

**Efek Pemberian Jus Kecambah Brokoli (*Brassica oleracea L. botrytis*
Var.) dalam Mencegah Agregasi Protein Lensa pada Tikus Model
Diabetes**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Mata



Oleh:

AYU PUSPITASARI

NIM: 148070600111004

**PESERTA PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
ILMU KESEHATAN MATA**

**BAGIAN ILMU KESEHATAN MATA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RUMAH SAKIT UMUM Dr. SAIFUL ANWAR MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

PENELITIAN ANALITIK

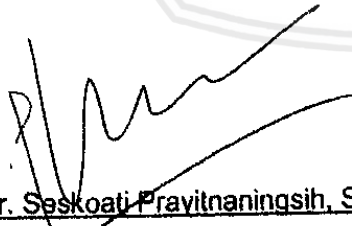
**Efek Pemberian Jus Kecambah Brokoli (*Brassica oleracea* L. *botrytis*
Var.) dalam Mencegah Agregasi Protein Lensa pada Tikus Model
Diabetes**

Oleh:

AYU PUSPITASARI

Dibacakan pada tanggal:

13 November 2018


Dr. dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M(K)

NIP: 19681023 200501 1 001

Ketua Program Studi


dr. Nina Handayani, Sp.M(K)

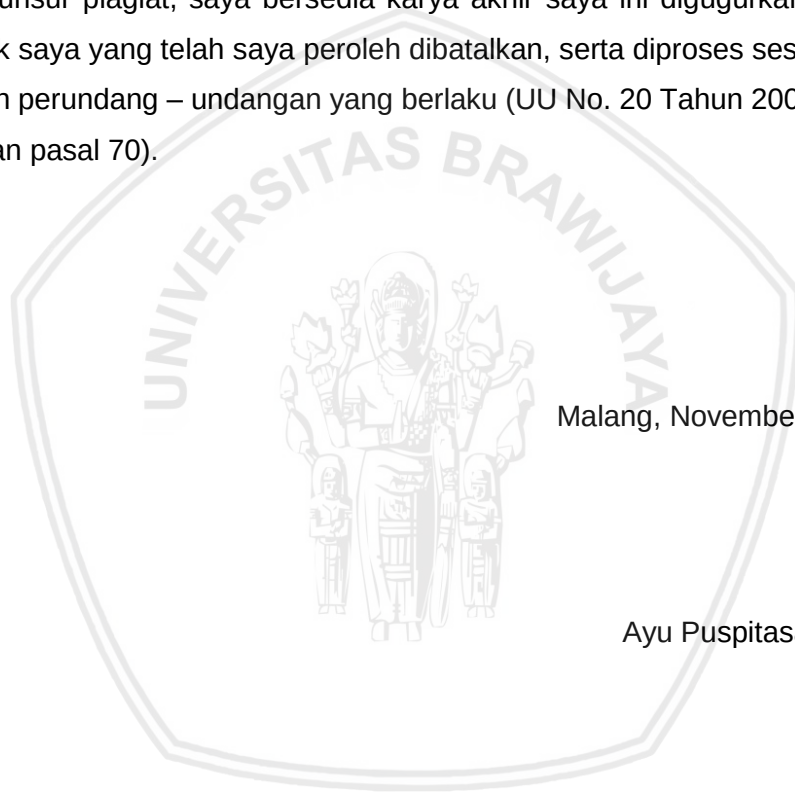
NIP: 201201 800215 2 001

Pembimbing

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam karya akhir saya ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh keserjanaan di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya yang pernah dibuat atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis dalam naskah ini dan telah disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah karya akhir ini dapat dibuktikan terdapat unsur – unsur plagiat, saya bersedia karya akhir saya ini digugurkan dan gelar akademik saya yang telah saya peroleh dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang – undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).



Malang, November 2018

Ayu Puspitasari

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan kasih sayangNya sehingga akhirnya saya dapat menyelesaikan tesis saya yang berjudul “Efek Pemberian Jus Kecambah Brokoli (*Brassica oleracea* L. *botrytis* Var.) dalam Mencegah Agregasi Protein Lensa pada Tikus Model Diabetes”. Dalam penyusunan tesis ini, banyak sekali pihak yang telah membantu saya dalam berbagai hal. Oleh karena itu, penulis sampaikan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

1. Rektor Universitas Brawijaya, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan PPDS I IK. Mata
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan PPDS I IK. Mata
3. Direktur RSSA Malang, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan PPDS I IK. Mata
4. dr. Safaruddin Refa, SpM-KVR selaku Kepala Departemen IK. Mata RSSA Malang, atas segala nasehat, arahan, kedisiplinan dan petunjuk hidupnya agar kami dapat menjadi pribadi yang semakin baik kedepannya.
5. DR. dr. Seskoati Prayitnaningsih, SpM(K) selaku Ketua Program Studi PPDS I IK. Mata Universitas Brawijaya Malang, yang telah memberikan motivasi dan kemudahan untuk menyelesaikan semua tugas ilmiah termasuk tugas akhir ini.
6. Pembimbing tesis saya, dr. Nina Handayani, SpM(K) atas segala petunjuk, saran, dukungan dan pengorbanan waktunya dalam berdiskusi selama ini sehingga akhirnya saya dapat menyelesaikan tugas ini.
7. Pembimbing statistik saya, Bapak Yayak Febri Kurniawan, S.Si atas segala petunjuk, saran, dukungan dan pengorbanan waktunya dalam berdiskusi selama ini sehingga akhirnya saya dapat menyelesaikan tugas ini.

8. Seluruh staf, pegawai dan analis di Laboratorium Biosains dan LSIH Universitas Brawijaya atas waktu dan kerjasamanya selama penelitian ini berlangsung.
9. Seluruh guru-guru saya di bagian IK. Mata FKUB/ RSSA Malang yang telah memberikan banyak ilmu, doa dan bimbingannya selama masa pendidikan.
10. Orang tua saya, Bapak Agus Soehardjono, Ibu Titik Surtiati, Bapak Maiumun, Ibu Sakerah (Alm) atas segala doa restu, dukungan, dan pengorbanan yang telah diberikan sehingga saya dapat mencapai tahap kehidupan ini.
11. Suami saya tercinta, Marsudi terimakasih atas kesabaran, pengertian, dan dukungannya.
12. Putra saya tercinta, Yusuf Tauhid As-Sudais yang selalu menjadi penyejuk dan penyemangat hati saya.
13. Teman-teman PPDS IK Mata khususnya angkatan Juli 2014 (dr. Irma Cholidah, dr. Lisanti, dr. Tata, dr. Dessira, dan dr. Decha) atas segala kerjasamanya dan kenangan manisnya selama pendidikan ini.
14. Semua staf TU IK Mata, paramedis di ruang 20/OK Mata/Poli Mata serta semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu, saya mengucapkan terima kasih atas bantuannya selama masa pendidikan.

