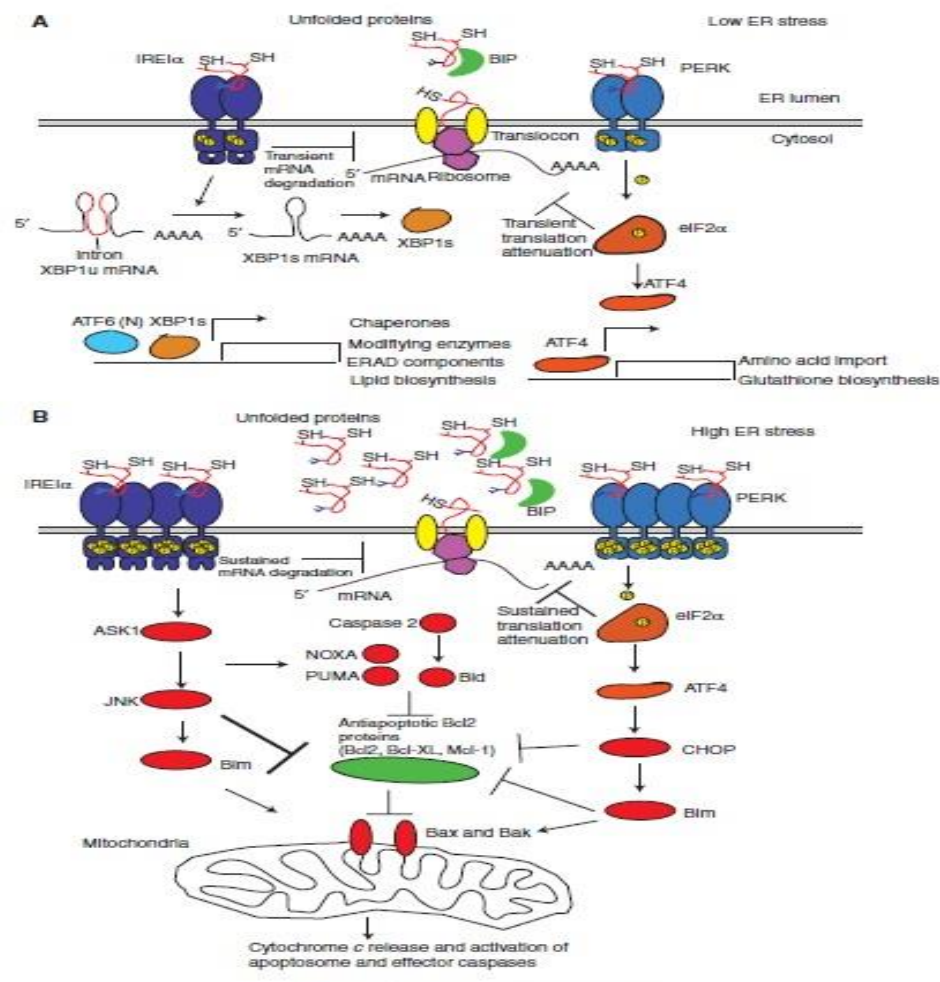
Jalur ekstrinsik dipicu oleh respon sel permukaan caspase terutama caspase 8 dan inisiasi dari kaskade caspase. Jalur intrinsik dikontrol oleh keseimbangan antara pro *apoptotic* BH-3 *proteine* seperti *Bad*, *Bak*, dan *Bax*, dan anti apoptotic protein yaitu BCL-2. Protein *Bak* dan *Bax* beraksi dalam membran mitokondria dan akan menghasilkan pelepasan sitokrom C. Sitokrom C kemudian akan memfasilitasi terbentuknya kompleks antara Apaf-1 dan pro-caspase9, aktivasi kaskade capase dan aktivasi dari (eksekusioner caspase) caspase 3 (Gambar 2.20) (Rutkowski dan Kaufman, 2004). Stres *RE* akan mengaktifasi kedua jalur ini jika terjadi apoptosis.



Gambar 2.20. Jalur apoptosis yang diatur oleh UPR. Dua jalur utama yang mengatur apoptosis adalah intrinsik dan ekstrinsik (Schroder dan kaufman 2004).

Sebagai respon terhadap stres RE, *Bak* dan *Bax* akan mengalami perubahan konformasi dan atau oligomerisasi pada membrane RE (Zong, 2003), sehingga terjadi pelepasan Ca^{2+} dari lumen ER. Penumpukan dari Ca^{2+} akan mengaktifasi calpain di dalam sitosol, yang akan mengubah ER-localized procaspase 12 menjadi caspase 12 (Orrenius, 2003). Caspase 12 yang teraktivasi akan menginduksi kaskade caspase melalui pemisahan pro caspase 9 dan 3 oleh caspase 9 (Morishima, 2002; Rao, 2002). Pelepasan Ca^{2+} dari RE akan ditangkap oleh mitokondria sehingga menyebabkan terjadinya kolaps dari potensial membran bagian dalam dan selanjutnya akan memicu apoptosis (Filippin, 2003). Efek anti apoptosis dari BCL-2 akan tersupresi oleh regulation yang menurunkan transkripsi BCL-2 oleh faktor transkripsi CHOP (McCullough, 2001). Adanya ekspresi CHOP pada stres RE ditingkatkan oleh ATF-6 (Ma, 2004). dan disintesis oleh ATF-4 setelah terjadi fosforilasi eIF2 α oleh PERK (Harding, 2000; Scheuner, 2001).

Pada jalur ekstrinsik, sebagai respon terhadap stres RE, IRE1 akan membentuk complex hetero trimetic dengan TRAF2 dan *Apoptosis signal-Regulating Kinase-1* (ASK-1) dan akan mengaktifasi *C Jun amino terminal kinase* dan keamatan sel (Urano, 2000; Nishitoh, 2002). *C-jun N-terminal inhibitory kinase* (JIK) berhubungan dengan IRE1 dan memicu fosforilasi dan menyebabkan adanya hubungan antara TRAF2 dengan IRE1 (Yoneda, 2001).



Gambar 2.21. Pengaturan homeostasis antara UPR dengan apoptosis. (A)

Adaptasi UPR menurunkan beban protein dengan melakukan pembatasan translasi dan kerusakan mRNA (yang dimediasi oleh PERK dan IRE1α). Sintesis produksi gen melalui transkripsi atau translasi de novo meningkatkan fungsi protein folding dan *ER Associated Degradation* (ERAD). (B) Ternibal UPR terjadi jika unfolded protein RE tidak dapat dikurangi secara signifikan dan sensor sinyal UPR akan dimatikan. Pada kondisi tersebut, destruksi output UPR akan terjadi melalui kerusakan endonukleotik IRE1α mRNA dan hambatan translasi melalui PERK. Penurunan amplifikasi dari terminal UPR terjadi melalui JNK dan CHOP dan menyebabkan Bax dan Bak memicu MOMP (Papa, 2012).

Pada katarak dengan retinopati diabetika ternyata ditemukan lebih banyak sel yang mengalami apoptosis (Okamura, 2002). Kim dan kawan – kawan mendapatkan peningkatan kadar Bax dan penurunan kadar BCL-2 pada pasien katarak diabetika yang dilakukan penelitian in-vivo. Dengan adanya penelitian – penelitian tersebut menunjukkan bahwa apoptosis dari sel epitel lensa meningkat pada kondisi diabetes dan mempunyai peranan penting dalam terjadinya katarak. Mekanisme apoptosis dari LEC masih belum jelas hingga saat ini. Penelitian oleh Jung dan kawan – kawan menunjukkan bahwa adanya peningkatan dari ekspresi caspase 3 dan caspase 9 pada pasien dengan dan tanpa retinopati diabetika, sehingga memunculkan hipotesis bahwa mitokondria yang memediasi apoptosis berperan dalam kataraktogenesis pada pasien diabetes, penelitian ini serupa dengan Mishra Oshitari et al juga menunjukkan peningkatan ekspresi Bax, caspase 3 dan caspase 9 pada sel mesangial manusia setelah dipapar dengan glukosa tinggi (Mishra, 2005;Oshitari, 2008)

2.4.5. UPR pada kondisi katarak dan katarak diabetika

Diferensiasi sel epitel menjadi sel serat lensa merupakan proses perkembangan yang dipengaruhi oleh banyak hal yaitu siklus withdrawal sel, elongasi sel, penyimpanan protein kristalin dan degradasi nukleus dan organela (Firtina, 2009). Perubahan sel serat lensa dapat menyebabkan stres RE dan akhirnya memberikan dampak retensi nukleus dan organel, “defective” elongasi sel serat lensa, dan penurunan sintesa kristalin. Stres RE sendiri juga akan mengaktivasi

UPR, jalur aktivasi UPR pada lensa diduga dimediasi oleh aktivasi UPR/*specific translation*. Produksi ATF6(N) dan XBP1 dapat mengubah program transkripsi sel serat lensa dengan cara meningkatkan regulasi gen yang terlibat dalam proses folding dalam RE dan biogenesis RE dalam sel serat lensa yang akan menyebabkan degradasi nukleus dan organela sitoplasma (Sriburi, 2004;Sriburi, 2007; Bommasamy, 2009). PERK yang memediasi translasi dapat berinteraksi dengan diferensiasi sel serat lensa melalui penurunan sintesis kristalin dan protein sel serat spesifik yang diperlukan untuk diferensiasi sel.

Jalur PERK aktif ini dianggap merupakan jalur yang penting untuk keberlangsungan hidup sel menghadapi stres RE karena dapat menurunkan bebas stres pada RE. Defek pada proses diferensiasi sel kemungkinan berhubungan dengan kurangnya produksi membran spesifik sel serat lensa, dan kurangnya protein – protein yang berhubungan dengan elongasi.

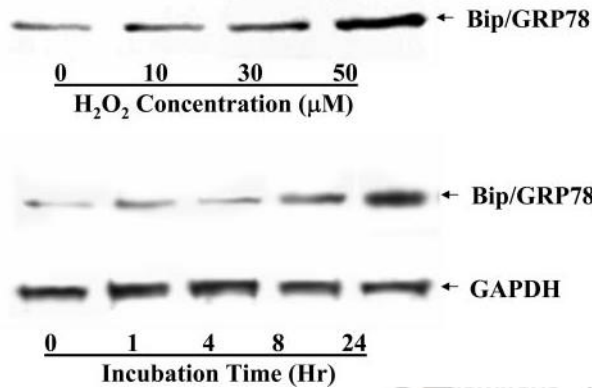
Pada manusia dengan mutasi genetic tertentu, seperti mutasi gen COL4A1 dapat terjadi katarak, namun hubungan dengan UPR masih belum jelas, diduga bahwa jalur aktivasi UPR dapat terjadi karena akumulasi dari rantai kolagen yang mengalami mutasi. Sebagai contoh sindroma *Alport* yang disebabkan oleh mutasi pada COL4A3, COL4A4, atau COL3A5, juga didapatkan katarak dan sel epitel lensa pada kasus ini memiliki bentuk yang ireguler dan dilatasi RE dan Golgi karena aktivasi UPR(Choi, 2005;Wilson Jr, 2006).

Selain karena adanya mutasi genetik, hiperglikemia kronis pada diabetes mellitus dianggap berhubungan dengan aktivasi UPR. Mulhern et al menunjukkan adanya hubungan yang cukup kuat dari peran UPR terhadap apoptosis LEC dan

kataraktogenesis pada *galactose-Fed rat*. Jalur UPR dapat memproduksi ROS dan menginduksi apoptosis pada LEC dari *galactose-Fed rat lenses*. Hal ini menunjukkan bahwa UPR dianggap memiliki peranan terhadap terbentuknya katarak diabetika (Torres-Bernal, 2014; Mulhern, 2006).

Eksresi *Glucose Regulated Protein (GRP78)* dan *Activating Transcription Factor (ATF-G)* yang merupakan 2 faktor pada UPR terdapat pada serat lensa katarak diabetika. Penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi misalignment dan disorganisasi dari serabut lensa pada kondisi katarak senilis maupun diabetika, dan tidak terdapat pada lensa normal, hal ini menunjukkan peranan UPR terhadap kataraktogenesis (Mullhern, 2006).

Terbentuknya UPR sangat berhubungan dengan adanya stres osmotik dan oksidatif di dalam lensa. Mulhern et al melakukan serangkaian penelitian untuk membuktikan hal tersebut. Pada kultur epitel lensa pada medium dengan MEM yang menjadi manitol, ternyata kadar ARI (sebagai penanda osmotik stres) dan kadar GRP78/BiP sebagai marker UPR meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa induksi UPR dan AR merupakan hasil dari stres osmotik ekstrasel pada kultur epitel lensa. Untuk menunjukkan UPR bisa diinduksi oleh *oxidative stres* dibuktikan penelitian dengan paparan H_2O_2 terhadap sel epitel lensa, didapatkan kematian sel yang meningkat serta kadar GRP78/BiP meningkat sesuai dengan waktu dan konsentrasi yang semakin banyak (*time and concentration dependent*)(Gambar 2.22) (Mullhern, 2006).



Gambar 2.22. Analisis protein blot dari kultur Lens Epithelial Cells dengan konsentrasi H₂O₂ yang berbeda. (A) Protein blot dari GRP78/Bip pada LECs yang dikultur selama 24 jam dalam 10% FBS/DMEM 0,10,30, dan 50 μM dari H₂O₂. (B) Ilustrasi dari protein blot dari GRP78/Bip pada LECs dalam waktu 24 jam. Pada seluruh protein blot, jumlah protein dari setiap well adalah sama. Ekspresi dari GAPDH digunakan sebagai control internal. Protein blot merepresentasikan hasil yang diperoleh dari tiga eksperimen independen (Mullhern, 2006).

Pada percobaan dengan hewan yang diberikan galaktosa, maka stres osmotik dan oksidatif dapat menginduksi UPR. Konsentrasi plasma glukosa pada tikus muda yang diberi diet 50% galaktosa mencapai level 20 mM (320 mg/dL) cukup untuk menginduksi UPR dalam kurun waktu 7-15 hari dan katarak dalam waktu 13-15 hari (Mullhern, 2006).

Aldosa Reduktase (AR) mengkatalisa reduksi galaktosa menjadi galaktitol, sehingga terjadi akumulasi galaktitol intra seluler pada sel epitel lensa serta peningkatan osmolaritas instaseluler pada lensa tikus. Pemberian *AR inhibitor*

(ARI) pada kondisi ini dapat menurunkan akumulasi galaktitol sehingga mencegah peningkatan osmolaritas intraseluler.

Unfolded Protein Respons (UPR) diketahui dapat membentuk ROS yang akan menurunkan GSH bebas dan berkurangnya *free* GSH ini menyebabkan kerusakan lebih lanjut pada fungsi mitokondria, sehingga ROS semakin banyak dihasilkan (O_2^-).

Harding et al dalam penelitiannya menyebutkan bahwa ER stres dapat memicu produksi ROS akut (Harding, 2003; Arap, 2004; Hagnes, 2004). Tu dan Weisman menduga bahwa sekitar 25% ROS seluler diproduksi selama sintesis protein (Tu, 2002). Penurunan GSH oleh UPR berakibat disfungsi mitokondria dan akumulasi ROS (Fribley, 2004; Hagnes, 2004;). ROS dari ER atau mitokondria juga dapat memberikan kontribusi terhadap produksi ROS oleh UPR. Munculnya ROS ini semakin lama akan menyebabkan penurunan GSH yang ada pada sel epitel lensa atau mungkin dapat berdifusi dari sel epitel lensa ke dalam sel serat korteks lensa dan dapat menyebabkan agregasi kristalin dan partikel yang menyebabkan perendapan sinar (*light scattering*). Aktivasi UPR dianggap juga sebagai bentuk lain dari mekanisme kematian sel yang telah diobservasi terjadi pada katarak (Mullhern, 2006).

2.5. *Glutathione* tereduksi (GSH)

2.5.1. Homeostasis dan Sintesis *Glutathione* tereduksi (GSH)

Penyimpanan GSH pada sel eukariotik paling besar adalah terletak pada sitosol (90%) dan merupakan tempat utama sintesis GSH. Dari sitosol, GSH di distribusikan ke dalam organela seperti mitokondria, nukleus dan retikulum

endoplasma (Forman, 2009; Lu, 2013; Aquilano, 2014). Pada mitokondria dan nukleus, GSH berupa GShtereduksi, sedangkan pada RE, GSH berupa GShteroxidasi yang penting pada proses koreksi protein folding dan jalur sekretori protein (Aquilano, 2014).

Glutathione (GSH) disintesa secara *in vivo*, melalui aksi dari dua enzim yang memerlukan ATP (*dependent* ATP), prekursor asam amino cystein, glutamat, dan glisin. Enzim yang pertama, *glutamate-cysteine ligase* (GCL) pada mulanya disebut *γ-glutamylcysteine synthase* (GCS) merupakan enzim dengan (rasio) yang terbatas. GCL merupakan heterodimer yang dapat berubah (*dissociated*) menjadi modulatori atau subunit yang ringan (GCML) dalam kondisi non denaturasi (Aquilano, 2014), dan dapat menjadi katalitik atau subunit yang berat (GCLS) (Lu, 2013).

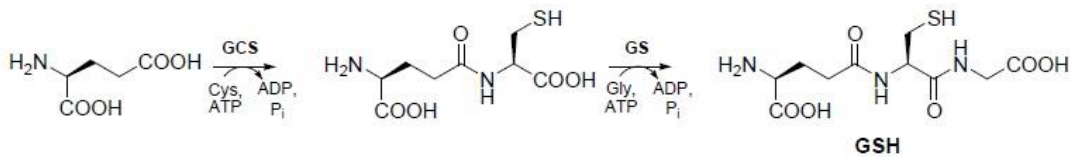
Glutamate-Cysteine Ligase (GCL) akan membentuk ikatan peptide yang khusus antara *γ-carboxyl glutamate* dan kelompok amino dari cysteine menggunakan energi yang didapat dari hidrolisis ATP (Lu, 2013; Aquilano, 2014).

GCL termasuk kelas protein yang sensitif terhadap stres oksidatif dan ekspresinya di regulasi oleh *Nuclear Factor (Erythroid-Derived-2)-Like 2* (NFE2L2) yaitu faktor transkripsi yang mengatur banyak jalur gen antioxidant responsive element pada berbagai tipe sel (Baldeli, 2013; Aquilano, 2014).

Enzim kedua yang sangat diperlukan untuk biosintesis GSH *de novo* adalah *Glutathione Synthase* (GS). Enzim GS pada manusia adalah subunit homodimer yang mengandung 474 residu asam amino yang dikode oleh *single-copy gene*.

Enzim ini mengkatalisa penambahan glycine pada *γ-glutamylcysteine* yang dibentuk oleh GCL untuk selanjutnya membentuk GSH, *γ-L-glutamyl-L-cysteine-glycine*, yang

merupakan reaksi yang diatur oleh hidrolisis dari ATP (Aquilano, 2014). Sintesis GSH dikontrol oleh beberapa faktor, antara lain ketersediaan substrat utama yaitu L-cysteine, jumlah dan rasio relatif antara subunit GCL (Chen, 2005; Aquilano, 2014), adanya hambatan *feedback* dari GCL oleh GSH.



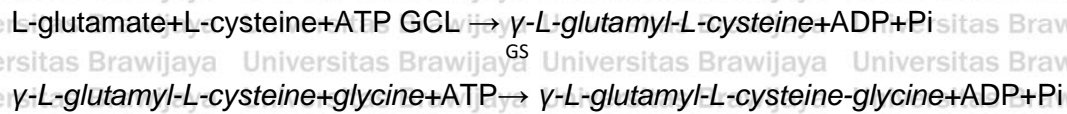
Gambar 2.23. Biosintesis dari Glutathion Tereduksi (GSH) (Cacciatore, 2010).

Setelah GSH intraseluler diproduksi, beberapa diantaranya akan dikirimkan ke kompartemen spesifik termasuk mitokondria, retikulum endoplasma, dan nukleus, namun terbanyak berlokasi di ruang ekstrasel jaringan (Gambar 2.23) (Cacciatore, 2010). Tidak seperti sintesa GSH intraseluler, degradasi GSH terutama terjadi pada ruang ekstraseluler dari sel yang akan mengekspresikan γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT). Glikoprotein heterodimer ini akan mengkatalisa hidrolisis dan transpeptidase dari grup GSH γ -glutamyl (Ballatori, 2009; Cacciatore, 2010).

Asam amino γ -glutamyl yang terbentuk selama reaksi ini adalah substrat dari γ -glutamyl cyclotransferase yang akan mengkonversi asam amino tersebut menjadi 5-oxoproline dan asam amino lainnya. Konversi dari 5-oxoproline menjadi L-glutamate bergantung terhadap ATP dan dikatalisa oleh enzim intraseluler 5-oxoprolinase. Cysteinglycine yang terbentuk dari reaksi transpeptidase akan dipecah oleh dipeptidase menjadi glycine dan cysteine (Cacciatore, 2010). Semua reaksi ini

GCL

membentuk siklus γ -*glutamyl* yang dapat mensuplai prekursor asam amino untuk sintesis GSH tambahan (Cacciatore, 2010).



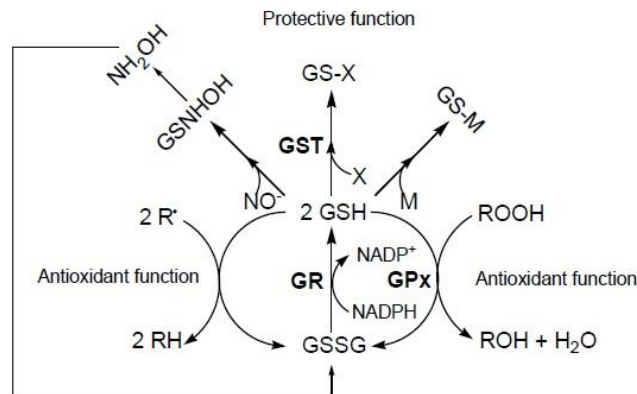
Kadar GSH intra dan ekstraseluler ditentukan oleh keseimbangan antara produksi, konsumsi, dan transportasinya. Karena fungsi fisiologisnya sangat penting, proses sintesis GSH ini diatur sangat ketat oleh beberapa enzim yang terlibat dalam metabolisme GSH pada saat transkripsi, translasi, dan post-translasi (Aquilano, 2014). Setiap enzim kunci yang penting dalam biosintesa dikode oleh gen *single-copy* pada genom haploid manusia.

2.5.2. Fungsi Biologi *Glutathione Tereduksi*

Glutathione tereduksi (GSH) terlibat pada beberapa proses biologis yang penting dan elemen fungsional yang merupakan kunci dari beberapa proses ini adalah molekul GSH yaitu grup *sulfhydryl* dari *cysteine*. Molekul ini berperan dalam reduksi dan reaksi konjugasi yang dianggap sebagai fungsi penting dari GSH (Cacciatore, 2010).

Sebagai antioksidan yang penting, GSH berperan dalam proses non enzimatis maupun enzimatis dalam hal perlindungan terhadap bahan yang toksik (Fang, 2002). GSH melindungi sel melawan efek dari radikal bebas dan ROS contoh *hydroxyl radical*, *peroxynitrite* dan H_2O_2 yang mungkin terbentuk secara normal dalam proses metabolisme. GSH juga berperan sebagai donor elektron pada proses reduksi enzimatis H_2O_2 dan peroksida organik (ROOH) dan dikatalisis oleh enzim

GSHperoksidase (GPx). GSSGyang terbentuk akan direduksi kembali secara cepat oleh GSHdengan bantuan NADPH-dependen *Glutathione Reductase*(GR)(Wu, 2004).



Gambar 2.24. Fungsi Biologi dari GSH.GSHmerupakan electron donor pada reaksi reduksi enzimatik dari H₂O₂ dan peroksida organik (ROOH) yang dikatalisa oleh GSHperoksidase (GPx). GSSG yang diproduksi akan kembali menjadi GSHoleh *Glutathione Reductase* (GR) dengan menggunakan NADPH(Cacciatore, 2010).

Pada mekanisme detoksifikasi, GSHbereaksi secara enzimatis dengan berbagai komponen elektrofilik Xenobiotik dalam reaksi katalisis dari *Glutathione-S-Transferase* (GST). Reaksi umum yang terjadi adalah adanya serangan nukleofilik rantai karbon yang tersaturasi, maupun yang tidak tersaturasi ataupun atom karbon aromatik (Cacciatore, 2010). Hasil dari konjugasi GSH-S dimetabolisme oleh enzim yang sama dengan yang digunakan dalam degradasi GSHmenjadi glutamat, yaitu *glycine* dan *cysteine*. Saat *glutamat* dan *glycine* dapat direabsorpsi ke dalam sel, konjugat *cysteine-S* dapat mengalami asetilasi pada grup amino dari residu *cysteinyll* oleh *N-acetyl transferase* intraseluler untuk membentuk asam *mercapturic*. Asam ini

kemudian akan dilepaskan ke dalam sirkulasi dan dikirimkan ke ginjal untuk diekspresikan ke dalam urin atau melalui metabolisme lebih lanjut (Cacchiatore, 2010).

Glutathione tereduksi(GSH)juga memainkan peranan penting dalam transportasi, penyimpanan, dan metabolisme metal (M), serta berperan dalam proses konjugasi metal melalui produksi kompleks via reaksi non enzimatis (Ballator,2009). Fungsi GSH adalah sebagai sumber *cysteine* untuk ikatan metal/logam, dan sebagai reduktan atau kofaktor dalam reaksi redoks yang membutuhkan metal. Grup *sulfhydryl* dari *cysteine*GSH memiliki aktivitas yang tinggi terhadap metal seperti merkuri, perak, cadmium, timbale, seng dan tembaga, membentuk kompleks termodinamis yang stabil yang dapat dieliminasi (Hammond,2001).

Konsentrasi intraseluler GSH dianggap berperan pula dalam hal pengaturan kerentanan sel terhadap NO dan derivatnya (Butterfield,2002). GSH bereaksi dengan NO untuk membentuk *hydroxylamine* dan GSSG. NO bereaksi dengan superoksida untuk membentuk peroksinitrit (ONDOO^-) dan selanjutnya akan bereaksi pula dengan GSH membentuk GSSG. Ketika kadar GSH menurun pada kondisi stres oksidatif, neuron akan menjadi sensitif terhadap NO dan ONOO^- .

Peroksinitrit dapat memicu nitrasi dari residu tyrosine untuk membentuk komponen *3-nitrotyrosine* yang stabil, spesies NO-derivat merupakan kontributor yang signifikan terhadap degenerasi neuron (Cacchiatore, 2010).

Pada akhirnya, GSH akan berfungsi sebagai substrat untuk *formaldehide dehydrogenase* yang dapat mengkonversi formal dehyde dan GSH menjadi *S-formyl*

glutathione. GSH juga berperan dalam system *glyoxalase* dan *glutathionylasi* dari protein (Lu, 2000; Townsend, 2003).

2.5.3. *Glutathione* dan Stres Oksidatif

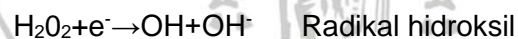
Oksigen merupakan komponen yang sangat penting dalam metabolisme sel, namun pada kondisi yang mengakibatkan konsumsi yang berlebihan terhadap oksigen secara cepat atau kronis dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang seringkali disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS). Produksi dari ROS ini merupakan hasil dari beberapa mekanisme yaitu pada mitokondria dimana radikal bebas dapat terhindar dari enzim pembersih (*scavenging enzyme*) atau terbentuk karena kesalahan proses oksidatif. Mekanisme yang kedua adalah yang terjadi di dalam kapiler endothel dimana terjadi kondisi hipoksia dan reoksigenasi selama olah raga yang intensif ataupun pada beberapa tipe dari penyakit kardiovaskular. Selain itu adanya lonjakan oksidatif dari sel yang mengalami inflamasi yang merupakan hasil dari kerusakan otot atau jaringan karena olah raga atau *exercise* yang berkepanjangan atau eksentrik (Kerksick dan Willoughby, 2005).

Energi metabolisme aerob atau oksidasi fosforilasi merupakan jalur metabolisme dalam sel yang dapat menyediakan energi yang diperlukan dalam kegiatan sehari – hari. Pada kondisi istirahat, proses ini akan berjalan lambat, dan ketika terjadi aktivitas (*exercise*) yang intens maka proses metabolisme akan meningkat hingga 100 kali lipat (Kerksick dan Willoughby, 2005). Di dalam mitokondria, transport elektron berperan dalam berbagai reaksi redoks yang akan menyebabkan sintesa ulang ATP. Pada system ini, O₂ mengalami reduksi oleh

cytochrome-c oksidase yang merupakan komponen akhir dari kompleks enzimatik mitokondria. Pada kondisi ini dapat terjadi reaksi redoks yang tidak berpasangan sehingga akan meningkatkan akumulasi dari radikal bebas di dalam sel. Radikal bebas adalah molekul yang terdiri dari minimal 1 elektron yang tidak berpasangan pada orbit bagian luar.

Radikal superoksida, radikal hidroksil, hidrogen peroksida, nitric oxide, lipid alkohol dan radikal peroksil merupakan ROS yang paling umum yang terdapat di dalam sistem aerobik suatu system (Stipanuk, 2000). Diperkirakan sekitar 2-5% dari oksigen yang melalui transport elektron dalam mitokondria akan menghasilkan superoksida (Sen, 2001).

Berikut adalah langkah terjadinya reduksi dari oksigen yaitu



Superoksida merupakan radikal bebas yang seirngkali diproduksi pada jalur fosforilasi oksidasi alami. Superoksida mengalami dismutase oleh enzim superoksida dismutase intraseluler (contoh *Copper Superoxide Dismutase* (CuSOD)), *Magnesium Superoxide Dismutase* (MgSOD). Enzim – enzim antoksidan ini ada yang berasal dari endothel, plasma maupun jaringan dan seringkali digunakan untuk mengukur jumlah stres oksidatif yang terjadi (Kerksick dan Willoughby, 2005).

Untuk melindungi dari efek ROS yang merugikan, di dalam tubuh terdapat sistem yang kompleks yang terdiri dari antioksidan endogen yang berbentuk enzim seperti *superoxide dismutase*, *catalase*, dan *glutathione peroxidase*.

Pada kondisi normal ROS dapat dikeluarkan dari sel sehingga tidak terjadi kerusakan lebih lanjut, namun pada kondisi – kondisi tertentu system antioksidan endogen tidak dapat menghasilkan produksi ROS yang berlebihan. Kondisi – kondisi tersebut antara lain kurangnya asupan makanan yang mengandung antioksidan, asupan yang berlebihan terhadap pro-oksidan, paparan zat kimia tertentu atau sinar UV, trauma atau *injury*, *exercise* yang terlalu intens.

Peningkatan kadar antioksidan tertentu dalam sirkulasi seperti *glutathione*, *n-acetyl-cysteine*, *α -lipoid acid*, vitamin A, vitamin E, vitamin-C dianggap dapat membantu mencegah akumulasi radikal bebas di dalam sel sehingga menurunkan stres oksidatif (Clarkson, 2000; Sen dan Packer, 2000). GSH secara efektif dapat melawan radikal bebas, ROS maupun RNS (nitrogen species, seperti radikal hidroksil, radikal lipid peroksit, anion superoksida, dan hydrogen peroksida) secara langsung maupun tidak langsung melalui suatu reaksi enzimatik.

Struktur kimia dari GSH menentukan fungsinya dan distribusinya yang luas diantara seluruh organisme menunjukkan peran pentingnya terhadap proses biologis (Aquilano, 2014, Johnson, 2012). GSH penting dalam hal fungsi antioksidannya untuk secara langsung melawan radikal bebas. Reduksi suatu elektron dengan radikal secara kimia tidak menguntungkan karena hal tersebut akan membentuk radikal *thiyl* GS yang tidak stabil. Secara kinetik, reaksi yang terjadi adalah mengeluarkan GS melalui reaksi yang menyertai *anion thiolate* (GS^-) dan oksigen.

Reaksi pertama akan membentuk GSSG dimana adanya oksigen akan membentuk GSSG dan superoksida (O_2^-). Rantai reaksi radikal ini akan dihambat oleh enzim antioksidan yaitu *Superoxide Dismutase* (SOD) yang berhubungan dengan katalase atau GPX yang menentukan perlawanan terhadap radikal bebas secara komplit (Aquilano, 2014).

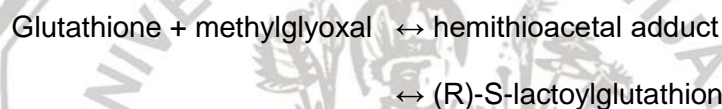
Glutathione tereduksi(GSH)tidak bereaksi langsung secara non enzimatik dengan hidroperoksida. GSH berfungsi sebagai ko substrat untuk *selenium-dependent-GPX* diketahui sebagai mekanisme yang paling penting dalam reduksi H_2O_2 dan *lipid hydroperoxides*. Saat ini juga ditemukan famili protein yang disebut *peroxiredoxin* yang dapat mengkatalisa reduksi H_2O_2 oleh GSH atau thiol lainnya, dengan *cysteine* dengan bentuk *thiolate* dan pada bagian aktifnya (Aquilano, 2014).

Glutathione tereduksi(GSH)juga berfungsi sebagai antioksidan dalam detoksifikasi produk yang terbentuk dari oksidasi lemak yang dipicu oleh ROS seperti *malonyl dialdehyde* dan *4-hydroxy-2-honenal* dan kemungkinan produk ROS lainnya yang berinteraksi dengan komponen seluler. Radikal *thiyl* yang terbentuk dari reaksi ini dapat bergabung dengan molekul lain dan membentuk GSSG. GSH juga dapat berkonjugasi dengan banyak komponen elektrofilik ketika elektrofil menjadi reaktif melalui aksi dari GST (Strange, 2000; Aquilano, 2014). Beberapa metabolit toksik yang diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme normal juga dapat bereaksi dengan GSH, sebagai contohnya adalah *methylglyoxal*, produk enzimatik, maupun non enzimatik yang didapatkan dari jalur glikolitik (Martins, 2001; Inagi, 2010).

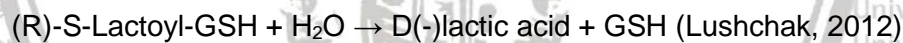
Methylglyoxal dan α -dicARBonyl lain juga diketahui berperan dalam pembentukan ROS. GSH berfungsi sebagai kofaktor dalam eliminasi *methylglyoxal* yang terdiri dari dua enzim *glyoxalase* (Yadav, 2008; Inagi, 2010; Lushchak, 2012).

Pemberian GSH yang merupakan antioksidan diharapkan dapat menurunkan produksi ROS untuk mengurangi stres oksidatif dan stres retikulum endoplasma.

GSH juga berfungsi sebagai kofaktor dalam eliminasi *methylglyoxal* (AGEs) dengan menggunakan dua enzim *glyoxalase* yaitu *glyoxalase I* dan *glyoxalase II* dengan reaksi sebagai berikut:



Enzim ke dua adalah, *glyoxalase II* (Glo II, EC 3.1.2.6), mengkatalisa hidrolisis kedua produk di atas dengan reaksi sebagai berikut:



Fungsi lain dari GSH yaitu mempertahankan status *thiol* yang esensial dari residu *cystein* dalam protein, penyimpanan cadangan *cysteine*, berperan dalam metabolisme *estrogen*, *leukotrien*, dan *prostaglandin*, partisipasidalam produksi deoxy-ribonucleotides, berperan dalam maturasi kelompok *iron-sulfurprotein*, serta sebagai sinyal transduksi dari lingkungan yang berguna dalam transkripsi seluler (Dickinson dan Forman, 2002).

2.5.4. *Glutathione Tereeduksi* pada Lensa

Glutathione tereeduksi(GSH) merupakan tripeptida anion yang merupakan antioksidan dan yang penting di dalam lensa dan berfungsi untuk mempertahankan protein thiol tetap dalam keadaan tereeduksi (Lou, 2003; Truscott, 2005). Kadar GSH tinggi pada epitel maupun korteks lensa bagian luar dan disintesa dari asam amino *cysteine*, *glutamate*, serta *glycine* oleh *g-glutamy L cysteine synthetase* dan *glutathione synthetase*. Di bagian lingkungan luar sel serat lensa dipertahankan dengan cara regenerasi GSH dan GSSG oleh enzim *glutathione reductase* dengan menggunakan NADPH yang diproduksi melalui jalur hexokinase sebagai kofaktornya (Lou, 2003, Truscott, 2005). Kadar GSH adalah 80-90% lebih rendah di dalam nucleus lensa, begitu pula dengan aktivitas enzim yang terkait sintesis dan regenerasi GSH. Perbedaan kadar GSH ini akan semakin nyata dengan bertambahnya usia. Karena penuaan, terjadi reduksi kadar GSH di dalam nukleus dan menyebabkan peningkatan GSSG sehingga terjadi oksidasi dari residu protein *cysteine* dan *methionine* dan pembentukan protein *mixed disulfides* (PSSG) sehingga lensa akan kehilangan kejernihannya (Lou, 2003; Truscott, 2005).

Belum diketahui dengan pasti bagaimana cara GSH ditransportasikan ke dalam nukleus, namun menurut salah satu review, GSH ditransportasikan melalui jalur ekstraseluler yang diatur oleh mikro sirkulasi pada lensa (Donaldson, 2010).

Menurut studi yang didapatkan bahwa di dalam semua lensa vertebrata terdapat arus sirkulasi ionik yang masuk melalui polus lensa dan keluar pada daerah ekuator lensa (Donaldson, 2010). Arus sirkulasi internal ini didapatkan ion sodium memasuki lensa sepanjang ruangan ekstraseluler antar sel. Setelah melewati

membran sel serat lensa pada daerah inferior selanjutnya akan mengalir dari sel ke sel menuju permukaan melalui jalur *gap junction*. Tingginya konsentrasi dari saluran *gap junction* pada daerah ekuator akan menyebabkan arus intraseluler menuju langsung ke permukaan sel dimana pompa Na^+/K^+ yang berlokasi di dalam sel epitel akan mengeluarkan dari Na^+ lensa (Cacciatore, 2010). Glukosa dan nutrisi lain yang berada pada ruangan ekstraseluler di sekeliling sel serat lensa, akan diangkut oleh transporter untuk dikirimkan kedalam serat lensa.

Antioksidan seperti GSH(dan asam askorbat) diduga juga dikirimkan ke dalam inti lensa dengan cara yang hampir sama, meskipun belum ada transporter GSHspesifik pada nucleus yang telah diidentifikasi hingga saat ini (Donaldson, 2010). Belum diketahui pula apakah peningkatan usia mempengaruhi kemampuan sistem sirkulasi ini untuk mengirimkan antioksidan yang cukup (Srinivas,2014).

Penelitian lain menyatakan bahwa transport GSH kedalam nukleus terjadi dengan cara difusi metabolit dari korteks terluar melalui *gap junction* (Kisic, 2012). Hambatan terhadap difusi dari GSHdari tepi menuju tengah diketahui semakin meningkat dengan usai, sehingga terjadi penurunan pengiriman GSHke dalam nukleus lensa (Kisic, 2012).

Difusi GSHmelalui *gap junction* dapat terjadi oleh adanya konsentrasi gradient yang besar dari korteks bagian luar menuju nukleus. Faktor lain yang menyebabkan difusi GSHkedalam lensa adalah potensial membran resting (*resting potential membrane*) dari sel serat lensa di dalam lensa lebih positif jika dibandingkan dengan sel yang berada pada korteks.

Penelitian oleh Srinivas (*unpublished*) menggunakan metode elektrofisiologik mengindikasikan bahwa *gap junction* di dalam sel serat lensa yang dibentuk oleh dua *isoform connexin*, CX46 dan CX5 ternyata permeabel terhadap anion besar termasuk GSH(PNa:PGSH~ 12:1), sehingga kemungkinan kontribusi jalur intraseluler ini cukup signifikan.

Masih diperlukan studi lebih lanjut terhadap transport GSH ini jika connexin dihilangkan ataupun dengan pemberian inhibitor pompa Na^+/K^+ . Penelitian lain menunjukkan pada MRNAi lensa sapi yang diinjeksi oleh oocyte menunjukkan adanya proses transport GSH dan transkrip dari salah satu GSH transporter hepar yang di cloning (RcGSHT) ternyata terdapat pada lensa sapi, tikus atau babi guinea. RcGSHT merupakan transporter dengan sifat tidak tergantung Na, afinitas rendah, dengan fungsi utama yaitu mengeluarkan GSH dari sel serat lensa bagian dalam melalui ruangan intraseluler.

Perfusi pembuluh darah secara *in vivo* menunjukkan terjadinya penyerapan (*uptake*) yang cepat dan signifikan dari turunan GSH plasma oleh epitel lensa anterior, sehingga diduga bahwa GSH di dalam sirkulasi juga merupakan sumber dari GSH epitel. Sintesis GSH *de novo* terjadi pada daerah epitel dan bagian luar korteks lensa, dan juga diduga bahwa lensa juga GSH dari jaringan sekitarnya seperti humor aqueous ataupun mengambil vimeaus (Fan, 2017). Transport GSH di dalam model perfusi vaskular mata memiliki afinitas yang tinggi dan dihambat oleh *Bromosulfophthalein*-GSH (BSP-GSH). Dengan adanya hal tersebut menunjukkan kemungkinan adanya sistem transport yang lain dengan afinitas yang tinggi dan

diduga berlokasi pada polus basolateral dari epitel dan berfungsi untuk mengumpulkan GSH dari humor *aqueous*.

Pada penelitian Kannan ditemukan bahwa hilangnya Natrium pada medium yang diinkubasi menyebabkan penurunan pengambilan (*uptake*) GSH pada epitel lensa sehingga dianggap bahwa Na^+/GSH co transporter juga berfungsi pada daerah epitel. Ditemukan pula protein RcGSHT pada fraksi epitel lensa dengan kadar yang lebih rendah daripada pada korteks, namun lokasi pasti GSH transporter dan regulasinya pada lensa masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Diduga kotransporter Na^+/GSH berlokasi di bagian basolateral epitel lensa dan RcGSHT pada polus apikal epitel serta pada membran dalam dan luar korteks, sehingga RcGSHT mendistribusikan GSH dari epitel menuju ke daerah dengan metabolisme yang lebih rendah melalui jalur seluler – paraseluler.

2.5.4.1. *Glutathione* pada Lensa serta Peran dalam Terjadinya Katarak

Glutathione tereduksi (GSH) merupakan antioksidan utama di dalam lensa yang dapat membantu menurunkan protein, serta mengandung rantai residu *sulfhydryl* (-SH) yang dapat membantu melindungi lensa melawan oksidan. GSH secara langsung dapat melawan ROS atau melalui reaksi enzimatik dengan bantuan dua enzim antioksidan utama yaitu *Glutathione Peroxidase* (GPX) dan *Glutathione S-Transferase* (GST) (Kisic, 2012).

Beberapa enzim seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* (CAT) dan GPX dapat mengatur ROS dan mencegah kerusakan seluler serta menginisiasi peroksidasi lipid. Sintesa ulang GSH dari bentuk teroksidasi dikatalisa oleh enzim

glutathione reductase, dimana $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ yang diperlukan diproduksi dalam jalur Pentosa karbohidrat (Linetsky, 2003). *Glutathione Reductase* (GR) adalah enzim yang mengontrol siklus glutathione redox dengan cara mempertahankan kadar GSH intraseluler yang dapat mempengaruhi transport kation, hidrasi lensa, grup sulfhydryl protein, dan integritas membrane (Kisic, 2012).

Glutathione tereduksi (GSH) memiliki kemampuan dalam reaksi katalisa dari konjugasi glutathione tereduksi dengan elektrolit endogen isoenzim GSH kelas μ dan π terekspresi dalam lensa manusia dengan kelas π yang paling dominan. Aktivitas GST yang tertinggi terjadi pada bagian korteks perifer dan ekuator dan yang terendah adalah pada nukleus. *Glutathione peroksidase* merupakan enzim yang mengkatalisa reduksi dari hidrogen peroksida, *organic hydroperoxide 2* dan *phospholipid hydroperoxide* menggunakan GSH sebagai donor hidrogen. *Superoxide Dismutase* (SOD) mengkatalisa reaksi dismutasi dari radikal anion superoksida (O_2^-) dengan donor hidrogen menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen.

Glutathione tereduksi (GSH) dan *sulfhydryl* penting untuk melindungi grup thiol (-SH) dari kalsin dan mencegah pembentukan agregat yang akan menurunkan kejernihan lensa (Ganea, 2006). *Glutathione teroksidasi* (GSSG) akan direduksi kembali menjadi GSH oleh *NADPH-dependent glutathione reductase* dimana pada kondisi fisiologis akan mempertahankan rasio GSH/GSSG tetap tinggi di dalam lensa dan jaringan mata lainnya (Kisic, 2012).

Stres oksidatif yang salah satunya disebabkan oleh akumulasi produk lipid peroksidase selama proses terjadinya katarak akan menyebabkan konsumsi GSH dan gangguan keseimbangan redoks dalam lensa. Selain karena konsumsi yang

berlebihan, penurunan sintesis GSH juga menyebabkan GSH dalam sel menurun.

Penurunan sintesis ini dapat disebabkan karena defisiensi substrat dan penurunan aktivitas enzim yang diperlukan dalam proses sintesis (*γ-glutamyl-cysteine-synthetase*). Penelitian oleh Li menunjukkan bahwa terdapat penurunan faktor antioksidatif pada lensa yang mengalami katarak melalui percobaan pada tikus yang di injeksi buthionine-sulphoximine yang merupakan inhibitor dari sintesa glutathione tereduksi (Li, 2002; Kusic, 2012).

Tabel 2.3. Percobaan pada Katarak Kortikonuclear dan Matur. Didapatkan aktivitas enzim GR, GPx, dan GST lebih rendah jika dibandingkan katarak insipien ($p < 0.001$) (Li, 2002).