Saya menyadari kalau dalam menyusun tesis ini masih jauh dari kata sempurna. Karenanya dengan hati terbuka penulis mengharapkan masukan dan kritik yang membangun guna kesempurnaan tesis ini. Terakhir, semoga tesis ini dapat memberi manfaat bagi pembacanya. Aamiin.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Malang, November 2018

dr. Ayu Puspitasari

Efek Pemberian Jus Kecambah Brokoli (*Brassica oleracea L. botrytis* Var.) dalam Mencegah Agregasi Protein Lensa pada Tikus Model Diabetes

Ayu Puspitasari ¹, Nina Handayani ²

Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang

Tujuan: Mengetahui efek pemberian jus kecambah brokoli dalam mencegah agregasi protein lensa pada tikus model diabetes.

Metode: Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris in vivo pada 25 tikus Wistar jantan yang dibagi dalam kelompok kontrol negatif, tikus diabetes tanpa perlakuan jus sebagai kontrol positif dan tikus diabetes yang diberi jus kecambah brokoli 0,25 gram/hari, 0,5 gram/hari dan 1 gram/hari selama 28 hari. Kondisi diabetes didapatkan dengan pemberian streptozotocin 65 mg/kgbb *single dose* intraperitoneal. Pada akhir perlakuan, semua tikus dilakukan pemeriksaan kadar gula darah puasa (GDP), derajat katarak menggunakan biomikroskopi slit lamp dan ekspresi *αB-crystallin* lensa menggunakan metode *Western blot*.

Hasil: Perlakuan jus kecambah brokoli secara signifikan menurunkan derajat katarak, kadar glukosa darah, dan ekspresi *αB-crystallin* lensa agregasi, namun meningkatkan ekspresi *αB-crystallin native* lensa pada tikus model diabetes ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Jus kecambah brokoli berpengaruh yang signifikan dalam mencegah agregasi protein lensa pada tikus model diabetes, dimana semakin tinggi dosis yang diberikan akan semakin memberikan gambaran derajat katarak yang lebih ringan, ekspresi *αB-crystallin native* lensa yang lebih tinggi dan ekspresi *αB-crystallin* agregasi lensa yang lebih rendah.

Kata Kunci: katarak diabetik, kecambah brokoli, stres oksidatif, *αB-crystallin* lensa.

Broccoli Sprouts Juice (*Brassica oleracea L. botrytis* Var.) Prevents Lens Protein Aggregation in Streptozotocin-induced Diabetic Rat

Ayu Puspitasari, Nina Handayani

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya

dr. Saiful Anwar General Hospital, Malang – Indonesia

Abstract

AIM: To investigate the effect of broccoli sprouts juice in preventing lens protein aggregation in diabetic rat model.

METHODS: This study was a laboratory experimental in vivo of 25 male Wistar rats. They were divided into negative control group, diabetic group without juice treatment as positive control and diabetic group given broccoli sprouts juice 0.25 g/day, 0.5 g/day and 1 g/day for 28 days. Diabetic rat model was obtained by administering a single dose streptozotocin 65 mg/kg intraperitoneal. At the end of the study, all rats were examined for fasting blood sugar level (FBS), visual cataract score using slit lamp biomicroscope and lens α B-crystallin expression using Western blot method. And statistical analysis was performed using one way ANOVA with post hoc test, correlation test, and simple linear regression.

RESULTS: Broccoli sprout juice treatment significantly reduced cataract scores, blood glucose levels, and lens aggregated α B-crystallin expression, but increased the expression of lens native α B-crystallin in diabetic rat models ($p < 0.05$).

CONCLUSION: Broccoli sprout juice has a significant effect in preventing lens protein aggregation in diabetic rat model. The higher dose gives better visual cataract scores, lower lens aggregated α B-crystallin expression and higher lens native α B-crystallin expression.

KEYWORDS: diabetic cataract, broccoli sprouts, oxidative stress, α B-crystallin lens.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT BEBAS PLAGIASI	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR GRAFIK.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	2
1.4. Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1. Lensa	3
2.1.1. Anatomi	3
2.1.2. Komposisi Lensa	4
2.1.3. Metabolisme Lensa	5
2.1.4. Perubahan Protein Lensa pada Katarak	9
2.2. Katarak Diabetik.....	11
2.2.1. Latar Belakang	11
2.2.2. Epidemiologi	11
2.2.3. Patogenesis.....	12
2.2.4. Gambaran Klinis	14
2.2.5. Penatalaksanaan	14
2.3. Kecambah Brokoli	17
2.3.1. Morfologi	17
2.3.2. Taksonomi	18
2.3.3. Kandungan	18
2.3.4. Manfaat	28

2.4. <i>Streptozotocin-Induced Diabetic</i> pada Tikus Model	30
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	33
3.1. Kerangka Teori	33
3.2. Kerangka Konsep	34
3.3. Hipotesis Penelitian	35
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	36
4.1. Desain Penelitian	36
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian	36
4.3. Kelompok Penelitian	36
4.3.1. Kriteria Inklusi	36
4.3.2. Kriteria Eksklusi	36
4.3.3. Penentuan Besar Dosis	37
4.4. Definisi Operasional	37
4.5. Perkiraan Replikasi	38
4.6. Variabel Penelitian	38
4.6.1. Variabel Bebas	38
4.6.2. Variabel Tergantung	38
4.6.3. Variabel Kendali	38
4.7. Alat dan Bahan Penelitian	38
4.8. Metode Percobaan	39
4.8.1. Aklimatisasi.....	39
4.8.2. Pembuatan Tikus Model Diabetes	40
4.8.3. Pengembangbiakan kecambah brokoli dan pembuatan Sediaan Jus Kecambah Brokoli	40
4.8.4. Perlakuan Penelitian	41
4.8.5. Pemeriksaan Derajat Kekeruhan Lensa	41
4.8.6. Pemeriksaan Ekspresi α -Crystallin Lensa	42
4.9. Rencana Analisa Data	42
4.10. Etika Penelitian	43
4.11. Alur Kerja Penelitian	44
4.12. Organisasi Penelitian	44
4.13. Jadwal Penelitian	45
BAB V. HASIL PENELITIAN	46
5.1. Kadar Gula Darah Puasa (GDP).....	46
5.1.1. Uji Perbedaan	49

5.1.2. Uji Korelasi	49
5.1.3. Uji Pengaruh	50
5.2. Derajat Kekeruhan Lensa/Katarak	51
5.2.1. Uji Perbedaan	53
5.2.2. Uji Korelasi	53
5.2.3. Uji Pengaruh	54
5.3. Ekspresi αB -crystallin Lensa	55
5.2.1. Uji Perbedaan	57
5.2.2. Uji Korelasi	58
5.2.3. Uji Pengaruh	59
5.4. Hubungan antara GDP, derajat katarak, dan ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes.....	60
5.4.1. Uji Korelasi	60
5.4.2. Uji Pengaruh Antar Variabel	61
BAB VI. PEMBAHASAN	65
6.1. Hewan coba model diabetes dan efek jus kecambah brokoli pada kadar gula darah puasa tikus model diabetes	65
6.2. Efek jus kecambah brokoli terhadap derajat kekeruhan/katarak lensa tikus model diabetes	68
6.3. Efek jus kecambah brokoli terhadap ekspresi αB -crystallin lensa tikus model diabetes	70
6.4. Hubungan antara kadar glukosa, derajat katarak dan ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes tikus	73
6.5. Keterbatasan Penelitian	75
BAB VII. PENUTUP	77
7.1. Kesimpulan	77
7.2. Saran	76
DAFTAR PUSTAKA	78
Lampiran 1	85
Lampiran 2	86
Lampiran 3	87
Lampiran 4	88
Lampiran 5	92
Lampiran 6	93

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Profil Nutrisi Brokoli Mentah (100 gram).....	19
Tabel 2. Glukosinolat yang Terkandung dalam <i>Brassica Spp.</i>	20
Tabel 3. Rerata kadar GDP tikus selama penelitian	47
Tabel 4. Kadar GDP tikus pada akhir penelitian	47
Tabel 5. Hasil uji perbedaan rerata GDP akhir	49
Tabel 6. Hasil uji lanjut perbedaan GDP akhir	49
Tabel 7. Hasil analisis korelasi antara dosis jus kecambah brokoli dan GDP akhir pada tikus model diabetes.....	49
Tabel 8. Hasil analisa regresi linier sederhana antara dosis jus kecambah brokoli dengan GDP akhir pada tikus model diabetes	50
Tabel 9. Rerata hasil pengamatan derajat kekeruhan lensa	51
Tabel 10. Hasil uji perbedaan rerata derajat kekeruhan lensa	53
Tabel 11. Hasil uji lanjut perbedaan rerata derajat kekeruhan lensa	53
Tabel 12. Hasil analisis korelasi antara dosis jus kecambah brokoli dan derajat kekeruhan lensa	53
Tabel 13. Hasil analisa regresi linier sederhana antara dosis jus kecambah brokoli dengan derajat kekeruhan lensa pada tikus model diabetes	54
Tabel 14. Rerata hasil pengamatan ekspresi αB -crystallin native lensa	55
Tabel 15. Rerata hasil pengamatan ekspresi agregrasi αB -crystallin lensa. ...	55
Tabel 16. Hasil Uji perbedaan rerata ekspresi αB -crystallin lensa.....	57
Tabel 17. Hasil uji lanjut perbedaan rerata ekspresi αB -crystallin native lensa .	57
Tabel 18. Hasil uji lanjut perbedaan rerata ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi.....	58
Tabel 19. Hasil analisis korelasi antara dosis jus kecambah brokoli dan ekspresi αB -crystallin lensa	58
Tabel 20. Hasil analisa regresi linier sederhana antara dosis jus kecambah brokoli dengan ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes	59
Tabel 21. Hasil analisis korelasi antar variable	60
Tabel 22. Hasil analisa regresi linier sederhana antara GDP dengan derajat katarak pada tikus model diabetes	61
Tabel 23. Hasil analisa regresi linier sederhana antara GDP dengan ekspresi	

αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes	62
Tabel 24. Hasil analisa regresi linier sederhana antara ekspresi αB -crystallin lensa dengan derajat katarak pada tikus model diabetes.....	63



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman Brokoli	17
Gambar 2. Mekanisme Pembentukan Sulforafan	22
Gambar 3. Fungsi sitoprotektif senyawa fenolik pada tanaman	28
Gambar 4. Gambar pemeriksaan derajat kekeruhan lensa yang diamati dengan slit lamp biomikroskopi	52
Gambar 5. Hasil pengukuran ekspresi <i>αB-crystallin</i> lensa menggunakan metode <i>Western blot</i>	56
Gambar 6. Foto tikus Wistar yang digunakan dalam penelitian	98
Gambar 7. Sediaan jus kecambah brokoli	98
Gambar 8. Perlakuan pada tikus penelitian	98



DAFTAR GRAFIK

Grafik 1. Grafik rerata GDP tikus selama penelitian	47
Grafik 2. Grafik rerata GDP tikus pada akhir penelitian	48
Grafik 3. Grafik regresi linier antara dosis jus kecambah brokoli dengan GDP akhir pada tikus model diabetes	50
Grafik 4. Grafik derajat kekeruhan lensa	52
Grafik 5. Grafik regresi linier antara dosis jus kecambah brokoli dengan derajat katarak pada tikus model diabetes	54
Grafik 6. Grafik rerata ekspresi αB -crystallin lensa	56
Grafik 7. Grafik regresi linier antara dosis jus kecambah brokoli dengan ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes	59
Grafik 8. Grafik regresi linier antara GDP dengan derajat katarak pada tikus model diabetes	62
Grafik 9. Grafik regresi linier antara GDP dengan ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes	63
Grafik 10. Grafik regresi linier antara ekspresi αB -crystallin lensa dengan Derajat katarak pada tikus model diabetes	64

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Katarak sampai saat ini masih menjadi penyebab kebutaan pertama di dunia. Menurut data WHO terbaru, katarak bertanggung jawab terhadap 51% kebutaan dunia dan 33% gangguan penglihatan. Sebagian besar penyebab kebutaan oleh karena katarak (hampir 90%) ditemukan di negara berkembang. Sedangkan diabetes mellitus merupakan penyakit kronis yang mengalami peningkatan jumlah penderita setiap tahun di seluruh dunia dan merupakan salah satu faktor resiko terjadinya katarak. Studi – studi telah membuktikan bahwa hiperglikemia kronis dapat menginduksi produksi berlebihan dari *reactive oxygen species* (ROS), yang berperan pada patogenesis dari komplikasi diabetes, termasuk katarak diabetik. Jumlah ROS yang tinggi secara langsung mengganggu fungsi fisiologis makromolekul seluler, dan selanjutnya memicu kekeruhan pada lensa.¹⁻³