Cataract incipient (type)	PS (n=23)	NP (n=9)	CN (n=9)
GSH	2.99 ± 0.90	2.16 ± 0.55†	1.81 ± 0.42*
GPx	4.58 ± 0.70	2.17 ± 0.53*	1.64 ± 0.17*
GR	4.03 ± 0.66	1.91 ± 0.73*	1.61 ± 0.27*
GST	3.31 ± 0.60	1.61 ± 0.75*	1.14 ± 0.29*
SOD	5.77 ± 1.25	2.34 ± 0.59*	1.71 ± 0.58*

Data is presented as means ± SD * $p < 0.001$, † $p < 0.01$.
GSH (μmol/g weight of lens), GPx, GR, GST (U/g protein), SOD (kU/g protein)

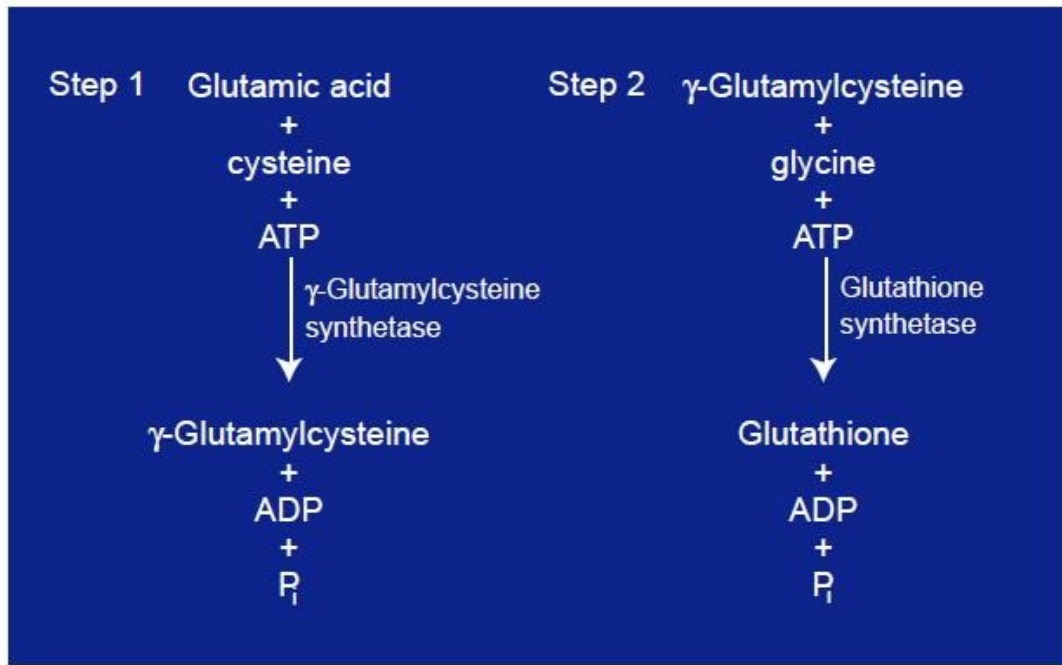
Peneliti lain menunjukkan juga penurunan kadar glutathione tereduksi pada lensa yang mengalami katarak (Zoric, 2008). Perubahan ini dapat terjadi karena proses oksidatif atau peningkatan pembentukan produk toksik.

Alasan terjadinya konsumsi GSH selama stres oksidatif adalah karena konversi menjadi bentuk teroksidasi yang dapat berkonjugasi dengan grup thiol dari protein untuk membentuk disulfide campuran (*mixed disulfides* PSSG) melalui proses yang disebut protein *S-thiolation* (Lou, 2000).

Penelitian oleh Huang terhadap aktivitas GSH pada sel epitel lensa yang mengalami katarak yang dioperasi menunjukkan bahwa terjadi hilangnya aktivitas *glutathione-s-transferase* secara total pada katarak kortikal nuklear. Aktivitas *glutathione reductase* lebih tinggi pada lensa dengan katarak insipien dibandingkan lensa dengan katarak matur. Hal yang sama juga ditemukan pada penelitian yang membandingkan aktivitas GR pada lensa katarak dan lensa pada subyek dengan usia tua (Yan, 2007). *Glutathione* reduktase memainkan peranan penting dalam mempertahankan grup thiol (-SH) dalam lensa dan hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa enzim tersebut mempunyai peran dalam mempertahankan kejernihan lensa. Aktivitas GR yang rendah dibandingkan aktivitas normal dapat menjadi salah satu penyebab terjadi kekeruhan lensa. Selain itu tinggi kerentanan GR terhadap modifikasi post translasi juga memainkan peranan penting terhadap terjadinya disfungsi GPX dan GST dalam kondisi stres oksidatif (Linetsky, 2003).

Sangat penting untuk mempelajari peran glutathione tereduksi dan enzim kofaktor dalam metabolisme lensa sehingga dapat diketahui mekanisme terjadinya katarak dan pencegahannya secara nutrisi. Studi *in vitro* dari lensa hewan coba ataupun manusia yang diinkubasi dapat membantu untuk mengetahui proses yang terjadi. Lensa mata adalah organ yang avaskuler sehingga kebutuhan nutrisi atau substansi lain aktif untuk proses metabolisme bergantung pada difusi pasif, transport aktif dan sintesa intralens, sehingga kandungan humor *aqueous* sangat memegang peranan penting dalam ketersediaan nutrient maupun subtract untuk metabolisme lensa. Ketika kadar GSH di dalam lensa tinggi, kadar di dalam humor *aqueous* rendah, sehingga kemungkinan bahwa glutathione disintesa di dalam lensa.

Glutathione terdiri dari asam amino cysteine, asam glutamate, dan glisine, sedangkan sintesanya di dalam lensa melalui dua langkah seperti pada gambar berikut (Gambar 2.25).



Gambar 2.25. Sintesa Glutathion di dalam Lensa. Glutathion dibentuk oleh asam amino cystein, *glutamic acid*, dan *glycine*. Sintesa GSH di dalam lensa terbagi menjadi 2 langkah seperti pada gambar (Kathleen,2001).

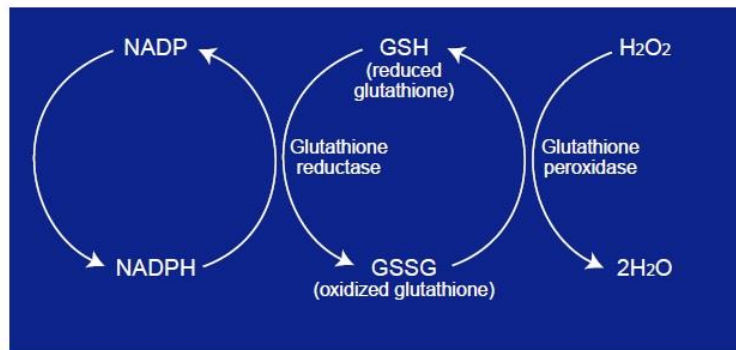
Pada lensa dengan katarak akan terjadi penurunan kadar GSH yang sangat drastis, hingga 81% dibanding pada lensa normal (Kathleen,2001). Penurunan GSH ini lebih disebabkan oleh penurunan sintesisnya akibat penurunan enzim yang berperan dalam sintesis (*γ -glutamyl transferase*) dan enzim daur ulang GSH dari *glutathione* yang teroksidasi (GSSG) yaitu enzim *glutathione reductase*, sehingga

timbul suatu teori bahwa sintesa GSH menurun pada kondisi lensa yang katarak (Kathleen, 2001).

Glutathione dianggap dapat mencegah terjadinya katarak melalui beberapa mekanisme, yaitu GSH dapat mempertahankan grup *Sulfhydryl* (SH) pada protein dalam bentuk reduksi sehingga dapat terhindar dari *disulfide cross-link* yang melindungi grup SH pada protein yang penting untuk transport aktif dan permeabilitas membran, mencegah kerusakan oksidatif dari hidrogen peroksida (H_2O_2). Ketika kadar GSH turun hingga level yang kritis, maka akan terjadi oksidasi pada grup SH protein sehingga akan terbentuk formasi ikatan disulfide dan protein HMW (*High Molecular Weight*) ini akan menyebabkan protein mengalami agregasi sehingga terjadi kekeruhan dalam lensa.

Glutathione juga berfungsi dalam mempertahankan permeabilitas lensa normal dan transport aktif kation dengan cara melindungi grup SH di dalam membran sel dari proses oksidasi. Jika terjadi oksidasi grup SH di permukaan membra sel akan dapat meningkatkan permeabilitas dan oksidasi grup SH dari Na^+/K^+ ATPase akan mempengaruhi transport aktif. Penurunan GSH dapat menyebabkan kerentanan pompa Na^+/K^+ terhadap kerusakan karena H_2O_2 oksidatif meningkat. Oksidasi GSH menyebabkan penurunan transport aktif sebesar 70% dan peningkatan permeabilitas membran dua kali lipat.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) ditemukan dalam humor *aqueous* pada manusia dan GSH terlibat dalam proses detoksifikasi ROS tersebut menjadi air melalui reaksi berpasangan yang menggunakan NADPH2.



Gambar 2.26. Metabolisme Hidrogen Peroksida oleh Glutathione. H₂O₂ ditemukan pada humor *aqueous* dan GSH berperan dalam detoksifikasi ROS ini menjadi air melalui reaksi berpasangan yang menggunakan NADPH(Kathleen, 2001).

Tanpa adanya proses detoksifikasi radikal peroksida, maka akan terjadi kerusakan membran lensa dan grup protein tertentu yang rentan terhadap ROS. GSH secara normal disintesa dan mengalami regenerasi pada korteks lensa dan akan berdifusi pada area sekitarnya. Penelitian pada subyek usia tua dengan lensa mata normal, secara *in vitro* ternyata ditemukan hambatan difusi GSH dari korteks ke dalam nukleus, dan hal ini diduga menyebabkan terjadinya katarak nuklearis.

Penelitian oleh Pandya (2014) menemukan bahwa pada lensa dengan katarak terdapat penurunan *glutathione s-transferase* sebesar 69,38% disbanding lesa normal, begitu pula dengan ezim *γ-glutamyl transpeptirase*, terjadi penurunan aktivitas enzim ini sebesar 61.43% pada lensa yang mengalami katarak. *γ-glutamyl transpeptirase* bereaksi secara efektif dengan *glutathione-s-transferase* dan semua enzim yang terlibat dalam siklus GSH. Aktivitas *γ-glutamyl transpeptirase* sangat rendah jika dibandingkan *glutathione reductase* dan *glutathione-s-transferase*.

Oksidasi GSH oleh γ -glutamyl transpeptidase didahului oleh transport asam amino melalui membran dengan enzim yang sama. Mekanisme ini sangat efektif di dalam lensa karena dapat menyebabkan penggantian (*turn over*) GSH dengan cepat dan dapat membantu transport asam amino di dalam jaringan. Semakin meningkatnya usia akan terjadi penurunan aktivitas *r-Glutamyl-Cysteine Synthetase* (r-GCS), kadar GSH akan menurun secara cepat di dalam lensa. Karena GSH merupakan substrat untuk γ -glutamyl transpeptidase maka penurunannya akan menghambat mekanisme *feed back* sehingga akan menyebabkan penurunan aktivitasnya (Pandya, 2014).

GSH maupun aktivitas enzim metabolisme dapat mempengaruhi satu sama lain, sehingga perubahan terhadap GSH maupun enzim – enzim tersebut merupakan kunci utamanya katarak (Pandya, 2014).

Glutathione reductase juga mengalami penurunan pada lensa yang mengalami katarak sebesar 50.1% dibanding lensa normal, hal ini sama dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Rao beberapa decade sebelumnya.

Penurunan aktivitas *glutathione reductase* akan menyebabkan penurunan konsentrasi GSH karena akan terjadi penurunan kapasitas untuk meregenerasi GSH dari GSSG. Penurunan *glutathione reductase* juga akan mempengaruhi protein karena penurunan kadar GSH akan menyebabkan gangguan pemeliharaan grup *protein-SH*. *glutathione reductase* tetap dalam bentuk tereduksi sehingga menyebabkan peningkatan ikatan disulfida atau peningkatan ikatan *protein-GSH disulfida* dan akhirnya terjadi agregasi *glutathione reductase* pada protein – protein ini (Pandya, 2014). Penurunan aktivitas *glutathione reductase* dapat mempengaruhi 2 unsur utama dalam lensa yaitu protein dan GSH sehingga terjadi

akumulasi GSSG, dan H₂O₂ yang toksik pada lensa karena merupakan substansi oksidatif yang kuat.

Tabel 2.4. GR (glutathione reductase), GST (Glutathione S-transferase, dan GTP (glutamyl trans peptidase) pada Lensa Manusia Normal Menurut Usia yang berbeda (Pandya, 2012).

Age (years)	GR (n moles/ min/mg)	GST (n moles/ min/mg)	GTP (n moles/min/ mg)
41-50(5)	1.620±0.091(5)	2.1703±0.083(3)	9.9121±0.11(6)
51-60(5)	1.339±0.071(4)	1.6398±0.064(4)	11.1342±0.09(4)
61-70(4)	1.521±0.084(5)	1.7906±0.069(4)	11.0781±0.14(4)
71-80(5)	1.519±0.047(4)	1.7781±0.058(5)	8.6237±0.18(3)
81-90(4)	1.316±0.079(4)	1.5240±0.071(5)	7.2311±0.09(5)

All values are expressed as mean ± S.E.
 Numbers in the parenthesis are sample sizes.
 P-value * < 0.01

Tabel 2.5. Aktivitas GR, GST, dan GTP pada Lensa Manusia Normal dan Katarak (Pandya, 2012).

Type	GR (n moles/min/mg)	GST (n moles/ min/mg)	GTP (n moles/min/mg)
Normal 54±11Yrs (n = 22)	1.463 ± 0.079	1.780±0.069 (N=20)	9.595±0.094 (N=22)
Cataractous 58±14yrs (n=42)	0.730±0.062	0.545±0.342 (N=45)	3.70±0.216 (N=39)

All values are expressed as mean ± S.E.
 Numbers in the parenthesis are sample sizes (n).
 For all p-value < 0.01

2.5.4.2. Glutathione pada Katarak Diabetika

Stres oksidatif dianggap sebagai penyebab utama terjadinya komplikasi dan progresivitas penyakit pada diabetes. Stres oksidatif kronis yang didapatkan dari jalur



polyol dianggap memainkan peranan penting dalam progresivitas katarak diabetik (Chandrasena,2006). Pada kondisi diabetes, 30% glukosa akan di metabolisme oleh jalur polyol sedangkan pada lensa normal hanya 5% glukosa yang memasuki jalur polyol. Aktivitas yang berlebihan dari *aldosa reduktase* akan menurunkan kofaktor NADPH yang penting dalam regenerasi glutathione tereduksi dengan menggunakan enzim glutathione reduktase, sehingga akan terjadi penurunan dari glutathione tereduksi. *Aldosa reduktase* dan glutathione reduksi saling bersaing untuk menggunakan NADPH dan pada kurangnya kuatitas NADPH akan berakibat pada kapasitas antioksidan seluler. Olofsson, Marklund dan Behndig (2009) menemukan kadar glutathione yang rendah pada lensa tikus dengan diabetes dibandingkan dengan kontrol non diabetes. Mereka berpendapat bahwa penurunan ini kemungkinan tidak hanya disebabkan oleh penggunaan glutathione tetapi juga dapat karena penurunan sintesis glutathione tereduksi karena kadar ATP yang rendah pada kondisi diabetes. Glutathione sangat penting dalam pengaturan status redoks di dalam sel. Pada kondisi normal, glutathione akan berikatan dengan residu sistein dari protein lensa dan mencegah pembentukan ikatan disulfide. Pada kondisi glutathione yang rendah, ikatan disulfida akan menyebabkan terjadinya *cROSS linking* dan agregasi. Sebagai reduktan yang penting di dalam sel, NADPH sangat diperlukan dalam konsentrasi yang cukup untuk menjaga keseimbangan oksidatif. NADPH merupakan produk dari jalur HMP dimana *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* (G6PD) merupakan enzim yang terbatas, sehingga penurunan aktivitas G6PD dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif karena adanya penurunan produksi NADPH dalam sistem antioksidan (Xu, 2010).

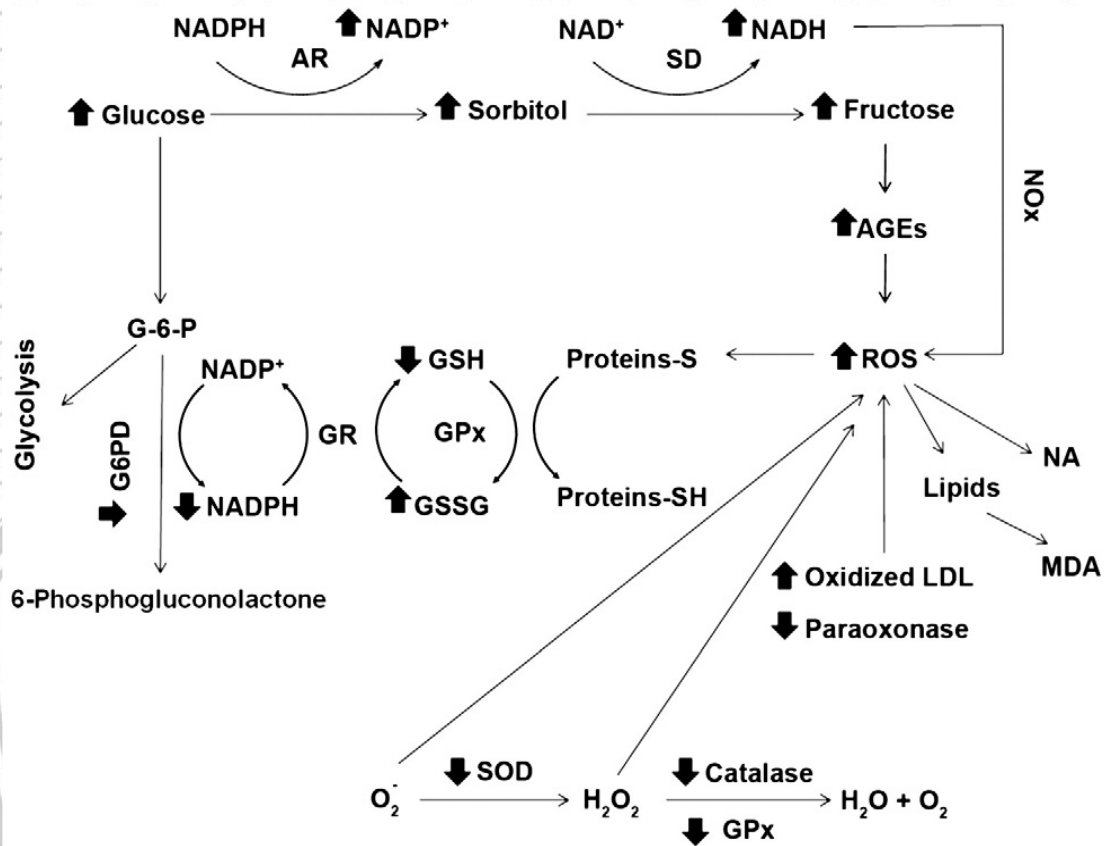
Ketidakseimbangan proses glikometabolik juga merupakan faktor penting katarak pada diabetes. Efek yang merugikan dari ROS di netralisir di dalam lensa oleh antioksidan seperti asam askorbat, vitamin E, sistem glutathione, superoksida dismutase, dan katalase. Ketika aktivitas superoksida dismutase, katalase dan GSH-Px menurun di dalam darah maupun jaringan pada pasien dengan diabetes, kadar ROS seperti radikal superoksida anion akan meningkat (Ozmen, 2002). Perubahan ini menunjukkan bahwa radikal bebas dan antioksidan memainkan peran penting dalam patogenesis terjadinya katarak diabetika. Selama proses perkembangan katarak senilis aktivitas enzim antioksidan (*superoksida dismutase*, GSH-Px) dan non enzim (*askorbat, cysteine, GSH*) menurun pada lensa subyek dengan usia tua (Emre, 2008). Salah satu konsekuensi dari hiperglikemia adalah terjadinya glikasi dari protein termasuk protein kristalin di dalam lensa yang merupakan modifikasi posttranslasi yang sangat penting dan menyebabkan agregasi, cROSS *linking* dan insolubilisasi.

Pada kondisi katarak diabetika, glukosa pada lensa, protein yang terglikasi dan lipid peroksida meningkat jika dibandingkan pada katarak senilis. Penurunan SOD dan katalase juga lebih jelas pada lensa dengan katarak diabetika dibandingkan katarak senilis, dan penurunan SOD dan katalase juga lebih jelas pada lensa dengan katarak diabetika dibanding katarak senilis (Emre, 2008).

Inaktivasi dari enzim – enzim ini akan menyebabkan peningkatan kadar H_2O_2 di dalam lensa, dan dapat menyebabkan terjadinya modifikasi oksidatif pada protein lensa. *Advance Glycation End Products* (AGEs) terakumulasi di dalam lingkungan intraseluler dan ekstraseluler pada struktur mata dan berhubungan

dengan terjadinya katarak diabetika (Emre, 2008). Penelitian oleh Blakytny et al menunjukkan bahwa glikasi dengan kadar gula yang berbeda – beda mengubah aktivitas *glutathione reductase* sesuai dengan waktu (*time dependent*) dan hilangnya aktivitas enzim hingga lebih dari setengah setelah 5 hari diinkubasi dengan glukosa dengan konsentrasi rendah (5mM) dan akan terjadi penurunan aktivitas ezim hingga 80% setelah 15 hari. GSH dapat mencegah glikasi dan berperan dalam reaksi Maillard sebagai agen anti glikasi. Dengan adanya GSH pada media glikasi yang dilihat secara *in vitro* terjadi hambatan pembentukan protein – protein cross linking yang dimediasi gula.

Dalam gambar berikut dapat diketahui beberapa proses yang berkaitan dengan terjadinya katarak diabetika, yaitu peningkatan aktivitas *aldosa reduktase* yang berlebihan akan menyebabkan akumulasi dari polyol dan diikuti oleh kerusakan osmotik pada lensa, terjadinya pembengkakan osmotik dan kerusakan sel. Peningkatan aktivitas dari G6PD juga memainkan peranan dalam kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh kondisi hiperglikemia. Stres osmotik juga merupakan faktor penyebab kerusakan oksidatif pada lensa dengan diabetes karena produksi radikal bebas oksigen dan inaktivasi dari enzim antioksidan karena pembentukan AGEs pada proses glikasi.



Gambar 2.27 Jalur Polyol, Sistem Antioksidan dan G6PD Coupling. Panah tebal mengindikasikan prediksi yang terjadi pada kondisi hiperglikemia. AR : Aldose Reductase; SD, Sorbitol Dehydrogenase; G6PD, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase; GSH, reduced Glutathione; GSSG, oxidized Glutathione; GPx, Glutathione Peroxidase; GR, Glutathione Reductase; AGEs, Advanced Glycation End Products; SOD, Superoxide Dismutase; Protein-S, Oxidized Proteins; Protein-SH, Reduced Proteins; NOx, NADH Oxidase; MDA, Malondialdehyde; ROS, Reactive Oxygen Species.

2.5.4.3. Glutathione Transporter

Di dalam lensa, kadar GSH dipertahankan dengan melalui sintesis de novo ataupun pengambilan langsung dari cairan aqueous. GSH disintesa dari asam

amino cystein, glutamate, dan glycine dengan bantuan enzyme γ glutamyl cysteine synthetase dan glutathione synthetase. Di antara jaringan mata, lensa memiliki konsentrasi GSH tertinggi (6-10 mM). Dalam lensa, GSH sintesis secara metabolik terbatas pada epitel dan lapisan korteks, sehingga gradien GSH tertinggi terdapat di dalam epitel bagian tengah dan serat sel korteks, sedangkan terendah di inti lensa. Keseimbangan GSH di dalam lensa diduga karena peran dari GSH di dalam sirkulasi dan masuknya GSH dari luar, misalnya dari humor aqueous ke dalam lensa memerlukan suatu transporter (Umapathy, 2013).

Dalam lensa tikus, prekursor asam amino GSH transporter dilaporkan terlibat dalam penyerapan sistein, glisin, dan glutamat untuk sintesis GSH. Beberapa transporter telah diteliti antara lain transporter pada korteks luar yaitu Xc dan EAAT 4/5 yang bekerjasama untuk pengambilan sistein yang diperlukan dalam sintesis GSH (Lim, 2005). Selain itu, Xc juga bekerjasama dengan *Alanin-Serinecysteine Transporter* (ASCT₂) yang mengangkut glutamate pH rendah sesuai dengan lingkungan di inti lensa yang kondisinya asam. Xc dan ASCT₂ juga dapat bekerjasama untuk mengumpulkan sistein (Lim, 2006). Transporter glisin, GLYT1 dan GLYT2 diteliti terdapat pada sel serat korteks dan inti lensa. Hal ini menunjukkan kemungkinan GLYT2 dapat bertindak sebagai agen antiglikasi untuk melindungi protein di dalam nukleus lensa dari modifikasi yang menyebabkan katarak nuklearis karena usia. Terdapat juga transporter yang lain seperti OAT 3 dan NaDC3 di dalam lensa tikus. NaDC3 berlokasi di dalam sitoplasma dari sel epitel dan sel serat korteks, dan OAT3 banyak terdapat pada permukaan apikal lensa (Li, 2010). Transporter yang berkaitan dengan sintesa GSH tersebut lebih merupakan

transporter untuk bahan sintesis GSH, sedangkan transporter untuk GSH yang sudah disintesa di luar lensa masih belum banyak diketahui, namun untuk transport GSH yang berasal dari liver diduga dibantu oleh GSH-liver transporter.

Penelitian terdahulu tentang GSH transporter dilakukan oleh Kannan dengan cara mengisolasi poly(A)⁺ RNA sapi yang diinjeksikan ke dalam oocyte *Xenopus laevis*. Oocyte tersebut kemudian diinkubasi selama satu jam dalam medium NaCl dan sukrosa yang mengandung pelacak GSH (GSH tracer). Dari hasil tersebut didapatkan adanya GSH efflux pada oocyte yang diinjeksi poly(A)⁺RNA dengan kecepatan 2.6 nmol/oocyte per jam serta ditemukan transkrip untuk RcGSHT (*rat canalicular GSH transporter*) pada RNA lensa sapi. Penelitian tersebut menunjukkan adanya GSH transporter di dalam lensa, sehingga jika dikembangkan penelitian lanjutan untuk pemberian GSH pada sel lensa diharapkan dapat meningkatkan kadar GSH di dalam lensa. Penelitian lanjutan oleh Kannan dilakukan pada sel epitel lensa manusia (Human Lens Epithelial/HLE) dengan cara poly (A)⁺ RNA dari HLE-B3 yang diinjeksikan ke dalam oocyte *X.Laevis* ternyata didapatkan aktivitas transport GSH . Pengambilan GSH ini sebagian tergantung pada natrium dengan menggunakan dua sistem yaitu melalui transport aktif yang bergantung natrium dan transport yang tidak menggunakan natrium dengan melalui *facilitated diffusion*.

Penelitian yang dilakukan oleh Fan mengidentifikasi dan membandingkan GSH transporter pada RNA lensa tikus *wild type*, homozygous LEGSKO (*Lens with Glutathione de Novo Synthesis Deficiency*), dan beberapa lensa mata manusia dengan usia 20-70 tahun, dari hasil tersebut didapatkan bahwa solute transporter gen SLCO4A1 teridentifikasi dari ketiga subyek tersebut. Dan pada mata manusia,

protein SLCO4A1 meningkat lebih tinggi pada lensa subyek dengan usia 60 tahun dibandingkan pada subyek dengan usia 20-30 tahun (Fan, 2013). Penelitian *in vitro* lainnya dilakukan oleh Langford menemukan bahwa aktivitas excitatory amino acid transporter (EAAT 1-5) dan Xc⁻ exchanger sangat penting dalam mempertahankan kadar GSH dan proteksi terhadap stres oksidatif di korteks lensa (Langford, 2015).

Beberapa penelitian tersebut menunjukkan adanya transporter glutathion di dalam lensa, sehingga diharapkan pemberian suplementasi GSH dari luar jaringan lensa dapat membantu meningkatkan kadar GSH di dalam lensa, meskipun penelitian pada manusia sampai saat ini terbatas pada *in vitro*.

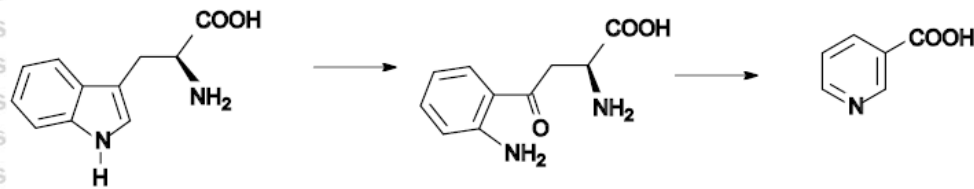
2.6. Niasin (Nicotinic Acid)

2.6.1. Formula dan Bentuk Dasar Niasin

Niasin yang dikenal juga dengan nama nicotic acid dan vitamin B3 adalah suatu bahan organik dengan struktur kimia $C_6H_5NO_2$. Niasin adalah derivatif dari pyridine, tidak berwarna dan larut air dengan grup karboksil (COOH) pada posisi 3.

Bentuk lain dari vitamin B3 adalah berhubungan dengan amide dan nicotinamide (niacinamide) dengan grup karboksil diganti dengan grup karboksamid (CONH₂) (Cantarella, 2012 dan Keene, 2014). Niasin diperlukan untuk berbagai proses metabolisme seperti respirasi sel, sintesis ATP, karbohidrat, lemak, protein.

Diperlukan 60 mg tryptophan untuk sintesis dari 1 mg niasin yang juga memerlukan adanya vit B6 dan B12 (Kirkland, 2009).



Gambar 2.28. Biosintesis Niasin. Biosintesis Niasi, dari tryptophan menjadi kynurenin dan kemudian menjadi niasin (UMMC,2004).

Niasin tidak dapat secara langsung berubah menjadi nicotinamide, namun keduanya merupakan prekursor dari koenzim *Nicotinamide Adenine Nucleotide* (NAD) dan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADP) in vivo (Cox, 2000). NAD berubah menjadi NADP melalui proses fosforilasi dengan adanya enzim NAD⁺ kinase. NADP dan NAD adalah koenzim dari berbagai proses dehidrogenase dan terlibat pada beberapa proses transfer hydrogen. NAD sangat penting dalam hal katabolisme lemak, karbohidrat, protein, alcohol, dan penting dalam hal sinyaling sel dan perbaikan DNA, sedangkan NADP penting dalam reaksi anabolisme seperti asam lemak dan sintesis kolesterol (Wan, 2011). Niasin yang merupakan prekursor untuk NAD dan NADP juga terlibat dalam proses perbaikan DNA (Kirkland, 2012; Kennedy, 2016).

Kedua asam nikotinat dan nikotinamida digunakan untuk membentuk koenzim NAD dan NADP, yang merupakan kofaktor penting yang ditemukan dalam sel. *Nicotinamida Adenina Dinukleotida* (NAD⁺) dan *Nicotinamida Adenin Dinukleotida Fosfat* (NADP⁺) memainkan peran kunci sebagai pembawa elektron dalam transfer potensial reduksi. NADH adalah bentuk tereduksi NAD⁺, dan NAD⁺ adalah bentuk teroksidasi NADH. Demikian pula, NADPH adalah bentuk tereduksi dari NADP⁺, dan NADP⁺ adalah bentuk teroksidasi dari NADPH.

Banyak enzim memerlukan niasin koenzim NAD dan NADP. Meskipun berbeda dengan hanya gugus fosfat tunggal, NAD dan NADP memiliki fungsi yang berbeda dalam biokimia. NAD (NADH) digunakan secara luas dalam katabolisme karbohidrat, lemak, protein, dan alkohol untuk menghasilkan energi. Oleh karena itu, menonjol dalam glikolisis dan siklus asam sitrat respirasi selular. Dalam kontrak, NADP (NADPH) digunakan dalam reaksi anabolik (biosintesis), seperti sintesis asam nukleat, asam lemak, dan kolesterol. Dalam sintesis NAD⁺, nicotinamide bergabung dengan ribose dan ADP untuk membentuk NAD⁺. Dari NAD⁺, penambahan gugus fosfat ke posisi 2 dari nukleotida adenyl melalui linkage ester membentuk NADP⁺. NAD (dan niasin) juga dapat disintesis di hati dari asam amino triptofan (Hidgon, 2002).

2.6.2. Farmakodinamik Niasin

Efek terapi dari niasin didapatkan melalui aktivasi reseptor protein G yang berpasangan, yaitu reseptor niasin 1 (NIACR1) dan reseptor niasin 2 (NIACR2) yang banyak tereksresi pada jaringan adipose, limpa, sel-sel imun dan keratinosit. (Soga, 2003; Wise, 2003). NIACR1 dan NIACR2 menghambat produksi *cyclic adenosine monophosphate (cAMP)* dan akan menyebabkan pemecahan lemak pada jaringan adipose dan asam lemak bebas akan tersedia bagi hepar untuk memproduksi trigliserida, *Very Low Density Lipoprotein (VLDL)*, dan *Low Density Lipoprotein (LDL)* (Gille, 2008 ; Wanders, 2011).

2.6.3. Niasin dan Katarak

Berdasarkan penelitian dari Blue Mountain Study, didapatkan adanya hubungan antara katarak dengan makro dan mikronutrien, termasuk vitamin antioksidan. Sebanyak 2900 populasi dengan usai 49-97 tahun di Australia menjadi subyek dalam penelitian ini dan didapatkan hasil bahwa asupan niasin yang tinggi dapat menurunkan prevalensi terjadinya katarak nuklearis dengan *odd ratio* 0.6 (95% CI, 0,4-0,9) (Cumming, 2000).

Penelitian yang serupa di China dengan subjek penelitian sebanyak 3249 orang dengan usia 45-74 tahun selama kurun waktu 5-6 tahun juga menunjukkan hasil yang serupa dimana didapatkan prevalensi katarak nuklearis yang lebih rendah pada subjek yang mengkonsumsi riboflavin/niasin dibandingkan dengan yang tidak mengkonsumsinya. Pada kelompok usia 65-74 tahun terjadi penurunan prevalensi sebesar 44% terhadap munculnya katarak nuklearis. Pada kelompok dengan katarak subkapsularis posterior meskipun hanya sedikit populasi yang diteliti, namun juga didapatkan penurunan prevalensi yang cukup signifikan.

Penelitian epidemiologi oleh Weikel sejak tahun 2007 dengan menganalisis lebih dari 12.000 subjek menunjukkan bahwa asupan setidaknya 2 µg riboflavin dapat membantu mengurangi risiko katarak kortikal dan nuklear, terutama pada populasi yang kekurangan gizi. Secara umum, kadar tiamin dan niacin yang tinggi terkait dengan risiko rendah terjadinya katarak (Weike, 2014).

2.6.4. Niasin dan Pentosephosphate Pathway

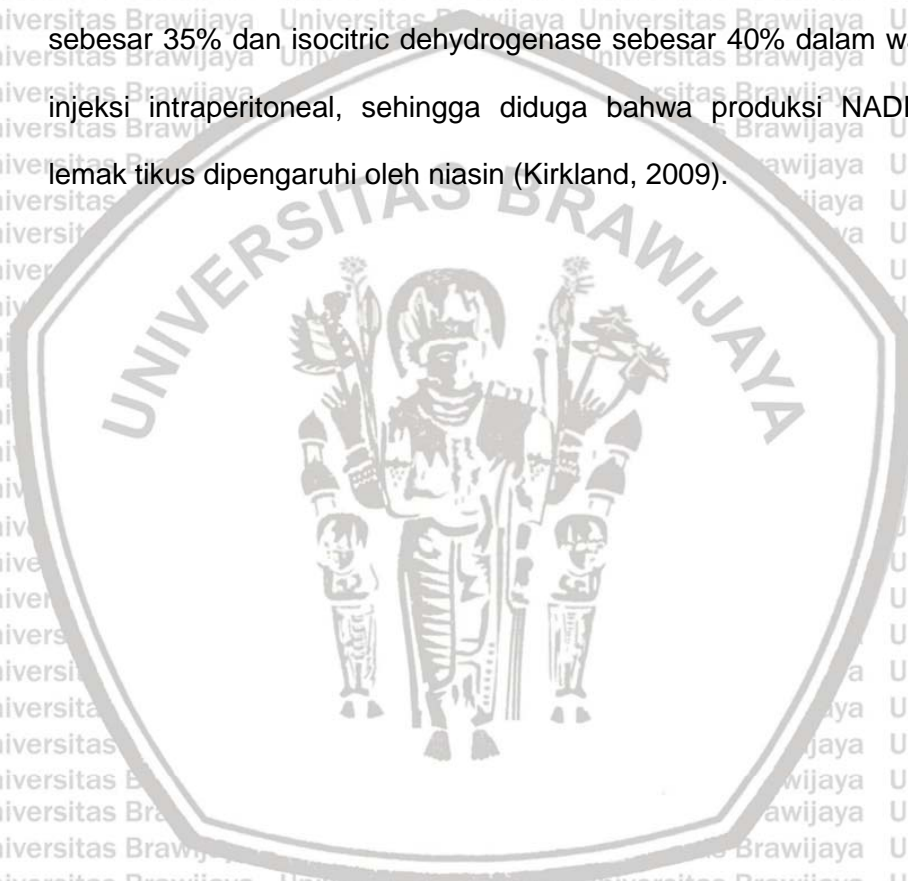
Nicotinic Acid (nicotinamide) adalah bagian dari struktur kimia dari koenzim NAD dan NADP. Enzim-enzim yang memerlukan NAD/NADP terlibat dalam proses reaksi oksidasi, reduksi pada produksi energi, metabolisme kolesterol, oksidasi asam lemak, degradasi glukosa dan *pentose phosphate pathway*, sintesis asam amino dan degradasinya, perlawanan terhadap bakteri patogen (produksi ROS yang bergantung pada NADPH dan regenerasi GSH dari GSSG), sintesis glukokortikoid serta hormone seks (Kirkland, 2009).

NAD mempunyai kegunaan sebagai substrat dari beberapa reaksi ADP-ribosylation seperti mono dan poly ADP ribosylation dari protein atau enzim, pembentukan cyclic ADP-ribose dan pembentukan O-acetyl ADP ribose pada reaksi deasetilasi. Ribosilasi umumnya memerlukan residu arginin, sistein, dan glutamine pada protein. Reaksi non redoks ini sangat penting dalam regulasi metabolisme seluler dan sangat sensitive terhadap status asupan niasin. Komponen seluler yang secara langsung diregulasi melalui reaksi ADP-ribosylation adalah chromatin. Perubahan fungsi chromatin yang disebabkan oleh status niasin yang rendah dapat menyebabkan perubahan stabilitas genomik, divisi sel, diferensiasi dan apoptosis (Kirkland, 2009).

Salah satu studi oleh Pyzhik mempelajari tentang efek defisiensi niasin dan nicotinamide eksogen (500 mg/kg) terhadap aktivitas dari enzim utama dalam *pentosephosphate pathway* dan NAO dependet malate serta isocitric dehydrogenase pada jaringan lemak epididimal tikus. Dari penelitian tersebut, didapatkan hasil bahwa jika terdapat penurunan vitamin pada hewan coba maka

akan terjadi penurunan NADP^+ sebanyak tiga kali lipat dan penurunan NADPH sebesar 1.7 kali lipat selain itu juga terjadi inhibisi sebanyak 43% terhadap aktivitas glucose-6-phosphate dehydrogenase dan penurunan transketolase sebesar 39%.

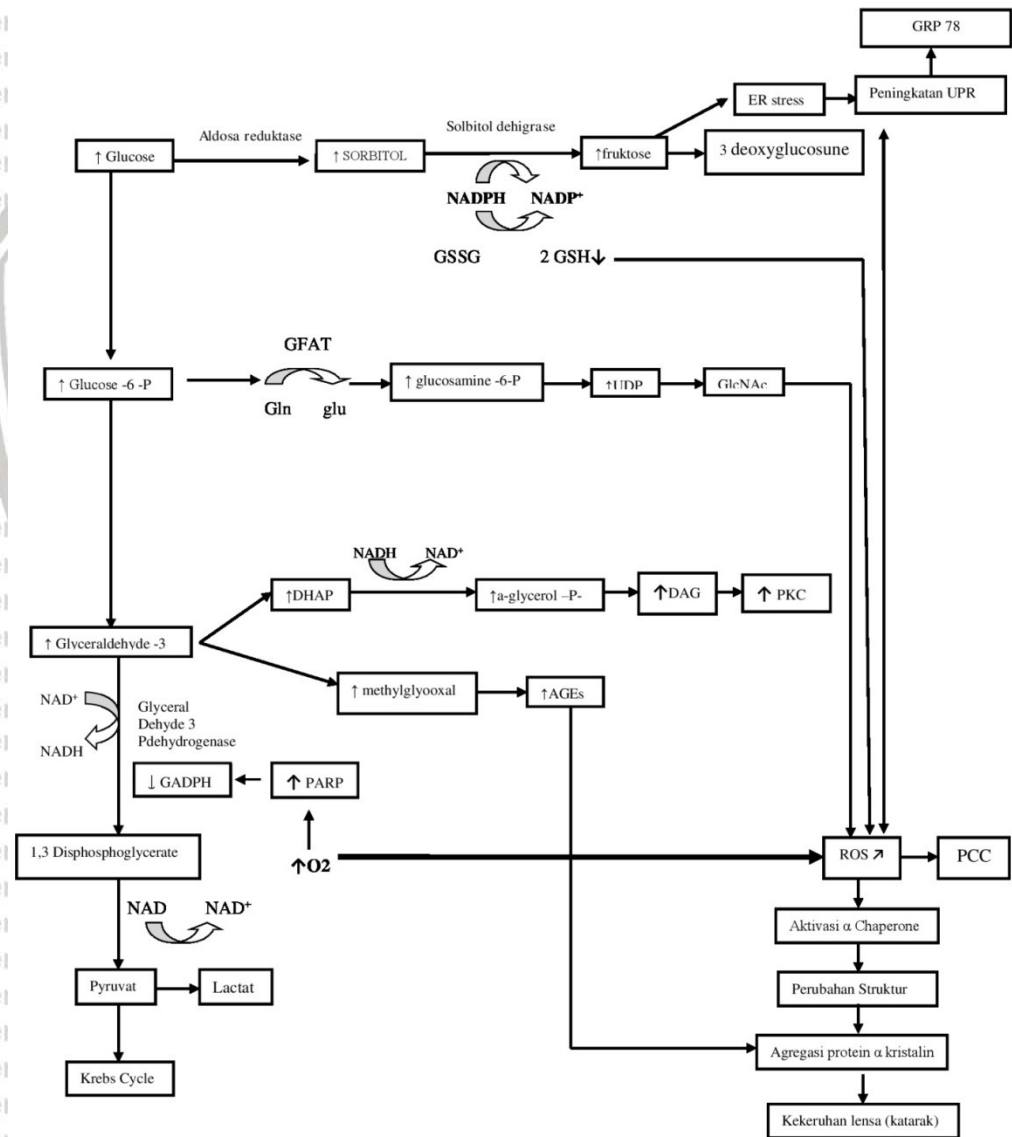
Nicotinamide akan mensupresi aktivitas glukosa-6-phosphate dehydrogenase sebesar 35% dan isocitric dehydrogenase sebesar 40% dalam waktu 12 jam setelah injeksi intraperitoneal, sehingga diduga bahwa produksi NADPH pada jaringan lemak tikus dipengaruhi oleh niasin (Kirkland, 2009).



BAB III

KERANGKA TEORI, KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. KERANGKA TEORI



Pada kondisi normoglikemik, kebanyakan glukosa intraseluler di fosforilasi ke glukosa-6-phosphate oleh hexokinase, hanya sebagian kecil dari glukosa masuk jalur polyol. Pada kondisi-kondisi hiperglikemia, hexokinase yang disaturasi, maka akan terjadi influks glukosa ke dalam jalur polyol. Ketika konsentrasi glukosa di dalam lensa terlalu tinggi, aldose reduktase juga mengurangi glukosa ke dalam jalur sorbitol, yang mana kemudian dioksidasi menjadi fruktosa. Aktivasi jalur polyol menyebabkan peningkatan metabolisme glukosa menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase dan mengkonsumsi kofaktor NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphat Hydrolase*). Penggunaan kofaktor NADPH untuk mengubah glukosa menjadi sorbitol akan berkompetisi dengan perubahan *Glutathione Teroksidasi* (GSSG) menjadi glutathione tereduksi (GSH). GSH merupakan salah satu antioksidan yang penting dalam lensa sehingga penurunan kadarnya akan menyebabkan peningkatan ROS dan stres oksidatif. Jalur polyol juga akan meningkatkan kepekaan stres oksidatif intraseluler sehingga terjadi stres retikulum endoplasma sehingga akan terjadi peningkatan *Unfolding Protein Response* (UPR). Kondisi ini akan menyebabkan peningkatan GRP 78/BiP yang merupakan sensor pada stres retikulum endoplasma dan akan menentukan kondisi sel akan kembali normal (*survive*) atau mengalami apoptosis. Stres oksidatif akan menyebabkan peningkatan oksigen radikal bebas dan peningkatan beberapa penanda stres oksidatif seperti *Malondialdehyde* (MDA).

Peningkatan glukosa intraseluler menyebabkan pembentukan *Advanced Glycosilation Products* (AGEs) melalui glikosilasi nonenzymatik pada protein seluler.

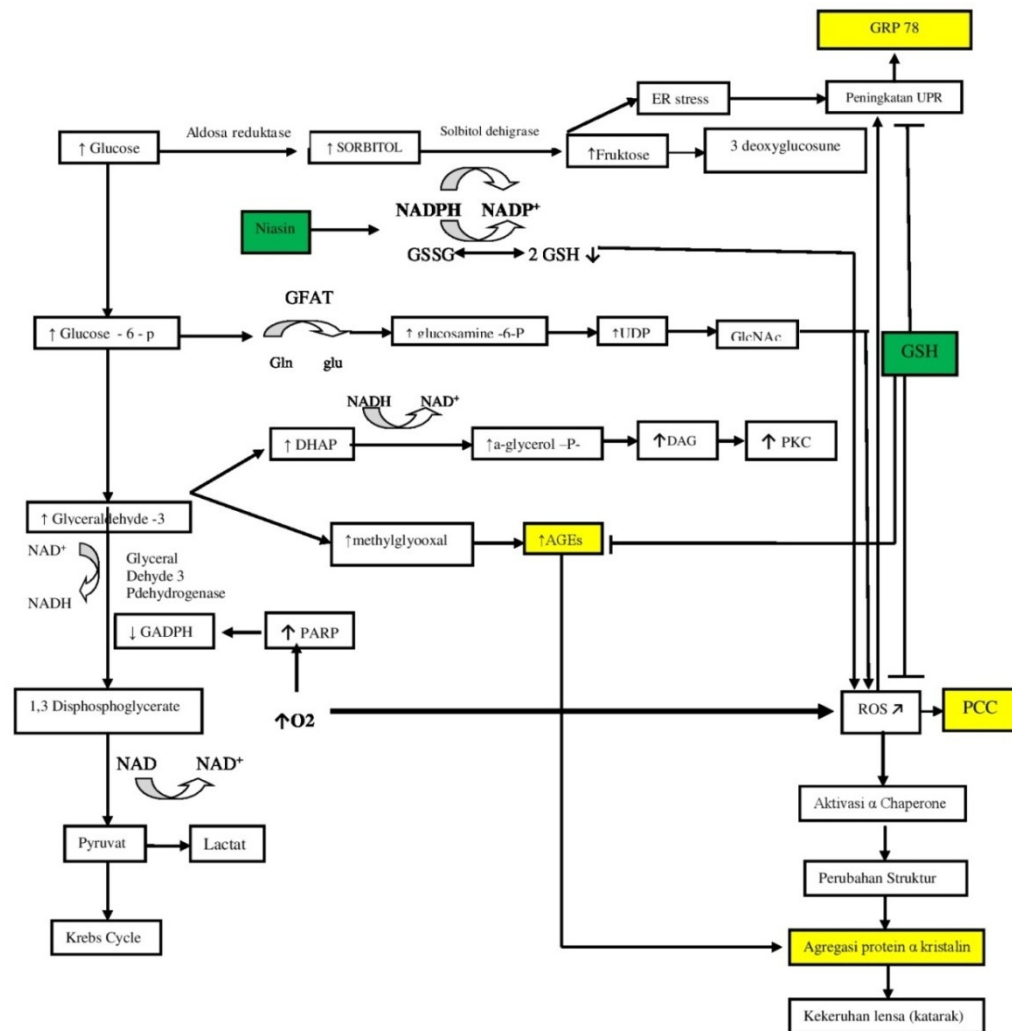
Glikosilasi dan protein jaringan menyebabkan pembentukan AGEs. Glikosilasi nonenzimatik ini merupakan hasil interaksi glukosa dengan kelompok amino pada protein. Pada kondisi hiperglikemia kronis beberapa kelebihan glukosa berkombinasi dengan asam amino pada sirkulasi atau protein jaringan. Proses ini pada awalnya membentuk produk glikosilasi awal yang reversibel dan selanjutnya membentuk AGEs yang ireversibel. Konsentrasi AGEs meningkat pada penderita diabetes melitus. Konsentrasi AGEs yang meningkat berhubungan dengan adanya perubahan struktur kristalin karena AGEs dapat menyebabkan munculnya protein dengan berat molekul yang lebih tinggi dan mudah mengalami agregasi yang menyebabkan kekeruhan pada lensa.