Saat ini, operasi ekstraksi katarak dengan implantasi *intraocular lens implant* (IOL), adalah terapi utama untuk katarak diabetik. Namun, operasi juga dapat memberikan komplikasi postoperatif yang serius, seperti infeksi, edema kornea, dan peningkatan tekanan intra okuli (TIO), khususnya pada pasien usia tua dan kondisi hiperglikemik. Sehingga, penting untuk mengembangkan strategi terapeutik yang efektif untuk mencegah dan menghambat progresifitas dari katarak diabetik, diantaranya adalah multivitamin dan antioksidan.¹⁻⁵

Brokoli adalah sumber senyawa bioaktif, seperti karotenoid, senyawa fenolik, vitamin C, dan terutama glukosinolat, dimana semua senyawa bioaktif tersebut memiliki aktivitas antioksidan. Glukosinolat adalah salah satu senyawa nutraceutical yang paling khas dalam sayuran *cruciferous*, termasuk brokoli dan sulforafan (produk hidrolisis dari glukosinolat) merupakan antikosidan *long acting* yang paling poten hingga saat ini. Brokoli adalah sumber sulforafan terbaik sejauh ini dan kandungan sulforafan pada kecambah brokoli lebih banyak dibandingkan dengan yang ada pada brokoli dewasa. Pada studi – studi eksperimental membuktikan bahwa sulforafan mengaktifasi faktor transkripsi Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2 – related factor – 2*) yang mengikat elemen – elemen yang merespon antioksidan di area promotor dari gen target, sehingga meningkatkan pertahanan seluler dalam melawan stres oksidatif. Sehingga berdasarkan paparan di atas,

kami ingin mengetahui pengaruh pemberian jus kecambah brokoli dalam mencegah agregasi protein lensa pada tikus model diabetes.⁶⁻⁹

1.2. Rumusan Masalah

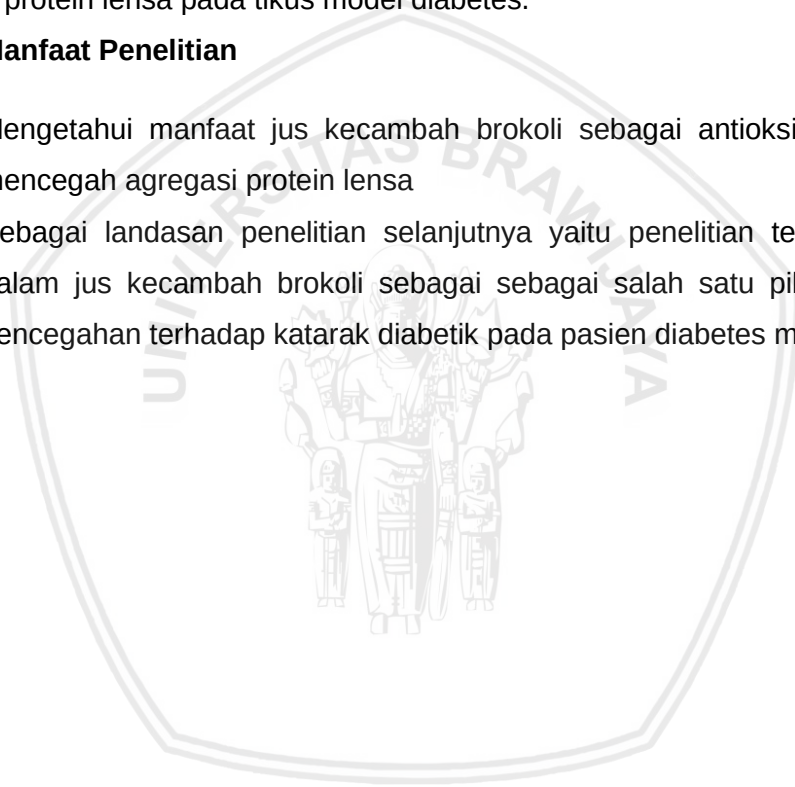
Apakah terdapat pengaruh pemberian jus kecambah brokoli dalam mencegah agregasi protein lensa pada tikus model diabetes?

1.3. Tujuan

Mengetahui pengaruh pemberian jus kecambah brokoli dalam mencegah agregasi protein lensa pada tikus model diabetes.

1.4. Manfaat Penelitian

- Mengetahui manfaat jus kecambah brokoli sebagai antioksidan dalam mencegah agregasi protein lensa
- Sebagai landasan penelitian selanjutnya yaitu penelitian tentang efek dalam jus kecambah brokoli sebagai sebagai salah satu pilihan terapi pencegahan terhadap katarak diabetik pada pasien diabetes mellitus



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Lensa

2.1.1. Anatomi

Lensa merupakan suatu struktur bikonveks yang transparan, asimetris, dengan bagian ekuator yang membulat. Lensa terletak tepat di bagian posterior dari iris dan kamera okuli posterior, serta berada di sebelah anterior dari permukaan vitreus yang disebut fossa lentikularis. Zonula zinni mempertahankan posisi lensa agar tetap berada pada tempatnya, dan menghubungkannya dengan bagian yang tidak berpigmen dari prosesus siliaris. Lensa mengandung 65 % air dan 35 % protein. Kandungan protein dalam lensa dua kali lebih banyak daripada jaringan tubuh yang lain.¹⁰

Lensa tersusun dari sel ektodermal pada berbagai macam tahap diferensiasi, dikelilingi oleh kapsul lensa (lamina basal). Di anterior mereka membentuk sebuah monolayer epitel sedangkan di dalamnya mereka disusun oleh serat lensa yang tersusun secara konsentris, yang membentuk sebagian besar lensa. Serat lensa paling superfisial aktif secara metabolik, dan merupakan sel inti sedangkan serat yang lebih dalam adalah *organelle-free*.¹¹

Serat lensa berasal dari sel epitel lensa yang mengalami mitosis dan diferensiasi. Selama proses ini, sel mengalami pemanjangan, mengandung protein lensa larut air (*crystallin*) dalam jumlah besar, dan kehilangan nukleus serta organel – organel selnya. Dengan adanya kandungan *crystallin* (α , β , γ) yang tinggi dalam sitoplasma serat lensa, memungkinkan lensa untuk mempunyai indeks refraksi yang tinggi.¹⁰⁻¹¹

Dengan adanya serat lensa baru yang terus dibentuk menyebabkan serat lensa yang lama secara perlahan akan terdorong makin dalam ke dalam lensa. Serat lensa yang tua ini kehilangan nukleusnya dan menjadi lebih padat, dan membentuk nukleus lensa yang makin lama akan makin membesar. Massa serat lensa baru yang terbentuk akan membentuk korteks lensa, dan terletak di bagian perifer/lapisan luar dari lensa. Serat lensa di daerah korteks mempunyai konsistensi yang lebih lunak dibandingkan serat lensa di daerah nukleus.¹⁰