Kondisi hiperglikemia ini pada akhirnya akan menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan juga dapat meningkatkan pembentukan AGEs intrasel melalui aktivasi PARP karena adanya kerusakan DNA dan penurunan GAPDH, sehingga GAPDH yang diperlukan untuk mengubah gliceraldehyde 3-p menjadi 1,3 DPG akan menurun fungsinya, dan terjadi penumpukan gliceraldehyde 3-p yang akan menjadi methylglyoxal dan semakin banyak AGEs yang terbentuk (Brownlee, 2005). Peningkatan ROS juga akan menyebabkan penurunan fungsi chaperone α Kristalin, sehingga akan terjadi perubahan struktur kristalin di dalam lensa yang akan memicu timbulnya agregasi dan polimerisasi α kristalin sehingga menyebabkan kekeruhan pada lensa dan timbul katarak.

Pada kondisi peningkatan stres oksidatif maupun *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat diberikan agen antioksidan antara lain katalase, vit C, vit E, pyruvate,

lycopene, SOD, GSH yang diharapkan dapat menurunkan stres oksidatif dengan menghambat produksi ROS.

3.2. KERANGKA KONSEP



Pada kondisi diabetes melitus, konsentrasi glukosa di dalam sel lensa terlalu tinggi, sehingga glukosa akan diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase dan kemudian dioksidasi menjadi fruktosa. Aktivasi jalur polyol menyebabkan peningkatan metabolisme glukosa menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase dan mengonsumsi kofaktor NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphat Hydrolase*). Penggunaan kofaktor NADPH untuk mengubah glukosa menjadi sorbitol akan berkompetisi dengan perubahan Glutathione Teroksidasi (GSSG) menjadi glutathione tereduksi (GSH). Penambahan niasin disini diharapkan dapat membantu sintesis NADP dan NADPH melalui *pentosephosphate pathway* sehingga kofaktor NADPH yang diperlukan untuk regenerasi GSH tetap tersedia dalam jumlah yang cukup.

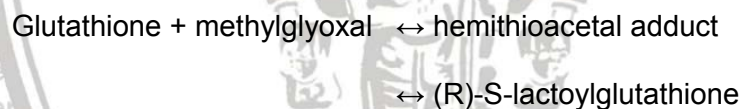
Glutathione merupakan salah satu antioksidan yang penting dalam lensa sehingga penurunan kadarnya akan menyebabkan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan stres oksidatif. Fruktosa akan diubah menjadi 3 deoxyglucosone dan memicu terbentuknya *Advanced Glycation End Product* (AGEs) dan menyebabkan terjadinya peningkatan stres oksidatif dan ROS.

Jalur polyol juga akan meningkatkan kepekaan stres oksidatif intraseluler sehingga terjadi stres retikulum endoplasma sehingga akan terjadi peningkatan *Unfolding Protein Response* (UPR). Kondisi ini akan menyebabkan peningkatan GRP78/BiP yang merupakan sensor pada stres retikulum endoplasma. Stres oksidatif akan menyebabkan peningkatan oksigen radikal bebas dan peningkatan beberapa

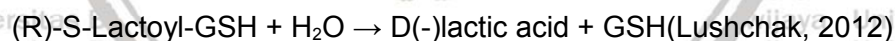
penanda stres oksidatif seperti *Protein Carbonyl Content* (PCC). Peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan peningkatan pembentukan AGEs melalui aktivasi PARP dan penurunan GAPDH serta dapat menyebabkan penurunan fungsi chaperone α Kristalin, sehingga akan terjadi perubahan struktur kristalin di dalam lensa yang akan memicu timbulnya agregasi dan polimerisasi α kristalin sehingga menyebabkan kekeruhan pada lensa dan timbul katarak.

Pemberian GSH yang merupakan antioksidan diharapkan dapat menurunkan produksi ROS untuk mengurangi stres oksidatif dan stres retikulum endoplasma.

GSH juga berfungsi sebagai kofaktor dalam eliminasi methylglyoxal (AGEs) dengan menggunakan dua enzim *glyoxalase* yaitu *glyoxalase I* dan *glyoxalase II* dengan reaksi sebagai berikut:



Enzim ke dua adalah, *glyoxalase II* (Glo II, EC 3.1.2.6), mengkatalisa hidrolisis kedua produk di atas dengan reaksi sebagai berikut:



3.3. Hipotesa Penelitian

1. Pemberian glutathione tereduksi (GSH) dan niasin dapat menurunkan kadar PCC (*Protein Carbonyl Content*), GRP78/BiP, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.
2. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar PCC (*Protein Carbonyl Content*), GRP78/BiP, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur

sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan *glutathione* dan niasin dengan yang tidak mendapatkan *glutathione* tereduksi dan niasin.

3. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar PCC (*Protein Carbonyl Content*), GRP78/BiP, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan *glutathione* dan niasin dengan berbagai dosis.





BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratoris secara *in vitro* pada kultur sel epitel lensa (*cell line*).

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan waktu penelitian mulai bulan Maret-Juni 2018.

4.3. Tahapan Penelitian

Tahap I : uji *in vitro* dengan pemberian glutathione dan niasin dengan lima (5) dosis terhadap kultur sel epitel lensa dalam medium hiperglikemia dengan menggunakan pemeriksaan MDA. Tahap I ini bertujuan untuk mengetahui dan menentukan tiga(3) dosis glutathione dan niasin yang paling berperan dalam proses penurunan stress oksidatif pada sel kultur.

Tahap II : uji *in vitro* efek pemberian glutathione dan niasin dengan dosis yang telah ditentukan pada penelitian tahap I terhadap proses pembentukan katarak melalui jalur stres oksidatif, *Unfolding Protein Response* (UPR), dan polimerisasi α kristalin dengan variabel penelitian adalah *Protein Carbonyl Content* (PCC) dan GRP 78/Bip.

Tahap III : uji invitro efek pemberian kombinasi tiga (3) dosis glutathione dan satu dosis niasin terhadap proses pembentukan katarak melalui jalur stres oksidatif, unfolding protein response, dan polimerisasi α kristalin dengan variabel penelitian adalah *Protein Carbonyl Content* (PCC), GRP 78/Bip, formasi *Advance Glycation End Products* (AGEs), dan polimerisasi α kristalin.

4.4. Sampel Penelitian

Sampel penelitian pada eksperimen ini adalah kultur sel epitel lensa (*cell line* HLE B3) yang didapatkan dari ATCC (Raju, 2013).

4.4.1. Perkiraan Besar Sampel

Pada penelitian ini, besaran sampel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Hidayat, 2010):

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

t = merupakan banyaknya kelompok penelitian

r = merupakan jumlah replikasi

Pada penelitian terdapat 7 kelompok penelitian, sehingga dibutuhkan jumlah replikasi pada masing-masing kelompok sebanyak 3. Dengan demikian, jumlah sampel penelitian yang dibutuhkan pada penelitian sebanyak 21 well.

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah *glutathione* dan niasin.

4.5.2. Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar PCC, GRP78/BiP, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin.

4.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.6.1. Kriteria Inklusi

Kultur sel epitel lensa dari *cell line* (HLE B3) yang viable.

4.6.2. Kriteria Eksklusi

1. Kultur sel epitel lensa HLE B3 pada *well* yang terkontaminasi oleh jamur.
2. Sel yang mengalami apoptosis

4.7. Definisi Operasional

1. Kultur sel epitel lensa adalah kultur sel immortal yang didapatkan dari *cell line* (HLE-B3) yang berasal dari jaringan lensa bayi (*infant*) dan ditransformasi dengan adenovirus virus 12-simian (SV40).
2. *Protein Carbonyl Content* (PCC) adalah salah satu cara pengukuran oksidasi protein yang terjadi karena adanya modifikasi protein karena ROS maupun produk sekunder dari stress oksidatif yang diukur dengan teknik ELISA.
3. *Glutathione* tereduksi (GSH) adalah antioksidan utama di dalam lensa yang mengandung rantai residu *sulphydryl* (-SH) yang dapat membantu melindungi lensa melawan oksidan.

4. Niasin adalah suatu komponen organik yang mempunyai nama lain *Nicotinic Acid* yang berfungsi sebagai prekursor dari koenzim *Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD)* dan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP)*.
5. *Advanced Glycation End Product (AGEs)* adalah protein yang terglykasi karena paparan dengan glukosa yang diukur dengan teknik ELISA.
6. GRP78/BiP adalah protein utama *chaperone* pada retikulum endoplasma yang penting dalam proses kontrol retikulum endoplasma dan dapat mengendalikan aktivitas sinyaling molekul trans membrane pada retikulum endoplasma yang diukur dengan teknik ELISA.
7. Polimerisasi kristalin adalah bergabungnya beberapa struktur kristalin membentuk protein dengan berat molekul yang tinggi yang diukur dengan teknik western blotting.
8. Medium glukosa tinggi adalah medium kultur sel epitel lensa (DMEM / RPMI 1640) yang diberi glukosa hingga konsentrasi akhir menjadi 25 mM. (Raju 2013)

4.8. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Tabung sentrifuge steril 15 cc, Sentrifuge (*Ependorf*), Plate 24 well, Inkubator, *Microplate reader*, Mikroskop, Mikropipet, Filter disposibel 0,2 µm, Membran filter, Tip micropipet, Holder, Spuit 20 cc, Bunsen, Sarung tangan, dan Jas laboratorium

4.9. Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Kultur sel epitel lensa, Methanol 80%, Kertas tissue, Larutan *Phosphate Buffer Saline-A (PBSA)*, Medium kultur RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 tanpa glukosa (Raju, 2013). Larutan serum free 3 ml, Larutan gelatin 0,2%, dan Medium kultur DMEM dan *Fetal Bovain Serum (FBS)* 10%.

4.10. Cara Kerja Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris untuk mengetahui pengaruh pemberian *glutathione* pada kultur sel epitel lensa dengan melihat kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC), GRP78/BiP, formasi AGEs, dan polimerisasi α kristalin.

4.10.1. Kultur Sel Epitel Lensa

Vial yang mengandung sel epitel lensa ditawing pada 37^o C selama 5 menit, dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge 15 cc dan dicuci dengan medium komplet yang mengandung 20% *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan 50 μ g/ml gentamisin. Dilakukan sentrifugasi pada 1000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Buang supernatan dan resuspensi pellet dengan medium komplet, lakukan tiga kali. Sel ditanam pada flash menggunakan medium komplet. Dilakukan inkubasi pada inkubator CO₂ dengan saturasi 5% CO₂ pada suhu 37^o C selama 2 hari.

Setelah konfluen, dilakukan sub kultur pada plate kultur. Pertama dilakukan tripsinisasi menggunakan tripsin-EDTA selama 5 menit, pada suhu 37^o C kemudian dimasukkan pada tabung sentrifus 15 cc, kemudian sentrifugasi pada 1000 rpm selama 5 menit, cuci sebanyak 3 kali menggunakan medium tanpa serum dan kemudian resuspensi menggunakan medium komplet. Dilakukan penanaman pada plate kultur, diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% dan sel diperbanyak sesuai dengan kebutuhan.

4.10.2. Perlakuan Kultur Sel Epitel Lensa

Kultur sel epitel lensa terbagi menjadi kelompok kontrol, kelompok kontrol dengan medium glukosa tinggi (tanpa perlakuan) dan dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi. Medium glukosa tinggi didapatkan dengan cara

menambahkan glukosa sebanyak 25 mM pada medium MEM berdasarkan rekomendasi ATCC pada data *sheet*. Pada kelompok kultur sel epitel lensa yang mendapat perlakuan, dibagi menjadi beberapa kelompok sesuai dengan penelitian tahap I, II, dan III. Penambahan glukosa dilakukan sejak hari pertama sel ditumbuhkan pada medium, sedangkan perlakuan diberikan setelah 7 hari.

Glutathione tereduksi (GSH) didapatkan dari *standard stock solution* (100 mM) yang dibuat dengan melarutkan 3.07 gram GSH ke dalam larutan 0.2 M EDTA dengan volume akhir 100 ml (Wang, 2014). GSH ini kemudian dilarutkan dalam medium kultur, selama 72 jam (inkubasi) untuk pemeriksaan kadar PCC dan GRP78/BiP, serta inkubasi selama 2 minggu untuk menentukan kadar pembentukan AGE dan polimerisasi α kristalin. Setelah 72 jam dan 2 minggu, medium diambil dan sel ditripsin selama 7 menit dengan tujuan supaya sel lepas.

Niasin didapatkan dari *standard stock solution* (100 μ g/mL) yang dibuat dengan melarutkan 50 mg dried niasin ke dalam 25% ethanol hingga volume akhir mencapai 500 mL (Crowley, 2000). Dengan *standard stock solution* ini akan didapatkan niasin sebesar 0.81 mM. Kemudian dilarutkan dalam medium kultur, selama 72 jam (inkubasi) untuk pemeriksaan kadar PCC dan GRP78/BiP, serta inkubasi selama 2 minggu untuk menentukan kadar pembentukan AGE dan polimerisasi α kristalin. Setelah 72 jam dan 2 minggu, medium diambil dan sel ditripsin selama 7 menit dengan tujuan supaya sel lepas.

Kemudian sel disentrifuge 2000rpm selama 7 menit, dan diberikan RIPA buffer agar sel pecah selama 20 menit pada suhu 37°C. Disentrifus ulang 2000rpm selama 7 menit, dan supernatan diambil. Melakukan pengukuran kadar protein, dan dilanjutkan dengan pengukuran kadar PCC, GRP78/BiP, dan Formasi AGES menggunakan *microplate rider* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

dengan menggunakan metode ELISA untuk PCC, GRP78/BiP, dan Formasi AGEs, serta pemeriksaan polimerisasi α kristalin dengan western blot.

4.10.3. Metode Pengukuran Kadar PCC dengan ELISA (MyBioSource)

4.10.3.1. Persiapan Reagen

1. 1x wash buffer : konsentrasi wash buffer 10X didilusi dengan air deionized menjadi 1X dan dilakukan pengadukan hingga homogen.
2. Blocking solution : Blocking reagent sebanyak 5 g dilarutkan ke dalam 100 mL 1X PBs dan disimpan dalam suhu 4 °C selama 1 minggu.
3. Untuk membuat DPNH stock solution dilakukan dengan cara melarutkan 1-5 mg DPNH ke dalam diluents DPNH menjadi 1 mg/ml. DPNH stock solution ini stabil dalam waktu 1 minggu jika disimpan pada ruangan yang gelap dengan suhu 4°C. Larutan DPNH ini dapat digunakan sesuai dengan banyaknya kebutuhan penelitian, dengan cara membuat DPNH working solution dengan mendilusikan 1 mg/ml DPNH stock solution menjadi 0.04 mg/mL dengan menggunakan DPNH diluents. Sebagai contoh, untuk 20 pemeriksaan, 100 μ L dari 1mg/ml DPNH stock solution dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung 2.4 mL DPNH diluents, dicampur hingga merata dan harus segera digunakan.
4. Anti-DNP antibodi dan antibodi sekunder dapat digunakan dengan cara mendilusikan anti-DPNH antibodi dan antibodi sekunder dengan 1X blocking solution masing-masing dengan perbandingan 1:1000.

4.10.3.2. Prosedur Pemeriksaan Protein Carbonyl Content (PCC)

1. Ditambahkan 100 μ L DPNH working solution pada setiap sampel dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan.
2. Ditambahkan 30 μ L TCA pada setiap sampel, diletakkan di atas es selama 5menit dan diputar pada kecepatan maksimum selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pellet digunakan untuk pemeriksaan lebih lanjut.

3. Ditambahkan 500 μL aceton dingin pada setiap tabung dan pellet dicuci selama 30 detik di dalam bath sonikasi. Diletakkan pada suhu -20°C selama 5 menit, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 2 menit dan aseton dibuang.
4. Setiap well dicuci dengan *wash solution* sebanyak 350-400 μL /well/tiap pencucian. Pencucian diulang sebanyak 5 kali dan dilakukan aspirasi setiap sebelum pencucian. *Automated washer* dapat diset untuk waktu pencucian selama 10 detik dan waktu pengocokan (*shaking*) selama 5 detik dalam setiap siklus pencucian. Jika pencucian dilakukan dengan cara manual, maka cairan pada well diaspirasi dan dibuang pada container pembuangan. Setiap well diisi dengan 1x *wash solution*, dan kemudian disapirasi lagi. Prosedur ini diulang sebanyak 5x. Setelah pencucian, plate dibalik dan sisa cairan dapat diserap menggunakan kertas penyerap hingga tidak ada cairan yang tersisa.
5. Ditambahkan 50 μL substrate A dan 50 μL substrate B pada setiap well termasuk well kontrol. Well ditutup dan diinkubasi selama 10-15 menit pada suhu 37°C (hindari cahaya jika warna tidak menjadi gelap dan waktu inkubasi diperpanjang namun tidak lebih dari 30 menit).
6. Ditambahkan 50 μL stop solution pada setiap well termasuk well kontrol dan dikocok ringan hingga merata.
7. Pembacaan absorbansi setiap well dilakukan dengan menggunakan *plate reader* dan panjang gelombang 450 nm.

4.10.4. Metode pengukuran GRp78/Bip dengan Elisa (MyBioSource)

4.10.4.1. Pengumpulan Sampel Kultur Sel Lysate

Untuk sel adherent, sel dicuci dengan PBS dingin dan sel dipisahkan dengan tripsin. Suspensi sel dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan dilakukan

sentrifus 100xg selama 5 menit. Medium dibuang dan sel dicuci ulang dengan PBS dingin sebanyak 3x. Setiap 1×10^6 sel ditambahkan 150-250 μL PBS untuk menjaga suspensi sel. Proses *freeze thaw* ini diulang beberapa kali hingga semua sel lisis. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 100xg pada suhu 4°C . Fragmen sel di buang dan supernatant digunakan untuk pemeriksaan.

4.10.4.2. Prosedur Pemeriksaan

1. Pada setiap well diberi 100 μL standart atau sampel, dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C .
2. Semua cairan pada setiap well diaspirasi.
3. *Biotynilated Detection Ab reagent* yang merupakan *working solution* diberikan sebanyak 100 μL pada setiap well, ditutup dengan penutup (*plate sealer*) sambil diguncang perlahan dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C .
4. Semua cairan dalam setiap well diaspirasi dan dicuci 3 kali dengan menambahkan 350 μL dari 1x *Wash Buffer*.
5. Ditambahkan 100 μL *HRP conjugate* pada setiap well, ditutup dengan menggunakan *plate sealer* yang baru dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C .
6. Cairan pada setiap well diaspirasi dan dicuci sebanyak 5x seperti pada langkah no.4.
7. Ditambahkan 90 μL *substrate reagent* pada setiap well, ditutup dengan *plate sealer* yang baru dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C . Semua well harus dilindungi dari cahaya dan dimonitor secara berkala hingga warna optimal telah dicapai.
8. Ditambah 50 μL *stop solution* pada setiap well. Warna biru akan berubah menjadi kuning dengan segera. Densitas optik setiap well dapat

ditentukan dengan menggunakan microplate reader yang diatur pada 450nm.

4.10.5. Metode Pengukuran *Advance Glycation End Product (AGEs)* dengan ELISA (MyBioSource)

4.10.5.1. Pengumpulan Sampel (Sel Lysate)

Sampel disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 5000xg pada 2-8°C, setelah dilakukan 2x siklus *freeze thaw*. Partikulat – partikulat dihilangkan dan dilakukan pemeriksaan dengan segera atau sampel dapat disimpan di *aliquot* pada suhu -20°C atau -80°C untuk penggunaan lebih lanjut.

4.10.5.2. Prosedur Pemeriksaan

1. Pada setiap well diberi 100µL standart atau sampel, well diberi penutup dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C
2. Cairan di setiap well dibuang, jangan dilakukan pencucian.
3. Ditambahkan *Biotin Antibody* (1x) sebanyak 100µL pada setiap well. Setiap well ditutup dengan adhesive strip dan diinkubasi selama 60 menit pada 37°C.
4. Proses pencucian / aspirasi diulang sebanyak lima kali sesuai dengan tahap no.2.
5. Ditambahkan 90µL substrate solution pada setiap well. Ditutup dengan plate sealer diinkubasi selama 15-25 menit pada suhu 37°C cairan akan menjadi berwarna biru dengan penambahan substrate solution. Setiap well diaspirasi dan dicuci, proses ini diulang sampai dengan 3x.
6. Pada setiap well ditambahkan 100µL HRP-avidin. Microtiter plate ditutup dengan adhesive strip yang baru dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
7. Setiap well diaspirasi dan dicuci kembali seperti step no 3.
8. Ditambahkan 90 µL TMB substrate pada setiap well dan diinkubasi selama 15-30 menit pada suhu 37°C. Proses ini harus dilindungi dari cahaya.
9. Ditambahkan 50 µL *stop solution* pada setiap well dan diketuk perlahan untuk memastikan cairan tercampur.



10. Dasar plate harus dibersihkan dari air maupun sidik jari, dan tidak diperbolehkan ada gelembung pada permukaan cairan. *Microplate reader* dapat dijalankan dan diatur pengukuran pada 450nm.

4.10.6. Metode Pemeriksaan Polimerisasi α Kristalin dengan *Western Blotting*

1. Alat Western blotting
 - Inkubator
 - Kertas
 - Shaker
2. Bahan Western Blott
 - Kertas saring (*absorbent paper*)
 - Membran IVC
 - Gel SDS-PAGE
 - *Tris base Solution* (TBS) yang terdiri dari *Tris Base* 50mM, IVA CL 0,2M, D₂O
 - *Transfer Buffer* yang terdiri dari *tris base* 25mM, glycine 192mM, methanol 20% dan Dd H₂O yang ditambahkan hingga 1000mL

4.10.6.1 Persiapan Lisat dari Sel Kultur

1. Dish sel kultur diletakkan di atas es dan sel – sel dicuci dengan ice cold PBS.
2. PBS diaspirasi dan ditambahkan *ice cold lysis buffer* (1 mL per 10⁷ cells / 100mm dish / 10cm² flask; 0,5mL per 5x10⁶ cell / 60mm dish / 75 cm² flask).
3. Dilakukan *scrapping* pada sel – sel yang melekat pada dish dengan menggunakan *cold plastic cell scrapper* dan dengan hati – hati suspensi sel dipindahkan pada tabung microcentrifuge. Prosedur lainnya sel dapat ditripinisasi dan dicuci dengan PBS sebelum diresuspensi dalam *lysis buffer* di tabung microcentrifuge.
4. Agitasi dipertahankan selama 30 menit pada suhu 4°C.
5. Dilakukan sentrifugasi dengan microcentrifuge pada suhu 4°C. Kecepatan sentrifugasi tergantung alat yang digunakan. Beberapa protokol menyarankan sentrifugasi selama 20 menit pada 12.000rpm.
6. Tabung dipindahkan secara hati – hati dari alat sentrifugasi dan diletakkan di atas es. Kemudian supernatan diaspirasi dan diletakkan pada tabung baru. Serta disimpan di dalam es.

4.10.6.2. Persiapan Sampel untuk Pemeriksaan Western Blotting

1. Sedikit volumelisate dipindahkan untuk dilakukan pengukuran protein secara kuantitatif. Ditentukan konsentrasi protein dari setiap sel lisate.
2. Ditentukan beberapa protein yang akan dimuat dan ditambahkan 2x *laemli sample buffer* dengan volume yang sama.
3. Untuk mereduksi dan denaturasi setiap sel lisate dididihkan dengan sample buffer pada suhu 100°C selama 3 menit. Lisate dapat disimpan pada suhu -20°C untuk penyimpanan dan penggunaan selanjutnya.

4.10.6.3 Persiapan Gel SDS-PAGE

1. 20-30µg dari total protein yang didapatkan dari sel lysate dimasukkan ke dalam well SDS-PAGE gel.
2. Dilakukan running gel selama 1-2 jam pada 100V.
3. Presentase gel yang diperlukan tergantung dari ukuran protein yang dipilih peneliti.

Tabel 4.1. Ukuran Protein dan Persentase Gel

Protein size	Persentase Gel
4–40 kDa	20%
12–45 kDa	15%
10–70 kDa	12.5%
15–100 kDa	10%
25–100 kDa	8%

4.10.6.4 Transfer Protein dari Gel ke Membran

Membran yang digunakan dapat berupa nitro selulosa atau PVDF. PVDF diaktivasi dengan denga methanol selama 1 menit dan dicuci dengan *transfer buffer* sebelum melakukan persiapan *stack*. Transfer protein ke membran dapat dievaluasi dengan menggunakan ponceau S staining sebelum dilakukan blocking. *Stack* disiapkan seperti gambar berikut.



Gambar 4.1. Contoh Persiapan Stack.

4.10.6.5 Pewarnaan dengan Antibodi

1. Membran diblok selama 1 jam pada temperatur ruangan atau selama semalam pada temperatur 4°C menggunakan *blocking buffer*.
2. Membran diinkubasi dengan antibodi primer yang telah didilusi secara sesuai dalam *blocking buffer*. Inkubasi dilakukan selama semalam pada suhu 4°C.
3. Membran dicuci dengan TST sebanyak 3 kali selama 5 menit pada masing – masing pencucian.
4. Membran diinkubasi dengan antibodi sekunder terkonjugasi yang telah didilusi sesuai petunjuk pada *blocking buffer* selama 1 jam pada temperatur ruangan.
5. Membran dicuci dengan TST sebanyak 3 kali selama 5 menit pada masing – masing pencucian.
6. Untuk pembentukan sinyal digunakan *DAB solution* sampai terlihat gambaran *band* yang jelas.

4.11. Rancangan Analisa Data

Data yang telah didapatkan dianalisa menggunakan program SPSS 19 for Windows. Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji Kolmogorof Smirnov, dan untuk mengetahui homogenitas varians data variabel dilakukan uji *Levene Test*. Uji One-Way Anova dilakukan untuk mengetahui adakah perbedaan kadar parameter yang diteliti diantara masing-masing kelompok. Apabila dari hasil uji Anova didapatkan perbedaan kadar parameter yang

diteliti (PCC, GRP 78/BiP, dan formasi AGEs) yang bermakna, maka dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui antara kelompok mana yang terdapat perbedaan. Sedangkan untuk mengetahui pengaruh glutathione dan niasin terhadap kadar PCC, Bip/GRP 78, dan pembentukan formasi AGEs dapat menggunakan uji regresi dan korelasi.





BAB IX

KESIMPULAN DAN SARAN

9.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa pemberian GSH, niasin, maupun kombinasi GSH dan niasin terhadap kultur sel epitel lensa :

- Menunjukkan adanya pengaruh atau perbedaan antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan dapat menurunkan kadar MDA, PCC, GRP78/BiP, AGEs dan dapat menurunkan agregasi α kristalin.
- Dosis *Glutathione* (GSH) sebesar 10 μM merupakan dosis terbaik untuk menurunkan kadar MDA dan PCC, sedangkan dosis 25 μM merupakan dosis terbaik untuk menurunkan kadar GRP 78.
- Dosis niasin sebesar 100 μM merupakan dosis terbaik untuk menurunkan kadar MDA, PCC, dan GRP 78/BiP.
- Dosis kombinasi *Glutathione* (GSH) sebesar 10 μM + niasin 25 μM merupakan dosis terbaik untuk menurunkan kadar PCC dan AGEs, sedangkan dosis kombinasi *Glutathione* (GSH) sebesar 100 μM + niasin 25 μM merupakan dosis terbaik untuk menurunkan kadar GRP78.
- Pemeriksaan dengan *western blotting* menunjukkan terjadinya agregasi protein lensa pada semua kelompok dan terjadi penurunan agregasi protein yang terbaik pada dosis kombinasi *Glutathione* (GSH) sebesar 10 μM + niasin 25 μM .

- Pemberian kombinasi GSH dan niasin dapat mencegah pembentukan katarak terutama melalui jalur AGEs.

9.2. Saran

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian ini, diharapkan :

- Adanya penelitian lanjutan sehingga akan didapatkan efektivitas maksimal dari kombinasi *glutathione* dan niasin dalam mencegah terjadinya katarak melalui beberapa jalur yaitu stress oksidatif, stress retikulum endoplasma, glikasi, maupun pembentukan agregasi protein.
- Perlu dilakukan penelitian *invivo* agar dapat mendasari penelitian tingkat klinis.



BAB V

PENELITIAN TAHAP I

PENENTUAN DOSIS AWAL *GLUTATHIONE* TEREDUKSI (GSH) DAN NIASIN DENGAN MENGGUNAKAN VARIABEL *MALONDYALDEHYDE* (MDA)

5.1. Latar Belakang

Glutathione tereduksi (GSH) merupakan tripeptida anion yang merupakan antioksidan dan yang penting di dalam lensa dan berfungsi untuk mempertahankan protein thiol tetap dalam keadaan tereduksi (Lou, 2003; Truscott, 2005). Kadar GSH tinggi pada epitel maupun korteks lensa bagian luar dan disintesa dari asam amino *cysteine*, *glutamate*, serta *glycine* oleh *g-glutamy L cysteine synthetase* dan *glutathione synthetase*. Radikal hidroksil dapat menyebabkan reaksi berantai peroksida lipid dengan asam lemak tak jenuh ganda untuk membentuk lipid peroksida (12, 13, 14). Peroksida lipid yang terkait dengan oksidasi protein membrane dapat menyebabkan pemecahan gradien ion transmembran dan hilangnya viabilitas seluler. Salah satu produk sampingan dari peroksidasi lipid adalah senyawa toksik malondialdehyde (MDA), yang keterlibatannya dalam kataraktogenesis adalah karena kemampuan cross linkingnya (15,16) (Cekic, 2010).

Dibagian lingkungan luar sel serat lensa dipertahankan dengan cara regenerasi GSH dan GSSG oleh enzim *glutathione reductase* dengan menggunakan NADPH yang diproduksi melalui jalur hexokinase sebagai kofaktornya (Lou, 2003, Truscott, 2005). Kadar GSH adalah 80-90% lebih rendah didalam nucleus lensa, begitu pula

dengan aktivitas enzim yang terkait sintesis dan regenerasi GSH. Perbedaan kadar GSH ini akan semakin nyata dengan bertambahnya usia. Karena penuaan, terjadi reduksi kadar GSH di dalam nukleus dan menyebabkan peningkatan GSSG sehingga terjadi oksidasi dari residu protein *cysteine* dan *methionine* dan pembentukan protein *mixed disulfides* (PSSG) sehingga lensa akan kehilangan kejernihannya (Lou, 2003; Truscott, 2005.).

Glutathione tereduksi (GSH) berfungsi sebagai substrat pada reaksi enzimatik yang menyediakan donor elektron untuk molekul yang tidak stabil dan reaktif (Holm, 2013) dan juga berperan untuk melindungi grup *thiol* pada membran protein dan kristalin intraseluler dari modifikasi post translasi yang menyebabkan *cross linking* (Holm, 2013).

Glutathione teroksidasi (GSSH) bereaksi secara non enzimatik dengan grup protein *thiol* untuk membentuk protein GSH (PSSG) yang bercampur dengan *disulfide* yang berfungsi sebagai penyimpanan GSH dan melindungi dari terjadinya *disulfide cross linking of proteins* (PSSP) (Holm, 2013). Peningkatan *disulfide-linkages* menyebabkan terjadinya agregasi protein dengan berat molekul tinggi dan secara langsung akan menyebabkan gangguan kejernihan lensa (Holm, 2013; Liang, 2000).

Glutathione tereduksi (GSH) ditemukan dalam konsentrasi yang tinggi dalam lensa dan memainkan peranan penting dalam melindungi lensa dengan cara detoksifikasi obat – obatan, menurunkan ROS dan peroksida, termasuk disulfida dan radikal bebas. GSH membantu mempertahankan status *thiol-disulfida* dari sel,

transport asam amino melalui siklus *gamma glutamyl*, dan membuang *elektrofili xenobiotik* dari sel (Mathew, 2006).

Telah diketahui bahwa kadar GSH yang rendah pada lensa yang mengalami katarak dapat disebabkan oleh sinar UV, kandungan zat toksik, gangguan metabolik, penuaan, ataupun defek genetik/bawaan (Mathew, 2006). Kondisi hiperglikemik seringkali dihubungkan juga dengan terjadinya katarak, dan beberapa penelitian pada hewan coba menunjukkan hasil bahwa terdapat hubungan antara kadar GSH lensa yang rendah dengan katarak yang tereduksi oleh galaktosa (Gao, 2011).

Suplementasi GSH terhadap lensa kemungkinan dapat membantu mempertahankan kemampuan protektifnya dalam menghadapi stres oksidatif dan dianggap dapat menghambat penurunan aktivitas antioksidan lensa pada kondisi penuaan dan diharapkan dapat menghambat munculnya katarak (Zhang, 2008). Karena pentingnya peranan GSH ini maka saat ini dikembangkan beberapa penelitian tentang bagaimana cara meningkatkan kadar GSH dalam sel sehingga dapat mencegah terjadinya katarak.

Pada kondisi hiperglikemia kronis seperti diabetes melitus, didapatkan penurunan kadar GSH yang disebabkan oleh penurunan sintesisnya maupun regenerasi dari GSSG karena kofaktor NADPH digunakan dalam perubahan glukosa menjadi sorbitol. Penurunan GSH ini dianggap dapat meningkatkan stres oksidatif yang dapat memicu timbulnya katarak.

5.2. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat penurunan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan *Glutathione* (GSH) dengan yang tidak mendapatkan?
2. Dosis *Glutathione* tereduksi (GSH) manakah yang dapat menurunkan kadar *Malondyaldehyde* (MDA) secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?
3. Apakah terdapat penurunan kadar *Malondyaldehyde* (MDA) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan niasin dengan yang tidak mendapatkan?
4. Dosis niasin manakah yang dapat menurunkan kadar *Malondyaldehyde* (MDA) secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?

5.3. Tujuan Penelitian Tahap I

5.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian tahap I adalah untuk mengetahui dosis *Glutathione* tereduksi (GSH) dan niasin secara terpisah yang mempunyai efek terhadap terjadinya penurunan kadar *Malondyaldehyde* (MDA) secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.

5.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui apakah terdapat penurunan kadar *Malondyaldehyde* (MDA) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan *Glutathione* tereduksi (GSH) dengan yang tidak mendapatkan.

2. Untuk mengetahui dosis *Glutathione* tereduksi (GSH) yang diperlukan untuk menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.

3. Untuk mengetahui apakah terdapat penurunan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan niasin dengan yang tidak mendapatkan.

4. Untuk mengetahui dosis niasin yang diperlukan untuk menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.

5.4. Metode Penelitian

5.4.1. Waktu Penelitian

Maret – Juni 2018

5.4.2. Tempat Penelitian

Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran atau Universitas Brawijaya Malang.

5.4.3. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah sel kultur epitel lensa dari *cell line* (HLEB3) yang didapatkan dari ATCC.

5.4.4. Variabel Penelitian

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah dosis *Glutathione* tereduksi (GSH) dan niasin yang diberikan pada kultur sel epitel lensa dengan kondisi hiperglikemia.

5.4.5. Prosedur Pemeriksaan

5.4.5.1. Perlakuan Kultur Sel Epithel Lensa

Kultur sel epithel lensa terbagi menjadi kelompok kontrol, kelompok kontrol dengan medium glukosa tinggi (tanpa perlakuan) dan dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi. Medium glukosa tinggi didapatkan dengan cara menambahkan glukosa sebanyak 25 mM pada medium DMEM tanpa glukosa. Pada kelompok kultur sel epithel lensa yang mendapat perlakuan, dibagi menjadi 3 kelompok yang masing-masing dipapar dengan *glutathione tereduksi* dengan dosis sebesar 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1000 μ M.

Glutathione tereduksi (GSH) didapatkan dari *standard stock solution* (100 mM) yang dibuat dengan melarutkan 3.07 gram GSH ke dalam larutan 0.2 M EDTA dengan volume akhir 100 ml. Kemudian dilarutkan dalam medium kultur, selama 72 jam (inkubasi) untuk pemeriksaan kadar MDA (*malondyaldehyde*). Setelah 72jam dan 2 minggu, medium diambil dan sel ditripsin selama 7 menit dengan tujuan supaya sel lepas. Kemudian sel disentrifuge 2000 rpm selama 7 menit, dan diberikan RIPA buffer agar sel pecah selama 20 menit pada suhu 37°C. Disentrifus ulang 2000 rpm selama 7 menit, dan supernatan diambil. Melakukan pengukuran kadar protein, dan dilanjutkan dengan pengukuran kadar MDA.

Niasin didapatkan dari *standard stock solution* (100 μ g/mL) yang dibuat dengan melarutkan 50 mg dried niasin ke dalam 25% ethanol hingga volume akhir mencapai 500 mL. Dengan *standard stock solution* ini akan didapatkan niasin sebesar 0.81 mM. Kemudian dilarutkan dalam medium kultur, selama 72 jam (inkubasi) untuk pemeriksaan kadar MDA.

Microplate reader disebut juga dengan *plate reader* atau *microplate photometers* adalah alat yang digunakan untuk mendeteksi kandungan biologi, kimia

atau fisik pada *microtiter plates*. Alat tersebut digunakan untuk pengujian, seperti tes ELISA, TBARS Assay, hitung protein dan asam nukleat atau uji aktivitas enzim. Sehingga untuk menghitung kadar MDA, dapat menggunakan alat tersebut dengan menggunakan parameter TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) Assay. TBARS Assay dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi MDA pada supernatan kultur sel, sel yang lisis, serum, plasma dan urine.

5.4.5.2. Metode Pengukuran MDA dengan Menggunakan TBARS Assay (NWLSS)

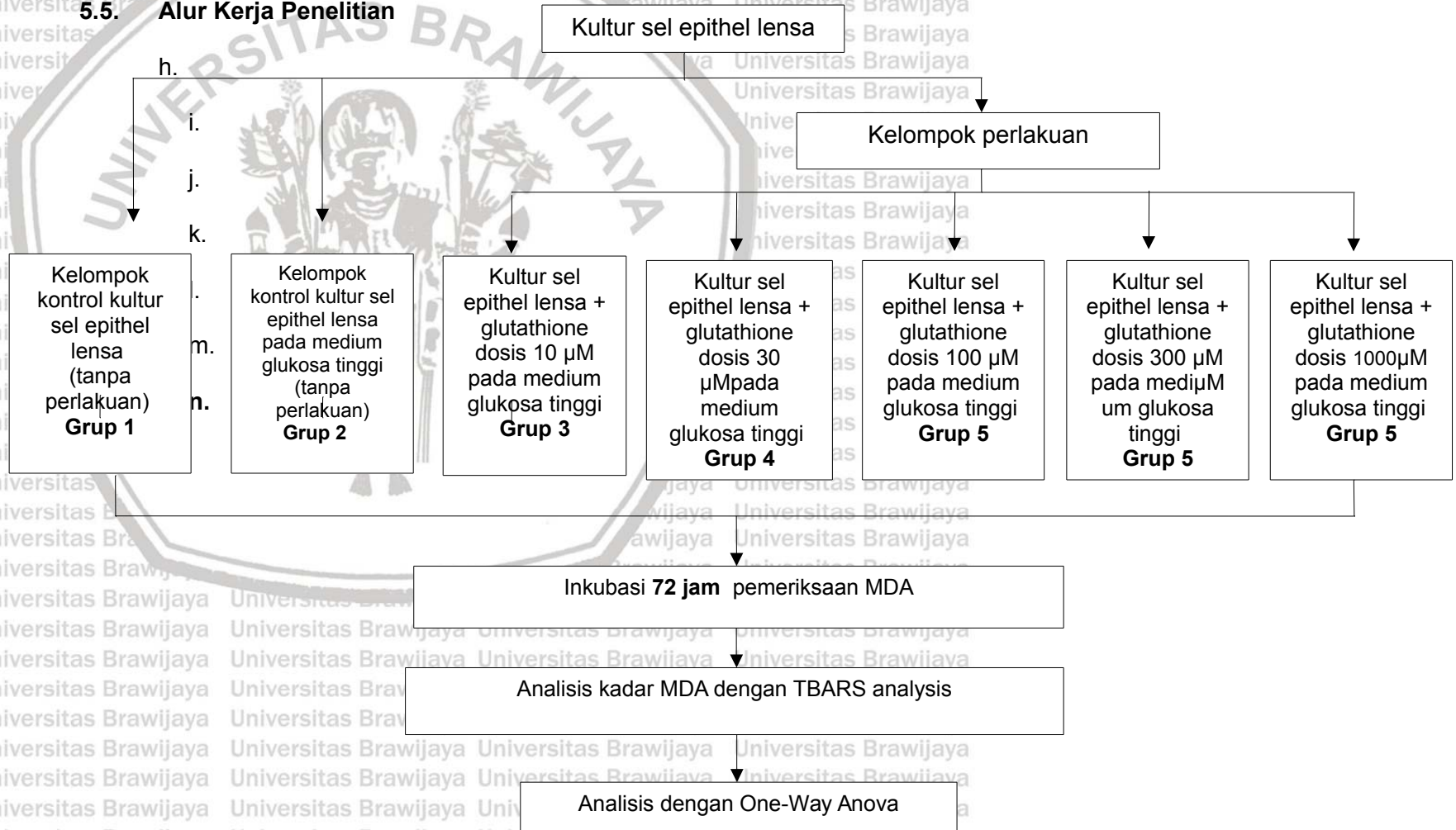
1. Prosedur lisis sel
 - a. Sel dicuci dengan PBS dingin (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 2 kali.
 - b. Resuspensi sel pada 1×10^6 sel/ml dalam larutan *Cell Lysis Buffer 3*.
 - c. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 2-8°C.
 - d. Sel yang telah lisis tidak perlu disentrifugasi sebelum penambahan terapi asam.
2. Penambahan terapi asam untuk mestabilkan sel
 - a. Ditambahkan 300 μ L sampel dengan 300 μ L reagen asam TBARS ke dalam tabung mikrosentrifuge agar tercampur.
 - b. Dilakukan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
 - c. Dilakukan sentrifuge 12.000 rpm selama 4 menit.
 - d. Supernatan dipindahkan secara hati-hati.
3. Pengukuran kadar protein sel
 - a. Penentuan kadar protein sel menggunakan metode *Lowry*.

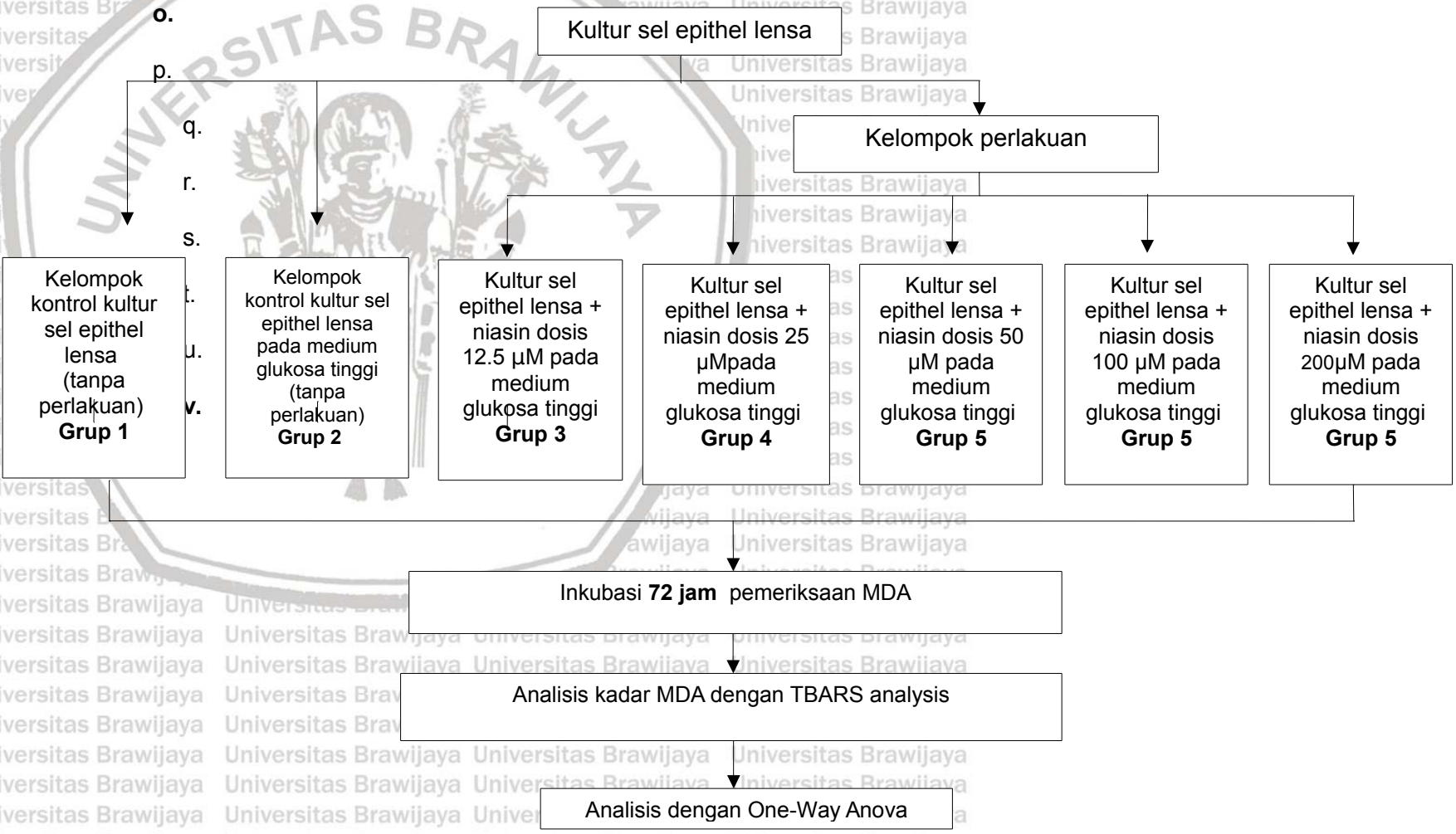
- b. Campur sampel penelitian dengan pereaksi *Lowry*, kemudian kocok dan diamkan selama 10 menit.
- c. Kadar protein diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 750 nm.
- d. Dilakukan pencatatan hasil yang didapat.