2.1.2. Komposisi Lensa

Lensa terdiri atas air (65%), protein (35%) yang merupakan kandungan protein tertinggi di antara jaringan - jaringan tubuh, dan sedikit sekali mineral dibandingkan jaringan tubuh lainnya. Kandungan kalium lebih tinggi di lensa daripada jaringan lain. Asam askorbat dan glutathione terdapat dalam bentuk teroksidasi maupun tereduksi. Lensa tidak memiliki serabut saraf, pembuluh darah, dan jaringan ikat.¹⁰⁻¹¹

Protein lensa dapat dibagi menjadi dua berdasarkan kelarutannya dalam air, yaitu protein larut air (protein sitoplasmik) dan protein tidak larut air (protein sitoskeletal). Fraksi protein larut air sebesar 90% dari seluruh protein lensa yang terdiri atas *crystallin*. *Crystallin* adalah protein intraselular yang terdapat pada epitel dan membran plasma dari sel serat lensa. *Crystallin* terbagi atas α -, β -, dan γ -*crystallin*.¹⁰⁻¹¹

α -*crystallin* adalah tipe yang paling dominan pada lensa mata, yaitu hingga 50% dari total protein larut air dan terdiri dari 2 tipe subunit, yaitu A dan B yang berhubungan secara tidak kovalen membentuk agregat dengan rata-rata berat molekul 800 kDa. Masing-masing subunit memiliki massa molekul sekitar 20 kDa, yang membentuk heteromerkompleks yang berisi sekitar 30 subunit. α -*crystallin* kompleks berikatan dengan protein yang terdenaturasi sebagian dan mencegahnya dari proses agregasi. Fungsi utama mereka dalam sel – sel serat lensa adalah menghambat denaturasi komplisit dan insolubilisasi dari kristalin – kristalin lainnya. Ekspresi αB -*crystallin* terdeteksi dalam berbagai jaringan, seperti kornea, lensa, saraf optik, retinal glia, astrosit, sel Muller, jantung, otot skelet, kulit, ginjal, otak dan paru-paru. Meskipun, peran langsung α -*crystallin* pada jaringan non lentikular tidak diketahui. Sedangkan ekspresi αA -*crystallin* hanya dideteksi pada lensa dan retina.¹⁰⁻¹¹

α -*crystallin* terlibat dalam transformasi sel epitel menjadi serat lensa. Laju sintesis α -*crystallin* tujuh kali lebih cepat di sel epitel daripada di serat kortikal, mengindikasikan penurunan laju sintesis setelah transformasi. α -*crystallin* melakukan peran kunci dalam menjaga transparansi lensa, tidak hanya sebagai protein struktural, tapi sebagai *chaperone*/pendamping lensa yang menjaga protein pada bentuk aslinya. Hal ini terutama relevan dengan penjagaan β -*crystallin* dan γ -*crystallin*, selain itu juga berlaku untuk sejumlah enzim dan protein fungsional, seperti $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. Fungsi utamanya adalah untuk meminimalkan perubahan konformasional dan *unfolding* yang merupakan karakteristik denaturasi

protein. Molekul α -crystallin oligomerik ada dalam keadaan dinamis dimana subunitnya terus diganti dengan asosiasi dan disosiasi yang cepat. Hal ini penting untuk fungsi pendamping (*chaperone*).¹¹

β -crystallin dan γ -crystallin terdiri dari beberapa protein yang terkait dengan *sequence* dan struktur, memiliki rangkaian asam amino homolog dan struktur yang sama sehingga dapat dipertimbangkan sebagai satu famili protein. β -crystallin terdiri dari empat subunit asam dan tiga subunit dasar yang memiliki berat molekul dalam kisaran 22–28 kDa, sedangkan γ -crystallin memiliki 7 jenis subunit yang berbeda dengan berat molekul sekitar 20 kDa. Pada lensa manusia, γ D-crystallin dan γ E-crystallin tidak diekspresikan, namun ditemukan dalam lensa *bovine*.¹⁰⁻¹¹

Protein lensa yang tidak larut air dapat dibagi menjadi dua, yaitu protein yang larut dalam urea dan yang tidak larut dalam urea. Fraksi yang larut dalam urea terdiri atas protein sitoskeletal yang berfungsi sebagai rangka struktural sel lensa. Fraksi yang tidak larut urea terdiri atas membran plasma serat lensa.¹⁰

Major Intrinsic Protein (MIP) adalah protein yang menyusun membran plasma sebesar 50%. MIP pertama sekali muncul di lensa ketika serat lensa mulai memanjang dan dapat dijumpai di membran plasma di seluruh massa lensa. MIP berhubungan dengan diferensiasi sel menjadi serat lensa. Namun, MIP tidak dijumpai pada sel epitel.¹⁰

2.1.3. Metabolisme Lensa

Tujuan utama dari metabolisme lensa adalah mempertahankan ketransparanan lensa. Lensa mendapatkan energi terutama melalui metabolisme glukosa anaerobik. Komponen penting lain yang dibutuhkan lensa adalah bentuk NADPH tereduksi yang didapatkan melalui jalur pentosa yang berfungsi sebagai agen pereduksi dalam biosintesis asam lemak dan glutathione. Metabolisme berbagai zat di lensa adalah sebagai berikut:¹²

– Metabolisme glukosa

Glukosa memasuki lensa dari aqueous humor melalui difusi sederhana dan *facilitated diffusion*. Kira-kira 90 – 95% glukosa yang masuk ke lensa akan difosforilasi oleh enzim hexokinase menjadi glukosa-6-fosfat. Hexokinase akan tersaturasi oleh kadar glukosa normal pada lensa sehingga apabila kadar glukosa normal telah dicapai, maka akan reaksi ini akan terhenti. Glukosa-6-fosfat yang terbentuk ini akan digunakan di jalur glikolisis anaerob dan jalur pentosa fosfat.¹²

Lensa tidak dilalui pembuluh darah sehingga kadar oksigen lensa sangat rendah. Oleh karena itu, metabolisme utamanya berlangsung secara anaerob yaitu glikolisis anaerob. Sebesar 70% ATP lensa dihasilkan melalui glikolisis anaerob. Walaupun kira-kira hanya 3% dari glukosa masuk ke siklus Krebs, tetapi siklus ini menghasilkan 25% dari seluruh ATP yang dibentuk di lensa.¹¹⁻¹²

Jalur lain yang memetabolisme glukosa-6-fosfat adalah jalur pentosa fosfat. Kira-kira 5% dari seluruh glukosa lensa dimetabolisme oleh jalur ini dan dapat distimulasi oleh peningkatan kadar glukosa. Aktivitas jalur pentosa fosfat di lensa lebih tinggi dibandingkan di jaringan lain untuk menghasilkan banyak NADPH yang berfungsi untuk mereduksi glutathione.¹²

Jalur lain yang berperan dalam metabolisme glukosa di lensa adalah jalur sorbitol. Ketika kadar glukosa meningkat, seperti pada keadaan hiperglikemik, jalur sorbitol akan lebih aktif dari pada jalur glikolisis sehingga sorbitol akan terakumulasi. Glukosa akan diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim yang berada di permukaan epitel yaitu aldosa reduktase. Lalu sorbitol akan dimetabolisme menjadi fruktosa oleh enzim poliol dehidrogenase. Enzim ini memiliki afinitas yang rendah, artinya sorbitol akan terakumulasi sebelum dapat dimetabolisme, sehingga menyebabkan retensi sorbitol di lensa. Selanjutnya sorbitol dan fruktosa menyebabkan tekanan osmotik meningkat dan akan menarik air sehingga lensa akan menggembung, sitoskeletal mengalami kerusakan, dan lensa menjadi keruh.¹²

– **Metabolisme protein**

Konsentrasi protein lensa adalah konsentrasi protein yang tertinggi dari seluruh jaringan tubuh. Sintesa protein lensa berlangsung seumur hidup. Sintesis protein utama adalah protein *crystallin* dan *Major Intrinsic Protein* (MIP). Sintesa protein hanya berlangsung di sel epitel dan di permukaan serabut kortikal.¹²

Lensa protein dapat stabil dalam waktu yang panjang karena kebanyakan enzim pendegradasi protein dalam keadaan normal dapat diinhibisi. Lensa dapat mengontrol degradasi protein dengan menandai protein yang akan didegradasi dengan ubiquitin. Proses ini berlangsung di lapisan epitelial dan membutuhkan ATP.¹²

– **Glutathione**

Glutathione adalah suatu senyawa tripeptida yang mengandung gugusan thiol (sulfhidril = -SH) dan mempunyai berat molekul rendah. Glutathione terdiri dari

3 asam amino yaitu glisin, sistein dan asam glutamat. Glutation disintesa secara aktif dalam lensa dan eritrosit. Karena itu dalam lensa dan eritrosit, glutathione didapatkan dalam jumlah yang sangat tinggi. Kadar glutathione dalam lensa adalah 6,5-15 $\mu\text{M/g}$ dan dalam eritrosit adalah 2-2,5 $\mu\text{M/g}$. Sebagian besar senyawa tersebut terdapat dalam bentuk glutathione tereduksi (GSH) dan hanya 2-5% terdapat dalam bentuk glutathione teroksidasi (GSSG) dalam tubuh manusia. Senyawa ini merupakan salah satu antioksidan yang sangat potensial dalam tubuh manusia, yang merupakan *scavenger* kuat terhadap spesies oksigen reaktif sehingga memberikan perlindungan bagi stres oksidatif.¹¹⁻¹⁴

Glutathione berperan dalam mempertahankan ketransparanan lensa dengan mempertahankan integritas sel dengan cara menjaga grup sulfhidril (SH) protein lensa tetap dalam bentuk tereduksi sehingga mencegah agregasi protein. Sebagaimana oksidasi yang terjadi akan menyebabkan *cross-linked* protein sehingga terjadi agregasi dan mengganggu kejernihan lensa. Selain itu, glutathione berperan dalam mempertahankan permeabilitas membran dengan melindungi grup SH yang diperlukan dalam transport kation dan dalam transportasi asam amino sebagai donor *Y-glutamyl* pada gugus α -amino dari asam amino sistein atau glutamin yang secara tidak langsung juga berperan dalam transport ion, dengan melindungi gugus sulfhidril dari $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Kemudian glutathione juga berfungsi melindungi dari kerusakan oksidatif, dimana glutathione merupakan ko-enzim beberapa reaksi dalam sistem oksidasi-reduksi dan mampu mengikat aldehid yang terbentuk dari proses peroksidase lemak oleh radikal bebas dan zat xenobiotik lainnya dan kemudian mendetoksifikasinya menjadi asam merkapturat dengan bantuan enzim glutathione S-transferase.¹¹⁻¹⁴

– Mekanisme antioksidan

Lensa dapat mengalami kerusakan akibat radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS). ROS adalah sebutan untuk sekelompok radikal oksigen yang sangat reaktif, merusak lipid, protein, karbohidrat dan asam nukleat. Contoh-contoh radikal oksigen adalah anion superoksida (O_2^-), radikal bebas hidroksil ($\text{OH}^\bullet$), radikal peroksil ($\text{ROO}^\bullet$), radikal lipid peroksil (LOOH), oksigen tunggal (O_2), dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Mekanisme kerusakan yang diakibatkan oleh spesies oksigen reaktif adalah peroksidasi lipid membran membentuk malondialdehid, yang akan membentuk ikatan silang antara protein dan lipid membran sehingga sel menjadi rusak. Polimerisasi dan ikatan silang protein

tersebut menyebabkan agregasi kristalin dan inaktivasi enzim-enzim yang berperan dalam mekanisme antioksidan seperti katalase dan glutathion reduktase.¹¹⁻¹⁴

Mekanisme pertahanan terhadap senyawa oksigen reaktif dilakukan oleh sistem enzim dan sistem non enzim. Pada lensa mata mekanisme pertahanan enzimatis terhadap senyawa oksigen reaktif bergantung pada 3 sistem, yaitu *glutathion redox cycle*, enzim superoksida dismutase, dan katalase. Sistem glutathion (*glutathion redox cycle*) merupakan mekanisme pertahanan yang utama. Sistem ini terdiri dari glutathion dalam bentuk tereduksi (GSH), glutathion dalam bentuk teroksidasi (GSSG), enzim glutathion peroksidase (GPx), dan enzim glutathion reduktase (GR).¹¹⁻¹⁴

Mekanisme antioksidan pada lensa adalah dengan cara dismutasi radikal bebas superoksida menjadi hidrogen peroksida dengan bantuan enzim superoksida dismutase. Lalu hidrogen peroksida tersebut akan diubah menjadi molekul air dan oksigen melalui bantuan enzim katalase. Selain itu, glutathion tereduksi (GSH) dapat mendonorkan gugus hidrogennya pada hidrogen peroksida sehingga berubah menjadi molekul air dengan bantuan enzim glutathion peroksidase (mereduksi H_2O_2). Glutathion tereduksi (GSH) yang telah memberikan gugus hidrogennya akan membentuk glutathion teroksidasi (GSSH) yang tidak aktif, tetapi NADPH yang berasal dari jalur pentosa akan mengubahnya kembali menjadi glutathion tereduksi (GSH) dengan bantuan enzim glutathion reduktase.¹¹⁻¹⁴