4. Prosedur TBARS Assay

- a. Disiapkan semua reagen, TBARS standard dan sampel yang telah diberikan terapi asam.
- b. Ditambahkan 75 μ L reagen TBA pada setiap *well*.
- c. *Microplate reader* disetting pada 532 nm.
- d. Semua *well* ditutup dengan adhesive strip dan inkubasi selama 2-3 jam pada suhu 45-50°C.
- e. Semua *well* dimasukkan ke dalam alat *microplate reader* yang telah disetting 532 nm sampai didapatkan hasil bacaan berupa data kuantitatif.
- f. Data yang didapat dibandingkan dengan data kadar protein masing-masing sampel, dan disamaratakan melalui rumus perbandingan dengan asumsi kadar protein rata-rata tiap kelompok 100 μ g/ml.
- g. Hasil data yang didapat dimasukkan ke dalam rumus, hingga didapatkan kadar MDA dalam satuan μ M.

5.5. Alur Kerja Penelitian





w. **5.6. Analisa Data**

x. Data yang telah didapatkan dianalisa menggunakan program SPSS 18 for Windows. Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji Kolmogorof Smirnov, dan untuk mengetahui homogenitas varians data variabel dilakukan uji *Levene test*. Uji One-Way Anova dilakukan untuk mengetahui adakah perbedaan kadar parameter yang diteliti diantara masing-masing kelompok. Untuk mengetahui pengaruh *glutathione* tereduksi terhadap kadar MDA dapat menggunakan uji regresi dan korelasi.

y.

z. **5.7. Hasil dan Analisa Data**

aa. Penelitian kultur sel epitel lensa dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Kultur sel epitel lensa yang disebut HLE B3 didapatkan dari *American Type Culture Collection (ATCC)* University Boulevard Manassas, VA 20110 USA. Waktu penelitian dari bulan Januari-Mei 2018. Hasil penelitian berupa 21 sampel yang diambil dari 25 well yang terdiri atas 7 kelompok. Kelompok pertama merupakan kontrol negatif, yang tidak mendapat perlakuan. Sedangkan kelompok kedua merupakan kedua merupakan kontrol positif (KP) yang diberikan tambahan glukosa 25 mM pada medium untuk membuat kondisi hiperglikemia. Lima kelompok selanjutnya adalah kelompok dengan medium glukosa tinggi (25 mM) dan mendapatkan perlakuan pemberian *glutathione* sebanyak 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM , 1000 μM dan niasin dosis 12.5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM pada masing-masing kelompok dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Sampel kemudian diinkubasi selama 72 jam dan viabilitas sel diperiksa dalam waktu 3,24,48,dan 72 jam setelah diberi perlakuan.

Kontrol negatif dalam penelitian ini digunakan untuk acuan menghitung dosis efektif (ED). Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan MDA dengan menggunakan metoda TBARS. Data yang didapatkan dianalisa dengan menggunakan program SPSS 18 for windows.

ab.
ac. **5.7.1. Hasil pemeriksaan MDA setelah pemberian *Glutathione* Tereduksi (GSH)**

ad. Hasil rerata kadar MDA pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan *Glutathione* (GSH) dengan 5 dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut 5.1.

ae. **Tabel 5.1. Rerata Kadar MDA pada Kultur Sel Epitel Lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan *Glutathione*.**

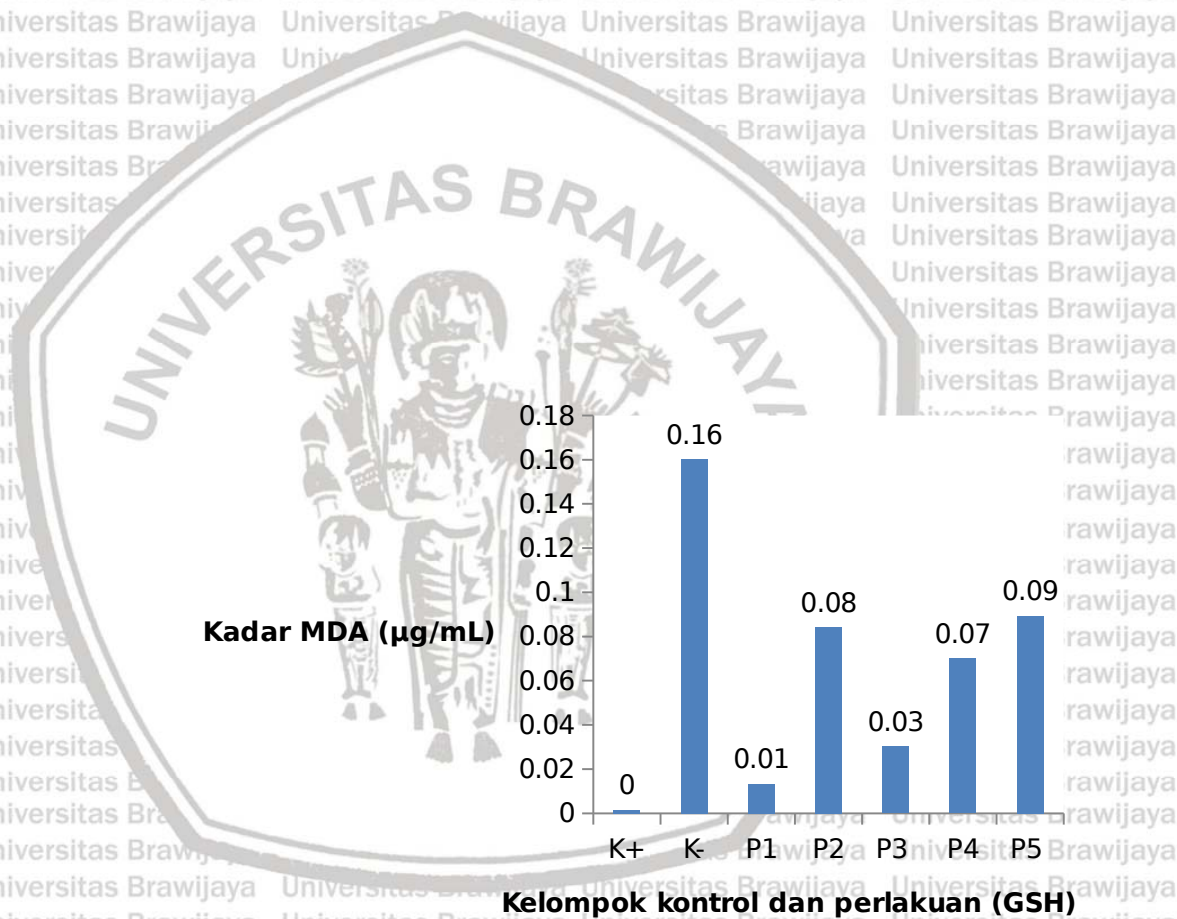
af.

ag. Kelompok	N	ai. R at a- r at a	aj. S tandard Error	ak. M in i m u m	al. M ax i m u m
am. Kontrol negatif (K-)	3	ao. 0. 0 0 1 5		ap. - aq. 0. 0 1	ar. 0. 01
as. Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	au. 0. 1 6 0 2		av. 0. aw. 0. 0 5	ax. 0. 37
ay. Glukosa 25 mM + 10 μM GSH) (P1)	3	ba. 0. 0		bbc. 0. 0	bd. 0. 02

		1 3 3			0
be.	Glukosa 25 mM + 30µM GSH) (P2)	3	bg.	0. 0 8 4 2	bh. bi. 0. 0 8 08
bk.	Glukosa 25 mM + 100µM GSH) (P3)	3	bm.	0. 0 3 0 3	bn. bo. 0. 0 2 04
bq.	Glukosa 25 mM + 300µM GSH) (P4)	3	bs.	0. 0 7 0 1	bt. bu. 0. 0 6 08
bw.	Glukosa 25 mM + 1000µM GSH) (P5)		by.	0. 0 8 9 3	bz. ca. 0. 0 8 cb. 0. 10

cc.

cd. Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar MDA pada kultur sel epitel lensa yang tampak dari perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar MDA. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok yang diberikan *glutathione* tampak penurunan dari kadar MDA jika dibandingkan dengan kontrol positif.



cf. **Gambar 5.1. Grafik Rerata Kadar MDA pada Kultur Sel Epithel Lensa Pada Kelompok Kontrol Negatif, Kelompok kontrol Positif dan Kelompok Perlakuan dengan Pemberian *Glutathione* (GSH).**
 cg. **K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, P1 : kelompok dengan glukosa 25 mM+GSH 10 µM, P2 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 30 µM, P3 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 100µM, P4 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 300 µM, P5 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 1000 µM**

ch.

ci. **5.7.2. Analisa statistik**

cj. Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan >2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Saphiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levenes test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova yaitu Kruskal Wallis.

ck.

cl. Uji Normalitas

cm. Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Saphiro wilk. Hasil uji normalitas dengan uji one *Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.000 yang berarti kurang dari α (0.05), maka data tidak berdistribusi normal.

cn.

co. Uji Homogenitas

cp. Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.000 yang kurang dari α (0.05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi kedua asumsi, yaitu tidak normal dan tidak homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti yaitu uji Kruskal Wallis. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 18. Hasil pengujian Kruskal Wallis adalah terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka MDA pada

masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney.

cr. **Pengujian Berganda (*Multiple Comparisons*)**

cs. Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Mann Whitney. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan yang berganda terhadap kadar MDA antara setiap kelompok dosis *glutathione* dan niasin, dengan hasil sebagai berikut.

ct. **cu. Tabel 5.5. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka MDA**

cv. Kelompok	cw. p-value
cx. Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH	dc. 0.046 <
cy. Glukosa 25 mM + 30 µM GSH	dd. 0.487 >
cz. Glukosa 25 mM + 100 µM GSH	de. 0.050 <
da. Glukosa 25 mM+ 300 µM GSH	df. 0.513 >
db. Glukosa 25 mM + 1000 µM GSH	dg. 0.513 >

dh. P –value < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan p-value >0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Kelompok kontrol positif berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 10 dan 100 dan tidak berbeda nyata dengan kelompok 30, 300, dan 1000. Kelompok perlakuan 300 berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 1000.

dj.

dk. Uji Korelasi

dl. Hasil uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* menunjukkan data dosis GSH dan data MDA tidak berdistribusi normal dengan nilai signifikansi masing-masing lebih kecil dari 0.05. Maka dilakukan uji korelasi spearman untuk melihat hubungan antara dosis GSH dengan data MDA. Angka koefisien korelasi menunjukkan hubungan yang positif atau searah, dapat dikatakan bahwa dosis GSH semakin tinggi, data MDA semakin tinggi. Koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 0.330, yang berarti hubungan antara dosis GSH dengan data MDA termasuk dalam rentang 0.20 – 0.40 yaitu kategori korelasi rendah (Arikunto, 2010).

dm.

dn.

do. Uji Pengaruh dosis GSH terhadap Angka MDA

dp. Uji pengaruh dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis *glutathione tereduksi* (GSH) terhadap kadar MDA.

dq.

dr. Uji Hipotesis (Uji-T)

ds. Hasil dari uji ini adalah variabel dosis GSH berpengaruh positif dan tidak signifikan terhadap variabel angka MDA. Koefisien yang positif menunjukkan jika variabel dosis GSH meningkat, maka akan meningkatkan variabel angka MDA sebesar 0.000012 angka.

dt.

du. Koefisien Determinasi (R²)

dv. Besarnya kontribusi dari variabel independen terhadap variabel dependen, berdasarkan hasil perhitungan pada tabel 5.7 dengan nilai koefisien determinasi (R Square) sebesar 0.003. Hasil tersebut menjelaskan kontribusi pengaruh variabel dosis GSH terhadap variabel angka MDA sebesar 0.3%, sedangkan 99.7% lainnya disumbangkan oleh variabel lainnya yang tidak dimasukkan ke dalam persamaan ini.

dw.

dx. 5.7.3. Data Hasil Pemeriksaan Kadar MDA dengan Pemberian Niasin

dy. Hasil rerata kadar MDA pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan niasin dengan 5 dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut.

dz.

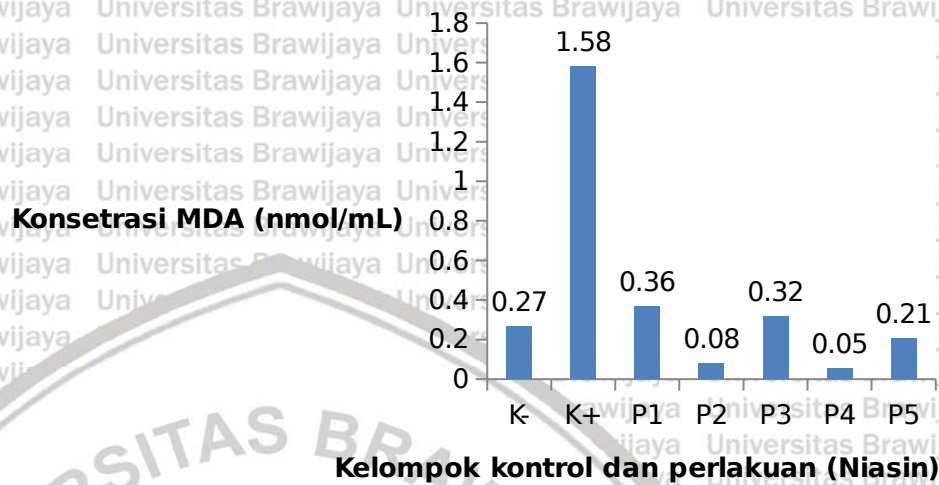
ea. Tabel 5.8. Rerata Kadar MDA pada Kultur Sel Epitel Lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan Niasin

eb. Kelompok	N	ed. Rata-rata	ee. Standar Error	ef. Minimum	eg. Maksimum
eh. Kontrol negatif (K-)	3	0.2656		0.12	0.45
eo. Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	1.5807		0.79	2.37
eu. Glukosa 25 mM + 12.5µM Niasin (P1)	3	0.336		0.15	0.72

			4			
			6			
fa. Glukosa 25 mM + 25 μM Niasin (P2)	3	fc.	0.0790		fd. fe. ff.	0.013
fg. Glukosa 25 mM + 50 μM Niasin (P3)	3	fi.	0.3169		fk. fl.	0.41
fm. Glukosa 25 mM + 100μM Niasin (P4)	3	fo.	0.0527		fp. fq. fr.	0.10
fs. Glukosa 25 mM + 200μM Niasin (P5)	3	fu.	0.2065		fv. fw. fx.	0.38

fy.

fz. Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar MDA pada kultur sel epitel lensa yang tampak dari perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar MDA. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok yang diberikan niasin tampak penurunan dari kadar MDA jika dibandingkan dengan kontrol positif.



ga.

gb. **Gambar 5.3. Grafik rerata kadar MDA pada Kultur Sel Epithel Lensa pada Kelompok Kontrol Negatif, Kelompok Kontrol Positif dan Kelompok Perlakuan dengan Pemberian Niasin.**

gc. **K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, P1 : kelompok dengan glukosa 25 mM+niasin 12.5µM, P2 : kelompok dengan glukosa 25 mM + niasin25µM, P3 : kelompok dengan glukosa 25 mM + niasin 50µM, P4 : kelompok dengan glukosa 25 mM + niasin 100µM, P5 : kelompok dengan glukosa 25 mM + niasin 200µM**

gd.

ge. **5.7.4. Analisa statistik**

gf. Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan >2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Saphiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene's test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova yaitu Kruskal Wallis.

gg.

gh.



gi.

gj. Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Saphiro wilk. Hasil uji normalitas dengan uji one *Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.000 yang berarti kurang dari α (0.05), maka data tidak berdistribusi normal.

gl.

gm. Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.000 yang kurang dari α (0.05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi kedua asumsi, yaitu tidak normal dan tidak homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti yaitu uji Kruskal Wallis.

Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 18. Hasil pengujian Kruskal Wallis adalah terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka MDA pada masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney.

go.

gp. Pengujian Berganda (*Multiple Comparisons*)

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Mann Whitney. Dengan metode ini akan dilakukan

pembandingan yang berganda terhadap kadar MDA antara setiap kelompok dosis *glutathione*.

gs. **Tabel 5.12. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka MDA**

gt. Kelompok	gu. P-value
gv. Glukosa 25 mM+ 12.5 μ M niasin	ha. 0.083 > α
gw. Glukosa 25 mM + 25 μ M niasin	hb. 0.083 > α
gx. Glukosa 25 mM + 50 μ M niasin	hc. 0.083 > α
gy. Glukosa 25 mM+ 100 μ M niasin	hd. 0.083 > α
gz. Glukosa 25 mM + 200 μ M niasin	he. 0.083 > α

hf.

hg. P –value < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan p-value >0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok kontrol positif tidak berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan 12,2, 25,50,100,200. Kelompok perlakuan 12.5 berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 25 dan 100.

hh.

hi. Uji Korelasi

hj. Hasil uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* menunjukkan data dosis niasin dan angka MDA tidak berdistribusi normal dengan nilai signifikansi masing-masing lebih kecil dari 0.05. Maka dilakukan uji pengganti korelasi spearman untuk melihat hubungan antara dosis niasin dengan data MDA. Angka koefisien korelasi menunjukkan hubungan yang negatif atau berbalik arah, dapat dikatakan bahwa dosis niasin semakin tinggi, data MDA semakin turun. Koefisien korelasi yang

diperoleh sebesar 0.389, yang berarti hubungan antara dosis niasin dengan data MDA termasuk dalam rentang 0.20 – 0.40 yaitu kategori korelasi rendah (Arikunto, 2010).

hk.

hl.

hm.

hn. Uji Pengaruh Niasin dan angka MDA

ho. Uji pengaruh dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis.

hp.

hq. Uji Hipotesis (uji-t)

hr. Hasil dari uji ini adalah variabel dosis niasin berpengaruh negatif dan tidak signifikan terhadap variabel angka MDA. Koefisien yang negatif menunjukkan jika variabel dosis niasin meningkat, maka akan menurunkan variabel angka MDA sebesar 0.002 angka.

hs.

ht. Koefisien Determinasi (R^2)

hu. Kontribusi pengaruh variabel dosis niasin terhadap variabel angka MDA sebesar 9.4%, sedangkan 90.6% lainnya disumbangkan oleh variabel lainnya yang tidak dimasukkan ke dalam persamaan ini.

hv.

hw.5.8. Pembahasan Penelitian Tahap I



hx. Penelitian pemberian *glutathione tereduksi* (GSH) pada sel kultur lensa dengan medium glukosa tinggi menunjukkan bahwa dengan pemberian lima dosis *glutathione* yang berbeda terdapat penurunan kadar MDA pada semua kelompok jika dibandingkan dengan kontrol positif. Pada dosis 10 μM dan 100 μM terdapat perbedaan yang signifikan dibandingkan kontrol positif.

hy. Penelitian bahwa GSH dapat menurunkan kadar MDA tersebut sesuai dengan teori bahwa *Glutathione tereduksi* (GSH) berfungsi sebagai antioksidan dalam detoksifikasi produk yang terbentuk dari oksidasi lemak yang dipicu oleh ROS seperti *malonyl dialdehyde* dan *4-hydroxy-2-honenal* dan kemungkinan produk ROS lainnya yang berinteraksi dengan komponen seluler. Radikal *thiyl* yang terbentuk dari reaksi ini dapat bergabung dengan molekul lain dan membentuk GSSG. GSH juga dapat berkonjugasi dengan banyak komponen elektrofilik ketika elektrofil menjadi reaktif melalui aksi dari GST (Aquilano, 2014; Strange, 2000). Beberapa metabolit toksik yang diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme normal juga dapat bereaksi dengan GSH, sebagai contohnya adalah *methylglyoxal*, produk enzimatis, maupun non enzimatis yang didapatkan dari jalur glikolitik (Martins, 2001; Inagi, 2010).

hz. Kondisi khusus yang dapat mempengaruhi kadar GSH di dalam sel lensa adalah hiperglikemia kronis. Peningkatan kadar glukosa kronis pada penyakit diabetes mellitus memainkan peranan penting dalam terjadinya katarak yang kemungkinan juga berhubungan dengan penurunan kadar GSH di dalam lensa. Pada kondisi diabetes, terjadi peningkatan stres oksidatif lebih banyak daripada yang dialami pada kondisi penuaan, hal ini tampak pada penelitian oleh Moemen

bahwa kadar plasma *Malondialdehyde* (MDA) meningkat lebih tinggi pada pasien katarak diabetika dibandingkan katarak senilis (Moemen, 2014).

ia. Penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar MDA pada kondisiglukosa yang tinggi yang ditunjukkan oleh peningkatan kadar MDA pada kontrol positif yang sesuai dengan teori di atas bahwa hiperglikemia dapat menyebabkan stress oksidatif. Dari seluruh kelompok yang diberikan terapi *glutathione* terjadi penurunan MDA, dan untuk penelitian selanjutnya dipilih tiga dosis yang dianggap paling optimal yaitu dosis 10 μ M, 30 μ M, dan 100 μ M.

ib. Pada tahap ini juga diteliti tentang pengaruh pemberian niasin terhadap kadar MDA pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi dan menentukan tiga dosis optimal dari lima dosis yang diberikan dan akan digunakan pada penelitian tahap selanjutnya yang akan dikombinasi dengan pemberian GSH.

ic. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa bahwa terjadi kenaikan kadar MDA pada kontrol positif dibandingkan dengan kontrol negatif. Pemberian lima dosis niasin yang berbeda menyebabkan terjadinya penurunan kadar MDA pada semua kelompok jika dibandingkan dengan kontrol positif. Berdasarkan penghitungan angka koefisien korelasi didapatkan bahwa dengan semakin tingginya dosis niasin maka kadar MDA semakin rendah.

id. Studi klinis yang dilakukan oleh beberapa peneliti memang membuktikan bahwa asupan niasin yang tinggi dapat menurunkan prevalensi terjadinya katarak nuklearis dengan *odd ratio* 0.6 (95% CI, 0,4-0,9) (Cumming, 2000). Penelitian yang serupa di China dengan subyek penelitian sebanyak 3249 orang dengan usia 45-74

tahun selama kurun waktu 5-6 tahun juga menunjukkan hasil yang serupa dimana didapatkan prevalensi katarak nuklearis yang lebih rendah pada subyek yang mengkonsumsi ribovlafin/niasin dibandingkan dengan yang tidak mengkonsumsinya. Pada kelompok usia 65-74 tahun terjadi penurunan prevalensi sebesar 44% terhadap munculnya katarak nuklearis.

ie. Belum didapatkan penelitian pemberian niasin terhadap kultur sel epitel lensa seperti pada penelitian ini, namun dengan adanya penurunan kadar MDA setelah pemberian niasin menunjukkan bahwa niasin dapat mencegah proses pembentukan katarak dengan berfungsi sebagai antioksidan. Penelitian ini juga didukung oleh penelitian Abdullah et al yang menunjukkan adanya penurunan kadar MDA pada *Human Serum Albumin* (HAS) terglikasi yang diberi niasin. Dari penelitian ini dapat ditunjukkan bahwa niasin dapat sebagai pencegah pembentukan ROS yang terbentuk karena proses glikasi dan menghambat kerusakan DNA yang diharapkan dapat berguna dalam mencegah diabetes (Abdullah, 2017).

if. Analisa pengaruh dosis GSH dan niasin menunjukkan hasil bahwa kenaikan dosis GSH tidak berbanding lurus dengan penurunan kadar MDA, sedangkan untuk niasin, semakin tinggi dosis niasin dapat semakin menurunkan kadar MDA.

ig.

ih. Kesimpulan tahap I

1. Terdapat penurunan kadar MDA pada seluruh kelompok yang diberikan GSH.
2. Tiga dosis GSH yang dianggap paling optimal yaitu dosis 10 μM , 30 μM , dan 100 μM dan akan digunakan pada penelitian tahap II.
3. Terdapat penurunan kadar MDA pada seluruh kelompok yang diberikan niasin.
4. Tiga dosis niasin yang dianggap paling optimal yaitu dosis 25 μM , 100 μM , dan 200 μM dan akan digunakan pada penelitian tahap II.





BAB VI
PENELITIAN TAHAP II
PENGARUH PEMBERIAN *GLUTATHIONE* TEREDUKSI (GSH) DAN NIASIN
TERHADAP PROSES TERJADINYA KATARAK PADA KONDISI
HIPERGLIKEMIA MELALUI JALUR STRESS OKSIDATIF DAN *UNFOLDED*
PROTEIN RESPONSE (UPR)

6.1. Latar Belakang

Glutathione tereduksi (GSH) merupakan tripeptida anion yang merupakan antioksidan dan yang penting di dalam lensa dan berfungsi untuk mempertahankan protein thiol tetap dalam keadaan tereduksi (Lou, 2003; Truscott, 2005). Kadar GSH tinggi pada epitel maupun korteks lensa bagian luar dan disintesa dari asam amino *cysteine*, *glutamate*, serta *glycine* oleh *g-glutamyl L cysteine synthetase* dan *glutathione synthetase*. Dibagian lingkungan luar sel serat lensa dipertahankan dengan cara regenerasi GSH dan GSSG oleh enzim *glutathione reductase* dengan menggunakan NADPH yang diproduksi melalui jalur hexokinase sebagai kofaktornya (Lou, 2003; Truscott, 2005). Kadar GSH adalah 80-90% lebih rendah didalam nucleus lensa, begitu pula dengan aktivitas enzim yang terkait sintesis dan regenerasi GSH. Perbedaan kadar GSH ini akan semakin nyata dengan bertambahnya usia. Karena penuaan, terjadi reduksi kadar GSH di dalam nukleus dan menyebabkan peningkatan GSSG sehingga terjadi oksidasi dari residu protein *cysteine* dan *methionine* dan pembentukan protein *mixed disulfides (PSSG)* sehingga lensa akan kehilangan kejernihannya (Lou, 2003; Truscott, 2005).

Glutathione tereduksi (GSH) berfungsi sebagai substrat pada reaksi enzimatik yang menyediakan donor elektron untuk molekul yang tidak stabil dan reaktif (Holm, 2013) dan juga berperan untuk melindungi grup *thiol* pada membran protein dan kristalin intraseluler dari modifikasi post translasi yang menyebabkan *cross linking* (Holm, 2013).

Glutathione teroksidasi (GSSH) bereaksi secara non enzimatik dengan grup protein *thiol* untuk membentuk protein GSH (PSSG) yang bercampur dengan *disulfide* yang berfungsi sebagai penyimpanan GSH dan melindungi dari terjadinya *disulfide cross linking of proteins* (PSSP) (Holm, 2013). Peningkatan *disulfide-linkages* menyebabkan terjadinya agregasi protein dengan berat molekul tinggi dan secara langsung akan menyebabkan gangguan kejernihan lensa (Holm, 2013; Liang, 2000).

Glutathione tereduksi (GSH) ditemukan dalam konsentrasi yang tinggi dalam lensa dan memainkan peranan penting dalam melindungi lensa dengan cara detoksifikasi obat – obatan, menurunkan ROS dan peroksida, termasuk disulfida dan radikal bebas. GSH membantu mempertahankan status *thiol-disulfida* dari sel, transport asam amino melalui siklus *gamma glutamyl*, dan membuang *elektrofili xenobiotik* dari sel (Mathew, 2006).

Telah diketahui bahwa kadar GSH yang rendah pada lensa yang mengalami katarak dapat disebabkan oleh sinar Ultra Violet (UV), kandungan zat toksik, gangguan metabolik, penuaan, ataupun defek genetik/bawaan (Mathew, 2006). Kondisi hiperglikemik seringkali dihubungkan juga dengan terjadinya katarak, dan beberapa penelitian pada hewan coba menunjukkan hasil bahwa terdapat hubungan

antara kadar GSH lensa yang rendah dengan katarak yang tereduksi oleh galaktosa (Gao, 2011).

Suplementasi GSH terhadap lensa kemungkinan dapat membantu mempertahankan kemampuan protektifnya dalam menghadapi stres oksidatif dan dianggap dapat menghambat penurunan aktivitas antioksidan lensa pada kondisi penuaan dan diharapkan dapat menghambat munculnya katarak (Zhang, 2008).

Karena pentingnya peranan GSH ini maka saat ini dikembangkan beberapa penelitian tentang bagaimana cara meningkatkan kadar GSH dalam sel sehingga dapat mencegah terjadinya katarak.

Pada kondisi hiperglikemia kronis seperti diabetes melitus, didapatkan penurunan kadar GSH yang disebabkan oleh penurunan sintesisnya maupun regenerasi dari GSSG karena kofaktor NADPH digunakan dalam perubahan glukosa menjadi sorbitol. Penurunan GSH ini dianggap dapat meningkatkan stres oksidatif yang dapat memicu timbulnya katarak.

6.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang tersebut di atas, yang menjadi masalah utama penelitian ini adalah :

Apakah *Glutathion* tereduksi (GSH) maupun niasin dapat mencegah terjadinya katarak melalui hambatan terjadinya stres oksidatif dan stress *retikulum endoplasma* pada kultur sel epitel lensa dengan medium glukosa tinggi?

6.3. Sub Masalah

Untuk menjawab rumusan masalah di atas, maka perlu dijabarkan dengan menjawab beberapa masalah yang terkait sebagai berikut :

1. Apakah terdapat penurunan kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC) dan GRP78/Bip pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan GSH dengan yang tidak mendapatkannya?
2. Dosis niasin manakah yang dapat menurunkan kadar PCC dan GRP 78/BiP secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?
3. Apakah terdapat penurunan kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC) dan GRP78/Bip pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi yang mendapatkan niasin dengan yang tidak mendapatkan?
4. Dosis niasin manakah yang dapat menurunkan kadar PCC dan GRP 78/BiP secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?

6.4. Tujuan Penelitian

6.4.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian GSH maupun niasin terhadap kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC) dan GRP78/Bip pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?

6.4.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui adanya penurunan kadar protein carbonyl content (PCC), GRP/Bip 78 pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan GSH dengan yang tidak mendapatkan GSH.

2. Untuk mengetahui dosis GSH yang diperlukan untuk menurunkan kadar PCC dan GRP78 secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.
3. Untuk mengetahui penurunan kadar protein carbonyl content (PCC), GRP/Bip 78 pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi yang mendapatkan niasin dengan yang tidak mendapatkan.
4. Untuk mengetahui dosis niasin yang diperlukan untuk menurunkan kadar PCC dan GRP78 secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.

6.4. Metode Penelitian

6.4.1. Waktu Penelitian

Maret 2018 – Juni 2018

6.4.2. Tempat Penelitian

Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

6.4.3. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah sel kultur epitel lensa dari *cell line* (HLEB3) yang didapatkan dari ATCC.

6.4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis *Glutathione* (GSH) maupun niasin yang diberikan pada kultur sel epitel lensa dengan kondisi hiperglikemia.

6.4.5. Prosedur Pemeriksaan

6.4.5.1. Perlakuan Kultur Sel Epitel Lensa

Kultur sel epitel lensa terbagi menjadi kelompok kontrol, kelompok kontrol dengan medium glukosa tinggi (tanpa perlakuan) dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi. Medium glukosa tinggi didapatkan dengan cara menambahkan glukosa sebanyak 25 mM pada medium MEM tanpa glukosa (Raju, 2013). Pada kelompok kultur sel epitel lensa yang mendapat perlakuan, dibagi menjadi 3 kelompok yang masing-masing dipapar dengan *glutathione* dengan 3 dosis yang ditentukan dari penelitian tahap I (10 μ M, 30 μ M, dan 100 μ M).

Glutathione tereduksi (GSH) didapatkan dari *standard stock solution* (100 mM) yang dibuat dengan melarutkan 3.07 gram GSH ke dalam larutan 0.2 M EDTA dengan volume akhir 100 ml. Kemudian dilarutkan dalam medium kultur, selama 72 jam (inkubasi) untuk pemeriksaan kadar PCC dan GRP78/BiP. Setelah 24 jam, medium diambil dan sel ditripsin selama 7 menit dengan tujuan supaya sel lepas.

Niasin didapatkan dari *standard stock solution* (100 μ g/mL) yang dibuat dengan melarutkan 50 mg dried niasin ke dalam 25% ethanol hingga volume akhir mencapai 500 mL. Dengan *standard stock solution* ini akan didapatkan niasin sebesar 0.81 mM. Kemudian dilarutkan dalam medium kultur, selama 72 jam (inkubasi) untuk pemeriksaan kadar MDA.

Kemudian sel disentrifuge 2000 rpm selama 7 menit, dan diberikan RIPA *buffer* agar sel pecah selama 20 menit pada suhu 37°C. Disentrifus ulang 2000rpm selama 7 menit, dan supernatan diambil. Melakukan pengukuran kadar protein, dan dilanjutkan dengan pengukuran kadar PCC dan GRP78/BiP pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan menggunakan metode ELISA untuk PCC dan GRP78/BiP.

6.4.5.2. Metode Pengukuran PCC dengan ELISA

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.10.3

6.4.5.3. Metode Pengukuran GRP 78/Bip dengan ELISA

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.10.4

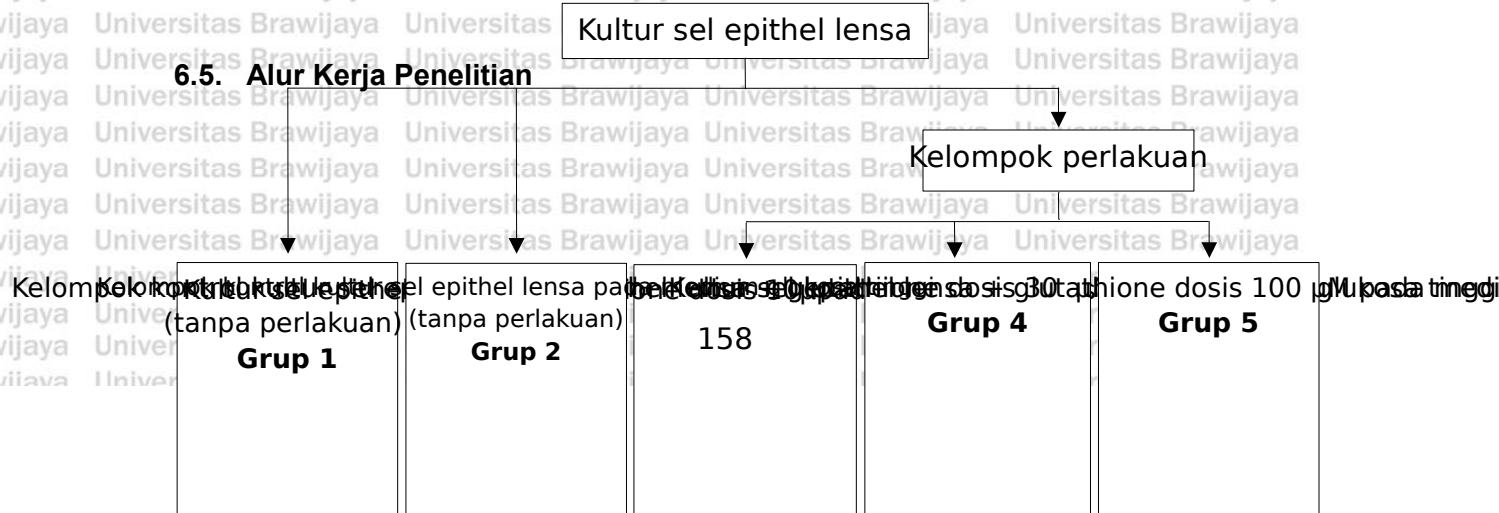
6.4.5.4. Metode Pengukuran formasi AGE dengan ELISA

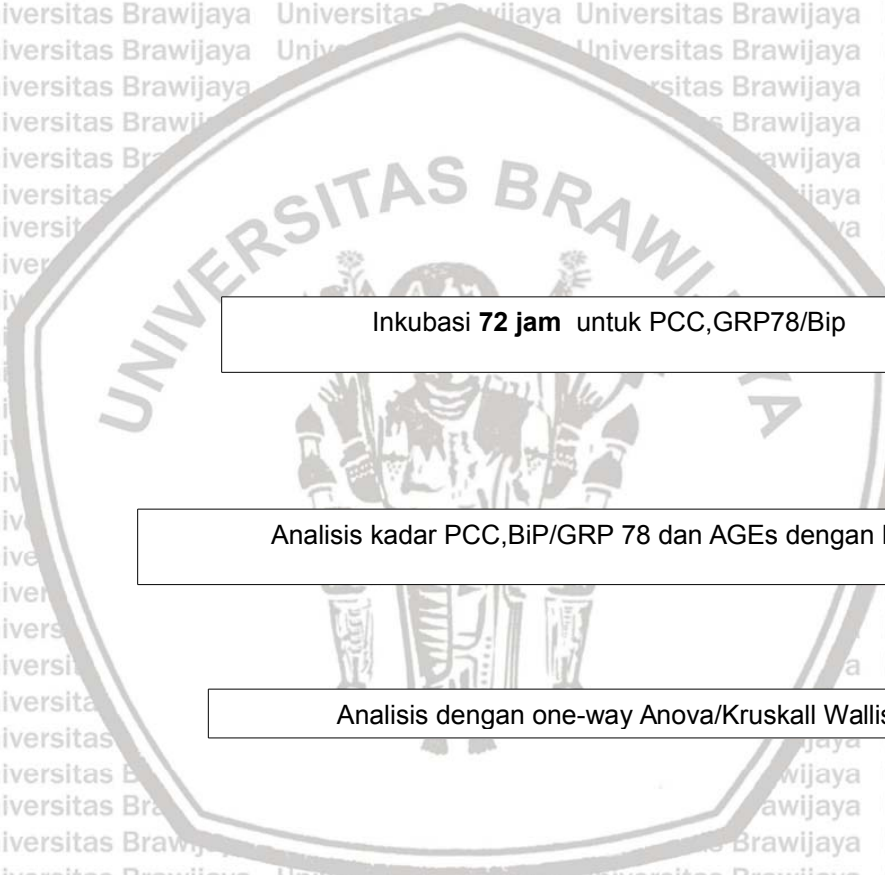
Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.10.5

6.4.5.5. Metode Pengukuran polimerisasi α kristalin dengan western blotting

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.10.6

6.5. Alur Kerja Penelitian





Inkubasi **72 jam** untuk PCC,GRP78/Bip

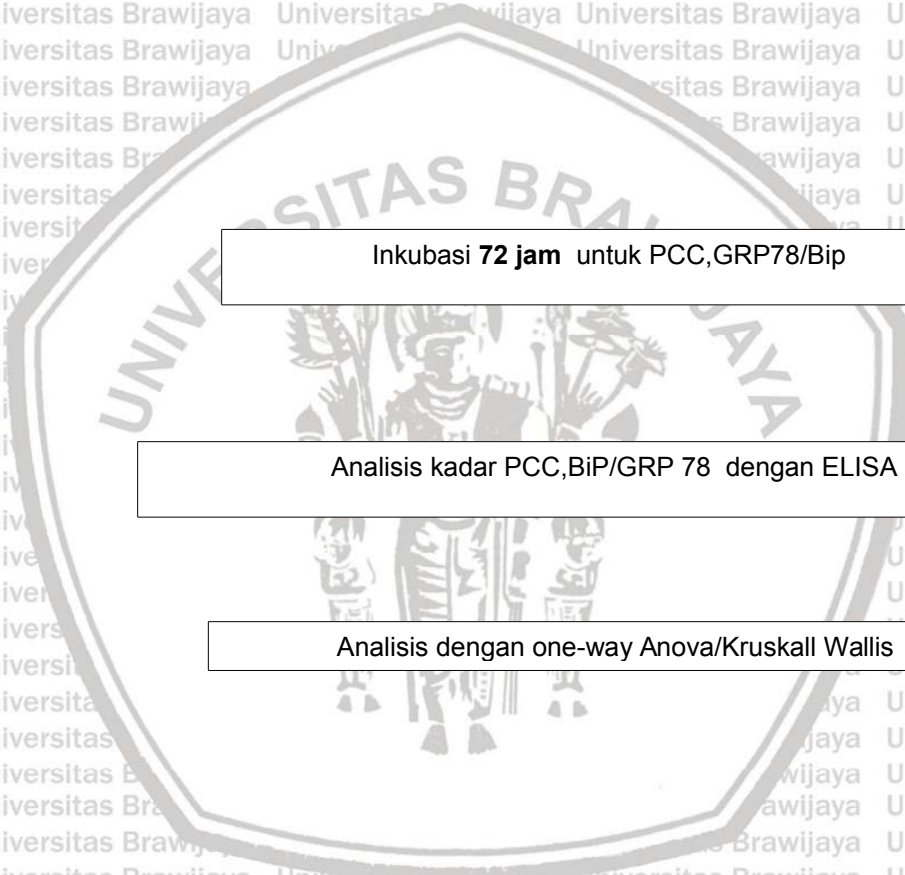
Analisis kadar PCC,BiP/GRP 78 dan AGEs dengan ELISA

Analisis dengan one-way Anova/Kruskall Wallis

Kultur sel epitel lensa

Kelompok perlakuan

Kelompok kultur sel epitel lensa pada kondisi kontrol (tanpa perlakuan)	Kelompok kultur sel epitel lensa pada kondisi kontrol (tanpa perlakuan)	Kelompok kultur sel epitel lensa pada kondisi kontrol (tanpa perlakuan)	Kelompok kultur sel epitel lensa pada kondisi kontrol (tanpa perlakuan)	Kelompok kultur sel epitel lensa pada kondisi kontrol (tanpa perlakuan)
Grup 1	Grup 2	159	Grup 4	Grup 5



Inkubasi **72 jam** untuk PCC,GRP78/Bip

Analisis kadar PCC,BiP/GRP 78 dengan ELISA

Analisis dengan one-way Anova/Kruskall Wallis

6.6. Analisa Data

Data yang telah didapatkan dianalisa menggunakan program SPSS 18 for Windows. Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji Kolmogorof Smirnov, dan

untuk mengetahui homogenitas varians data variabel dilakukan uji *Levene test*. Uji One-Way Anova dilakukan untuk mengetahui adakah perbedaan kadar parameter yang diteliti, diantara masing-masing kelompok. Apabila dari hasil uji Anova didapatkan perbedaan kadar parameter yang diteliti (PCC, GRP 78/BiP) yang bermakna, maka dilanjutkan uji Post Hoc Tukey untuk mengetahui antara kelompok mana yang terdapat perbedaan. Sedangkan untuk mengetahui pengaruh *glutathione* terhadap kadar PCC, Bip/GRP 78 dapat menggunakan uji regresi dan korelasi.

6.7 Hasil dan Analisa Penelitian Tahap II

Penelitian kultur sel epitel lensa dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Kultur sel epitel lensa yang disebut HLE B3 didapatkan dari *American Type Culture Collection (ATCC)* University Boulevard Manassas, VA 20110 USA. Waktu penelitian dari bulan Januari-Mei 2018. Hasil penelitian berupa 15 sampel yang diambil dari 24 *well* yang terdiri atas 5 kelompok. Kelompok pertama merupakan kontrol negatif, yang tidak mendapat perlakuan. Sedangkan kelompok kedua merupakan kedua merupakan kontrol positif (K+) yang diberikan tambahan glukosa 25 mM pada medium untuk membuat kondisi hiperglikemia. Tiga kelompok selanjutnya adalah kelompok dengan medium glukosa tinggi (25 mM) dan mendapatkan perlakuan pemberian *glutathione* sebanyak 10 μM , 30 μM , 100 μM . Pada masing-masing kelompok dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Sampel kemudian diinkubasi selama 72 jam dan viabilitas sel diperiksa dalam waktu 3,24,48, dan 72 jam setelah diberi perlakuan.

Kontrol negatif dalam penelitian ini digunakan untuk acuan menghitung dosis efektif (ED).

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan *Protein Carbonyl Content* (PCC) dengan menggunakan metoda ELISA. Data yang didapatkan dianalisa dengan menggunakan program SPSS 18 for windows.

6.7.1. Data Hasil Pemeriksaan Kadar PCC dengan Pemberian GSH

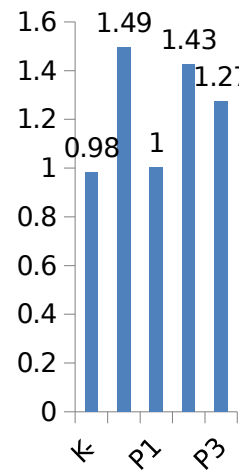
Hasil rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan *glutathione* (GSH) dengan tiga dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut.

Tabel 6.1. Rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi dan diberikan glutathion.

Kelompok	N	Rata-rata	Standar Eror	Minimu m	Maximu m
Kontrol negatif (K-)	3	.9827	.28521	.41	1.29
Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	1.4950	.13795	1.32	1.77
Glukosa 25 mM + 10 µM GSH) (P1)	3	1.0037	.26704	1.50	1.40
Glukosa 25 mM + 30µM GSH) (P2)	3	1.4263	.04092	1.35	1.48
Glukosa 25 mM + 100µM GSH) (P3)	3	1.2733	.12604	1.05	1.48

Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar PCC pada kultur sel epitel lensa yang tampak dari perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar PCC. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok yang diberikan *glutathione* tampak penurunan dari kadar PCC jika dibandingkan dengan kontrol positif.

Protein Carbonyl Content (PCC) (nmol/mL)



Kelompok kontrol dan Perlakuan (GSH)

Gambar 6.1. Grafik rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian *glutathione* (GSH).

K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, P1 : kelompok dengan glukosa 25 mM+GSH 10 µM, P2 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 30 µM, P3 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 100µM.

6.7.2. Analisa statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan >2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Saphiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene's test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova yaitu Kruskal Wallis.

Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Saphiro-wilk. Hasil uji normalitas dengan uji one *Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.041 yang berarti kurang dari α (0.05), maka data tidak berdistribusi normal.

Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.025 yang kurang dari α (0.05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi kedua asumsi, yaitu tidak normal dan tidak homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti yaitu uji Kruskal Wallis. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 19. Hasil pengujian Kruskal Wallis adalah terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka PCC pada masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney.