– Mekanisme pengaturan keseimbangan cairan dan elektrolit

Aspek fisiologi yang terpenting dalam menjaga ketransparanan lensa adalah pengaturan keseimbangan cairan dan elektrolit. Ketransparanan lensa sangat bergantung pada komponen struktural dan makromolekular. Selain itu, hidrasi lensa dapat menyebabkan kekeruhan lensa.¹¹⁻¹²

Lensa mempunyai kadar kalium dan asam amino yang tinggi dibandingkan aqueous dan vitreus dan memiliki kadar natrium dan klorida yang lebih rendah dibandingkan sekitarnya. Keseimbangan elektrolit diatur oleh permeabilitas membran dan pompa natrium dan kalium (Na-K-ATPase). Pompa ini berfungsi memompa natrium keluar dan memompa kalium untuk masuk.¹¹⁻¹²

Kombinasi dari transport aktif dan permeabilitas membran di lensa disebut *pump-leak theory*. Kalium dan asam amino ditransportasikan ke dalam lensa secara aktif ke anterior lensa melalui epithelium. Lalu kalium dan asam amino akan

berdifusi melalui bagian posterior lensa. Sedangkan natrium masuk ke dalam lensa di bagian posterior lensa secara difusi dan keluar melalui bagian anterior lensa secara aktif.¹¹⁻¹²

2.1.4. Perubahan Protein Lensa pada Katarak

– Perubahan post-translasi pada *crystallin* lensa

Crystallin adalah protein yang stabil secara intrinsik, *tightly folded* dalam bentuk aslinya namun mengalami modifikasi non-enzimatik major terhadap struktur dan fungsinya sejak awal kehidupan. Perubahan meliputi tiolasi, deamidasi, glikasi, karbamilasi, cis-metilasi, fosforilasi dan asetilasi dan juga proteolisis, menyebabkan pemotongan dan pelepasan fragmen *crystallin*.¹¹

Deamidasi dimulai dalam rahim dan berlangsung seiring bertambahnya usia dan terutama dengan katarak, merubah struktur tersier sehingga α - dan β -*crystallin* menjadi *unfolded* dan *insoluble*. *Crystallin* yang dideaminasi ditemukan lebih banyak di fraksi protein lensa tidak larut air daripada yang larut air. Modifikasi *crystallin* post-translasi oleh derivat/turunan glukosa terjadi pada lensa dengan penuaan dan katarak dan berkorelasi dengan hilangnya transparansi.¹¹

Glikasi melibatkan modifikasi non-enzimatik dan kovalen, oleh reaksi gugus aldehida glukosa dengan protein bebas amino. Modifikasi ekstensif α A- dan α B-*crystallin* dengan glikasi menyebabkan agregasi dan penurunan fungsi *chaperone*, kemungkinan dengan mengubah keadaan dinamis protein.¹¹

Protein yang denaturasi dan *unfolded* rentan terhadap oksidasi dan protein lensa tidak terkecuali. Hal ini disebabkan oleh penurunan kemampuan antioksidan lensa misalnya dengan bertambahnya usia dimana kadar GSH dan *GSH-regenerating enzyme* rendah, dan memicu akumulasi *mixed disulphide*, *disulphide cross-linked crystallin* dan *oxidized methionine residu*. β - dan γ -*crystallin* kaya thiol paling rentan terhadap oksidasi, oksidasi α A- dan α B-*crystallin* juga terjadi, memicu perubahan struktural dan hilangnya aktivitas *chaperone*.¹¹

α - dan β - *crystallin* mengalami pembelahan untuk menghasilkan produk yang tidak stabil, terpotong, dengan jumlah pembelahan lebih tinggi di fraksi protein tidak larut air daripada yang larut air. Pemotongan C-terminal α A- dan α B-*crystallin* mempengaruhi oligomerisasi dan pertukaran subunit dan menyebabkan hilangnya aktivitas pendamping (*chaperone*), mungkin dengan menghapus bagian dari *sequence* yang mengatur *chaperone-substrate complex* dalam bentuk yang mudah larut.¹¹

Ada peningkatan jumlah fragmen *crystallin* pada serat lensa dengan usia, lebih besar jumlahnya di nukleus daripada di korteks dan di fraksi protein tidak larut air dibandingkan dengan yang larut air. Telah dikemukakan bahwa fragmen *crystallin* yang dihasilkan dari *crystallin* teroksidasi pada penuaan lensa dapat mengganggu aktivitas α -chaperone dan meningkatkan agregasi protein terdenaturasi, mungkin dengan kehadiran fragmen yang bersifat *antichaperon*. Ada jalur *ubiquitin-proteasom* yang penting di lensa, termasuk degradasi dan menghilangkan protein teroksidasi. Aktivitas konjugasi ubiquitin rendah pada lensa dengan penuaan, yang menyebabkan akumulasi *crystallin* teroksidasi, terutama nukleus, berkontribusi pada agregasi dan penghamburan cahaya.¹¹

– **Perubahan konformasional**

Serangan oksidatif pada *unfolded crystallin* atau yang telah mengalami modifikasi menyebabkan *cross-linked*, *insoluble* dan pembentukan agregat dengan berat molekul tinggi. Hal ini selanjutnya dapat mengganggu *short-range order* dari *crystallin*, di satu sisi menyebabkan kehilangan transparansi lensa dan pada sisi lain terjadi pengerasan progresif, terutama dari nukleus lensa. Di dalam nukleus, perubahan ini berangsur-angsur memberikan gambaran katarak nuklear, baik *grey-white nuclear opacity*, atau lebih sering, dengan akumulasi kromofor fluorescein, *brunescient nuclear opacity*. Salah satu penyumbang utama akumulasi kromofor adalah pembentukan produk Maillard dan AGEs sebagai hasil glikasi atau askorbilasi. Selain itu, kromofor fluorescein terbentuk dari senyawa tryptophan (senyawa 'filter UV') seperti GSH-3-OHKG, dan *3-hydroxy kynurenine*, yang membentuk derivatif *cross-linked* dengan *crystallin*.¹¹

– **Hilangnya fungsi chaperone**

Turunnya aktivitas *chaperon* α -*crystallin* menyebabkan peningkatan agregasi dan hilangnya transparansi lensa. Ini merupakan prekursor dari katarak. Perubahan diperkuat dengan berkurangnya ketersediaan *free-radical scavenger* yang mampu melindungi protein yang rentan melawan oksidasi.¹¹