Pengujian Berganda (*Multiple Comparisons*)

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Mann. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan yang berganda terhadap kadar PCC antara setiap kelompok dosis *glutathione* dan antara kelompok *glutathion* kombinasi niasin dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 6.2. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka PCC

Kelompok	P value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH	0.184 > α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH	0.827 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH	0.275 > α

P –value < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan p-value >0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok kontrol positif tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 10,30 dan 100.

Uji Korelasi

Hasil uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* menunjukkan data dosis GSH dan data PCC tidak berdistribusi normal dengan nilai signifikansi masing-masing lebih kecil dari 0.05. Maka dilakukan uji korelasi spearman untuk melihat hubungan antara dosis GSH dengan data PCC. Angka koefisien korelasi menunjukkan hubungan yang negatif atau berbalik arah, dapat dikatakan bahwa dosis GSH semakin tinggi, data PCC semakin turun. Koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 0.108, yang berarti hubungan antara dosis GSH dengan data PCC termasuk dalam rentang 0.00 – 0.20 yaitu kategori korelasi sangat rendah (Arikunto, 2010).

Uji Pengaruh Dosis GSH terhadap Kadar PCC

Uji pengaruh merupakan uji yang dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis *Glutathione* (GSH) terhadap kadar PCC.

Uji Hipotesis (Uji-t)

Hasil dari uji ini adalah variabel dosis GSH berpengaruh negatif dan tidak signifikan terhadap variabel angka PCC. Koefisien yang negatif menunjukkan jika variabel dosis GSH meningkat, maka akan menurunkan variabel angka PCC sebesar 0.0003 angka.

Koefisien Determinasi (R²)

Kontribusi pengaruh variabel dosis GSH terhadap variabel angka PCC sebesar 0.1%, sedangkan 99.9% lainnya disumbangkan oleh variabel lainnya yang tidak dimasukkan ke dalam persamaan ini.

6.7.3 Data Hasil Pemeriksaan Kadar GRP78 dengan pemberian GSH

Hasil rerata kadar GRP78 pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan *Glutathione* (GSH) dengan tiga dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut 6.8.

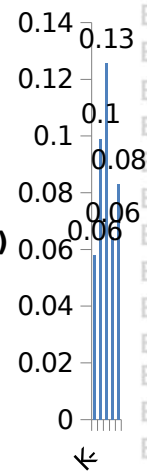
Tabel 6.3. Rerata Kadar GRP78 pada Kultur Sel Epitel lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan *Glutathione*.

Kelompok	N	Rata-rata	Standar Error	Minimum	Maximum
Kontrol negatif (K-)	3	.0580	.28521	.05	.06
Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	.0990	.13795	.08	.12
Glukosa 25 mM + 10 μM GSH)	3	.1257	.26704	.12	.13

(P1)	3	.0643	.04092	.06	.07
Glukosa 25 mM + 30µM GSH)					
(P2)	3	.0830	.12604	.07	.09
Glukosa 25 mM + 100µM GSH)					
(P3)					

Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar GRP78 pada kultur sel epitel lensa yang tampak dari perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar PCC. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok yang diberikan *glutathione* tampak penurunan dari kadar GRP78 jika dibandingkan dengan kontrol positif.

Kadar Glucose Reactive Protein (GRP78) (nmol/mL)



Kelompok kontrol dan perlakuan (GSH)

Gambar 6.2. Grafik rerata kadar GRP78 pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian *glutathione* (GSH).

K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, P1 : kelompok dengan glukosa 25 mM+GSH 10 µM, P2 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 30 µM, P3 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 100µM.

6.7.4 Analisa statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan >2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Saphiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene's test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova yaitu Kruskal Wallis.

Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Saphiro wilk. Hasil uji normalitas dengan uji one *Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.109 yang berarti lebih besar dari α (0.05), maka data berdistribusi normal.

Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.019 yang kurang dari α (0.05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi kedua asumsi, yaitu normal namun tidak homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti yaitu uji Kruskal Wallis. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 19. Hasil pengujian Kruskal Wallis adalah terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka GRP78 pada

masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney.

Pengujian Berganda (*Multiple Comparisons*)

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji pembandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Mann Whitney. Dengan metode ini akan dilakukan pembandingan yang berganda terhadap kadar GRP78 antara setiap kelompok dosis *glutathione* dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 6.4. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH	0.072 > α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH	0.050 < α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH	0.275 > α

P –value < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan p-value >0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok kontrol positif tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 10 dan 100. Kelompok kontrol positif berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 30.

Uji Korelasi

Hasil uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* menunjukkan data angka GRP berdistribusi normal dengan nilai signifikansi lebih besar dari 0.05, tetapi data dosis GSH tidak berdistribusi normal dengan nilai signifikansi lebih kecil dari 0.05. Maka

dilakukan uji pengganti korelasi spearman untuk melihat hubungan antara dosis GSH dengan data GRP. Angka koefisien korelasi menunjukkan hubungan yang negatif atau berbalik arah, dapat dikatakan bahwa dosis GSH semakin tinggi, data GRP semakin turun. Koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 0.466, yang berarti hubungan antara dosis GSH dengan data GRP termasuk dalam rentang 0.40 – 0.60 yaitu kategori korelasi agakrendah (Arikunto, 2010).

Uji Pengaruh dosis GSH terhadap Kadar GRP78

Uji pengaruh merupakan uji yang dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis *glutathione* terhadap kadar GRP78.

Uji hipotesis (uji-t)

Hasil dari uji ini adalah variabel dosis GSH berpengaruh negatif dan tidak signifikan terhadap variabel angka GRP. Koefisien yang negatif menunjukkan jika variabel dosis GSH meningkat, maka akan menurunkan variabel angka GRP sebesar 0.00025 angka.

Koefisien Determinasi (R²)

Kontribusi pengaruh variabel dosis GSH terhadap variabel angka GRP sebesar 15.9%, sedangkan 84.1% lainnya disumbangkan oleh variabel lainnya yang tidak dimasukkan ke dalam persamaan ini.

6.7.5. Data Hasil Pemeriksaan Kadar PCC dengan Pemberian Niasin

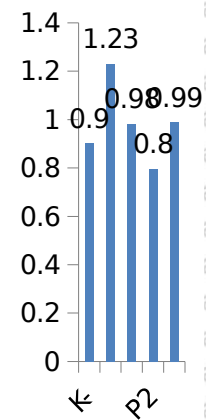
Hasil rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan niasin dengan 3 dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut.

Tabel 6.5. Rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi dan diberikan niasin.

Kelompok	N	Rata-rata	Standar Error	Minimum	Maximum
Kontrol negatif (K-)	3	0.9020	.00600	0.80	0.96
Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	1.2310	.01266	1.07	1.54
Glukosa 25 mM + 25 µM Niasin (P2)	3	0.9820	.00376	0.86	1.07
Glukosa 25 mM + 100µM Niasin (P4)	3	0.7297	.00493	0.67	0.78
Glukosa 25 mM + 200µM Niasin (P5)	3	0.9887	.02204	0.73	1.22

Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar PCC pada kultur sel epitel lensa yang tampak dari perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar PCC. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok yang diberikan niasin tampak penurunan dari kadar PCC jika dibandingkan dengan kontrol positif.

Kadar Protein carbonyl Content (PCC) (nmol/mL)



Kelompok kontrol dan Perlakuan (niasin)

Gambar 6.3. Grafik rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian niasin.

K- : kelompok kontrol negatif, **K+** : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, **P1** : kelompok dengan glukosa 25 mM+niasin 25 µM, **P2** : kelompok dengan glukosa 25 mM + niasin 100 µM, **P3** : kelompok dengan glukosa 25 mM + niasin 100 µM.

Berdasarkan tabel tersebut, dapat terlihat bahwa rata-rata angka PCC tertinggi pada perlakuan K+ sebesar 1.23 ± 0.265 , dan rata-rata angka PCC terendah pada perlakuan niasin 100µm yaitu sebesar 0.730 ± 0.054 . Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata angka PCC antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik oneway anova, tetapi terlebih dahulu diuji normalitas dan homogenitasnya.

6.7.6. Analisa statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan >2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji *Saphiro Wilk*, dan uji homogenitas untuk

melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene's test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova yaitu Kruskal Wallis.

Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Saphiro wilk. Hasil uji normalitas dengan uji one *Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.178 yang berarti lebih dari α (0.05), maka data berdistribusi normal.

Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.085 yang lebih dari α (0.05) membuktikan ragam data homogen. Karena data yang digunakan memenuhi kedua asumsi, yaitu normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian dengan one way anova. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 19. Hasil pengujian One Way Anova terdapat perbedaan yang tidak signifikan rata-rata angka PCC pada masing-masing perlakuan. Terlihat dari rata-rata antar perlakuan yang tidak terlalu jauh pada tabel tersebut dan tidak dilakukan uji lanjutan.

Uji Korelasi

Hasil uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* menunjukkan data PCC berdistribusi normal dengan nilai signifikansi lebih besar dari 0.05, tetapi data dosis niasin tidak berdistribusi normal dengan nilai signifikansi lebih kecil dari 0.05. Maka dilakukan uji korelasi spearman untuk melihat hubungan antara dosis niasin dengan data PCC.

Angka koefisien korelasi menunjukkan hubungan yang negatif atau berbalik arah, dapat dikatakan bahwa dosis niasin semakin tinggi, data PCC semakin rendah. Koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 0.478, yang berarti hubungan antara data dosis niasin dengan data PCC termasuk dalam rentang 0.40 – 0.60 yaitu kategori korelasi agak rendah (Arikunto, 2010).

Uji Pengaruh Dosis Niasin terhadap Angka PCC

Untuk selanjutnya dilakukan analisis regresi yang berguna untuk mendapatkan pengaruh variabel terhadap variabel. Dalam pengolahan data dengan menggunakan analisis regresi linier sederhana, dilakukan beberapa tahapan untuk mencari pengaruh antara variabel independen terhadap dependen. Berdasarkan hasil pengolahan data dengan menggunakan *software* SPSS 18. Pengujian model regresi ini digunakan untuk mengetahui apakah variabel independen memiliki pengaruh yang signifikan terhadap variabel dependen menggunakan uji t.

Uji Hipotesis (Uji-T)

Hasil dari uji ini adalah variabel dosis niasin berpengaruh negatif dan tidak signifikan terhadap variabel angka PCC. Koefisien yang negatif menunjukkan jika variabel dosis niasin meningkat 1 angka, maka akan menurunkan variabel angka PCC sebesar 0.001ng/ml.

Koefisien Determinasi (R²)

Kontribusi pengaruh variabel dosis niasin terhadap variabel angka PCC sebesar 10.9%, sedangkan 89.1% lainnya disumbangkan oleh variabel lainnya yang tidak dimasukkan ke dalam persamaan ini.

6.7.7. Data Hasil Pemeriksaan Kadar GRP78 dengan Pemberian Niasin

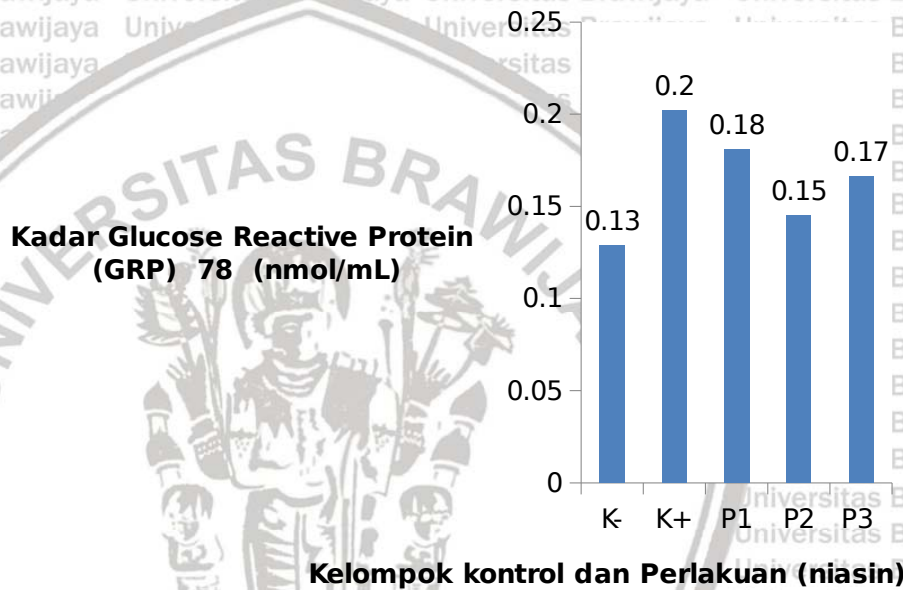
Hasil rerata kadar GRP78 pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan niasin dengan 3 dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut.

Tabel 6.6. Rerata kadar GRP78 pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi dan diberikan niasin.

Kelompok	N	Rata-rata	Standar Eror	Minimu m	Maximu m
Kontrol negatif (K-)	3	0.1287	.01438	0.10	0.14
Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	0.2020	.01136	0.18	0.22
Glukosa 25 mM + 25 µM Niasin (P2)	3	0.1810	.01800	0.14	0.20
Glukosa 25 mM + 100µM Niasin (P4)	3	0.1450	.00404	0.14	0.15
Glukosa 25 mM + 300 µM Niasin (P5)	3	0.1660	.00945	0.15	0.18

Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar GRP pada kultur sel epitel lensa yang tampak dari perbandingan

antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar GRP. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok perlakuan yang diberikan niasin 25, 100, dan 200 tampak penurunan dari kadar GRP jika dibandingkan dengan kontrol positif.



Gambar 6.4. Grafik rerata kadar GRP pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian niasin.

K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, P1 : kelompok dengan glukosa 25 mM+niasin 25 µM, P2 : kelompok dengan glukosa 25 mM + niasin 100 µM, P3 : kelompok dengan glukosa 25 mM + niasin 100 µM.

6.7.8. Analisa statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan > 2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Saphiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene's

test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova yaitu Kruskal Wallis.

Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Saphiro wilk. Hasil uji normalitas dengan uji one *Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.940 yang berarti lebih besar dari α (0.05), maka data berdistribusi normal.

Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.124 yang lebih besar dari α (0.05) membuktikan ragam data homogen. Karena data yang digunakan normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian dengan menggunakan One Way Anova terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka GRP pada masing-masing perlakuan. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji tukey 5% .

Pengujian Berganda (*Multiple Comparisons*)

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Tukey 5%. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan yang

berganda terhadap kadar GRP antara setiap kelompok dosis niasin, dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 6.7. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 25 µM niasin	0.752 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM niasin	0.053 > α
Glukosa 25 mM + 200 µM niasin	0.308 > α

P –value < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan p-value >0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh kelompok kontrol positif tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif, dan kelompok perlakuan 25 dan 200. Kelompok kontrol positif berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 100.

Uji Korelasi

Hasil uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* menunjukkan data GRP berdistribusi normal dengan nilai signifikansi lebih besar dari 0.05, tetapi data dosis niasin tidak berdistribusi normal dengan nilai signifikansi lebih kecil dari 0.05. Maka dilakukan uji korelasi spearman untuk melihat hubungan antara dosis niasin dengan data GRP. Angka koefisien korelasi menunjukkan hubungan yang negatif atau berbalik arah, dapat dikatakan bahwa dosis niasin semakin tinggi, data GRP semakin rendah. Koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 0.536, yang berarti hubungan antara data dosis niasin dengan data GRP termasuk dalam rentang 0.40 – 0.60 yaitu kategori korelasi agak rendah (Arikunto, 2010).

Analisis Regresi Linier Sederhana

Untuk selanjutnya dilakukan analisis regresi yang berguna untuk mendapatkan pengaruh variabel terhadap variabel. Dalam pengolahan data dengan menggunakan analisis regresi linier sederhana, dilakukan beberapa tahapan untuk mencari pengaruh antara variabel independen terhadap dependen. Berdasarkan hasil pengolahan data dengan menggunakan *software* SPSS 18. Pengujian model regresi ini digunakan untuk mengetahui apakah variabel independen memiliki pengaruh yang signifikan terhadap variabel dependen menggunakan uji t.

Uji Pengaruh Dosis Niasin terhadap kadar GRP

Uji pengaruh dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis niasin terhadap kadar GRP.

Uji Hipotesis (Uji-t)

Hasil dari uji ini adalah variabel dosis niasin berpengaruh negatif dan tidak signifikan terhadap variabel angka GRP. Koefisien yang negatif menunjukkan jika variabel dosis niasin meningkat, maka akan menurunkan variabel angka GRP sebesar 0.00009 angka.

Koefisien Determinasi (R^2)

Kontribusi pengaruh variabel dosis niasin terhadap variabel angka GRP sebesar 1.9%, sedangkan 91.7% lainnya disumbangkan oleh variabel lainnya yang tidak dimasukkan ke dalam persamaan ini.

6.7.9. Pembahasan Penelitian Tahap 2

Penelitian tahap ini meneliti tentang pengaruh pemberian tiga dosis *glutathione* tereduksi (GSH) serta tiga dosis niasin terhadap terhadap kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC) dan *Glucose Reactive Protein 78* (GRP78) pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi. Penelitian tahap ini merupakan studi eksplorasi dosis GSH atau niasin yang akan digunakan pada tahap selanjutnya yaitu kombinasi GSH dan niasin.

Penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pemberian *glutathione* dan niasin, didapatkan penurunan kadar PCC. Protein carbonyl sendiri merupakan penanda dari oksidasi protein yang akan terbentuk awal saat terjadinya oksidasi dan relative stabil untuk dilakukan pemeriksaan. Dalam hal ini *Glutathione tereduksi* (GSH) dan niasin dapat berfungsi sebagai antioksidan, sehingga dapat menurunkan stress oksidatif dan menurunkan kadar MDA seperti pada penelitian di atas. Pada pemberian GSH dengan tiga dosis mampu menurunkan kadar PCC, dengan dosis yang terbaik pada dosis 10 μ M, sedangkan untuk pemberian niasin, didapatkan penurunan kadar PCC pada semua dosis dengan dosis terbaik dalam pada dosis 100 μ M.

Karbonilasi berarti adanya penambahan aldehid atau keton pada residu asam amino yang spesifik melalui reaksi non enzimatis. Karbonilasi ini merupakan suatu modifikasi oksidatif protein yang paling sering terjadi. *Protein carbonyl* dapat mempengaruhi stabilitas metabolik dan protein yang mengalami modifikasi dan memainkan peranan penting dalam patofisiologi dari kelainan yang terkait dengan stress oksidatif. Grup karboksil dapat mempengaruhi protein dengan 2 mekanisme yaitu oksidatif (langsung) dan non oksidatif (tidak langsung). Mekanisme oksidatif

yaitu katalisa ion yang menunjukkan reaksi langsung dari hydrogen peroxide atau lipid hydroperoxide dengan lys, arg dan pro serta memproduksi AAS dan GGS (Bizzozero, 2009). Karbonilasi non enzimatik dari protein terjadi jika terdapat reaksi pada residu cys, his atau lys. ROS yang di dapat dari oksidasi lipid (HNE, MDA, acrolein) dan karbohidrat (contoh glyoxal, methylglyoxal) pada daerah pusat nukleofil. (Zheng, 2017) Penurunan dari rasio GSH /GSSG diketahui dapat membuka MPTP (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*) dengan cara oksidasi dari dithiol pada kompleks protein (Zheng, 2017). Jika GSH turun melewati kadar yang normal, permeabilitas transisi akan terjadi dan diikuti oleh potensial membran mitokondria yang kolaps. Hal ini akan menyebabkan peningkatan produksi superoksida dimana superoksida ini juga meningkat karena adanya siklus redoks dari ubiquinone dalam complex III (Chen, 2003) atau melalui transport elektron yang dari succinate ke NADH dalam complex I (Lambert, 2004). Hilangnya cytochrome c dari mitokondria juga semakin meningkatkan produksi dari radikal bebas O_2 dengan cara menurunkan jalur redoks dari complex IV (Votyakova, 2005). Studi oleh Zheng (2017) tentang mekanisme karbonilasi protein pada otak tikus menunjukkan bukti bahwa terdapat hubungan antara penurunan GSH dengan terjadinya karbonilasi protein (Zheng, 2017).

Penambahan GSH pada penelitian kami terbukti dapat menurunkan kadar PCC dan berdasarkan literature di atas, maka penambahan GSH di harapkan dapat mempertahankan rasio GSH /GSSG sehingga reaksi oksidasi, peningkatan produksi superoksida maupun radikal bebas lainnya tidak terjadi.

Reaksi awal antara glukosa dan protein akan membentuk produk yang tidak stabil yaitu *schiff's base* dan selanjutnya akan di konversi menjadi bentuk yang lebih stabil yaitu gugus ketoamine yang disebut produk amadori. Produk amadori ini selanjutnya akan masuk kedalam reaksi enediol untuk memproduksi komponen protein carbonyl (Khajehpour, 2006).

Produk akhir dari reaksi ini adalah radikal superoksida yang akan dikonversi menjadi radikal hidroksil yang sangat reaktif melalui reaksi fenton sehingga akan menyebabkan stress oksidatif dan kerusakan seluler (Beal, 2002). Pada gambar 6.21 didapatkan bahwa kadar PCC pada sampel kultur sel epitel lensa mengalami peningkatan pada kondisi hiperglikemia. Penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan pembentukan spesies *carbonyl* yang reaktif. Pemberian beberapa dosis niasin yang beragam yaitu menurunkan kadar PCC dengan penurunan yang terbaik dicapai pada dosis 100 μM .

Penelitian ini didukung juga oleh penelitian yang di lakukan oleh Abdullah dimana terjadi peningkatan *carbonyl content* pada sampel *Human Serum Albumin* (HSA) yang terglisidasi terjadi penurunan kadar *carbonyl content* setelah pemberian niasin dengan beberapa dosis (50,100,200 dan 500 μM) dengan penurunan yang paling optimal pada kadar 500 μM (Abdullah, 2017). Dari data yang diperoleh diduga bahwa niasin mempunyai kemampuan untuk memecah group karbonil bebas yang terbentuk dari *carbonyl content* yang tereduksi seperti pada penelitian pemberian niasin pada kultur epitel lensa ini. Dalam hal ini niasin dapat dianggap berperan sebagai antioksidan.

GRP78/Bip yang merupakan salah satu penanda stress RE. Stres RE dapat disebabkan oleh beberapa hal salah satunya adalah karena proses folding yang tidak sempurna dan terjadi terus menerus. Pada penelitian ini GSH maupun niasin dapat menurunkan kadar GRP78/BIP dengan signifikan pada dosis 30 μM untuk GSH dan dosis 100 μM untuk niasin. Dengan adanya penelitian ini menunjukkan bahwa GSH dan niasin dapat memperbaiki kondisi stress oksidatif baik pada membran sel maupun pada *Retikulum Endoplasma* (RE).

Salah satu fungsi potensial GSH dalam RE adalah diduga dapat menurunkan ikatan disulphida non native yang terbentuk dalam protein karena proses stress oksidatif maupun oleh enzim yang mengkatalisa oksidasi (Jansens, 2002)

Dua studi menunjukkan bahwa *glutathione* mempunyai peran penting dalam isomerisasi dari ikatan disulfide non native. Kedua studi ini menunjukkan peningkatan pembentukan ikatan disulfide *non-native* akan terjadi ketika kadar *glutathione* total menurun (Chakravarthi dan Bulleid, 2004; Molteni 2004).

Peningkatan oksidasi juga disertai dengan peningkatan pembentukan ikatan disulfide *non-native*. Penurunan atau hilangnya kadar GSH sitosol dapat menyebabkan PDI (*Protein Disulphide Isomerase*) menjadi lebih teroksidasi dan akan mengganggu kemampuan untuk melakukan isomerisasi pada ikatan disulfide non native yang juga memerlukan waktu untuk isomerisasi yang lebih panjang. Hal ini menguatkan dugaan bahwa GSH terlibat dalam proses isomerisasi ikatan disulfide baik secara langsung maupun tidak langsung.

GSH juga merupakan reduktor utama yang bertanggung jawab dalam mempertahankan enzim oxidoreductase yang terdapat dalam RE untuk tetap berada

dalam bentuk reduksi. Enzim ini dibutuhkan proses reduksi atau isomerisasi dari ikatan disulfide *non-native*. GSH mereduksi ikatan disulfide *non-native* dengan cara :
1) glutathionilasi dari residu cystein; 2) molekul *glutathione* menyerang protein yang mengalami glutathionilasi yang akan melepaskan GSSG dan menurunkan subtrat protein. CXXC motif dari PDI yang terdapat pada oxidoreductase RE juga berfungsi untuk menjaga reduksi atau isomerisasi yang efisien. Domain ikatan polypeptide (*polypeptide binding domain*) pada PDI juga meningkatkan isomerisasi dari ikatan disulphide (Winer, 2002).

Untuk membuktikan bahwa niasin atau NA (Nicotinic Acid) dapat menurunkan kadar stress RE yang diinduksi oleh hiperlikemia, maka kami melakukan penelitian untuk memeriksa efek pemberian niasin terhadap kadar GRP 78 sel epitel lensa manusia yang ditumbuhkan pada media yang diberi tambahan glukosa tinggi dan diberikan beberapa dosis niasin (25 μM , 100 μM , 200 μM).

Pemeriksaan GRP 78 pada gambar 6.7 menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar GRP78 dengan pemberian niasin dengan dosis yang terendah dicapai pada dosis 100 μM .

Penelitian ini serupa yang pernah dilakukan oleh Crowley et al (2000) yang meneliti efek pemberian NA 10 mM pada sel jurkat dan dilakukan pemeriksaan GR78 dengan pemeriksaan imunofluoresensi dan mikroskop konfokal. Dari penelitian ini didapatkan bahwa terjadi penurunan kadar GRP78 pada nukleus protein sebesar 43% dan penurunan kadar GRP 78 pada sitoplasma sebesar 20% (Crowley,2000)

GRP 78 merupakan protein chaperone yang berespon terhadap kondisi stress RE (Crowley,2000). NA diduga menurunkan stress RE dengan melindungi atau terjadi proteksi terhadap malfoding protein pada RE dan mencegah deplesi Ca^{2+} di dalam RE. Penelitian lain oleh Chaterjee et al menunjukkan bahwa pemberian 6-amino nicotinamide yang dapat menyebabkan defisiensi niasin dapat menginduksi aktivas GRP 78.

Nicotine Acid dan nikotinamide merupakan prekursor dari NAD^+ dan $NADH$ yang juga merupakan bahan dari perbaikan DNA. Peningkatan kemampuan perbaikan DNA didapatkan dari dugaan bahwa NAD^+ merupakan substrat dari PARP, yaitu enzim perbaikan DNA dan induksi pembentukan GAPDH yang juga berfungsi dalam perbaikan DNA melalui aktivitas glycosylase urasil.

Untuk selanjutnya, pada tahap ini ditentukan satu dosis niasin yang akan digunakan dalam kombinasi dengan 3 dosis GSH. Meskipun dosis niasin yang terbaik menurunkan angka GRP78 dan PCC adalah pada dosis 100 μM , namun untuk kombinasi tetap dipertimbangkan menggunakan dosis yang terendah terlebih dahulu yaitu dosis 25 μM . Penelitian ini juga merujuk pada penelitian yang dilakukan Benavente et al pada sel kultur keratinosit manusia dengan pemberian niasin dosis 33 μM yang ternyata dapat menghambat pembentukan ROS pada sel tersebut. (Benavente, 2008).

Kesimpulan Penelitian Tahap 2

- Terdapat penurunan kadar protein carbonyl content (PCC), GRP/Bip 78 pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan GSH dengan yang tidak mendapatkan GSH.
- Dosis GSH 10 μM merupakan dosis yang terbaik untuk menurunkan kadar PCC dan dan dosis GSH 30 μM merupakan dosis yang terbaik untuk menurunkan kadar GRP78 secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.
- Terdapat penurunan kadar protein carbonyl content (PCC), GRP/Bip 78 pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi yang mendapatkan niasin dengan yang tidak mendapatkan.
- Dosis niasin 100 μM merupakan dosis yang terbaik untuk menurunkan kadar PCC dan GRP78 pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.
- Dosis GSH 10 μM , 30 μM , 100 μM dan niasin 25 μM akan digunakan untuk penelitian tahap selanjutnya.



BAB VII

PENELITIAN TAHAP III

PENGARUH PEMBERIAN *GLUTATHIONE* TEREDUKSI (GSH) DAN NIASIN TERHADAP PROSES TERJADINYA KATARAK PADA KONDISI HIPERGLIKEMIA MELALUI JALUR STRESS OKSIDATIF, UPR, DAN POLIMERISASI α KRISTALIN

7.1. Latar Belakang

Penelitian pada katarak senilis maupun katarak diabetika menunjukkan bahwa peningkatan glikasi dari protein kristalin, reaksi maillard, memainkan peranan penting dalam terjadinya katarak (Mulhern, 2006). Glikasi non enzimatis menyebabkan terbentuknya formasi *Advanced Glycation End Product* (AGE). Akumulasi dari AGE ini pada lensa kristalin merupakan salah satu patogenesis munculnya katarak pada usia tua maupun pada pasien dengan diabetes melitus, dimana lensa juga merupakan organ yang rentan terhadap proses glikasi protein karena sedikit atau tidak adanya proses daur ulang protein di dalam lensa. Dengan demikian, protein lensa akan menjadi mudah mengalami agregasi dan membentuk partikel dengan berat molekul tinggi yang menyebabkan gangguan pada kejernihan lensa dan menyebabkan terjadinya katarak (Pokupec, 2003)

Dalam proses sintesis dan modifikasi protein di dalam lensa, protein dapat mengalami *unfolding*, *misfolding*, atau *incomplete folding*. Protein – protein yang tidak sempurna ini dapat terakumulasi di dalam *Retikulum Endoplasma* (RE) dan akan menyebabkan stres RE. Pada kondisi ini akan dikirimkan sinyal yang beraksi

terhadap stres RE yaitu *Unfolding Protein Response* (UPR). Aktivasi UPR akan memicu respon transkripsi secara luas yang akan mengatur kapasitas protein folding dalam RE sesuai dengan kebutuhan. Hiperglikemia kronis pada penyakit diabetes mellitus juga dapat memperburuk kondisi stres RE karena pada kondisi ini akan terjadi glikasi protein lensa serta peningkatan stres oksidatif. Salah satu penanda pada kondisi stres RE adalah Bip/GRP 78. GRP78/BiP mempunyai fungsi sebagai chaperone dan ekspresinya juga didapatkan pada sel serat lensa (Mulhern, 2006).

Pada kondisi hiperglikemia kronis seperti diabetes mellitus, didapatkan penurunan kadar GSH yang disebabkan oleh penurunan sintesisnya maupun regenerasi dari GSSG karena kofaktor NADPH digunakan dalam perubahan glukosa menjadi sorbitol. Penurunan GSH ini dianggap dapat meningkatkan stres oksidatif yang dapat memicu timbulnya katarak. Karena itu dalam kondisi hiperglikemia kronis perlu dipertimbangkan pemberian GSH dalam sel untuk mengatasi terjadinya penurunan GSH dan niasin yang diperlukan dalam sintesa NADPH yang penting dalam proses regenerasi GSSG menjadi GSH, sehingga kadar GSH dalam sel dapat dipertahankan serta tidak terjadi penumpukan GSSG dalam sel yang kemungkinan dapat menjadi suatu pro oksidan.

Berdasarkan latar belakang di atas diperlukan penelitian tentang peran GSH dan niasin dalam menghambat terjadinya katarak melalui hambatan terjadinya stres oksidatif dengan mengukur kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC), *Glucose Reactive Protein* (GRP 78/Bip) formasi *Advanced Glycation End Products* (AGEs), serta polimerisasi α Kristalin di dalam kultur sel epitel lensa.

7.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang tersebut di atas, yang menjadi masalah utama penelitian ini adalah :

1. Apakah terdapat penurunan kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya?
2. Dosis kombinasi GSH dan niasin manakah yang dapat menurunkan kadar PCC secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?
3. Apakah terdapat penurunan kadar GRP78/Bip pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkan?
4. Dosis kombinasi GSH dan niasin manakah yang dapat menurunkan kadar GRP 78/BiP secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?
5. Apakah terdapat penurunan kadar Advanced Glycation End Products (*AGEs*) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya?
6. Dosis kombinasi GSH dan niasin manakah yang dapat menurunkan kadar *AGEs* secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?
7. Apakah terdapat penurunan agregasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya?

8. Dosis kombinasi GSH dan niasin manakah yang dapat menurunkan agregasi α kristalin secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?

7.3. Tujuan Penelitian

7.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian GSH terhadap kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC), GRP/Bip 78, formasi AGEs, serta polimerisasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?

7.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui penurunan kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya.
2. Untuk mengetahui dosis kombinasi GSH dan niasin yang diperlukan untuk menurunkan kadar PCC secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.
3. Untuk mengetahui apakah terdapat penurunan kadar GRP78/Bip pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkan.
4. Untuk mengetahui dosis kombinasi GSH dan niasin yang diperlukan untuk menurunkan kadar GRP 78/BiP secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.

5. Untuk mengetahui penurunan kadar Advanced Glycation End Products (AGEs) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya.
6. Untuk mengetahui dosis kombinasi GSH dan niasin yang diperlukan untuk menurunkan kadar AGEs secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.
7. Untuk mengetahui penurunan agregasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya?
8. Untuk mengetahui dosis kombinasi GSH dan niasin yang diperlukan untuk menurunkan agregasi α kristalin secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi?

7.4. Metode Penelitian

7.4.1. Waktu Penelitian

Maret – Juni 2018

7.4.2. Tempat Penelitian

Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

7.4.3. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah sel kultur epitel lensa dari *cell line* yang didapatkan dari ATCC (Raju, 2013).

7.4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis *glutathione* (GSH) dan niasin yang diberikan pada kultur sel epitel lensa dengan kondisi hiperglikemia.

7.4.5. Prosedur Pemeriksaan

7.4.5.1. Perlakuan Kultur Sel Epitel Lensa

Kultur sel epitel lensa terbagi menjadi kelompok kontrol, kelompok kontrol dengan medium glukosa tinggi (tanpa perlakuan) dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi. Medium glukosa tinggi didapatkan dengan cara menambahkan glukosa sebanyak 25 mM pada medium MEM tanpa glukosa (Raju, 2013). Pada kelompok kultur sel epitel lensa yang mendapat perlakuan, dibagi menjadi 3 kelompok yang masing-masing dipapar dengan *glutathione tereduksi* sebanyak 3 dosis yang merupakan dosis optimal yang ditentukan dari penelitian tahap I dan niasin dengan 1 dosis yang dipertimbangkan dari penelitian tahap II.

Niasin didapatkan dari *standard stock solution* (100 µg/mL) yang dibuat dengan melarutkan 50 mg dried niasin ke dalam 25% ethanol hingga volume akhir mencapai 500 mL. Dengan *standard stock solution* ini akan didapatkan niasin sebesar 0.81 mM. Kemudian dilarutkan dalam medium kultur, selama 3 jam (inkubasi) untuk pemeriksaan kadar PCC dan GRP78/BiP, serta inkubasi selama 2 minggu untuk menentukan kadar pembentukan AGE dan polimerisasi α kristalin.

Setelah 3 jam dan 2 minggu, medium diambil dan sel ditripsin selama 7 menit dengan tujuan supaya sel lepas. Kemudian sel disentrifuge 2000 rpm selama 7 menit, dan diberikan RIPA buffer agar sel pecah selama 20 menit pada suhu 37°C. Disentrifus ulang 2000 rpm selama 7 menit, dan supernatan diambil. Melakukan pengukuran kadar protein, dan dilanjutkan dengan pengukuran kadar PCC,

GRP78/BiP, dan Formasi AGEs menggunakan *microplate rider* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan menggunakan metode ELISA untuk PCC, GRP78/BiP, dan Formasi AGEs, serta pemeriksaan polimerisasi α kristalin dengan *western blot*.

7.4.5.2. Metode Pengukuran PCC dengan ELISA

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.10.3

7.4.5.3. Metode Pengukuran GRP 78/Bip dengan ELISA

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.10.4

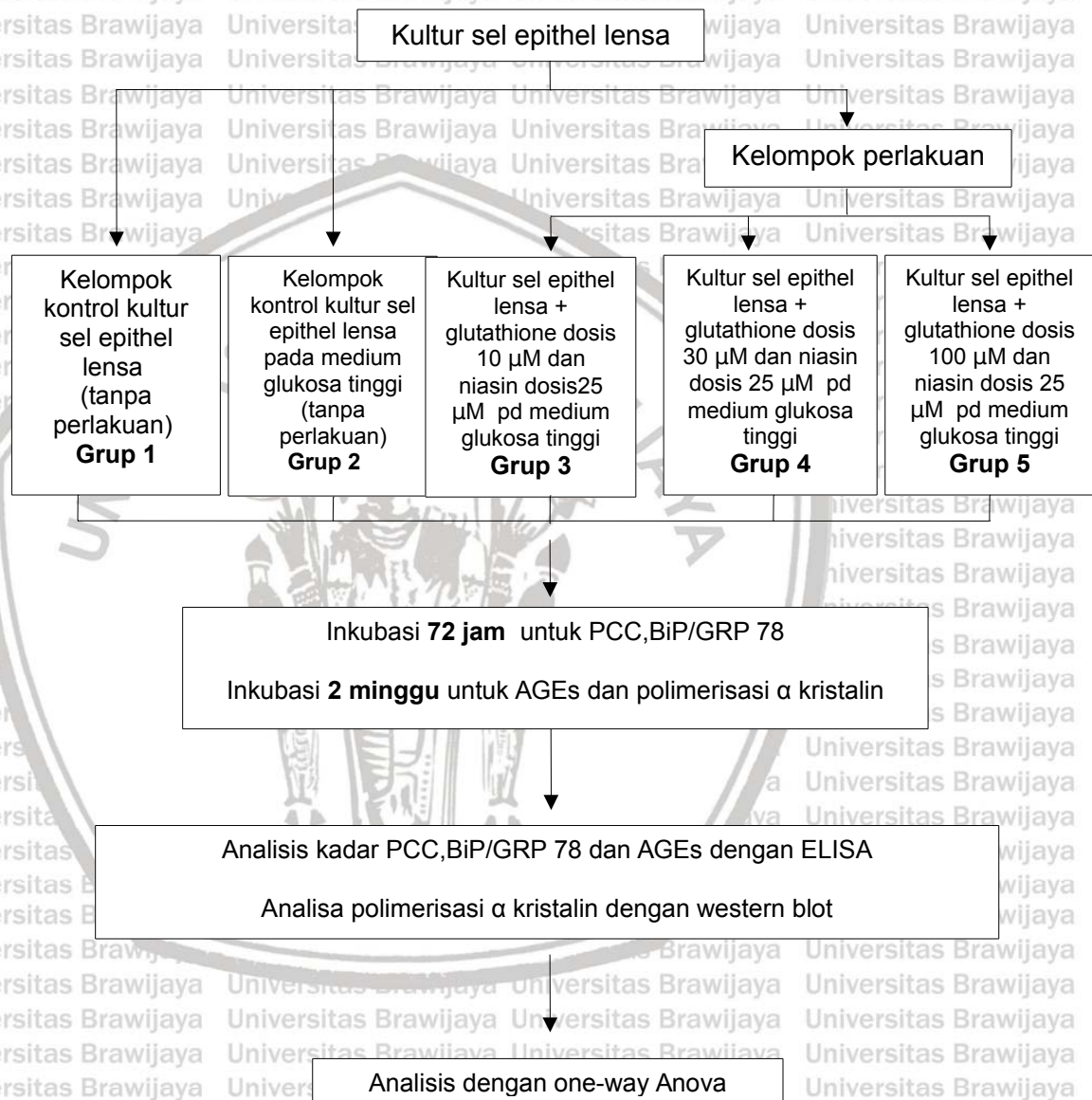
7.4.5.4. Metode Pengukuran formasi AGE dengan ELISA

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.10.5

7.4.5.5. Metode Pengukuran polimerisasi α kristalin dengan western blotting

Prosedur lengkap sebagaimana terlihat pada BAB IV tentang metodologi penelitian sub BAB 4.10.6

7.5. Alur Kerja Penelitian



7.6. Analisa Data

Data yang telah didapatkan dianalisa menggunakan program SPSS 18 for Windows. Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji Kolmogorof Smirnov, dan untuk mengetahui homogenitas varians data variabel dilakukan uji *Levene test*. Uji One-Way Anova dilakukan untuk mengetahui adakah perbedaan kadar parameter yang diteliti diantara masing-masing kelompok. Apabila dari hasil uji Anova didapatkan perbedaan kadar parameter yang diteliti (PCC, GRP 78/BiP, dan formasi AGEs) yang bermakna, maka dilanjutkan uji Post Hoc Tukey untuk mengetahui antara kelompok mana yang terdapat perbedaan. Sedangkan untuk mengetahui pengaruh *glutathione* dan niasin terhadap kadar PCC, Bip/GRP 78, dan pembentukan formasi AGEs dapat menggunakan uji regresi dan korelasi.

7.7. Hasil Penelitian Tahap III

Penelitian kultur sel epitel lensa dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Kultur sel epitel lensa yang disebut HLE B3 didapatkan dari *American Type Culture Collection (ATCC)* University Boulevard Manassas, VA 20110 USA. Waktu penelitian dari bulan Januari-Mei 2018. Hasil penelitian berupa 15 sampel yang diambil dari 24 *well* yang terdiri atas 5 kelompok. Kelompok pertama merupakan kontrol negatif, yang tidak mendapat perlakuan. Sedangkan kelompok kedua merupakan kedua merupakan kontrol positif (KP) yang diberikan tambahan glukosa 25 mM pada medium untuk membuat kondisi hiperglikemia. Tiga kelompok selanjutnya adalah kelompok dengan medium glukosa tinggi (25 mM) dan mendapatkan perlakuan kombinasi *glutathione*

dan niasin yaitu 10 μM (GSH) + 25 μM (niasin), 30 μM (GSH) + 25 μM (niasin), 100 μM (GSH) + 25 μM (niasin). Pada masing-masing kelompok dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Sampel kemudian diinkubasi selama 72 jam dan viabilitas sel diperiksa dalam waktu 3, 24, 48, dan 72 jam setelah diberi perlakuan. Kontrol negatif dalam penelitian ini digunakan untuk acuan menghitung dosis efektif (ED).

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan *Protein Carbonyl Content* dengan menggunakan metoda ELISA. Data yang didapatkan dianalisa dengan menggunakan program SPSS 18 for Windows.

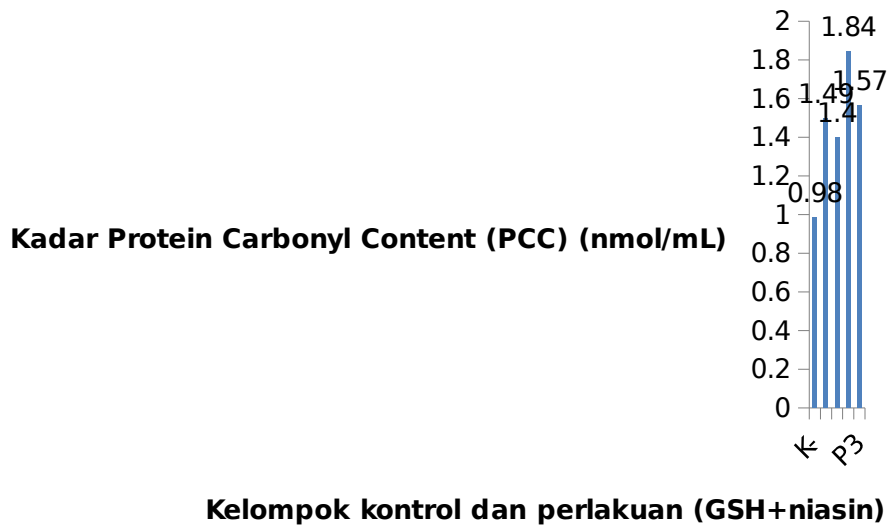
7.7.1. Data Hasil Pemeriksaan Kadar PCC dengan pemberian kombinasi GSH dan Niasin

Hasil rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan *Glutathione* (GSH) dan kombinasi GSH dan niasin dengan berbagai dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut

Tabel 7.1. Rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan medium glukosa tinggi dan diberikan glutathion dan *glutathione* kombinasi niasin.

Kelompok	N	Rata-rata	Standar Error	Minimum	Maximum
Kontrol negatif (K-)	3	.9827	.28521	.41	1.29
Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	1.4950	.13795	1.32	1.77
Glukosa 25 mM + 10 μM GSH) + 25 μM niasin (P4)	3	1.4000	.06696	1.27	1.48
Glukosa 25 mM + 30 μM GSH) + 25 μM niasin (P5)	3	1.8433	.15394	1.54	2.01
Glukosa 25 mM + 100 μM GSH) + 25 μM niasin (P6)	3	1.5657	.07509	1.45	1.71

Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar PCC pada kultur sel epitel lensa yang tampak dari perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar PCC. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok yang diberikan *glutathione* tampak penurunan dari kadar PCC jika dibandingkan dengan kontrol positif.



Gambar 7.1. Grafik rerata kadar PCC pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian *glutathione* tereduksi (GSH) dan Niasin.

K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, P1 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 10 μ M + niasin 25 μ M, P2 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 30 μ M + niasin 25 μ M, P3: kelompok dengan glukosa 25 mM+ GSH 10 μ M + niasin 25 μ M

7.7.2. Analisa statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan > 2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Saphiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene,s

test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti One-Way Anova yaitu Kruskal Wallis.

Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Saphiro wilk. Hasil uji normalitas dengan uji *One Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.041 yang berarti kurang dari α (0.05), maka data tidak berdistribusi normal.

Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.025 yang kurang dari α (0.05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi kedua asumsi, yaitu tidak normal dan tidak homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti yaitu uji Kruskal Wallis. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 19. Hasil pengujian Kruskal Wallis adalah terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka PCC pada masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney.

Pengujian Berganda (*Multiple Comparisons*)

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*)

dengan uji Mann Whitney. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan yang berganda terhadap kadar PCC antara setiap kelompok dosis *glutathione* dan antara kelompok glutathion kombinasi niasin dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 7.2. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka PCC

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH+ 25 µM niasin	0.827 > α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH + 25 µM niasin	0.127 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH + 25 µM niasin	0.513 > α

P –value < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan p-value >0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok kontrol positif tidak berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan 10+25, 30+25 dan 100+25. Kelompok perlakuan 30+25 tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 100+25.

7.7.3. Data Hasil Pemeriksaan Kadar GRP 78 dengan pemberian kombinasi GSH dan niasin.

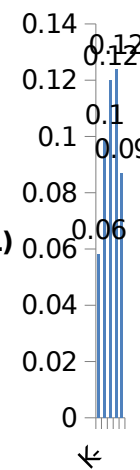
Hasil rerata kadar Glucose Reactive Protein (GRP78) pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan kombinasi GSH dan niasin dengan berbagai dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut .

Tabel 7.3. Rerata kadar GRP78 pada kultur Sel Epithel Lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan Glutathion Kombinasi Niasin.

Kelompok	N	Rata-rata	Standar d Eror	Minimu m	Maximu m
Kontrol negatif (K-)	3	.0830	.00600	.09	.16
Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	.1197	.01266	.09	.16
Glukosa 25 mM + 10µM GSH) + 25 µM niasin (P4)	3	.1243	.03818	.08	.09
Glukosa 25 mM + 30µM GSH) + 25 µM niasin (P5)	3	.0873	.03607	.05	.16
Glukosa 25 mM + 100µM GSH) + 25 µM niasin (P6)	3	.0968	.00351	.09	.16

Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar GRP78 pada kultur sel epithel lensa yang tampak dari perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar GRP78. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok yang diberikan *glutathione* tampak penurunan dari kadar GRP78 jika dibandingkan dengan kontrol positif.

Kadar Glucose Reactive Protein (GRP78) (nmol/mL)



Kelompok kontrol dan perlakuan (GSH+niasin)

Gambar 7.2 . Grafik rerata kadar GRP78 pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian glutathione tereduksi (GSH) dan niasin

K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, P1 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 10 µM + niasin 25 µM, P2 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 30 µM + niasin 25 µM, P3: kelompok dengan glukosa 25 mM+ GSH 10 µM + niasin 25 Mm

7.7.4. Analisa statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan > 2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Saphiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene;s test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova yaitu Kruskal Wallis.

Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Saphiro wilk. Hasil uji normalitas dengan uji one *Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.109 yang berarti lebih dari α (0.05), maka data berdistribusi normal.

Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.019 yang kurang dari α (0.05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi kedua asumsi, yaitu normal namun tidak homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti yaitu uji Kruskal Wallis. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 19. Hasil pengujian Kruskal Wallis adalah terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka GRP78 pada masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney.

Pengujian Berganda (*Multiple Comparisons*)

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Mann Whitney. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan yang berganda

terhadap kadar GRP78 antara setiap kelompok dosis *glutathione* dan antara kelompok glutathion kombinasi niasin dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 7.4. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH+ 25 µM niasin	0.513 > α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH + 25 µM niasin	0.275 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH + 25 µM niasin	0.513 > α

P –value < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan p-value >0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok kontrol positif tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 10+25, 30+25, dan 100+25. Kelompok perlakuan 10+25 tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 30+25 dan 100+25.

7.7.5. Data Hasil Pemeriksaan (AGEs) dengan Pemberian Kombinasi GSH dan Niasin

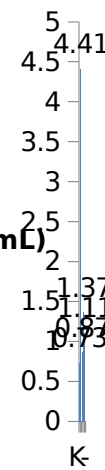
Hasil rerata kadar *Advanced Glycation End Products* (AGEs) pada kultur sel epitel lensa yang dikultur pada media dengan glukosa tinggi dan dipaparkan dengan kombinasi GSH dan niasin dengan berbagai dosis yang berbeda terangkum pada tabel berikut.

Tabel 7.5. Rerata kadar GRP78 pada kultur Sel Epithel Lensa pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Medium Glukosa Tinggi dan diberikan Glutathion Kombinasi Niasin.

Kelompok	N	Rata-rata	Standar d Eror	Minimu m	Maximu m
Kontrol negatif (K-)	3	.7330	.04177	.67	.81
Kontrol positif (glukosa 25 mM) (K+)	3	.4.4097	.00367	4.41	4.42
Glukosa 25 mM + 10µM GSH) + 25 µM niasin (P4)	3	.8657	.00567	.86	.88
Glukosa 25 mM + 30µM GSH) + 25 µM niasin (P5)	3	1.3663	.03353	1.31	1.43
Glukosa 25 mM + 100µM GSH) + 25 µM niasin (P6)	3	1.1073	.00267	1.10	1.11

Pada tabel di atas tampak adanya pengaruh pemberian glukosa tinggi terhadap kadar AGEs pada kultur sel epithel lensa yang tampak dari perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif, dimana terdapat kenaikan kadar AGEs. Dari tabel tersebut juga dapat dilihat pada kelompok yang diberikan *glutathione* tampak penurunan dari kadar AGEs jika dibandingkan dengan kontrol positif.

Kadar Advanced Glycation end Products (AGEs)($\mu\text{g}/\text{mL}$)



Kelompok kontrol dan perlakuan (GSH+Niasin)

Gambar 7.3. Grafik rerata kadar AGEs pada kultur sel epitel lensa pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan pemberian *glutathione tereduksi* (GSH) dan niasin.

K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif dengan glukosa 25 mM, P1 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 10 μM + niasin 25 μM , P2 : kelompok dengan glukosa 25 mM + GSH 30 μM + niasin 25 μM , P3: kelompok dengan glukosa 25 mM+ GSH 10 μM + niasin 25 Mm

7.7.6. Analisa statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan > 2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan *uji Saphiro Wilk*, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan *Levene's test*. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova yaitu *Kruskal Wallis*.



Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *Saphiro wilk*. Hasil uji normalitas dengan uji one *Shapiro Wilk* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.000 yang berarti lebih dari α (0.05), maka data berdistribusi normal.

Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.025 yang kurang dari α (0.05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi kedua asumsi, yaitu tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti yaitu uji Kruskal Wallis. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 19. Hasil pengujian Kruskal Wallis adalah terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka AGEs pada masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney.

Pengujian Berganda (*Multiple Comparisons*)

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Mann Whitney. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan yang

berganda terhadap kadar AGEs antara setiap kelompok dosis glutathion kombinasi niasin dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 7.6. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Kadar AGEs

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH+ 25 µM niasin	0.043 < α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH + 25 µM niasin	0.046 < α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH + 25 µM niasin	0.043 < α

P –value < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan p-value >0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok kontrol positif berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 10+25, 30+25, dan 100+25.

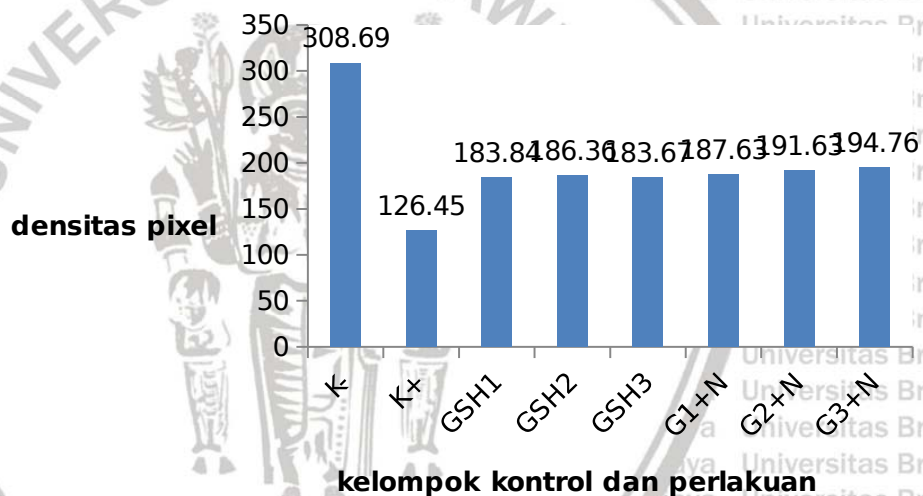
7.7.7. Data Hasil Pemeriksaan Agregasi α Kristalin dengan Metode Western

Blotting

Untuk mengetahui terjadinya agregasi protein lensa, maka dilakukan pemeriksaan menggunakan antibodi anti-α kristalin dengan menggunakan tehnik *western blot*. Kultur sel epitel lensa yang telah diinkubasi selama 2 minggu kemudian dipanen untuk dilakukan pemeriksaan ini. Hasil *western blot* menunjukkan adanya beberapa band yang terbentuk dengan ketebalan yang berbeda-beda dari tiap kelompok perlakuan pada 72 kDa dimana α kristalin mempunyai berat molekul 20 kDa, sehingga hal ini menunjukkan berat molekul yang terbentuk lebih tinggi dari yang seharusnya dan mengindikasikan terjadinya agregasi protein.



Gambar 7.4. Hasil pemeriksaan protein α Kristalin dengan metode western blotting. Didapatkan semua band terdeteksi pada berat molekul 76 kDa. (Keterangan : K- kontrol negatif, K+ kontrol positif, G1+N GSH 10 μ M+niasin 25 μ M, G2+N : GSH 30 μ M+niasin 25 μ M; GSH 100 μ M+niasin 25 μ M).



Gambar 7.5. Grafik densitas pixel. K- : 308.685; K+ : 126.448 ; GSH1: 183.842; GSH2 : 186.362 ; GSH3: 183.665; G1+N : 187.63; G2+N : 191.632; G3+N : 194.758. (Keterangan : K- kontrol negatif, K+ kontrol positif, GSH 1 : GSH 10 μ M, GSH2 : GSH 30 μ M, GSH3: GSH 100 μ M. G1+N GSH 10 μ M+niasin 25 μ M, G2+N : GSH 30 μ M+niasin 25 μ M; GSH 100 μ M+niasin 25 μ M).

Catatan : angka densitas pixel berbanding terbalik dengan ketebalan blotting.

7.7.8. Pembahasan Penelitian tahap III

Penelitian tahap 3 ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi *glutathione* dan niasin terhadap kadar PCC, GRP78/BiP dan AGE's pada

kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi. Pemberian *glutathione* dan niasin menggunakan tiga dosis GSH dan satu dosis niasin.

Pemberian kombinasi tiga dosis *glutathione* dan niasin menunjukkan adanya penurunan kadar PCC pada kelompok dengan dosis GSH 10 μM + niasin 25 μM .

Sembilan puluh persen kandungan lensa adalah kristalin yang dapat menunjukkan berbagai perubahan karena oksidasi. Pengukuran *Protein Carbonyl Content*

merupakan salah satu indeks yang penting untuk mengetahui status redoks protein di dalam lensa (Altomare, 1997; Boscia, 2000). Kadar protein carbonyl yang

didapatkan dari asam amino selama oksidasi protein dengan metal katalisa baik invitro maupun invivo menunjukkan pengukuran langsung dari terjadinya kondisi

oksidasi dari molekul tersebut (Boscia, 2000). Redoks protein dianggap dianggap sebagai suatu hal yang penting dalam menjaga fungsi dan kejernihan lensa.

Beberapa kondisi lokal atau sistemik yang dapat mempengaruhi redoks protein antara lain adalah myopia, diabetes, dan penuaan (*aging*) (Boscia, 2000).

Pengukuran PCC sebagai penanda stress oksidatif mempunyai kelebihan dibandingkan dengan pengukuran dari produk oksidasi lainnya yaitu antara lain

bahwa protein carbonyl terbentuk pada awal terjadinya oksidasi dan relatif stabil untuk mengetahui protein yang mengalami carbonylasi.

Dalam penelitian ini pemberian kombinasi GSH dan niasin dalam menunjukkan terjadinya penurunan kadar PCC meskipun tidak pada semua

kelompok, namun hal tersebut mendukung bahwa kombinasi GSH dan niasin dapat dipertimbangkan dalam mencegah terjadinya stress oksidatif pada lensa.

Hasil dari pemberian kombinasi GSH (*glutathione*) dan niasin terhadap kadar GRP78 dapat dilihat pada gambar 7.2 dan ditemukan bahwa terjadi kenaikan kadar GRP78 pada kontrol positif dibandingkan dengan kontrol negatif. Dengan pemberian kombinasi tiga dosis *glutathione* dan niasin terdapat penurunan kadar GRP78 pada kelompok dengan dosis kelompok dengan dosis GSH 100 μM + niasin 25 μM .

Sebelum melalui jalur sekretori, protein dan membran protein harus mengalami folding komplit dalam *Retikulum Endoplasma* (RE), sehingga RE merupakan suatu pabrik tempat protein folding dan harus mengontrol kualitas dan produknya sehingga hanya protein yang dirakit sempurna dan berfungsi baik yang akan dikirimkan ke tujuan yang sesuai (Ellgaard dan Helenius, 2003). Selama proses perkembangan sel adakalanya sel mengalami situasi yang menyebabkan kebutuhan protein melebihi kapasitas folding RE sehingga menimbulkan stres RE. salah satu kondisi yang dapat menyebabkan sel mengalami perubahan atau gangguan proses folding adalah hiperglikemia. Pada kondisi stress RE, kebutuhan akan protein folding akan melebihi kapasitasnya (Papa, 2012) dan kondisi ini akan memicu regulasi *Unfolding Protein Response* (UPR) (Yoshida, 2009).

Salah satu studi yang dilakukan oleh Mulhern et al (2006)(2006) pada kultur epitel lensa pada medium dengan MEM yang diberi manitol, ternyata kadar *Aldose Reductase Inhibitor* (ARI) yang merupakan penanda osmotik stress dan kadar GRP78/BiP sebagai penanda terjadinya aktivasi UPR meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa induksi UPR dan AR merupakan hasil dari stres osmotik ekstrasel pada kultur epitel lensa. Selain itu untuk menunjukkan UPR bisa diinduksi

oleh *oxidative stress* dibuktikan oleh penelitiannya pada sel epitel lensa yang dipapar dengan H_2O_2 , ternyata didapatkan kematian sel yang meningkat serta kadar GRP78/BiP meningkat sesuai dengan waktu dan konsentrasi yang semakin banyak (*time and concentration dependent*) (Mullhern, 2006).

Sejalan dengan penelitian Mulhern (2006), penelitian yang kami lakukan juga menunjukkan bahwa kadar GRP78 meningkat setelah pemberian glukosa tinggi pada medium sel kultur epitel lensa, yang mendukung bahwa high glukosa dapat menyebabkan terjadinya stress pada RE. Dengan pemberian kombinasi GSH dan niasin didapatkan penurunan kadar GRP78 meskipun belum mencapai perbedaan yang signifikan kemungkinan karena kombinasi dosis yang belum optimal, namun hal ini mengindikasikan bahwa kombinasi GSH dan niasin dapat berperan dalam proses pencegahan terjadinya stress RE melalui beberapa mekanisme yang telah disampaikan pada pembahasan penelitian tahap kedua.

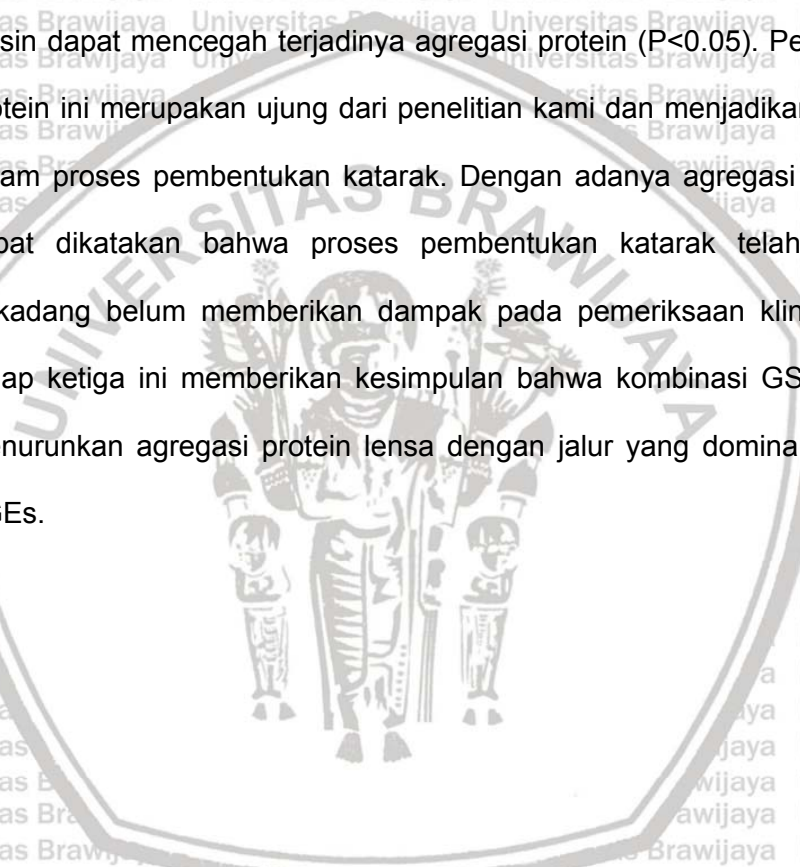
Penelitian kombinasi GSH (*glutathione tereduksi*) dan niasin terhadap kadar AGEs disajikan pada gambar 7.3. dan bahwa terjadi kenaikan kadar AGEs pada kontrol positif dibandingkan dengan kontrol negatif dengan perbedaan yang signifikan. Dengan pemberian kombinasi tiga dosis *glutathione* dan niasin terdapat penurunan kadar AGE pada semua kelompok, baik pada kelompok dengan dosis GSH 30 μM + niasin 25 μM , kelompok dengan GSH 30 μM + niasin 25 μM maupun kelompok dengan dosis GSH 100 μM + niasin 25 μM dan semuanya menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Glikasi dari protein lensa terjadi jika glukosa atau gula tereduksi lainnya bereaksi dengan e amino grup residu lisin atau termin amino dari protein yang akan

menghasilkan terbentuknya *schiff base* (SB) (Jansirani, 2004). SB akan melakukan penyusunan ulang Amadori melalui reaksi *Maillard* dan menghasilkan ketoamin yang lebih stabil atau produk amadori (*early glycation product*). Pada stadium lanjut, produk amadori mengalami dehidrasi dan pengaturan ulang untuk membentuk *cross-links* antara protein yang berdekatan, dan akhirnya akan menghasilkan agregat protein atau *Advance Glycation Product* (AGEs). Kondisi hiperglikemia yang lama dipercaya dapat menyebabkan terbentuknya AGEs yang merupakan produk glikasi yang ireversibel dan merupakan salah satu penyebab terjadinya katarak. Penelitian ini membuktikan bahwa terjadi peningkatan kadar AGEs yang cukup tinggi pada sel epitel lensa yang dipapar dengan glukosa tinggi jika dibandingkan kontrol negatif. Pemberian kombinasi GSH dan niasin ternyata sangat mempengaruhi kadar AGEs, dimana terjadi penurunan yang signifikan dengan adanya pemberian kombinasi keduanya. Dalam hal ini GSH dan niasin mempunyai potensi masing-masing dalam hal mencegah terjadinya glikasi. GSH berfungsi sebagai kofaktor dalam eliminasi methylglyoxal (AGEs) dengan menggunakan dua enzim *glyoxalase* yaitu *glyoxalase I* dan *glyoxalase II*, sedangkan niasin dapat mencegah terjadinya pembentukan methylglyoxal. Niasin juga dapat melindungi protein tetap pada bentuk asalnya (native) sehingga dapat bertahan dari perubahan karena proses glikasi (Abdullah, 2017). Adanya hasil ini mengindikasikan bahwa kombinasi GSH dan niasin sangat baik dalam mencegah terjadinya katarak terutama melalui jalur hambatan terhadap pembentukan AGEs ini.

Hasil pemeriksaan agregasi protein dengan pemeriksaan western blotting menunjukkan adanya peningkatan densitas blotting yang merepresentasikan

terjadinya peningkatan agregasi pada kontrol positif dan penurunan densitas bloting pada pemberian GSH saja maupun kombinasi GSH dan niasin. Dari hasil analisa statistik didapatkan perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan semua kelompok yang berarti bahwa pemberian GSH saja maupun kombinasi GSH dan niasin dapat mencegah terjadinya agregasi protein ($P < 0.05$). Pemeriksaan agregasi protein ini merupakan ujung dari penelitian kami dan menjadikan tolok ukur terakhir dalam proses pembentukan katarak. Dengan adanya agregasi protein sebenarnya dapat dikatakan bahwa proses pembentukan katarak telah dimulai meskipun terkadang belum memberikan dampak pada pemeriksaan klinis lensa. Penelitian tahap ketiga ini memberikan kesimpulan bahwa kombinasi GSH dan niasin dapat menurunkan agregasi protein lensa dengan jalur yang dominan adalah pada jalur AGEs.



BAB VIII**PEMBAHASAN UMUM**

Beberapa penelitian sebelumnya dengan menggunakan kultur sel epitel lensa maupun kultur lensa telah banyak dikembangkan untuk mengetahui beberapa kondisi fisiologis maupun patologis yang dapat terjadi pada lensa. Penelitian ini menggunakan sel kultur epitel lensa yang didapatkan dari ATCC, yaitu sel immortal (*cell line*) yaitu *Human Epithel Lens* (HLE B3). Pemilihan penggunaan sel kultur epitel lensa manusia pada penelitian ini adalah untuk mengetahui proses awal terjadinya katarak di tingkat seluler yang terjadi pada sel lensa manusia. Upaya awal untuk kultur sel epitel lensa manusia belum memuaskan karena rendahnya kemampuan proliferasi *in vitro*, yang juga semakin menurun dengan bertambahnya usia. Baru-baru ini, sel-sel epitel lensa manusia telah dikultur oleh beberapa peneliti menggunakan janin atau eksplan epitel bayi lensa. Kultur primer sel bayi dan janin dapat berhasil tumbuh dan dikultur melalui setidaknya tiga pasase dengan pembentukan monolayer yang stabil dengan doubling populasi hingga 12 dalam kultur. Sel-sel ini mengekspresikan lensa crystallins, mensintesis kapsul secara *in vitro*, dan dapat menjalani diferensiasi sel menjadi sel-sel seperti serat lentoid pada *low-protein binding surface* atau dalam kokultur sel epitel lensa dan fibroblast siliaris.

Terlepas dari kemajuan ini, kegunaan sel-sel epitel lensa manusia dihalangi oleh terbatasnya ketersediaan lensa bayi dan janin, berkurangnya pertumbuhan *in vitro* setelah empat hingga enam tingkat penggadaan populasi dalam kultur sel, kurangnya *cell line*, dan panjang waktu proliferasi yang diperlukan untuk

mendapatkan jumlah sel yang cukup untuk digunakan sebagai model untuk mempelajari diferensiasi sel dan etiologi katarak. Namun dengan adanya penelitian oleh Andley et al untuk membuat cell line sel epitel lensa manusia (HLE B3), maka berkembanglah beberapa penelitian menggunakan cell line ini. Penelitian dengan menggunakan sel HLE B3 ini juga pernah dilakukan oleh Shuang Ni 2013 yang menggunakan epitel lensa manusia dari sel immortal (*cell line*) yaitu *Human Epithel Lens* (HLE B3) cell yang dibuat oleh professor Marjorie F dari University of Nebroska-Lincoln, Nebraska, USA, dimana sel tersebut merupakan sel yang pertama kali digunakan sebagai model dalam penelitian epitel lensa manusia fisiologis dan yang mengalami katarak yang dilakukan oleh And Ley et al (Ni, 2013) HLE B3 sel dikultur pada minimum essential media yang ditambah suplemen 20% fetal bovine serum dan 50µg/ml gentamisin dengan kelembaban atmosfer CO₂ 5% pada suhu 37°C Cell Line imortal ini (HLE B3) berasal dari jaringan lensa manusia (*infant*) dan ditransformasikan dengan *adeno virus 12-simian virus (SV40)*. HLE B3 sering kali digunakan untuk mempelajari stress oksidatif (Ni, 2013; Huang, 2006).

Penelitian dengan menggunakan HLE B3 ini juga pernah dilakukan oleh Wang et al (2003) untuk mempelajari efek estrogen terhadap oksidatif stress pada kultur sel epitel lensa manusia (HLEC's), dengan metode kultur yang sama dan HLE B3 yang digunakan adalah antara pasase 18 dan 23 (Wang, 2003).

Penggunaan sel HLE B3 ini mempunyai beberapa kelebihan antara lain kondisi sel yang immortal sehingga diharapkan tidak mudah mengalami kematian saat penelitian. Meskipun didapatkan dari sel epitel lensa bayi, namun sel ini memiliki morfologi epitel yang stabil dan dapat memproduksi β kristalin secara kontinyu,

dimana kristalin ini merupakan protein yang karakteristik untuk diferensiasi sel lensa.

Cell line ini dapat menjadi model yang penting untuk studi diferensiasi sel epitel manusia dan manifestasi patologinya dalam katarak. Sel-sel ini juga akan berguna untuk pemeriksaan obat pencegah pembentukan katarak primer dan sekunder, studi toksikologi terkait mata, dan pengembangan marker sel dan tes immunodiagnostik yang berguna untuk studi klinis pembentukan katarak. Namun penelitian invitro tetap memiliki kelemahan yaitu penelitian ini tidak menggambarkan kondisi sesungguhnya dalam tubuh seperti penelitian invivo, sehingga penelitian ini masih menggambarkan dasar dari patofisiologi perkembangan katarak.

Dalam mempelajari pengaruh *high glukosa* pada penelitian ini sel kultur lensa dikembangkan pada medium dengan glukosa tinggi dengan rujukan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Raju (2013) yaitu menambahkan glukosa dalam medium dengan konsentrasi 25 mM, 30 mM (Suryanarayana, 2004; Kumar, 2011; Zigler, 2003; Suryanarayana, 2007) untuk mendapatkan kondisi hiperglikemia secara invitro. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah MEM yang sesuai dengan komposisi yang dianjurkan oleh ATCC ditambah dengan glukosa hingga konsentrasi 25 mM. Pemberian glukosa tinggi ini diharapkan dapat mewakili kondisi hiperglikemia dalam tubuh dan memicu timbulnya reaksi stress oksidatif yang akan diperiksa dengan menggunakan beberapa marker stress oksidatif. Penggunaan sel kultur pada penelitian ini dimulai dari pasase 3 dihitung dari thawing pertama dari sel yang didapat dari ATCC, namun tidak dicantumkan pada data sheet pasase yang seharusnya dari sel tersebut.

Hiperlikemia kronis merupakan salah satu penyebab utama terjadinya komplikasi sekunder dari diabetes, termasuk katarak diabetika. Beberapa studi mengindikasikan bahwa hiperglikemia dan lamanya menderita diabetes akan meningkatkan resiko terjadinya katarak (Kumar, 2005). Pasien dengan diabetes atau hiperglikemia kronis akan meningkatkan resiko terjadinya stress oksidatif yang juga akan meningkatkan kadar *malondialdehyde* (MDA) baik di dalam serum darah, platelet, maupun sel. MDA merupakan tiga *carbonyaldehydae* yang mempunyai sifat mutagenik, tumorigenik dan sangat reaktif, yang diproduksi selama peroksidasi PUFA dan metabolisme asam arakhidonat. MDA merupakan metabolit utama dari asam arakhidonat dan merupakan biomarker stres oksidatif yang terpercaya (Zorawar, 2014). *Malondialdehyde* merupakan produk terbanyak yang dihasilkan dari proses lipid peroksidasi. Metode yang paling banyak digunakan untuk mengukur kadar malondialdehyde adalah melalui reaksinya dengan Thiobarbituric Acid (TBA) Tes tersebut merupakan uji spektrofotometrik dengan cara memanaskan 100°C sampel dibawah kondisi asam untuk membentuk *MDA-TBA* dan mengukur absorbansi dari campuran reaksi tersebut pada 532 nm (Tukozkan, 2006; Al-Fawaeir, 2011; Journal Chromatogr B, 2007; Suttnar, 2001) Meskipun metode ini kurang spesifik karena TBA juga dapat bereaksi dengan carbonyl lain seperti karbohidrat, pigmen, dan asam amino, namun metode ini masih seringkali digunakan di beberapa penelitian dan mudah untuk dilakukan pengulangan.

Penelitian tahap pertama dilakukan dengan mengevaluasi kadar MDA pada saat sel kultur dibiakkan pada medium glukosa tinggi (kontrol positif) dan saat diberikan *glutathione* tereduksi (GSH) atau niasin. Pengukuran kadar MDA

menggunakan metode TBA seperti yang telah dijelaskan di atas. Hasil pemeriksaan MDA menunjukkan bahwa baik GSH maupun niasin dapat menurunkan kadar MDA, sehingga mendukung teori bahwa GSH dan niasin berfungsi sebagai antioksidan.

Protein Carbonyl Content (PCC) merupakan marker dari stress oksidatif yang pada penelitian ini diperiksa dengan tehnik ELISA. Pada penelitian ini, pemeriksaan PCC memiliki keunggulan dibandingkan pemeriksaan MDA meskipun keduanya merupakan marker dari stress oksidatif, namun diketahui bahwa lensa tersusun dari protein kristalin. Sehingga PCC sebagai marker stress oksidatif akan meningkat jika terdapat hal-hal yang menyebabkan perubahan dari protein lensa. Dari hasil penelitian, didapatkan penurunan kadar PCC jika diberikan *glutathione* dengan dosis 10 μM , 30 μM dan μM 100 , niasin dengan dosis 25 μM ,100 μM ,200 μM , maupun kombinasi *glutathione* 10 dan niasin 25 μM . Peningkatan dosis *glutathione* pada penelitian kombinasi *glutathione* dan niasin justru tidak menurunkan kadar PCC dan menunjukkan kenaikan yang menunjukkan bahwa kemungkinan pemberian GSH yang berlebihan akan menyebabkan penumpukan GSSG yang menjadi prooksidan.

Selama proses sintesis dan modifikasi protein di dalam lensa, protein dapat mengalami unfolding, misfolding, atau inkomplit folding. Protein-protein yang tidak sempurna ini dapat terakumulasi di dalam *Retikulum Endoplasma* (RE) dan akan menyebabkan stres RE. Pada kondisi ini akan dikirimkan sinyal yang beraksi terhadap RE stres yaitu *Unfolding Protein Response* (UPR). Aktivasi UPR akan memicu respon transkripsi secara luas yang akan mengatur kapasitas protein folding dalam RE sesuai dengan kebutuhan. Hiperglikemia kronis pada penyakit diabetes mellitus juga dapat memperburuk kondisi stres RE karena pada kondisi ini akan

terjadi glikasi protein lensa serta peningkatan stres oksidatif. Salah satu penanda pada kondisi stress RE adalah Bip/GRp 78. Bip/GRP78 mempunyai fungsi sebagai chaperone dan ekspresinya juga didapatkan pada sel serat lensa. (Mullhern, 2006).

Deteksi atau kuantifikasi protein dengan analisa imunoblot dapat digunakan untuk memeriksa *Grp78* atau *CHOP* dengan menggunakan antibodi monoclonal terhadap *Grp78* (*anti-KDEI, Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC*), *Gadd153/CHOP* (*Santa Cruz, Santa Cruz CA*).

Beberapa antibodi yang digunakan untuk mendeteksi *Grp78* antara lain *SPA-928(stress gen)* dengan menggunakan metode Western Blott (1:1000); *AB32618* (*Abcam*) dengan imunohistokimia (1:200) (Samali, 2010). Beberapa penelitian memilih metode western blott untuk pemeriksaan *Grp78/Bip* pada sel epitel lensa (Yang, 2015; Mullher, 2006; Fatma 2011, Firtina, 2010). Pemeriksaan dengan western blott merupakan pemeriksaan kualitatif atau semi kuantitatif dengan menggunakan tehnik elektroforesis dan memiliki keunggulan maka *antibody* yang digunakan dapat mendeteksi dan berikatan dengan protein yang mengalami denaturasi, selain itu antigen telah dipisahkan dan dapat bekerja dengan menggunakan berbagai macam preparat yang mengandung antibodi, Pada penelitian ini dipilih pemeriksaan GRP78 dengan metode ELISA sehingga didapatkan data kadar GRP78 secara kuantitatif. Penurunan kadar GRP78 pada penelitian kali ini dengan pemberian GSH, niasin, maupun kombinasi GSH dan niasin menunjukkan bahwa GSH dan niasin juga mempunyai kemampuan menekan stress oksidatif di dalam RE. Pemberian kombinasi GSH dan niasin membutuhkan kadar GSH yang paling tinggi (100 μ m) untuk dapat menurunkan kadar GRP78

menunjukkan bahwa proses stress oksidatif di dalam RE merupakan proses yang kompleks dan melibatkan banyak hal sehingga membutuhkan dosis *glutathione* yang lebih besar untuk dapat menekan stress tersebut, disamping itu kemungkinan juga kemampuan recovery dalam RE lebih membutuhkan waktu yang panjang dengan dosis yang lebih besar dibandingkan jika stres oksidatif terjadi pada membran sel.

Beberapa metode dapat digunakan untuk mengukur kadar *Advanced Glycation End Products* (AGEs) antara lain menggunakan studi imunohistokimia (Ling, 2001), spektrofotometri seperti yang dideskripsikan oleh Kalousva. Intensitas fluoresens diukur pada emisi maksimal 440 nm dan eksitasi pada 350nm (Beisswenger, 2001) dengan menggunakan spektrofotometer Shimadzu, Model RF 5000 (Shimadzu, Kyoto, Japan), serta metode pemeriksaan lain yaitu kompetitif ELISA. Metode ini pernah dilakukan oleh Pokupec et al (2003) untuk mengetahui kadar AGE pada lensa yang mengalami katarak pada subyek dengan dan tanpa diabetes melitus. (Pokupec, 2003). Pada penelitian oleh Pokupec ini, ELISA dilakukan dengan cara kompetitif ELISA dengan antibodi polyclonal anti AGE (Pokupec : 30) dan diperlukan competing antigen dalam hal ini adalah sampel lensa yang didapat dari lensa mata pasien yang menjalani ekstraksi katarak ekstra kapsular, *rabbit antiserum against AGEs*, serta p-nitrophenyl phosphate sebagai substrat kolorimetrik dalam buffer 2-amino-2-methylpropanolol (Pokupec, 2003).

Metode penelitian kami memilih dengan menggunakan kompetitif ELISA karena dapat mengetahui kadar AGE secara kuantitatif dan mudah dilakukan karena banyak anti AGE yang telah tersedia. Hasil dari penelitian ini menunjukkan kenaikan

yang signifikan pada kultur sel epitel lensa pada medium tanpa glukosa (kontrol negatif) dengan medium yang diberikan glukosa, yang berarti bahwa memang terjadi proses glikasi dalam sel. Pemberian GSH yang dikombinasi dengan niasin menunjukkan penurunan yang cukup signifikan, sehingga mengindikasikan bahwa kombinasi dua bahan tersebut memiliki sifat antioksidan dan antiglikasi.

Peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan peningkatan pembentukan AGEs melalui aktivasi PARP dan penurunan GAPDH serta dapat menyebabkan penurunan fungsi chaperone α Kristalin, sehingga akan terjadi perubahan struktur kristalin di dalam lensa yang akan memicu timbulnya agregasi dan polimerisasi α kristalin sehingga menyebabkan kekeruhan pada lensa dan timbul katarak. Agregasi dan polimerisasi α kristalin dalam penelitian ini diperiksa dengan menggunakan tehnik western blott. Dari hasil penelitian didapatkan hasil bahwa berat molekul α kristalin yang seharusnya 20 kD, ditemukan pada kisaran 72 kDa pada semua kelompok yang mengindikasikan terjadinya agregasi kristalin sehingga berat molekulnya bertambah. Pada kontrol negatif, juga ditemukan pada berat molekul 72 kDa karena kemungkinan kondisi sel epitel lensa yang diluar kondisi anatomis sebenarnya dianggap menjadi faktor pemicu terjadinya agregasi protein, meskipun belum ada pemberian glukosa tinggi. Pada seluruh kelompok dengan medium glukosa tinggi didapatkan peningkatan berat molekul karena terjadinya kondisi agregasi protein lensa, dan setelah pemberian GSH maupun kombinasi GSH niasin terdapat perubahan yang berbeda dari tiap kelompok. Dari pemeriksaan western blotting tersebut didapatkan penurunan intensitas blotting yang hampir sama pada tiga kelompok yang diberikan tiga dosis



GSH dan 1 dosis niasin, namun yang terbaik adalah pada kelompok dengan dosis GSH 10 μM dan niasin 25 μM .

Pada kondisi diabetes atau hiperglikemia, glukosa akan diubah menjadi sorbitol oleh enzim aldosa reduktase dengan bantuan NADPH. Pada metabolisme GSH, NADPH juga diperlukan untuk membantu daur ulang GSSG menjadi GSH, sehingga diperkirakan bila NADPH digunakan dalam metabolisme glukosa pada diabetes maka akan terjadi penumpukan GSSG di dalam sel. Penumpukan GSSG ini akan mengubah rasio GSH dan GSSG. Peningkatan GSSG yang berlebihan karena kurangnya daur ulang menjadi GSH diduga dapat menjadi pro oksidan. Meningkatkan kadar GSH di dalam sel diharapkan merupakan cara yang terbaik agar kadar GSH tetap dalam jumlah yang cukup sehingga fungsinya untuk menangkap ROS dapat berjalan dengan baik.

Pada kondisi diabetes melitus, konsentrasi glukosa di dalam sel lensa terlalu tinggi, sehingga glukosa akan diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldosa reduktase dan kemudian dioksidasi menjadi fruktosa. Aktivasi jalur poliol menyebabkan peningkatan metabolisme glukosa menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldosa reduktase dan mengkonsumsi kofaktor NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphat Hydrolase*). Penggunaan kofaktor NADPH untuk mengubah glukosa menjadi sorbitol diduga akan berkompetisi dengan perubahan *glutathione* teroksidasi (GSSG) menjadi *glutathione* tereduksi (GSH) yang juga memerlukan kofaktor NADPH. Penambahan niasin disini diharapkan dapat membantu sintesis NADP dan NADPH melalui *pentosephosphate pathway* sehingga kofaktor NADPH yang diperlukan untuk regenerasi GSH tetap tersedia dalam jumlah yang cukup.

Dasar teori tersebut yang mendasari pertimbangan pemberian niasin selain pemberian GSH karena kombinasi GSH dan niasin ini diharapkan dapat mempertahankan siklus regenerasi GSSG menjadi GSH yang membutuhkan niasin sehingga tidak terjadi penumpukan GSSG yang akan berakibat menjadi pro oksidan.

Dari keseluruhan hasil penelitian didapatkan bahwa kombinasi GSH dan niasin memang terbukti bermanfaat dalam mencegah pembentukan katarak yang ditunjukkan dengan penurunan agregasi kristalin dengan terutama melalui jalur AGEs, dengan kecenderungan dosis kombinasi terbaik adalah GSH 10 μ M-niasin 25 μ M.

Kesimpulan Penelitian Tahap III

- Tidak terdapat penurunan kadar *Protein Carbonyl Content* (PCC) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya.
- Tidak didapatkan dosis kombinasi GSH dan niasin yang optimal menurunkan kadar PCC pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.
- Tidak terdapat penurunan kadar GRP78/Bip pada kultur sel epitel lensa pada medium dengan glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkan.
- Tidak didapatkan dosis kombinasi GSH dan niasin yang optimal menurunkan kadar GRP 78/BiP pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.
- Terdapat penurunan kadar Advanced Glycation End Products (AGEs) pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya.
- Dosis kombinasi GSH 10 μ M dan niasin 25 μ M merupakan dosis yang terbaik untuk menurunkan kadar AGEs secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.

- Terdapat penurunan agregasi α kristalin pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi yang mendapatkan kombinasi GSH dan niasin dengan yang tidak mendapatkannya.
- Dosis kombinasi GSH $10\mu\text{M}$ dan niasin $25\mu\text{M}$ merupakan dosis yang terbaik untuk menurunkan agregasi α kristalin secara optimal pada kultur sel epitel lensa pada medium glukosa tinggi.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah KM, QaisFaizanAbul, AhmadIqbal, NaseemImrana. 2017. Inhibitory effect of vitamin B₃ against glycation and reactive oxygen species production in HSA: An *in vitro* approach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 627: 21-29
- Acosta-Sampson L, dan King J. 2010. Partially folded aggregation intermediates of human gammaD-, gammaC-, and gammaScrySTALLIN are recognized and bound by human alphaB-crystallin chaperone. *J. Mol. Biol.* 401: 134–152
- Adachi Y, Yamamoto K, [Okada T](#), [Yoshida H](#), [Harada A](#), [Mori K](#). 2008. ATF6 is a transcription factor specialized in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct. Funct.* 33: 75–89
- Al-Fawaeir S, Akgul EO, Cayci T. 2011. Comparison of Two Methods for Malondialdehyde Measurement. *Journal Of Clinical And Analytical Medicine*. 2(2): 12-14.
- Al-Mashat HA, Kandru S, Liu R, Behl Y, Desta T, Graves DT, 2006. Diabetes enhances mRNA levels proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired healing. *Diabetes*. 55: 487-495
- Altomare e, Grattagliano I, Vendemiale G, Micelli Ferrari T, Signorile A, cardia L. 1997. Oxidative protein damage in human diabetic eye : evidence of a retinal participation. *Eur J clin Invest*. 27: 141-147.
- Anderson RG, Falck JR, [Goldstein JL](#), [Brown MS](#), 1984. Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 4838 – 4842
- Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ. 2004. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell*. 6: 275–284
- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. 2014. *Glutathione* : new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*. 196(5): 1-12.
- Baldelli S, Aquilano K, Ciriolo MR. 2013. Punctum on two different transcription factors regulated by PGC- alpha: nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and nuclear respiratory factor 2. *Biochim. Biophys. Acta*. 1830: 4137–4146.
- Ballator [Nazzareno i](#), Krance [Suzanne M](#) , Notenboom [Sylvia](#) , Shi [Shujie](#) , Tieu [Kim Hammond Christine L](#) . 2009. *Glutathione* dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 390 (3): 191–214.
- Banerjee PR, [Puttamadappa SS](#), [Pande A](#), [Shekhtman A](#), and [Pande J](#). 2011. Increased hydrophobicity and decreased backbone flexibility explain the lower solubility of a cataract-linked mutant of gammaD-crystallin. *J. Mol. Biol.* 412: 647–659
- Bayro MJ, [Maly T](#), [Birkett NR](#), [MacPhee CE](#), [Dobson CM](#), and [Griffin RG](#). 2010. High-resolution MAS NMR analysis of PI3-SH3 amyloid fibrils: backbone conformation and implications for protofilament assembly and structure. *Biochemistry*. 49: 7474–7484
- [Behndig A](#), [Karlsson K](#), [Johansson BO](#), [Brännström T](#) [Marklund SL](#). 2001. Superoxide Dismutase Isoenzymes in the Normal and Diseased Human Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 2293-2296

- Beisswenger PJ, Howell SK, O'Dell RM, Wood ME, Touchette AD, Szwergold BS. 2001. Aliphatic carbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care*. 24: 726-732.
- Benedek GB. 1997. Cataract as a protein condensation disease: the Proctor Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 38: 1911-1921.
- Berthoud VM, Beyer EC. 2009. Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxidants Redox Signal* 11: 339-353
- Birkholz E, Oetting TA, Kitzmann AS. 2011. Posterior Polar Cataract. EyeRounds.org. Available from : <http://EyeRounds.org/cases/128-Posterior-Polar-Cataract.htm>. Diakses tanggal 7 Februari 2015.
- Bloemendal H, [de Jong W](#), [Jaenicke R](#), [Lubsen NH](#), [Slingsby C](#), [Tardieu A](#). 2004. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog. Biophys. Mol. Biol*. 86: 407-485
- Bobrovnikova-Marjon Ekaterina, Hatzivassiliou Georgia, Grigoriadou Christina, Romero Margarita, Cavener Douglas R, hompson Craig B. T, Diehl J. Alan .2008. PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105: 16314-16319.
- Bommiasamy Hemamalini, Back Sung Hoon, Fagone Paolo, Lee Kyungho, Meshinchi Sasha, Vink Elizabeth, Sriburi Rungtawan, Frank Matthew, Jackowski Suzanne, J Randal, Kaufman, W Joseph, Brewer. 2009. "ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum." *J. Cell Sci*. 122: 1626-1636.
- Borchman D dan Yappert MC. 2010. Lipids and the ocular lens. *J. Lipid Res. Jlr. R004119*.
- Boscia F, Grattagliano I, Vendemiale G, Micelli Ferrari T, Altomare E. 2000. Protein Oxidation and Lens Opacity in Humans. *Invest Ophthalmol Vis. Sci*; 41:2461-65.
- Bravo R, [Vicencio JM](#), [Parra V](#), [Troncoso R](#), [Munoz JP](#), [Bui M](#), [Quiroga C](#), [Rodriguez AE](#), [Verdejo HE](#), [Ferreira J](#), [Iglewski M](#), [Chiong M](#), [Simmen T](#), [Zorzano A](#), [Hill JA](#), [Rothermel BA](#), [Szabadkai G](#), [Lavandero S](#). 2011. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J. Cell Sci*. 124: 2143-2152
- Brownlee M. 2005. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes* 54: 1615-2635
- Butterfield DA, Pocernich CB, Drake J. 2002. Elevated *glutathione* as a therapeutic strategy in alzheimer's disease. *Drug Dev. Res*. 56: 428-437.
- Cacciatore I, Cornacchia C, Pinnen F, Mollica A, Di Stefano A. 2010. Prodrug Approach for Increasing Cellular *Glutathione* Levels. *Molecules* 15: 1242-1264.
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, and Ron D. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415: 92-96
- Cantor LB, Rapuano CJ, Cioffi GA. 2014. Biochemistry and Physiology in Lens and cataract Basic and Clinical Science Course. *American Academy of Ophthalmology San francisco* 11: 5-20



- Cekic Sonia, Zlatanovic Gordana, Cvetkovic Tatjana, Petrovic Branislav. 2010. Oxidative Stress In Cataractogenesis. *Bosnia Journal Of Basic Medical Sciences*. 10 : 266-269
- Chandrasena LG, Chackrewarthy S, [Perera PT, de Silva D](#). 2006. Erythrocyte antioxidant enzymes in patients with cataract. *Ann.Clin.Labo.Sci* 36: 201-204.
- Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Jr, Thomas JA. 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for *glutathione* disulfide. *Arch Biochem Biophys*. 310:273–281
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ.2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*.278:36027–36031
- Chung SS, Ho EC, [Lam KS, Chung SK](#). 2003. Contribution of polyol pathway to diabetesinduced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 14: S233–S236
- Clarkson PM.2000. Thompson HS: Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* 72(suppl): 637S-646S.
- Crowley CL., Payne, CM Bernstein, H Bernstein, C Roe. 2000. The NAD⁺ precursors, nicotinic acid and nicotinamide protect cells against apoptosis induced by a multiple stress inducer, deoxycholate. *Cell Death and Differ*, 7(3), 314-326.
- Cullinan SB dan Diehl JA. 2004. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem*.279: 20108–20117
- Cumming RG, Mitchell P, Smith W.2000. Diet and Cataract : the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 107(3):450-6.
- Das P, King JA, Zhou P, 2011. Aggregation of gamma-crystallins associated with human cataracts via domain swapping at the C-terminal betastrands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*.108: 10514–10519
- Datiles MB, Ansari RR, 2006. Methods used for Cataract Evaluation : Documentation of Cataract and Its Effect on Vision. References in : Clinical Evaluation of Cataracts Chapt. 73B. Duane’s Ophthalmology. Lippincot William and Wilkins.
- Delcourt C, Cristol JP, [Tessier F, Léger CL, Michel F, Papoz L](#). 2000. Risk factors for cortical nuclear, and posterior subcapsular cataracts: the POLA study: Pathologies Oculaires Liees a l’Age. *Am J Epidemiol*151: 497–504
- Derham BK, and Harding JJ. 2002. Effects of modifications of acrySTALLIN on its chaperone and other properties. *Biochem. J*.364: 711–717
- Dickinson DA, and Forman HJ.2002. Cellular *glutathione* and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol*. 64: 1019–1026.
- Dobson CM. 2004. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.15 : 3–16
- Donaldson PJ, Musil LS, Mathias RT.2010. Point: A critical appraisal of the lens circulation model-an experimental paradigm for understanding the maintenance of lens transparency? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 51: 2303-2306.

- Dalle D, Rossi R, Giustarini D, Mizani A, Colombo R. 2003. Protein Carbonyl groups as Biomarker of Oxidative Stress. *Clin Chim Acta*.329(1-2):23-88
- Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M. 2003. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 112: 1049-1057
- Emre S, Ateş B, Taşar A, Doğanay S. 2008. Lens Capsular *Glutathione* Level and *Glutathione* Peroxidase Activity Among Diabetic Patients + *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 15(3): 139-143.
- Ellgaard L, and Helenius A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 181–91
- Fang YZ, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872–879.
- Fan X, Monnier VM, Whitson J. 2017. Lens *glutathione* homeostasis: Discrepancies and gaps in knowledge standing in the way of novel therapeutic approaches. *Exp Eye Res*.156:103-111
- Fatma N, Singh P, Chhunchha B, Kubo E, Shinohara T, Bhargavan B, Singh DP. 2011. Deficiency of Prdx6 in lens epithelial cells induces ER stress response-mediated impaired homeostasis and apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*301: C954–C967.
- Ferreira N, Saraiva MJ, Almeida MR. 2011. Natural polyphenols inhibit different steps of the process of transthyretin (TTR) amyloid fibril formation. *FEBS Lett*.585: 2424–2430
- Firtina Zeynep, Danysh Brian P., Bai Xiaoyang, Gould Douglas B., Kobayashi Takehiro, Duncan, Melinda K. 2009. Abnormal expression of collagen IV in lens activates unfolded protein response resulting in cataract. *J. Biol. Chem.*284: 35872–35884.
- Firtina Z dan Duncan MK. 2011. *Unfolded Protein Response* (UPR) is activated during normal lens development. *Gene Expression Patterns*. 11: 135–143.
- Flaugh SL, Mills IA, and King J. 2006. Glutamine deamidation destabilizes human gammaD-crystallin and lowers the kinetic barrier to *unfolding*. *J. Biol. Chem.*281: 30782–30793
- Filippin Luisa, Magalhaes Paulo J., Benedetto Giulietta Di, Colella Matilde, Pozzan Tullio. 2003. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J. Biol. Chem.*278: 39224–39234.
- Fribley A, Zeng Q, Wang CY, Creagh EM, and Martin SJ. 2004. Proteasome Inhibitor PS-341 Induces Apoptosis through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress-Reactive Oxygen Species in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Mol Cell Biol*.24: 9695–9704
- Friedlander R., Jarosch Ernst, Urban Jorg, Volkwein Corinna, Sommer. 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.*2: 379–384.
- Ganea E, Harding JJ. 2006. *Glutathione* -related enzymes and the eye. *Curr Eye Res.* 31(1): 1-11.

- Garvey M, Ecroyd H, Ray NJ, Gerrard JA, Carver JA. 2017. Functional Amyloid Protection in the Eye Lens: Retention of α -Crystallin Molecular Chaperone Activity after Modification into Amyloid Fibrils. *Biomolecules Journal*. 7 (67).
- Gao S, Qin T, Liu Z, Caceres MA, Ronchi CF, Chen CY, Yeum KJ, Taylor A, Blumberg JB, Liu Y, Shang F. 2011. Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H₂O₂-induced oxidative damage in human lens epithelial cells. *Mol Vis*. 17:3180–90.
- Gentile CL, Frye MA, Pagliassotti MJ. 2011. Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease. *Biofactors*. 37: 8–16
- Gerber J, Muhlenhoff U, Hofhaus G, Lill R, Lisowsky T. 2001. Yeast Erv2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J. Biol. Chem.* 276: 23486–23491.
- Gong B, Zhang LY, Lam DS-C, Pang C-P, Yam GH-F. 2010. Sodium 4-phenylbutyrate ameliorates the effects of cataract-causing mutant gammaD-crystallin in cultured cells. *Mol. Vis*. 16: 997–1003
- Goulet DR, Knee Km, an King JA. 2011. Inhibition of Unfolding and Aggregation of Lens Protein Human Gamma D Crystallin by Sodium Citrate. *Exp Eye Res*. 93(4): 371–381.
- Gul A, Rahman MA, Salim A, Simjee SU. 2009. Advanced glycation end products in senile diabetic and nondiabetic patients with cataract. *J. Diabetes Complication* 23: 343-8. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2008.04.001. Epub 2008 May 27.
- Gupta VB, Rajagopala M, Ravishankar B. 2014. Etiopathogenesis of cataract: An appraisal. *Indian J. Ophthalmol* 62: 103-10
- Hains PG, and Truscott RJ. 2007. Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses. *J. Proteome Res*. 6: 3935–3943
- Hains PG, dan Truscott RJ. 2008. Proteomic analysis of the oxidation of cysteine residues in human age-related nuclear cataract lenses. *Biochim. Biophys. Acta*. 1784: 1959–1964
- Hammond CL, Lee TK, Ballatori N. 2001. Novel roles for *glutathione* in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J. Hepatol*. 34: 946–954.
- Hanson SRA, Hasan A, Smith DL, Smith JB. 2000. The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation, and backbone cleavage. *Exp. Eye Res*. 71: 195–207
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6: 1099–1108
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11: 619–633
- Hashim Z, and Zarina S. 2012. Osmotic stress induced oxidative damage: possible mechanism of cataract formation in diabetes. *J. Diabetes Complication* 26: 275-9. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.04.005.

- [Haynes CM](#), [Titus EA](#), [Cooper AA](#). 2004. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell* 15: 767-76
- Haze Kyosuke, Okada Tetsuya, Yoshida Hiderou, Yanagi Hideki, Yura Takashi, Negishi Manabu, Mori Kazutoshi. 2001. Identification of the G13 (cAMP-response-elementbinding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* 355: 19-28.
- Hennis A, Wu, SY Wu SY, Nemesure B, Leske MC, 2005. Barbados Eye Studies Group. Risk factors for incident cortical and posterior subcapsular lens opacities in the Barbados Eye Studies. *Arch Ophthalmol* 122: 525-530
- Heys KR, [Friedrich MG](#), [Truscott RJ](#), 2007. Presbyopia and heat: changes associated with aging of the human lens suggest a functional role for the small heat shock protein, alpha-crystallin, in maintaining lens flexibility. *Aging Cell* 6: 807-815
- Hidayat AA. 2010. Metode Penelitian dan Teknik Analisis Data. Jakarta: Salemba Medika. 80-81
- Higdon, J. 2000. Micronutrient Information Center: Niacin. Retrieved September 26, 2015, from <http://pi.oregonstate.edu/mic/vitamins/niacin#deficiency>
- Holm T, Brogger-Jensen MR, Johnson L, Kessel L. 2013. *Glutathione* Preservation during Storage of Rat Lenses in Optisol-GS and Castor Oil. *PLOS ONE* 8: 1-5
- Hong [Min](#), Luo [Shengzhan](#), Baumeister [Peter](#), Huang [Jen-Ming](#), Gogia [Raveen K.](#), Li [Mingqing](#), Lee [Amy S.](#) 2004. "Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response." *J. Biol. Chem.* 279: 11354-11363.
- Huang P, Jiang C, Teng S. 2006. Synergism between phospholipase D2 and sorbitol accumulation in diabetic cataract formation through modulation of Na, K-ATP-ase activity and osmotic stress. *Exp Eye Res* 8: 939-938
- Inagi R, Kumagai T, Fujita T, and Nangaku M. 2010. The role of glyoxalase system in renal hypoxia. *Adv Exp. Med. Biol.* 662: 49-55.
- Iwawaki T, Hosoda A, Okuda T, Kamigori Y, Nomura-Furuwatari C, Kimata Y, Tsuru A, and Kohno K. 2001. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat. Cell. Biol.* 3: 158-164
- Iwakoshi [Neal N](#), Lee [Ann-Hwee](#), Vallabhajosyula [Prasanth](#), Otipoby [Kevin L.](#), Rajewsky [Klaus](#), Glimcher [Laurie H.](#) 2003. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat. Immunol.* 4: 321-329.
- J Shen, X [Chen](#), L [Hendershot](#), R [Prywes](#). 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 3(1):99-111.
- Jansirani, Anathanaryana PH. 2004. A comparative study of lens protein glycation in various forms of cataract. *Indian J Clin Biochem* 19: 110-112
- Journal Chromatogr B. 2007. Determination of Malondialdehyde (MDA) by HPLC, In serum and liver as a biomarker for oxidative stress. 827: 76-82.
- Kador PF. (2010). Diabetes-associated cataracts in : Leonard A, Levin MD

- Jung Y, Kim MS, Joo CK, Chung SK. 2013. Role of the intrinsic apoptosis pathway in cataractogenesis in type 2 diabetic patients. *J. Cataract. Refract. Surg.* 39: 1470-1476
- Kador PF. 2010. Diabetes-associated cataracts in: Leonard A, Levin MD, Daniel M.A. Ocular Disease : Mechanisms and Management. Elsevier inc all rights USA 32: p243-249
- Kathleen Head ND. 2001. Natural Therapies for Ocular Disorders Part Two: Cataracts and Glaucoma. *Altern. Med. Rev.* 6(2): 141-166.
- Kerksick C dan Willoughby D. 2005. The Antioxidant Role of *Glutathione* and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2(2): 38-44.
- Khalfaoui T, Basora N, Ouertani-Meddeb A. 2010. Apoptotic factors (Bcl-2 and Bax) and diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *J. Mol. Hist.* 41: 143
- Kisic B, Miric D, Zoric L, Ilic A. 2012. Role of Lipid Peroxidation in the Pathogenesis of Age-Related Cataract. Biochemistry, Genetic and Molecular Biology, editor: Angel Catala 2012. *Intech Publisher.* Croatia. Europe
- Kim YH, [Kapfer DM](#), [Boekhorst J](#), [Lubsen NH](#), [Bächinger HP](#), [Shearer TR](#), [David LL](#), [Feix JB](#), [Lampi KJ](#). 2002. Deamidation, but not truncation, decreases the urea stability of a lens structural protein, betaB1-crystallin. *Biochemistry* 41: 14076–14084
- Kirkland J. 2009. Niacin Status Impacts Chromatin Structure. *J Nutr.* 139 (12) : 2397-2401.
- Klein BE, Klein R, [Wang Q](#), [Moss SE](#). 2005. Older-onset diabetes and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmic Epidemiol.* 2: 49 –55
- Knee Kelly M, Goulet Daniel R, Zhang Junjie, Chen Bo, Chiu Wah dan King Jonatha A. 2011. The group II chaperonin Mm-Cpn binds and refolds human γ D crystalline. *Protein Sci.* 20(1): 30–41.
- Koo HJ, Piao Y, Pak YK. 2012. Endoplasmic reticulum stress impairs insulin signaling through mitochondrial damage in SH-SY5Y cells. *NeuroSignals* 20: 265–280
- Kosinski-Collins MS, and King J. 2003. In vitro *unfolding*, refolding, and polymerization of human gamma D crystallin, a protein involved in cataract formation. *Protein Sci.* 12: 480–490
- Kumar MS, Mrudula T, Mitra N, Reddy GB. 2004. Enhanced degradation and decreased stability of eye lens α -crystallin upon methylglyoxal modification. *Exp. Eye. Res.* 79: 577-83
- Kumar PA dan Reddy GB. 2009. Modulation of α -Crystallin Chaperone Activity: A Target of Prevent or Delay Cataract?. *Life* 65: 485-495
- Kumar PA, Reddy PY, Suryanarayana P, Reddy GB. 2011. Effect of the tannoid enriched fraction of *Emblca officinalis* on α -crystallin chaperone activity under hyperglycemic conditions in lens organ culture. *J. Biophys. Struct. Biol.* 3(2): 30-37.
- Lambert AJ, Brand MD. 2004. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J.* 382:511–517

- Lampi KJ, [Wilmarth](#) PA, [Murray](#) MR, dan [David](#) LL. 2006. Deamidation in human lens betaB2-crystallin destabilizes the dimer. *Biochemistry*45: 3146–3153
- Laplante M dan Sabatini DM. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*.149: 274–293
- Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.*23: 7448–7459
- Lee J dan Ozcan U. 2014. Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases. *J. Biol. Chem.*289: 1203–1211.
- Li Mingqing, Baumeister Peter, Roy Binayak, Phan Trevor, Foti Dolly, Luo Shengzhan, S Amy, Lee.2000. ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol. Cell Biol.*20: 5096–5106.
- Li W, Calvin HI, David LL, Wu K, McCormack AL, Zhu GP, Fu SC. 2002. Altered patterns of phosphorylation in cultured mouse lenses during development of buthionine sulfoximine cataracts. *Exp Eye Res.* 75(3):335-346.
- Liang JJ, Akhtar NJ, 2000. Human lens high-molecular-weight alpha-crystallin aggregates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 354–359
- Lim JH, [Lee HJ](#), [Ho Jung M](#), [Song J](#). 2009. Coupling mitochondrial dysfunction to endoplasmic reticulum stress response: a molecular mechanism leading to hepatic insulin resistance. *Cell, Signal.*21: 169–177
- Lim SA, Joo CK, Kim Man Soo, Chung SK. 2014. Ekspresion of ps3 and caspase-8 in lens epithelial cells of diabetic cataract. *J. Cataract Refrac. Surg.* 40: 1102-1108
- Linetsky M, Chemoganskiy VG, Hu F, Ortwerth BJ. 2003. Effect of UVA Light on the Activity of Several Aged Human Lens Enzymes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(1): 264-74.
- Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S, and Takahashi K. 2001. Immunohistochemical Distribution and Quantitative Biochemical Detection of Advanced Glycation End Products in Fetal to Adult Rats and in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes *Laboratory Investigation.* 81(6): 845-861.
- Lou MF. 2000. Thiol Regulation in the lens. *Journ. of Ocular Pharmacol. and Therapeut.* 16 (2): 137-148.
- Lou MF. 2003. Redox regulation in the lens. *Prog. Retin. Eye. Res.* 22: 657-682.
- Lu SC. 2000. Regulation of *glutathione* synthesis. *Curr Top Cell. Regul.* 36: 95–116
- Lu SC. 2013. *Glutathione* synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830: 3143–3153.
- Lushchak VI. 2012. *Glutathione* Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J Amino Acids* 2012: 1-26
- M Khajehpour JL, Dashnau JM, Vanderkooi. Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins, *Anal. Biochem.* 348; 40-48
- M FB. 2002. Oxidatively modified proteins in aging and disease 1, 2, *Free Radic. Biol Med.* 32 (9); 797- 803

- Ma Y dan Hendershot LM.2004.The role of the unfolded protein response in tumor development: friend or foe?. *Nat. Rev. Cancer*4: 966–77
- Marsili S, [Salganik RI](#), [Albright CD](#), [Freel CD](#), [Johnsen S](#), [Peiffer RL](#), [Costello MJ](#). 2004. Cataract formation in a strain of rats selected for high oxidative stress. *Exp. Eye Res.*79: 595–612
- Martins AM, Cordeiro CA, Ponces Freire AM. 2001. Insitu analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 499: 41–44.
- Mathew JP, Joseph P, Thomas VC, Thomas I. 2006. *Glutathione* and associated enzymes in toxic cataractogenesis-Selenite model. *Journal Environ Biol* 27: 733-738.
- McCullough Karen D, Martindale Jennifer L, Klotz Lars-Oliver, Aw Tak-Yee, Holbrook Nikki J.2001.Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state.*Mol. Cell Biol*,21: 1249–1259.
- Meehan S, [Berry Y](#), [Luisi B](#), [Dobson CM](#), [Carver JA](#), [MacPhee CE](#). 2004. Amyloid fibril formation by lens crystallin proteins and its implications for cataract formation. *J. Biol. Chem.*279: 3413–3419
- Meng F, [Abedini A](#), [Plesner A](#), [Verchere CB](#), [Raleigh DP](#). 2010. The flavanol (–)-epigallocatechin 3-gallate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide, disaggregates amyloid fibrils, and protects cultured cells against IAPP-induced toxicity. *Biochemistry*. 49: 8127–8133
- Michael R, Bron AJ. 2011. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 366: 1278–1292
- Mishra R, Emancipator SN, Kem T, Simonson MS. 2005. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int.*67: 82-93
- Mohamad N, Gutiérrez A, Nunez M, Cocca C, Martin G, Cricco G, Medina V, Rivera E, Bergoc R, 2005. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell*. 29: 149-161
- Moran S, [Woys AM](#), [Buchanan LE](#), [Bixby E](#), [Decatur SM](#), [Zanni MT](#). 2012. Two-dimensional IR spectroscopy and segmental ¹³C labeling reveals the domain structure of human gammaD-crystallin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*109: 3329–3334
- Morishima Nobuhiro, Nakanishi Keiko, Takenouchi Hiromi, Shibata Takehiko, Yasuhiko Yukuto, N Morishima.2002.An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem*,277: 34287–34294.
- Moreau KL, and King JA/ 2012. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends in Molecular Medicine*18: 273-282
- Mukesh BN, [Le A](#), [Dimitrov PN](#), [Ahmed S](#), [Taylor HR](#), [McCarty CA](#). 2006. Development of cataract and associated risk factors: the Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol*124: 79–85
- Mulhern ML, Madson CJ, Danford A, Ikesugi K, Kador PF, Shinohara T. 2006. The unfolded protein response in lens epithelial cells from galactosemic rat lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*47: 3951-3959

- Nagaraj RH, Oya-Ito T, [Padayatti PS](#), [Kumar R](#), [Mehta S](#), [West K](#), [Levison B](#), [Sun J](#), [Crabb JW](#), [Padival AK](#). 2003. Enhancement of chaperone function of α -crystallin by methylglyoxal modification. *Biochemistry*42: 10746–10755
- Nelson R, and Eisenberg D. 2006. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.*16: 260–265
- Ni S, Yu Y, Zhang Y, Wu W, Lai K, Yao K. 2013. Study of Oxidative Stress in Human Lens Epithelial Cells Exposed to 1.8 GHz Radiofrequency Fields. *PLOS ONE*. 8(8:e72370): 1-9.
- Nishitoh [Hideki](#), Matsuzawa [Atsushi](#), Tobiume [Kei](#), Saegusa [Kaoru](#), Takeda [Kohsuke](#), Inoue [Kiyoshi](#), Hori [Seiji](#), Kakizuka [Akira](#), Ichijo [Hidenori](#). 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev. Cell*16: 1345–1355.
- Okamura N, Ito Y, Shibata M-A, Ikeda T, Otsuki Y. 2002. Fast-mediated apoptosis in human lens epithelial cells of cataracts associated with diabetic retinopathy. *Med. Electron Microsc.*35: 234-241
- Olofsson EM, Marklund SL, Behndig A. 2009. Enhanced diabetes-induced cataract in copper-zinc superoxide dismutase-null mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*50: 2913–2918
- Olofsson EM, Marklund SL, Karlsson K, Behndig A. 2005. In vitro glucose-induced cataract in copper-zinc superoxide dismutase null mice. *Experimental Eye Research* 81: 639-646
- Ornek K, [Karel F](#), [Buyukbingol Z](#), 2003. May nitric oxide molecule have a role in the pathogenesis of human cataract?. *Exp Eye Res.*76: 23–27
- Orrenius S, [Zhivotovsky B](#), [Nicotera P](#). 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*4: 552–565
- Oshitari T, Yamamoto S, Hata N, Roy S. 2008. Mitochondria and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy. *Br. J. ophthalmol.* 92: 552-556
- Özmen B, Özmen D, Erkin E, Güner İnci, Habif [Sara](#), Bayındır [Oya](#). 2002. Lens superoxide dismutase and catalase activities in diabetic cataract. *Clinical Biochemistry* 35: 69-72.
- Pandya AV. 2014. Proteomix and Enzyme Kinetics in Normal and Cataractous Human Lens. *Global Journal of Science Frontier Research: G Bio-Tech & Genetics* 14(2): 1-5.
- Papa FR. 2012. Endoplasmic Reticulum Stress, Pancreatic β -Cell Degeneration, and Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1-17.
- Papanikolopoulou K, [Mills-Henry I](#), [Thol SL](#), [Wang Y](#), [Gross AA](#), [Kirschner DA](#), [Decatur SM](#), [King J](#). 2008. Formation of amyloid fibrils in vitro by human γ D-crystallin and its isolated domains. *Mol Vis.*14: 81–89
- Paredes [R. Madelaine Paredes](#), Bollo [Mariana](#), Holstein [Deborah](#), and Lechleiter James D. 2013. Luminal Ca^{2+} Depletion During The Unfolded Protein Response in *Xenopus* Oocytes: Cause and Consequence. *Cell Calcium*. 53(4): 286–296.
- [Pokroy R](#), [Tendler Y](#), [Pollack A](#), [Zinder O](#) [Weisinger G](#). 2002. Expression in the Normal Murine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* June 43: 1736-1741

- Pokupec R, Kalauz M, Turk N, and Turk Z. 2003. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. *Graef's ARCH Clin Exp. Ophthalmol.* 241: 378-384
- Pollreis A, Schmidt-Erturh US. 2010. Diabetic Cataract—Pathogenesis, Epidemiology and Treatment. *J Ophthalmol* p1-8. www.hindawi.com/journals/joph/2010/608751/
- Rainbolt TK, Saunders JM, Wiseman L. 2014. Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. *Trends Endocrinol Metab.* 25: 528-237
- Rajan S, Horn C, Abraham EC. 2006. Effect of oxidation of aA- and aB-crystallins on their structure, oligomerization and chaperone function. *Mol. Cell. Biochem.* 288: 125–134
- Raju I, Kannan K, Abraham EC. 2013. FoxO3a Serves as a Biomarker of Oxidative Stress in Human Lens Epithelial Cells under Conditions of Hyperglycemia. *PLOS ONE* 8(6): e67126.
- Raman R, Pal SS, Adams JSK, Rani PK, Vaitheeswaran K, Sharma T. 2010. Prevalence and Risk Factors for Cataract in Diabetes: Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetics Study, Report No. 17 *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 6253-6261
- Rao [Rammohan V](#), Peel [Alyson](#), Logvinova [Rio](#), Hermel [Evan](#), Yokota [Takanori](#), Goldsmith [Paul C](#), Ellerby [Lisa M](#), Ellerby [H. Michael](#), Bredesen [Dale E](#). 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 21836–21842.
- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D. 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health* 82: 844-51
- Reimold [Andreas M](#), Iwakoshi [Neal N](#), Manis [John](#), Vallabhajosyula [Prashanth](#), Tsuda [Eva Szomolanyi](#), Gravallesse [Ellen M](#), [Daniel Friend](#), Grusby [Michael J](#), Alt [Frederick](#), Glimcher [Laurie H](#). 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.* 412: 300–307.
- Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, and Mammucari C, 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 566–578
- Ron D, and Walter P, 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 519–529
- Rotimi C, Daniel H, [Zhou J](#), [Obisesan A](#), [Chen G](#), [Chen Y](#), [Amoah A](#), [Opoku V](#), [Acheampong J](#), [Agyenim-Boateng K](#), [Eghan BA Jr](#), [Oli J](#), [Okafor G](#), [Ofoegbu E](#), [Osotimehin B](#), [Abbiyesuku F](#), [Johnson T](#), [Fasanmade O](#), [Dumatay A](#), [Aje T](#), [Collins F](#), [Dunston G](#). 2003. Prevalence and determinants of diabetic retinopathy and cataracts in West African type 2 diabetes patients. *Ethn. Dis.* 13: S110-S117
- Rutkowski DT dan Kaufman RJ. 2004. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 14: 20–28
- Sandilands A, [Hutcheson AM](#), [Long HA](#), [Prescott AR](#), [Vrensen G](#), [Loster J](#), [Klopp N](#), [Lutz RB](#), [Graw J](#), [Masaki S](#), [Dobson CM](#), [MacPhee CE](#), [Quinlan RA](#). 2002. Altered aggregation properties of mutant gamma-crystallins cause inherited cataract. *Embo J.* 21: 6005–6014

- Santhoshkumar P, [Udupa P](#), [Murugesan R](#), [Sharma KK](#). 2008. Significance of interactions of low molecular weight crystallin fragments in lens aging and cataract formation. *J. Biol. Chem.*283: 8477–8485
- Santhoshkumar P, Raju M, Sharma KK. 2011. α A-Crystallin peptide SDRDKFVIFLDVKHF accumulating in aging lens impairs the function of alpha-crystallin and induces lens protein aggregation. *Plos One*6: e19291
- Santiago AR, Christovao AJ, Santos PF, Carvalho CM, Ambrosio AF. 2007. High glucose induces caspase-independent cell death in retinal nuclear cells. *Niurobiol. Dis.*25: 464-472
- Saxena S, Mitchell P, [Roctchina E](#). 2004. Five-year incidence of cataract in older persons with diabetes and prediabetes. *Ophthalmic Epidemiol*11: 271-277
- Saygili EI, Aksor SN, Gurler B, Erel O, Ozaslan M, 2010. Oxidant/Antioxidant satatus of patients with diabetic and snile cataract. *Biotechnol Biotechnoll Equip*24: 1648.1652
- Scheuner [Donalyn](#) , Song [Benbo, Ewen Edward Mc, Liu Chuan,](#) Laybutt [Ross Gillespie Patrick, Saunders Thom, Weir Susan Bonner, Kaufman Randal J.](#) 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell.*7: 1165–1176.
- Schroder M, and Kaufman RJ. 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation ReseARch* 569: 29–63
- Sen CK.2001. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 33(3): 368-370.
- Sen CK and Packer L. 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72(suppl): 653S-669S.
- Sevier CS, Cuozzo JW, [Vala A](#), [Aslund F](#), [Kaiser CA](#).2001. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat. Cell Biol.*3: 874–882
- Shaffer [A.L.](#) Shelef [Miriam Shapiro](#), Iwakoshi [Neal N, Le Ann-Hweee](#) , Qian [Shu-Bing](#), Zhao [Hong.](#) Yu [Xin](#), [Yang](#) Liming, [KTan](#) Bruce , Rosenwald [Andreas](#) , MHurt [Elaine.](#) Petroulakis [Emmanuel, Sonenberg Nahum, Sonenberg Jonathan W Yewdell, Calame Kathryn, Jimcher Laurie HG.](#)2004.XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity.* 21: 81–93.
- Sharma KK dan Santhoshkumar P.2009 Lens aging: effects of crystallins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790: 1095–1108
- Shen J, Chen Xi, Hendershot Linda, Prywes Ron.2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.*3: 99–111.
- Shimizu M, Takeshita A, [Tsukamoto T](#), [Gonzalez FJ](#), [Osumi T](#). 2004. Tissue-selective, bidirectional regulation of PEX11 alpha and perilipin genes through a common peroxisome proliferator response element. *Mol. Cell. Biol.*24: 1313–1323
- Singh Z, Karthigesu IP, Singh P, Kaur R, 2014. Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Diferent Disease Pathologies: a Review. *Iranian J. Publ. Health.* 43: 7-16

- Sriburi Rungtawan, Jackowski Suzanne, Mori Kazutoshi, Brewer Joseph W. 2004. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 167: 35–41.
- Sriburi [Rungtawan](#), Bommasiamy [Hemamalini](#), Buldak [Gerald L.](#) Robbins [Gregory R.](#) Frank [Matthew](#), Jackowski [Suzanne](#), Brewer [Joseph W.](#) 2007. "Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis." *J Biol Chem.* 282(10): 7024-34.
- Srinivas M. 2014. Delivery of *Glutathione* to the Lens Nucleus. *Journal of Ophthalmic and Vision Research* 9(1): 148-149.
- Stipanuk MH. 2000. Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition. *Philadelphia, PA: SAUNDERS.*
- Stitt AW. 2005. The Maillard reaction in eye diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043: 582–597
- Strange RC, Jones PW, Fryer AA. 2000. *Glutathione* S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 112–113: 357–363.
- Suryanarayana P, Kumar PA, Saraswat M, Petrash JM, Reddy GB. 2004. Inhibition of aldose reductase by tannoid principles of *Emblica officinalis*: implications for the prevention of sugar cataract. *Mol. Vis.* 10: 148-154.
- Suryanarayana P, Saraswat M, Petrash JM, Reddy GB. 2007. *Emblica officinalis* and its enriched tannoids delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Mol. Vis.* 13: 1291-1297.
- [Suryanarayana P](#), [Saraswat M](#), [Mrudula T](#), [Krishna TP](#), [Krishnaswamy K](#), [Reddy GB](#), 2005. Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *IOVS Journal* 46: 2092-9
- Suttnar J, Massova L, Dyr E. (2001). Determination of Malondialdehyde (MDA) by HPLC as 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Chromatogr B.* 751: 193.
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A, 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010: 186–194
- Takata T, [Oxford JT](#), [Brandon TR](#), [Lampi KJ](#), 2007. Deamidation alters the structure and decreases the stability of human lens betaA3-crystallin. *Biochemistry* 46: 8861–8871
- Takata T, [Oxford JT](#), Demeler [B](#), [Lampi KJ](#), 2008. Deamidation destabilizes and triggers aggregation of a lens protein, betaA3-crystallin. *Protein Sci.* 17: 1565–1575
- Takata T, Woodbury LG, [Lampi KJ](#). 2009. Deamidation alters interactions of betacrystallins in hetero-oligomers. *Mol. Vis.* 15: 241–249
- Tang WH, Martin KA, Hwa JO. 2012. Aldose Reductase, Oxidative Stress, and Diabetes Mellitus. *Front Pharmacol* 3: 87.
- [Torres-Bernal BE](#), [Torres-Bernal LF](#), [Gutiérrez-Campos RR](#), [Kershenovich Stalnikowitz DD](#), [Barba-Gallardo LF](#), [Chayet AA](#), [Ventura-Juárez J](#), 2014. Unfolded protein response activation in cataracts. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 40: 1697-705
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. 2003. The importance of *glutathione* in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 57: 145–155.

- Trombetta ES, and Parodi AJ.2003. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19: 19: 649–76
- Truscott RJ.2005. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key. *ExpEyeRes.*80: 709–725
- Tukozkan N, Erdamar H, Seven I.2006. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Experimental Research.* 11(2): 88–92.
- Tu BP, and Weissman JS.2002. The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 10: 983–994
- Tu BP, and Weissman JS. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes mechanisms and consequences. *J Cell Biol.* 164(3): 341–346.
- Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS, 2000. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*290: 1571–1574.
- University of Maryland Medical Center (UMMC). 2004. [Vitamin B3 \(Niacin\)](#). University of Maryland Medical Center Web Site. Retrieved January 28, 2007.
- Urano F, Wang X, [Bertolotti A](#), [Zhang Y](#), [Chung P](#), [Harding HP](#), [Ron D](#), 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*287: 664–666
- Varma SD, Hedge KR, Kovtun S.2008. UV-B-induced damage to the lens in vitro: prevention by caffeine. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*24: 439–444
- Vislisel J, 2013. Eye Rounds online atlas of ophthalmology. Available at <http://webeye.ophth.uiowa.edu>. Diakses tanggal 7 Februari 2015
- Votyakova TV, Reynolds IJ.2005.Ca²⁺-induced permeabilization promotes free radical release from rat brain mitochondria with partially inhibited complex I. *J Neurochem.* 93:526–537
- Wang S, Leng XY, Yan YB, 2011. The benefits of being beta-crystallin heteromers: betaB1-crystallin protects betaA3-crystallin against aggregation during co-refolding. *Biochemistry*50: 10451–10461
- Wang X, Simpkins JW, Dykens JA, CammarataPR.2003. Oxidative Damage to Human Lens Epithelial Cells in Culture: Estrogen Protection of Mitochondrial Potential, ATP, and Cell Viability.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(5): 2067–2075.
- Wang Y, [Petty S](#), [Trojanowski A](#), [Knee K](#), [Goulet D](#), [Mukerji I](#), [King J](#). 2010. Formation of amyloid fibrils in vitro from partially unfolded intermediates of human C-crystallin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*51: 672–678
- [Wang HJ](#), [Zhu J](#), [Zheng GY](#),2014. Role of *glutathione* and other antioxidants in the inhibition of apoptosis and mesenchymal transition in rabbit lens epithelial cells. *Genet Mol Res.* 2014 Sep 1;13(3):7149-56
- Webb SE, and Miller AL. 2003. Calcium signalling during embryonic development. *NatRev Mol Cell Biol.*4: 539–551
- Weike [Karen A I](#), Garber [Caren](#), Baburins [Alyssa](#), Taylor Allen. 2014 . Nutritional modulation of cataract. *Nutr Rev. Jan; 72(1): 30–47.*

- West S. 2013. Cataract – Middle east/North Africa. American Academy of Ophthalmology. Available at: <http://one.aao.org>. diakses tanggal 7 Februari 2015
- Wickner W, and Schekman R. 2005. Protein translocation across biological membranes. *Science* 310: 1452–56
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. *Glutathione* metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134: 489–492.
- Wu J dan Kaufman RJ. 2006. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.* 13: 374–84
- Yadav SK, Singla-Pareek SL, and Sopory SK. 2008. An overview on the role of methyl glyoxal and glyoxalases in plants. *Drug Metabol. Drug. Interact.* 23: 51–68.
- [Yamamoto K](#), [Sato T](#), [Matsui T](#), [Sato M](#), [Okada T](#), [Yoshida H](#), [Harada A](#), [Mori K](#). 2007. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* 13: 365-76
- Yoneda T, Imaizumi K, et al. 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* 276: 13935–13940.
- Ye J, Rawson RB, et al. 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6: 1355–1364.
- [Yildirim Z](#), [Yildirim F](#), [Ucgun NI](#), [Kilic N](#). 2009. The evaluation of the oxidative stress parameters in nondiabetic and diabetic senile cataract patients. *Biol. Trace Elem Res.* 128: 135-43. doi: 10.1007/s12011-008-8258-9
- Yoneda [Takunari](#) , Imaizumi [Kazunori i](#), Oono [Kayoko](#) , Yui [Daishi](#) , Gomi [Fumi](#) , Katayama [Taiichi](#) , Tohyama [Masaya](#) . 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* 276: 13935–13940.
- Yoshida H, 2007. Unconventional splicing of XBP-1 mRNA in the unfolded protein response. *Antioxid Redox. Signal* 9: 2323–2333
- Yoshida H, 2009. ER Stress Response, Peroxisome Proliferation, Mitochondrial Unfolded Protein Response and Golgi Stress Response. *Life* 61: 871–879
- Yoshida H, Matsui T, [Hosokawa N](#), [Kaufman RJ](#), [Nagata K](#), [Mori K](#), 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell* 4: 265–271
- Yoshida H, Nadanaka S, [Sato R](#), [Mori K](#), 2006. XBP1 is critical to protect cells from endoplasmic reticulum stress: evidence from site-2 protease-deficient Chinese hamster ovary cells. *Cell Struct. Funct.* 31: 109–116
- Yoshida H, Okada T, [Haze K](#), [Yanagi H](#), [Yura T](#), [Negishi M](#), [Mori K](#), 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* 20: 6755–6767
- Yoshida H, Okada T, [Haze K](#), [Yanagi H](#), [Yura T](#), [Negishi M](#), [Mori K](#), 2001. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor



complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.*21: 1239–1248

Yoshida H, Oku M, [Oku M](#), [Suzuki M](#), [Mori K](#), 2006. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *JCell Biol.*172: 565–575

Zeevaert R, Foulquier F, [Jaeken J](#), [Matthijs G](#), 2008. Deficiencies in subunits of the conserved oligomeric golgi (COG) complex define a novel group of congenital disorders of glycosylation. *Mol. Genet. Metab.*93: 15–21

Zhang K, Shen X, et al. 2006. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*124: 587–599.

Zhang S, Chai FY, Yan H, Guo Y, Harding JJ, 2008. Effects of N-acetylcysteine and glutathione ethyl ester drops on streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Molecular Vision*, 14: 862-870

Zhang Z, [Smith DL](#), [Smith JB](#), 2003. Human beta-crystallins modified by backbone cleavage, deamidation and oxidation are prone to associate. *ExpEyeRes.*77: 259–272

Zheng Jianzheng, Hu Chen-Lin, Sharley KL, Bizzorezo OA. 2017. Mechanis of Protein Carbonylation in Glutathione -Deplete Rat. *Neurochemical Reseach.*43; 609-618

Zigler JS Jr, Qin C, Kamiya T.2003. Tempol-H inhibits opacification of lenses in organ culture. *Free Radic. Biol. Med.* 35: 1194-1202.

Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlarge T, Kizek R. 2012. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett.* 4(6): 1247–1253.

Zong WX, Li C, et al. 2003. "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." *J. Cell Biol.*162: 59–69.

Zorawar S, Indrakaran PK, Pramjit S, Rupinder K. 2014. Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies: a Review. *Iranian J. Publ. Health.* 43(3): 7-16.

Zoric L, Elek-Vlajic S, Jovanovic M, Kistic B, Djokic O, Canadanovic V, Cosic V, Jaksic V.2008. Oxidative stress intensity in lens and aqueous depending on age-related cataract type and brunescense. *Eur. J. Ophthalmol.* 18(5): 669-674.

Lampiran 1 Analisa Statistik Kadar MDA dengan pemberian GSH

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MDA	.276	21	.000	.645	21	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas Ragam

Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14.366	6	14	.000

Deskriptif

Descriptives

MDA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					K-	3		
glukosa 25 mm	3	.1602	.18354	.10597	-.2958	.6161	.05	.37
10 mm GSH	3	.0133	.01149	.00663	-.0153	.0418	.00	.02
30 mm GSH	3	.0842	.00000	.00000	.0842	.0842	.08	.08
100 mm GSH	3	.0303	.00554	.00320	.0165	.0440	.02	.04
300 mm GSH	3	.0701	.00713	.00412	.0524	.0878	.06	.08
1000 mm GSH	3	.0893	.01117	.00645	.0616	.1171	.08	.10
Total	21	.0637	.07850	.01713	.0280	.0994	-.01	.37

Uji Kruskal wallis

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
MDA	K-	3	2.33
	glukosa 25 mm	3	14.00
	10 mm GSH	3	4.67
	30 mm GSH	3	17.00
	100 mm GSH	3	8.00
	300 mm GSH	3	13.00
	1000 mm GSH	3	18.00
	Total	21	

Test Statistics

	MDA
Chi-square	17.372
Df	6
Asymp. Sig.	.008

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan



Uji Lanjut dengan Mann Whitney

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-	3	2.00	6.00
MDA glukosa 25 mm	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-	3	2.33	7.00
MDA 10 mm GSH	3	4.67	14.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.550
Asymp. Sig. (2-tailed)	.121
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-	3	2.00	6.00
MDA 30 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-	3	2.00	6.00
MDA 100 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-	3	2.00	6.00
MDA 300 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-	3	2.00	6.00
MDA 1000 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan



Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
glukosa 25 mm	3	5.00	15.00
MDA 10 mm GSH	3	2.00	6.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
glukosa 25 mm	3	3.00	9.00
MDA 30 mm GSH	3	4.00	12.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.696
Asymp. Sig. (2-tailed)	.487
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
glukosa 25 mm	3	5.00	15.00
MDA 100 mm GSH	3	2.00	6.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA glukosa 25 mm	3	3.00	9.00
MDA 300 mm GSH	3	4.00	12.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA glukosa 25 mm	3	3.00	9.00
MDA 1000 mm GSH	3	4.00	12.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA 10 mm GSH	3	2.00	6.00
MDA 30 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.121
Asymp. Sig. (2-tailed)	.034
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA 10 mm GSH	3	2.00	6.00
MDA 100 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA 10 mm GSH	3	2.00	6.00
MDA 300 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA 10 mm GSH	3	2.00	6.00
MDA 1000 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
30 mm GSH	3	5.00	15.00
MDA 100 mm GSH	3	2.00	6.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
30 mm GSH	3	5.00	15.00
MDA 300 mm GSH	3	2.00	6.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
30 mm GSH	3	3.00	9.00
MDA 1000 mm GSH	3	4.00	12.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.696
Asymp. Sig. (2-tailed)	.487
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA 100 mm GSH	3	2.00	6.00
MDA 300 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA 100 mm GSH	3	2.00	6.00
MDA 1000 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MDA 300 mm GSH	3	2.00	6.00
MDA 1000 mm GSH	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran 2. Analisa Statistik Kadar MDA dengan Pemberian Niasin

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KLP	.274	21	.000	.569	21	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas Ragam

Test of Homogeneity of Variances

KLP

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.551	6	14	.002

Deskriptif

Descriptives

KLP

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					K	3		
K+	3	1.0937	1.15334	.66588	-1.7714	3.9587	.12	2.37
D1 (12.5)	3	.3646	.30717	.17735	-.3984	1.1277	.15	.72
D2 (25)	3	.0790	.06160	.03556	-.0740	.2321	.01	.13
D3 (50)	3	.3169	.07832	.04522	.1223	.5115	.26	.41
D4 (100)	3	.0527	.03879	.02240	-.0437	.1491	.02	.10
D5 (200)	3	.2065	.15279	.08821	-.1730	.5860	.11	.38
Total	21	.3399	.51007	.11131	.1077	.5720	.01	2.37

Uji Kruskal wallis

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
KLP	K	3	12.50
	K+	3	16.17
	D1 (12.5)	3	14.33
	D2 (25)	3	5.00
	D3 (50)	3	15.33
	D4 (100)	3	3.17
	D5 (200)	3	10.50
	Total	21	

Test Statistics^{a,b}

	KLP
Chi-square	12.214
Df	6
Asymp. Sig.	.057

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran 3. Analisa Statistik Kadar PCC dan GRP dengan Pemberian Niasin

Uji normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KLP	.232	15	.029	.762	15	.001

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas Ragam

Test of Homogeneity of Variances

KLP

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
20.162	6	8	.000

Deskriptif

Descriptives

KLP

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K	3	.2656	.16622	.09597	-.1473	.6785	.12	.45
K+	2	.4569	.47701	.33730	-3.8289	4.7427	.12	.79
D1 (12.5)	2	.1891	.06194	.04380	-.3674	.7456	.15	.23
D2 (25)	2	.1132	.02418	.01710	-.1041	.3305	.10	.13
D3 (50)	2	.2724	.01966	.01390	.0958	.4490	.26	.29
D4 (100)	2	.0310	.01358	.00960	-.0910	.1530	.02	.04
D5 (200)	2	.1186	.01662	.01175	-.0307	.2678	.11	.13
Total	15	.2106	.19410	.05012	.1031	.3181	.02	.79

Uji Kruskal wallis

Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank
K	3	9.83
K+	2	10.25
D1 (12.5)	2	10.00
D2 (25)	2	5.25
D3 (50)	2	12.50
D4 (100)	2	1.50
D5 (200)	2	5.75
Total	15	

Test Statistics^{a,b}

	KLP
Chi-square	8.955
Df	6
Asymp. Sig.	.176

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan



Lampiran 4. Output SPSS UjiPerbedaan Rata-Rata

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PCC (ng/ml)	.161	15	.200*	.918	15	.178
GRP (ng/ml)	.184	15	.182	.940	15	.384

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Homogenitas Ragam

Test of Homogeneity of Variances

PCC (ng/ml)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.783	4	10	.086

Test of Homogeneity of Variances

GRP (ng/ml)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.352	4	10	.124

Deskriptif

Descriptives

PCC (ng/ml)

	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		
K-	.9020	.09133	.05273	.6751	1.1289	.80	.96
K+	1.2310	.26516	.15309	.5723	1.8897	1.07	1.54
P2 (Niasin 25 µm)	.9820	.10737	.06199	.7153	1.2487	.86	1.07
P4 (Niasin 100 µm)	.7297	.05363	.03096	.5964	.8629	.67	.78
P5 (Niasin 200 µm)	.9887	.24257	.14005	.3861	1.5913	.73	1.22
Total	.9667	.22307	.05760	.8431	1.0902	.67	1.54

Descriptives

GRP (ng/ml)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	3	.1287	.02491	.01438	.0668	.1905	.10	.14
K+	3	.2020	.01967	.01136	.1531	.2509	.18	.22
P2 (Niasin 25 µm)	3	.1810	.03118	.01800	.1036	.2584	.14	.20
P4 (Niasin 100 µm)	3	.1450	.00700	.00404	.1276	.1624	.14	.15
P5 (Niasin 200 µm)	3	.1660	.01637	.00945	.1253	.2067	.15	.18
Total	15	.1645	.03232	.00835	.1466	.1824	.10	.22

Uji One Way Anova

Oneway

ANOVA
PCC (ng/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.393	4	.098	3.233	.060
Within Groups	.304	10	.030		
Total	.697	14			

Oneway ANOVA
GRP (ng/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.010	4	.003	5.463	.014
Within Groups	.005	10	.000		
Total	.015	14			

Post Hoc Tests
Multiple Comparisons

GRP (ng/ml)
Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	M	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-.07330	.01750	.012	-.1309	-.0157
	P2 (Niasin 25 µm)	-.05230	.01750	.080	-.1099	.0053
	P4 (Niasin 100 µm)	-.01630	.01750	.878	-.0739	.0413
	P5 (Niasin 200 µm)	-.03730	.01750	.278	-.0949	.0203
K+	K-	.07330	.01750	.012	.0157	.1309
	P2 (Niasin 25 µm)	.02100	.01750	.752	-.0366	.0786
	P4 (Niasin 100 µm)	.05700	.01750	.053	-.0006	.1146
	P5 (Niasin 200 µm)	.03600	.01750	.308	-.0216	.0936
P2 (Niasin 25 µm)	K-	.05230	.01750	.080	-.0053	.1099
	K+	-.02100	.01750	.752	-.0786	.0366
	P4 (Niasin 100 µm)	.03600	.01750	.308	-.0216	.0936
	P5 (Niasin 200 µm)	.01500	.01750	.906	-.0426	.0726
P4 (Niasin 100 µm)	K-	.01630	.01750	.878	-.0413	.0739
	K+	-.05700	.01750	.053	-.1146	.0006
	P2 (Niasin 25 µm)	-.03600	.01750	.308	-.0936	.0216
	P5 (Niasin 200 µm)	-.02100	.01750	.752	-.0786	.0366
P5 (Niasin 200 µm)	K-	.03730	.01750	.278	-.0203	.0949
	K+	-.03600	.01750	.308	-.0936	.0216
	P2 (Niasin 25 µm)	-.01500	.01750	.906	-.0726	.0426
	P4 (Niasin 100 µm)	.02100	.01750	.752	-.0366	.0786

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

Homogeneous Subsets

GRP (ng/ml)

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
K-	3	.1287	
P4 (Niasin 100 µm)	3	.1450	.1450
P5 (Niasin 200 µm)	3	.1660	.1660
P2 (Niasin 25 µm)	3	.1810	.1810
K+	3		.2020
Sig.		.080	.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 5. Analisa Korelasi Regresi Kadar PCC dan GRP

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
dosis	.256	12	.029	.820	12	.016
PCC	.169	12	.200*	.918	12	.267
GRP	.196	12	.200*	.909	12	.210

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Korelasi

Non Parametric Correlations Correlations

		dosis	PCC
Spearman's rho	dosis	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.116
		N	12
	PCC	Correlation Coefficient	-.478
		Sig. (2-tailed)	.116
		N	12

Non Parametric Correlations Correlations

		dosis	GRP
Spearman's rho	dosis	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.073
		N	12
	GRP	Correlation Coefficient	-.536
		Sig. (2-tailed)	.073
		N	12

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
PCC	.9828	.24574	12
dosis	81.2500	81.27185	12



Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	dosis ^a	.	Enter

- a. All requested variables entered.
 b. Dependent Variable: PCC

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.330 ^a	.109	.020	.24329

- a. Predictors: (Constant), dosis

ANOVA^b

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	.072	1	.072	1.223	.295 ^a
1 Residual	.592	10	.059		
Total	.664	11			

- a. Predictors: (Constant), dosis
 b. Dependent Variable: PCC

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1.064	.102		10.478	.000
	dosis	-.001	.001	-.330	-1.106	.295

- a. Dependent Variable: PCC

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
GRP	.1735	.02790	12
dosis	81.2500	81.27185	12

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	dosis ^a	.	Enter

- a. All requested variables entered.
 b. Dependent Variable: GRP

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.501 ^a	.251	.176	.02533

- a. Predictors: (Constant), dosis

ANOVA^b

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	.002	1	.002	3.345	.097 ^a
1 Residual	.006	10	.001		
Total	.009	11			

- a. Predictors: (Constant), dosis
 b. Dependent Variable: GRP

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	.187	.011		17.731	.000
dosis	.000	.000	-.501	-1.829	.097

a. Dependent Variable: GRP

Lampiran 6. Analisa Statistik Kadar PCC dan GRP dengan pemberian GSH dan kombinasi GSH niasin

UjiNormalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PCC	.174	23	.068	.910	23	.041
GRP (ng/dl)	.189	23	.033	.930	23	.109

a. Lilliefors Significance Correction

UjiHomogenitasRagam

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
PCC	3.234	7	16	.025
GRP (ng/dl)	3.523	7	15	.019

Deskriptif

Descriptives

	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
				Lower Bound	Upper Bound			
PCC	K	.9827	.49400	.28521	-.2445	2.2098	.41	1.29
	K+	1.4950	.23893	.13795	.9015	2.0885	1.32	1.77
	P1 (g 10)	1.0037	.46253	.26704	-.1453	2.1527	.50	1.40
	P2 (g 30)	1.4263	.07087	.04092	1.2503	1.6024	1.35	1.48
	P3 (g 100)	1.2733	.21831	.12604	.7310	1.8156	1.05	1.48
	P4 (g10+n)	1.4000	.11597	.06696	1.1119	1.6881	1.27	1.48
	P5 (g30+n)	1.8433	.26664	.15394	1.1810	2.5057	1.54	2.01
	P6 (g100+n)	1.5657	.13006	.07509	1.2426	1.8888	1.45	1.71
	Total	1.3738	.36504	.07451	1.2196	1.5279	.41	2.01
	GRP (ng/dl)	K	.0580	.00849	.00600	-.0182	.1342	.05
K+		.0990	.02193	.01266	.0445	.1535	.08	.12
P1 (g 10)		.1257	.00231	.00133	.1199	.1314	.12	.13
P2 (g 30)		.0643	.00651	.00376	.0482	.0805	.06	.07
P3 (g 100)		.0830	.00854	.00493	.0618	.1042	.07	.09
P4 (g10+n)	.1197	.03818	.02204	.0248	.2145	.09	.16	

P5 (g30+n)	.1243	.03607	.02083	.0347	.2139	.09	.16
P6 (g100+n)	.0873	.00351	.00203	.0786	.0961	.08	.09
Total	.0968	.03029	.00632	.0837	.1099	.05	.16

UjiKruskalwallis Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
PCC	K	3	4.33
	K+	3	14.17
	P1 (g 10)	3	5.83
	P2 (g 30)	3	13.67
	P3 (g 100)	3	9.33
	P4 (g10+n)	3	12.33
	P5 (g30+n)	3	22.17
	P6 (g100+n)	3	18.17
Total		24	
GRP (ng/dl)	K	2	2.25
	K+	3	13.17
	P1 (g 10)	3	19.17
	P2 (g 30)	3	3.50
	P3 (g 100)	3	9.17
	P4 (g10+n)	3	17.33
	P5 (g30+n)	3	17.50
	P6 (g100+n)	3	10.67
Total		23	

Test Statistics^{a,b}

	PCC	GRP (ng/dl)
Chi-Square	15.119	16.851
Df	7	7
Asymp. Sig.	.035	.018

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K	3	2.00	6.00
	K+	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K	2	1.50	3.00
	K+	3	4.00	12.00
	Total	5		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	6.000	3.000
Z	-1.964	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	.200 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K	3	3.33	10.00
	P1 (g 10)	3	3.67	11.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K	2	1.50	3.00
	P1 (g 10)	3	4.00	12.00
	Total	5		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	4.000	.000
Wilcoxon W	10.000	3.000
Z	-.218	-1.777
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827	.076
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b	.200 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K	3	2.00	6.00
	P2 (g 30)	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K	2	2.25	4.50
	P2 (g 30)	3	3.50	10.50
	Total	5		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	.000	1.500
Wilcoxon W	6.000	4.500
Z	-1.964	-.889
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.374
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	.400 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K	3	2.67	8.00
	P3 (g 100)	3	4.33	13.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K	2	1.50	3.00
	P3 (g 100)	3	4.00	12.00
	Total	5		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	2.000	.000
Wilcoxon W	8.000	3.000
Z	-1.091	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^b	.200 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K	3	2.33	7.00
	P4 (g10+n)	3	4.67	14.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K	2	1.50	3.00
	P4 (g10+n)	3	4.00	12.00
	Total	5		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.000	.000
Wilcoxon W	7.000	3.000
Z	-1.528	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.200 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K	3	2.00	6.00
	P5 (g30+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K	2	1.50	3.00
	P5 (g30+n)	3	4.00	12.00
	Total	5		

Test Statistics^a



	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	6.000	3.000
Z	-1.964	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	.200 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K	3	2.00	6.00
	P6 (g100+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K	2	1.50	3.00
	P6 (g100+n)	3	4.00	12.00
	Total	5		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	6.000	3.000
Z	-1.964	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	.200 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K+	3	4.50	13.50
	P1 (g 10)	3	2.50	7.50
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K+	3	2.17	6.50
	P1 (g 10)	3	4.83	14.50
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.500	.500
Wilcoxon W	7.500	6.500
Z	-1.328	-1.798
Asymp. Sig. (2-tailed)	.184	.072
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K+	3	3.33	10.00
	P2 (g 30)	3	3.67	11.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K+	3	5.00	15.00
	P2 (g 30)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	4.000	.000
Wilcoxon W	10.000	6.000
Z	-.218	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K+	3	4.33	13.00
	P3 (g 100)	3	2.67	8.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K+	3	4.33	13.00
	P3 (g 100)	3	2.67	8.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	2.000	2.000
Wilcoxon W	8.000	8.000
Z	-1.091	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^b	.400 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K+	3	3.67	11.00
	P4 (g10+n)	3	3.33	10.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K+	3	3.00	9.00
	P4 (g10+n)	3	4.00	12.00
	Total	6		

Test Statistics^a



	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	4.000	3.000
Wilcoxon W	10.000	9.000
Z	-.218	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b	.700 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K+	3	2.33	7.00
	P5 (g30+n)	3	4.67	14.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K+	3	2.67	8.00
	P5 (g30+n)	3	4.33	13.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.000	2.000
Wilcoxon W	7.000	8.000
Z	-1.528	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.400 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	K+	3	3.00	9.00
	P6 (g100+n)	3	4.00	12.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	K+	3	4.00	12.00
	P6 (g100+n)	3	3.00	9.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	3.000	3.000
Wilcoxon W	9.000	9.000
Z	-.655	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^b	.700 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P1 (g 10)	3	2.33	7.00
	P2 (g 30)	3	4.67	14.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P1 (g 10)	3	5.00	15.00
	P2 (g 30)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.000	.000
Wilcoxon W	7.000	6.000
Z	-1.528	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P1 (g 10)	3	3.00	9.00
	P3 (g 100)	3	4.00	12.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P1 (g 10)	3	5.00	15.00
	P3 (g 100)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	3.000	.000
Wilcoxon W	9.000	6.000
Z	-.655	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P1 (g 10)	3	2.33	7.00
	P4 (g10+n)	3	4.67	14.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P1 (g 10)	3	4.00	12.00
	P4 (g10+n)	3	3.00	9.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.000	3.000
Wilcoxon W	7.000	9.000
Z	-1.528	-.664
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127	.507
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.700 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P1 (g 10)	3	2.00	6.00
	P5 (g30+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P1 (g 10)	3	3.33	10.00
	P5 (g30+n)	3	3.67	11.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	.000	4.000
Wilcoxon W	6.000	10.000
Z	-1.964	-.232
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.817
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	1.000 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P1 (g 10)	3	2.00	6.00
	P6 (g100+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P1 (g 10)	3	5.00	15.00
	P6 (g100+n)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	6.000	6.000
Z	-1.964	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P2 (g 30)	3	4.17	12.50
	P3 (g 100)	3	2.83	8.50
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P2 (g 30)	3	2.00	6.00
	P3 (g 100)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	2.500	.000
Wilcoxon W	8.500	6.000
Z	-.886	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.376	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P2 (g 30)	3	3.67	11.00
	P4 (g10+n)	3	3.33	10.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P2 (g 30)	3	2.00	6.00
	P4 (g10+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	4.000	.000
Wilcoxon W	10.000	6.000
Z	-.225	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.822	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P2 (g 30)	3	2.00	6.00
	P5 (g30+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P2 (g 30)	3	2.00	6.00
	P5 (g30+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	6.000	6.000
Z	-1.964	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P2 (g 30)	3	2.50	7.50
	P6 (g100+n)	3	4.50	13.50
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P2 (g 30)	3	2.00	6.00
	P6 (g100+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.500	.000
Wilcoxon W	7.500	6.000
Z	-1.328	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.184	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P3 (g 100)	3	3.17	9.50
	P4 (g10+n)	3	3.83	11.50
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P3 (g 100)	3	2.17	6.50
	P4 (g10+n)	3	4.83	14.50
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	3.500	.500
Wilcoxon W	9.500	6.500
Z	-.443	-1.771
Asymp. Sig. (2-tailed)	.658	.077
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P3 (g 100)	3	2.00	6.00
	P5 (g30+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P3 (g 100)	3	2.33	7.00
	P5 (g30+n)	3	4.67	14.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	.000	1.000
Wilcoxon W	6.000	7.000
Z	-1.964	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	.200 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P3 (g 100)	3	2.33	7.00
	P6 (g100+n)	3	4.67	14.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P3 (g 100)	3	3.00	9.00
	P6 (g100+n)	3	4.00	12.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.000	3.000
Wilcoxon W	7.000	9.000
Z	-1.528	-.674
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127	.500
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.700 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P4 (g10+n)	3	2.00	6.00
	P5 (g30+n)	3	5.00	15.00
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P4 (g10+n)	3	3.67	11.00
	P5 (g30+n)	3	3.33	10.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)

Mann-Whitney U	.000	4.000
Wilcoxon W	6.000	10.000
Z	-1.964	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b	1.000 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P4 (g10+n)	3	2.50	7.50
	P6 (g100+n)	3	4.50	13.50
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P4 (g10+n)	3	4.83	14.50
	P6 (g100+n)	3	2.17	6.50
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.500	.500
Wilcoxon W	7.500	6.500
Z	-1.328	-1.771
Asymp. Sig. (2-tailed)	.184	.077
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.100 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PCC	P5 (g30+n)	3	4.50	13.50
	P6 (g100+n)	3	2.50	7.50
	Total	6		
GRP (ng/dl)	P5 (g30+n)	3	4.50	13.50
	P6 (g100+n)	3	2.50	7.50
	Total	6		

Test Statistics^a

	PCC	GRP (ng/dl)
Mann-Whitney U	1.500	1.500
Wilcoxon W	7.500	7.500
Z	-1.328	-1.328
Asymp. Sig. (2-tailed)	.184	.184
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b	.200 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

Lampiran 7. Hasil Analisa Kadar AGE dengan pemberian GSH dan kombinasi GSH niasin

Uji Normalitas
Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
data AGE	.256	24	.000	.648	24	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas Ragam

Test of Homogeneity of Variances

data AGE

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.207	7	16	.025

Deskriptif
Descriptives

data AGE

	Mean	SD	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
K-			.04177	.5533	.9127		
k+glukose25mM			.00367	4.3939	4.4254		
P1 (gsh 10uM)			.02850	.5221	.7673		
P2 (gsh 30uM)			.04479	1.5223	1.9077		
P3 (gsh 100uM)			.01927	.5717	.7376		
P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)			.00567	.8413	.8900		
P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)			.03353	1.2221	1.5106		
P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)			.00267	1.0959	1.1188		
Total	1.20335		.24563	.9289	1.9452		

Uji Kruskal Wallis
Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
data AGE	K-	3	7.33
	k+glukose25mM	3	23.00
	P1 (gsh 10uM)	3	3.33
	P2 (gsh 30uM)	3	20.00
	P3 (gsh 100uM)	3	4.33
	P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)	3	11.00
	P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)	3	17.00
	P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)	3	14.00
Total		24	

Test Statistics^{a,b}

	data AGE
Chi-square	22.149
df	7
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Uji Lanjut Mann Whitney

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K-	3	2.00	6.00
data AGE	k+glukose25mM	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K-	3	4.67	14.00
data AGE	P1 (gsh 10uM)	3	2.33	7.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K-	3	2.00	6.00
data AGE	P2 (gsh 30uM)	3	5.00	15.00

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-		3	4.67	14.00
data AGE	P3 (gsh 100uM)	3	2.33	7.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-		3	2.00	6.00
data AGE	P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
K-		3	2.00	6.00
data AGE	P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K-	3	2.00	6.00
data AGE	P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	k+glukose25mM	3	5.00	15.00
data AGE	P1 (gsh 10uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data AGE	k+glukose25mM	3	5.00	15.00
	P2 (gsh 30uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	k+glukose25mM	3	5.00	15.00
data AGE	P3 (gsh 100uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	k+glukose25mM	3	5.00	15.00
data AGE	P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.023
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	k+glukose25mM	3	5.00	15.00
data AGE	P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
k+glukose25mM	3	5.00	15.00
data AGE P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.023
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
P1 (gsh 10uM)	3	2.00	6.00
data AGE P2 (gsh 30uM)	3	5.00	15.00
Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
P1 (gsh 10uM)	3	3.00	9.00
data AGE P3 (gsh 100uM)	3	4.00	12.00
Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P1 (gsh 10uM)	3	2.00	6.00
data AGE	P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P1 (gsh 10uM)	3	2.00	6.00
data AGE	P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P1 (gsh 10uM)	3	2.00	6.00
data AGE	P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		



Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P2 (gsh 30uM)	3	5.00	15.00
data AGE	P3 (gsh 100uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data AGE	P2 (gsh 30uM)	3	5.00	15.00
	P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P2 (gsh 30uM)	3	5.00	15.00
data AGE	P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
 b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P2 (gsh 30uM)	3	5.00	15.00
data AGE	P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
 b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P3 (gsh 100uM)	3	2.00	6.00
data AGE	P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
 b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P3 (gsh 100uM)	3	2.00	6.00
data AGE	P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P3 (gsh 100uM)	3	2.00	6.00
data AGE	P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
data AGE	P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P4 (gsh 10uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
data AGE	P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.023
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P5 (gsh 30uM + niasin 25uM)	3	5.00	15.00
data AGE	P6 (gsh 100uM + niasin 25uM)	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^b

	data AGE
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Output SPSS uji perbedaan rata-rata (pemeriksaan Western Blotting)

Uji normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Data pemeriksaan Western Blotting	.357	32	.000	.708	32	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Uji homogenitas ragam

Test of Homogeneity of Variances

Data pemeriksaan Western Blotting

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.773	7	24	.007

Deskriptif

Descriptives
Data pemeriksaan Western Blotting

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	4	308.6850	7.38976	3.69488	296.9262	320.4438	303.06	319.25
K+	4	126.4475	.73699	.36850	125.2748	127.6202	125.47	127.24
GSH1	4	183.8425	2.10884	1.05442	180.4869	187.1981	181.10	186.22
GSH2	4	186.3625	2.03939	1.01969	183.1174	189.6076	183.43	188.14
GSH3	4	183.6650	.84370	.42185	182.3225	185.0075	182.76	184.72
G1+N	4	187.6300	.71475	.35737	186.4927	188.7673	186.64	188.31
G2+N	4	191.6325	.50022	.25011	190.8365	192.4285	190.90	192.03
G3+N	4	194.7575	4.77153	2.38576	187.1649	202.3501	187.62	197.51
Total	32	195.3778	48.30264	8.53878	177.9629	212.7928	125.47	319.25

Uji Kruskal Wallis

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Perlakuan			N	Mean Rank
Data pemeriksaan Western Blotting	K-		4	30.50
	K+		4	2.50
	GSH1		4	9.50
	GSH2		4	14.75
	GSH3		4	8.75
	G1+N		4	18.00
	G2+N		4	23.50
	G3+N		4	24.50
	Total		32	

Test Statistics^{a,b}

	Data pemeriksaan Western Blotting
Chi-square	28.159
df	7
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Uji lanjut mann whitney

Mann-Whitney Test

Ranks

Perlakuan			N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	K-		4	6.50	26.00
	K+		4	2.50	10.00
	Total		8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

		Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	K-		4	6.50	26.00
	GSH1		4	2.50	10.00
	Total		8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

		Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	K-		4	6.50	26.00
	GSH2		4	2.50	10.00
	Total		8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test



Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western	K-	4	6.50	26.00
Blotting	GSH3	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western	K-	4	6.50	26.00
Blotting	G1+N	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western	K-	4	6.50	26.00
Blotting	G2+N	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan



Mann-Whitney Test

Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	K-			4	6.50	26.00
Blotting		G3+N			4	2.50	10.00
				Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	K+			4	2.50	10.00
Blotting		GSH1			4	6.50	26.00
				Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	K+			4	2.50	10.00
Blotting		GSH2			4	6.50	26.00
				Total	8		



Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan



Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	K+	4	2.50	10.00
	GSH3	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	K+	4	2.50	10.00
	G1+N	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	K+	4	2.50	10.00
	G2+N	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	K+		4	2.50	10.00	
Blotting		G3+N		4	6.50	26.00	
Total				8			

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	GSH1		4	3.25	13.00	
Blotting		GSH2		4	5.75	23.00	
Total				8			

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.443
Asymp. Sig. (2-tailed)	.149
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	GSH1		4	4.75	19.00	
Blotting		GSH3		4	4.25	17.00	
Total				8			

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-.289
Asymp. Sig. (2-tailed)	.773
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	GSH1	4	2.50	10.00
	G1+N	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.
 b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	GSH1	4	2.50	10.00
	G2+N	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.
 b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	GSH1	4	2.50	10.00
	G3+N	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.
 b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	GSH2	4	6.00	24.00
	GSH3	4	3.00	12.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	GSH2	4	3.75	15.00
	G1+N	4	5.25	21.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	GSH2	4	2.50	10.00
	G2+N	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	GSH2		4		2.75	11.00
Blotting		G3+N		4		6.25	25.00
Total				8			

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.021
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	GSH3		4		2.50	10.00
Blotting		G1+N		4		6.50	26.00
Total				8			

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	GSH3		4		2.50	10.00
Blotting		G2+N		4		6.50	26.00
Total				8			

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	GSH3	4	2.50	10.00
	G3+N	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan Western Blotting	G1+N	4	2.50	10.00
	G2+N	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	G1+N	4		3.25	13.00	
Blotting		G3+N	4		5.75	23.00	
			Total	8			

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.443
Asymp. Sig. (2-tailed)	.149
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks

				Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Data pemeriksaan	Western	G2+N	4		3.50	14.00	
Blotting		G3+N	4		5.50	22.00	
			Total	8			

Test Statistics^b

	Data pemeriksaan Western Blotting
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.162
Asymp. Sig. (2-tailed)	.245
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Perlakuan



Lampiran 8. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda Penelitian Tahap 1

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka MDA (GSH)

Kelompok	Signifikansi	Keputusan
Kontrol negatif dengan kontrol positif	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 10	0.121	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 30	0.037	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 100	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 300	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 1000	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 10	0.046	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 30	0.487	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 100	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 300	0.513	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 1000	0.513	Tidak berbeda signifikan
10 dengan 30	0.034	Berbeda signifikan
10 dengan 100	0.046	Berbeda signifikan
10 dengan 300	0.046	Berbeda signifikan
10 dengan 1000	0.046	Berbeda signifikan
30 dengan 100	0.037	Berbeda signifikan
30 dengan 300	0.037	Berbeda signifikan
30 dengan 1000	0.487	Tidak berbeda signifikan
100 dengan 300	0.050	Berbeda signifikan
100 dengan 1000	0.050	Berbeda signifikan
300 dengan 1000	0.050	Berbeda signifikan

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka MDA (Niasin)

Kelompok	Signifikansi	Keputusan
Kontrol negatif dengan kontrol positif	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 12.5	0.513	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 25	0.127	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 50	0.513	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 100	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 200	0.513	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 12.5	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 25	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 50	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 100	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 200	0.083	Tidak berbeda signifikan
12.5 dengan 25	0.050	Berbeda signifikan
12.5 dengan 50	0.513	Tidak berbeda signifikan
12.5 dengan 100	0.050	Berbeda signifikan
12.5 dengan 200	0.275	Tidak berbeda signifikan
25 dengan 50	0.050	Berbeda signifikan
25 dengan 100	0.658	Tidak berbeda signifikan
25 dengan 200	0.184	Tidak berbeda signifikan
50 dengan 100	0.050	Berbeda signifikan
50 dengan 200	0.275	Tidak berbeda signifikan
100 dengan 200	0.050	Berbeda signifikan

Lampiran 9. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda Penelitian Tahap2

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka PCC (GSH)

Kelompok	Signifikansi	Keputusan
Kontrol negatif dengan kontrol positif	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 10	0.827	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 30	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 100	0.275	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 10	0.184	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 30	0.827	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 100	0.275	Tidak berbeda signifikan
10 dengan 30	0.127	Tidak berbeda signifikan
10 dengan 100	0.513	Tidak berbeda signifikan
30 dengan 100	0.376	Tidak berbeda signifikan

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78 (GSH)

Kelompok	Signifikansi	Keputusan
Kontrol negatif dengan kontrol positif	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 10	0.076	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 30	0.374	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 100	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 10	0.072	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 30	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 100	0.275	Tidak berbeda signifikan
10 dengan 30	0.046	Berbeda signifikan
10 dengan 100	0.046	Berbeda signifikan
30 dengan 100	0.050	Berbeda signifikan

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78 (Niasin)

Kelompok	Signifikansi	Keputusan
Kontrol negatif dengan kontrol positif	0.120	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 25	0.080	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 100	0.878	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 200	0.278	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 25	0.752	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 100	0.053	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 200	0.308	Tidak berbeda signifikan
25 dengan 100	0.308	Tidak berbeda signifikan
25 dengan 200	0.995	Tidak berbeda signifikan
100 dengan 200	0.752	Tidak berbeda signifikan

Lampiran 10. Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda Penelitian Tahap 3
Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka PCC (GSH-niasin)

Kelompok	Signifikansi	Keputusan
Kontrol negatif dengan kontrol positif	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 10+25	0.127	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 30+25	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 100+25	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 10 + 25	0.827	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 30+25	0.127	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 100+25	0.513	Tidak berbeda signifikan
10+25 dengan 30+25	0.050	Berbeda signifikan
10+25 dengan 100+25	0.184	Tidak berbeda signifikan
30+25 dengan 100+25	0.184	Tidak berbeda signifikan

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78 (GSH-niasin)

Kelompok	Signifikansi	Keputusan
Kontrol negatif dengan kontrol positif	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 10+25	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 30+25	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 100+25	0.083	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 10 + 25	0.513	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 30+25	0.275	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 100+25	0.513	Tidak berbeda signifikan
10+25 dengan 30+25	0.827	Tidak berbeda signifikan
10+25 dengan 100+25	0.077	Tidak berbeda signifikan
30+25 dengan 100+25	0.184	Tidak berbeda signifikan

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Kadar AGEs (GSH-niasin)

Kelompok	Signifikansi	Keputusan
Kontrol negatif dengan kontrol positif	0.046	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 10+25	0.046	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 30+25	0.050	Berbeda signifikan
Kontrol negatif dengan 100+25	0.046	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 10 + 25	0.043	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 30+25	0.046	Berbeda signifikan
Kontrol positif dengan 100+25	0.043	Berbeda signifikan
10+25 dengan 30+25	0.046	Berbeda signifikan
10+25 dengan 100+25	0.043	Berbeda signifikan
30+25 dengan 100+25	0.046	Berbeda signifikan

LAMPIRAN 11. Analisa Statistika Tahap 1

Hasil Uji Normalitas Kadar MDA

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.645
Signifikansi	0.000

Hasil Uji Homogenitas kadar MDA

Uji	Nilai
Levene	14.366
Signifikansi	0.000

Hasil Uji Perbedaan Rata-Rata Angka MDA

Chi-square hitung	Signifikans	Chi-square table	Kesimpulan
17.372	0.008	12.592	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;
- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- Jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- Jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka MDA

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH	0.046 < α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH	0.487 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH	0.050 < α
Glukosa 25 mM + 300 µM GSH	0.513 > α
Glukosa 25 mM + 1000 µM GSH	0.513 > α

Hasil Pengujian Korelasi Spearman Hubungan Dosis GSH dengan Data MDA

Koefisien korelasi (r)	Signifikan si	Keputusan
0.330	0.181	Berhubungan tidak signifikan

Kriteria Pengujian

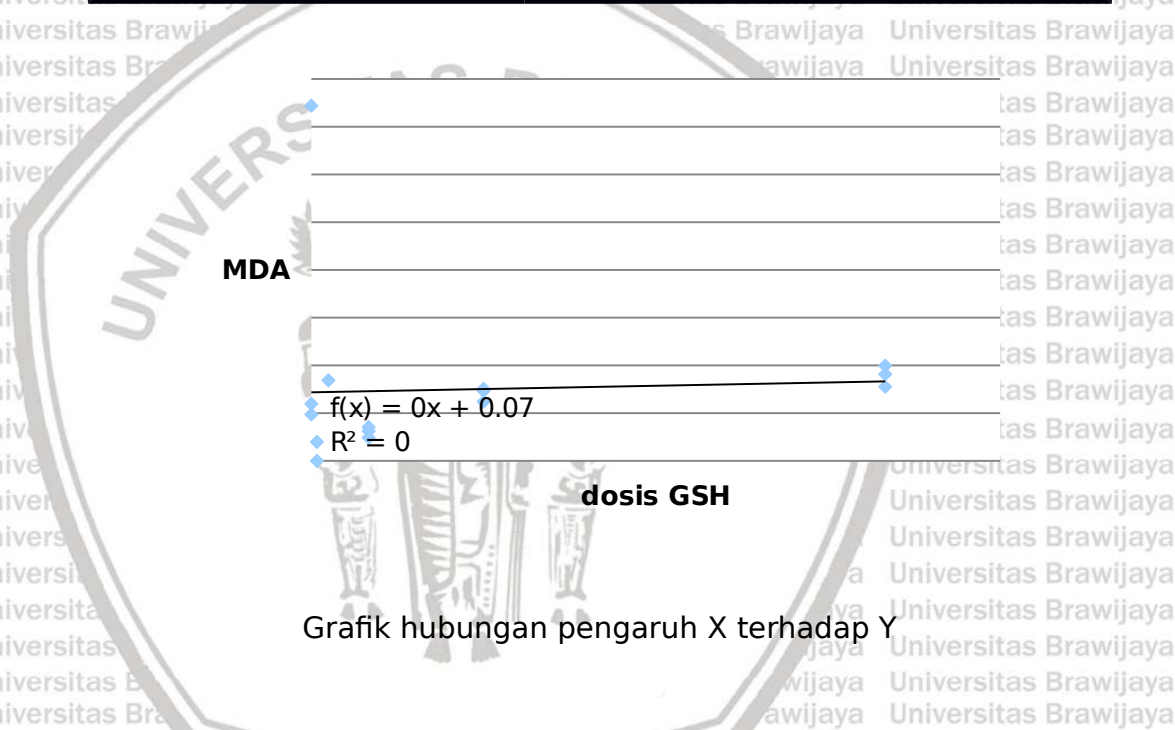
Jika nilai $|t_{hitung}| > t_{tabel}$, atau nilai signifikansi < 0.05 , maka H_0 ditolak.

Jika nilai $|t_{hitung}| < t_{tabel}$, atau nilai signifikansi > 0.05 , maka H_0 diterima.

Ringkasan uji Regresi Linier Sederhana

Variabel	B	t _{hitung}	Signifikansi	Keterangan
----------	---	---------------------	--------------	------------

Konstanta	0.072			
dosis GSH (X)	0.000012	0.211	0.836	Tidak signifikan
A	= 0.050			
Koefisien Determinasi (R ²)	= 0.003			
t-tabel (t _{16,0.05})	= 2.120			



Grafik hubungan pengaruh X terhadap Y

Berdasarkan tabel 5.7 di atas, diperoleh model regresi sebagai berikut :

$$Y = 0.072 + 0.000012 X + e_i$$

Hasil Uji Normalitas Kadar MDA

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.581
Signifikansi	0.000

Hasil Uji Homogenitas Kadar MDA

Uji	Nilai
Levene	44.822
Signifikansi	0.000

Hasil uji Perbedaan Rata-rata Angka MDA

Chi-square hitung	Signifikansi	Chi-square tabel	Kesimpulan
14.279	0.027	12.592	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;
- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka MDA

Kelompok	P-value
Glukosa 25 mM+ 12.5 µM niasin	0.083 > α
Glukosa 25 mM + 25 µM niasin	0.083 > α
Glukosa 25 mM + 50 µM niasin	0.083 > α
Glukosa 25 mM+ 100 µM niasin	0.083 > α
Glukosa 25 mM + 200 µM niasin	0.083 > α

Hasil pengujian korelasi Spearman Hubungan dosis niasin dengan data MDA.

Koefisien korelasi (r)	Signifikan si	Keputusan
-0.389	0.110	Berhubungan tidak signifikan



Ringkasan uji Regresi Linier Sederhana Pengaruh Dosis Niasin terhadap Kadar MDA

Variabel	B	thitung	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	0.507			
dosis niasin (X)	-0.002	-1.292	0.215	Tidak signifikan
A		= 0.050		
Koefisien Determinasi (R ²)		= 0.094		
t-tabel (t _{16,0.05})		= 2.120		

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut :

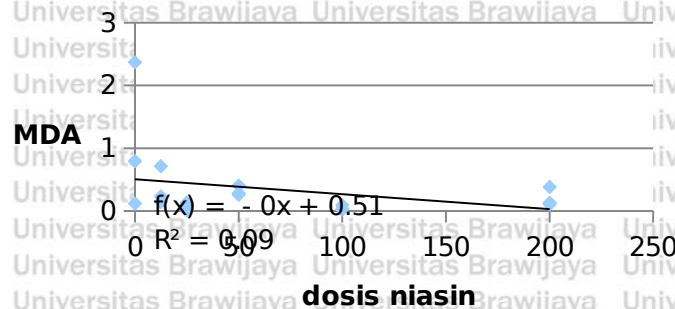
H₀ : Terdapat hubungan yang tidak signifikan antara variabel;

H₁ : Terdapat hubungan yang signifikan antara variabel.

Dengan kriteria Pengujian sebagai berikut :

Jika nilai signifikansi < 0.05, maka H₀ ditolak.

Jika nilai signifikansi > 0.05, maka H₀ diterima.





Grafik hubungan pengaruh X terhadap Y

Berdasarkan tabel 5.14 di atas, diperoleh model regresi sebagai berikut :

$$Y = 0.507 - 0.002 X + e_i$$



LAMPIRAN 12. Hasil Analisa Statistik Tahap ke 2

Hasil Uji Normalitas kadar PCC

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.910
Signifikansi	0.041

Hasil Uji Homogenitas kadar PCC

Uji	Nilai
Levene	3.234
Signifikansi	0.025

Hasil uji Perbedaan Rata-rata angka PCC

Chi-square hitung	Signifikansi	Chi-square tabel	Kesimpulan
15.119	0.035	14.067	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;
- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka PCC

Kelompok	P-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH	0.184 > α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH	0.827 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH	0.275 > α

Hasil pengujian korelasi Spearman Hubungan dosis GSH dengan data PCC.

Koefisien korelasi (r)	Signifikansi	Keputusan
-0.108	0.738	Berhubungan tidak signifikan

Ringkasan uji Regresi Linier Sederhana Pengaruh dosis GSH terhadap angka PCC.

Variabel	B	thitung	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	1.310			
dosis GSH (X)	-0.0003	-0.121	0.906	Tidak signifikan
A		= 0.050		
Koefisien Determinasi (R ²)		= 0.001		
t-tabel (t _{10,0.05})		= 2.228		

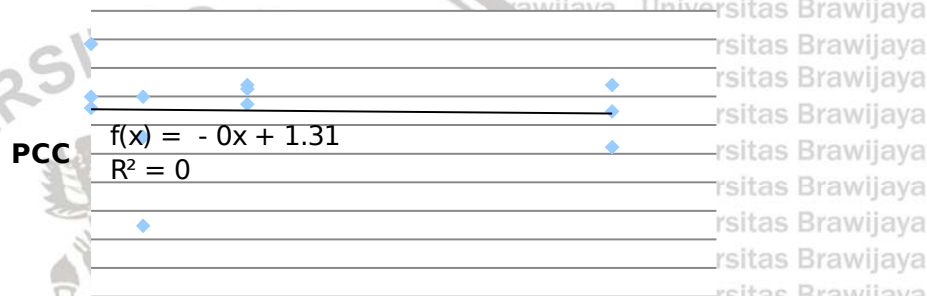
H₀ : terdapat pengaruh yang tidak signifikan antara variabel X terhadap variabel Y;

H1 : terdapat pengaruh yang signifikan antara variabel X terhadap variabel Y

Kriteria Pengujian

Jika nilai $|t \text{ hitung}| > t \text{ tabel}$, atau nilai signifikansi < 0.05 , maka H0 ditolak.

Jika nilai $|t \text{ hitung}| < t \text{ tabel}$, atau nilai signifikansi > 0.05 , maka H0 diterima.



dosis GSH

Grafik hubungan pengaruh X terhadap Y

Berdasarkan tabel 10 di atas, diperoleh model regresi sebagai berikut :

$$Y = 1.310 - 0.0003 X + e_i$$

Hasil Uji Normalitas kadar GRP78

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.930
Signifikansi	0.109

Hasil Uji Homogenitas Kadar GRP78

Uji	Nilai
Levene	3.523

Signifikansi 0.019

Hasil uji Perbedaan Rata-Rata Angka GRP78

Chi-square hitung	Signifikansi	Chi-square tabel	Kesimpulan
16.851	0.018	14.067	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- o H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;
- o H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- o jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- o jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH	0.072 > α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH	0.050 < α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH	0.275 > α

Hasil pengujian korelasi Spearman Hubungan dosis GSH dengan data GRP.

Koefisien korelasi (r)	Signifikan si	Keputusan
------------------------	---------------	-----------

-0.466	0.127	Berhubungan tidak signifikan
--------	-------	------------------------------

Ringkasan uji Regresi Linier Sederhana Pengaruh dosis GSH terhadap angka GRP

Variabel	B	t hitung	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	0.102			
dosis GSH (X)	-0.00025	-1.374	0.199	Tidak signifikan
A		= 0.050		
Koefisien Determinasi (R ²)		= 0.159		
t-tabel (t _{10,0.05})		= 2.228		

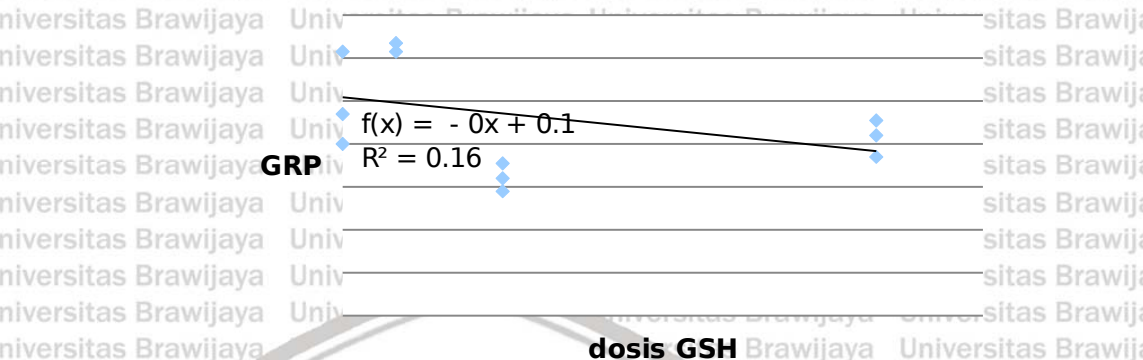
H₀ : terdapat pengaruh yang tidak signifikan antara variabel X terhadap variabel Y;

H₁ : terdapat pengaruh yang signifikan antara variabel X terhadap variabel Y.

Kriteria Pengujian

Jika nilai $|t \text{ hitung}| > t \text{ tabel}$, atau nilai signifikansi < 0.05 , maka H₀ ditolak.

Jika nilai $|t \text{ hitung}| < t \text{ tabel}$, atau nilai signifikansi > 0.05 , maka H₀ diterima



Grafik hubungan pengaruh X terhadap Y

Berdasarkan tabel 6.14 di atas, diperoleh model regresi sebagai berikut :

$$Y = 0.102 - 0.00025 X + e_i$$

Hasil Uji Normalitas kadar PCC

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.918
Signifikansi	0.178

Hasil Uji Homogenitas kadar PCC

Uji	Nilai
Levene	2.783
Signifikansi	0.085

Hasil uji Perbedaan Rata-rata angka PCC

F hitung	Signifikansi	F tabel	Kesimpulan

3.233	0.060	3.478	Tidak signifikan
-------	-------	-------	------------------

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;
- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

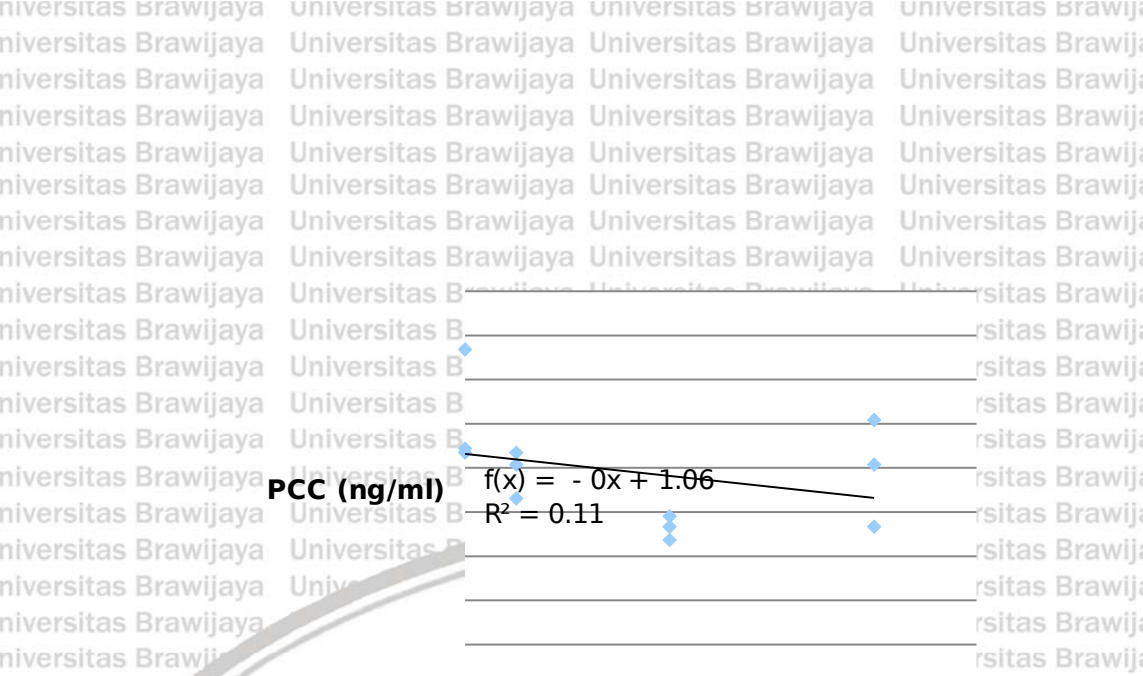
- jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil pengujian korelasi Spearman hubungan dosis niasin dengan data PCC.

Koefisien korelasi (r)	Signifikansi	Keputusan
-0.478	0.116	Berhubungan tidak signifikan

Ringkasan uji Regresi Linier Sederhana Pengaruh dosis niasin terhadap angka PCC.

Variabel	B	t _{hitung}	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	1.064			
dosis niasin (X)	-0.001	-1.106	0.295	Tidak signifikan
A		= 0.050		
Koefisien Determinasi (R ²)		= 0.109		
t-tabel (t _{10,0.05})		= 2.228		



Grafik hubungan pengaruh X terhadap Y

Berdasarkan tabel 7 di atas, diperoleh model regresi sebagai berikut :

$$Y = 1.064 - 0.001 X + e_i$$

Hasil Uji Normalitas kadar GRP

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.940
Signifikansi	0.384

Hasil Uji Homogenitas kadar GRP78

Uji	Nilai
Levene test	2.352
Signifikansi	0.124

SPSS versi 19. Hasil pengujian One Way Anova adalah terdapat

Hasil uji Perbedaan Rata-rata angka GRP78 dengan one way Anova

F hitung	Signifikansi	F tabel	Kesimpulan
5.463	0.014	3.478	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;
- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78

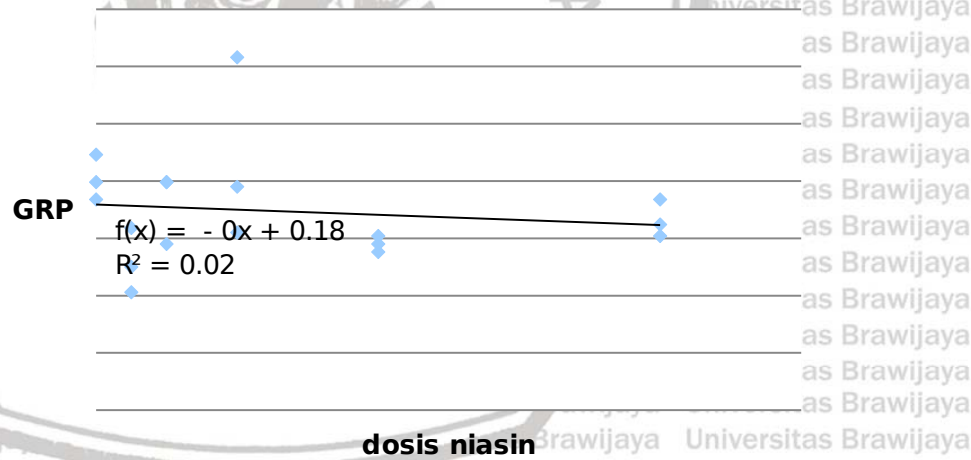
Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 25 µM niasin	0.752 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM niasin	0.053 > α
Glukosa 25 mM + 200 µM niasin	0.308 > α

Hasil pengujian korelasi Spearman Hubungan dosis niasin dengan kadar GRP78

Koefisien korelasi (r)	Signifikansi	Keputusan
-0.536	0.073	Berhubungan tidak signifikan

Ringkasan uji Regresi Linier Sederhana pengaruh Dosis Niasin terhadap kadar GRP

Variabel	B	t hitung	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	0.179			
dosis niasin (X)	-0.00009	-0.559	0.584	Tidak signifikan
A		= 0.050		
Koefisien Determinasi (R ²)		= 0.019		
t-tabel (t _{16,0.05})		= 2.120		



Grafik hubungan pengaruh X terhadap Y

Berdasarkan tabel 13 di atas, diperoleh model regresi sebagai berikut :

$$Y = 0.179 - 0.00009 X + e_i$$

LAMPIRAN 3. Hasil Analisa Statistika Tahap 3

Hasil Uji Normalitas kadar PCC

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.910
Signifikansi	0.041

Hasil Uji Homogenitas kadar PCC

Uji	Nilai
Levene	3.234
Signifikansi	0.025

Hasil uji Perbedaan Rata-Rata Angka PCC

Chi-square hitung	Signifikansi	Chi-square tabel	Kesimpulan
15.119	0.035	14.067	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- o H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;
- o H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- o jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- o jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka PCC

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH+ 25 µM niasin	0.827 > α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH + 25 µM niasin	0.127 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH + 25 µM niasin	0.513 > α

Hasil Uji Normalitas Kadar GRP78

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.930
Signifikansi	0.109

Hasil Uji Homogenitas Kadar GRP78

Uji	Nilai
Levene	3.523
Signifikansi	0.019

Hasil uji Perbedaan Rata-rata angka GRP

Chi-square hitung	Signifikan si	Chi-square tabel	Kesimpulan
16.851	0.018	14.067	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- o H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;

- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.
Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:
 - jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
 - jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Angka GRP78

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH+ 25 µM niasin	0.513 > α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH + 25 µM niasin	0.275 > α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH + 25 µM niasin	0.513 > α

Hasil Uji Normalitas Kadar AGEs

Uji	Nilai
Saphiro Wilk	0.648
Signifikansi	0.000

Hasil Uji Homogenitas Kadar AGEs

Uji	Nilai
Levene	3.207
Signifikansi	0.025

Hasil uji Perbedaan Rata-Rata Angka AGEs

Chi-square hitung	Signifikansi	Chi-square tabel	Kesimpulan
22.149	0.002	14.067	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;
- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Hasil Uji Lanjut Pengujian Berganda terhadap Perbedaan Kadar AGES

Kelompok	p-value
Glukosa 25 mM+ 10 µM GSH+ 25 µM niasin	0.043 < α
Glukosa 25 mM + 30 µM GSH + 25 µM niasin	0.046 < α
Glukosa 25 mM + 100 µM GSH + 25 µM niasin	0.043 < α