– **Kehilangan antioksidan dan kemampuan *free-radical scavenging***

Hilangnya fungsi *chaperone* secara progresif dengan bertambahnya usia disertai dengan turunnya kemampuan *free-radical scavenging*, mengakibatkan protein cenderung memiliki risiko oksidasi yang lebih besar. Kadar GSH berkurang

hampir secara linear dengan bertambahnya usia, dan konsentrasi GSH teroksidasi (GSSG) menunjukkan kenaikan yang sesuai.^{11,19}

2.2. Katarak Diabetik

2.2.1. Latar Belakang

Lebih dari 285 juta populasi di seluruh dunia menderita diabetes dan diperkirakan akan mencapai 439 juta di akhir tahun 2030 berdasarkan *International Diabetes Federation*. Katarak merupakan penyebab utama kebutaan pada pasien diabetes sebagaimana insiden dan progresifitas katarak yang meningkat pada pasien yang menderita diabetes mellitus.^{15,16}

Hubungan antara diabetes dan pembentukan katarak telah ditunjukkan pada studi – studi dasar, klinis, epidemiologi. Oleh karena peningkatan jumlah pasien dengan diabetes mellitus baik tipe 1 maupun tipe 2 di seluruh dunia, maka insiden katarak diabetik juga terus meningkat. Baik diabetes maupun katarak menimbulkan beban kesehatan dan ekonomi yang cukup besar, terutama pada negara – negara berkembang, dimana pengobatan diabetes belum cukup maksimal dan operasi katarak sering tidak terakses. Meskipun operasi katarak adalah tindakan bedah mata yang paling sering dilakukan di seluruh dunia dan merupakan penatalaksanaan utama pada katarak, namun pasien dengan diabetes mellitus memiliki tingkat resiko/komplikasi operasi katarak yang lebih tinggi.^{15,16}

2.2.2. Epidemiologi

Studi – studi epidemiologi mengungkapkan bahwa prevalensi katarak dengan kekeruhan kortikal dan/atau subkapsular meningkat hingga 5x lipat pada subjek dengan diabetes dibandingkan pada populasi nondiabetes. Seseorang dengan diabetes mellitus baik tipe 1 maupun tipe 2 memiliki resiko yang lebih besar untuk terjadinya katarak.¹⁶

Prevalensi katarak di Amerika Serikat adalah 22.42%, 3.8%, 11.92%, dan 38.37% pada dewasa dengan diabetes dibandingkan dengan 3.30%, 0.48%, 1.58%, dan 16.56% pada dewasa nondiabetes, masing – masing, sesuai kelompok usia ≤ 18 , 18 – 44, 45 – 64, dan ≥ 65 tahun. Studi – studi juga melaporkan bahwa katarak terutama 4x lebih sering terjadi pada subyek usia muda (usia ≤ 18 tahun) dengan diabetes tipe 2 dibandingkan dengan diabetes tipe 1 (23.40 versus 5.77%), sedangkan subyek dengan diabetes tipe 1 memiliki manifestasi prevalensi katarak yang lebih besar pada kelompok usia yang lebih

tua (18 – 44 tahun) yaitu 5.19% versus 3.24% pada subyek dengan diabetes tipe 2.¹⁶⁻¹⁸

2.2.3. Patogenesis

Secara definisi, katarak adalah setiap keadaan kekeruhan pada lensa yang dapat terjadi akibat hidrasi (penambahan cairan) lensa, denaturasi protein lensa, atau akibat kedua – duanya.¹⁵

Enzim *aldose reductase* (AR) mengkatalisis reduksi glukosa menjadi sorbitol melalui jalur polyol, sebuah proses yang berhubungan dengan timbulnya katarak diabetik. Penelitian ekstensif telah fokus pada peran utama jalur AR sebagai faktor inisiasi timbulnya katarak diabetik. Pada hiperglikemia terjadi peningkatan aktifitas enzim aldose reduktase yang menyebabkan akumulasi intraseluler sorbitol memicu perubahan osmotik yang menyebabkan korteks lensa hidrofik, yang berhubungan dengan perubahan biokimia kompleks dan akhirnya memicu timbulnya katarak. Selain itu, beberapa studi juga menunjukkan bahwa stres osmotik pada lensa yang disebabkan akumulasi sorbitol, menginduksi apoptosis di sel epitelial lensa, yang memicu terjadinya katarak. Pada lensa, sorbitol diproduksi lebih cepat dibandingkan dengan yang dikonversi menjadi fruktosa oleh enzim *sorbitol dehydrogenase*.^{12,15,-18}

Hiperglikemia menyebabkan radikal bebas atau ROS yang berlebih, defisit antioksidan dan pada akhirnya menjadi stres oksidatif. Hiperglikemia meningkatkan konsentrasi radikal bebas melalui glikasi protein (glikasi enzimatis), autooksidasi glukosa (autooksidasi monosakarida) dan peningkatan jalur poliol. Jalur polyol telah dideskripsikan sebagai mediator primer diabetes yang menginduksi stres oksidatif di lensa. Stres osmotik disebabkan oleh akumulasi sorbitol yang menginduksi stres di *endoplasmic reticulum* (ER), tempat utama terjadinya sintesa protein, sehingga memicu timbulnya radikal bebas. Stres ER juga dihasilkan dari fluktuasi kadar glukosa, kemudian menginisiasi *unfolded protein response* (UPR) yang menghasilkan ROS dan menyebabkan stres oksidatif merusak serat lensa.^{15,16}

Selain itu pada diabetes melitus, perubahan glukosa menjadi sorbitol pada jalur poliol yang meningkat banyak memakai NADPH, sehingga NADPH yang tersisa tinggal sedikit dan banyak GSSH yang tidak bisa dikembalikan ke bentuk GSH lagi (terjadi penurunan aktifitas *gluthation redox cycle*). Penurunan kadar

GSH akan menyebabkan banyak H_2O_2 tidak dapat dinetralkan sehingga terjadi stres oksidatif.^{12,15-17}

Sedangkan autooksidasi glukosa juga dapat menghasilkan senyawa dikarbonil yang reaktif dan senyawa oksigen reaktif seperti radikal superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH). Glukosa dapat teroksidasi sebelum berikatan dengan protein demikian juga glukosa setelah berikatan dengan protein (*glycated protein*) dapat teroksidasi menghasilkan ROS. Proses glikasi protein nonenzimatik adalah pengikatan gugus amino materi kristalin oleh molekul gula yang berlangsung tanpa bantuan enzim. Reaksi glikasi nonenzimatik protein kristalin akan menimbulkan *cross-linked* antar dan intra molekul protein sehingga terjadi penambahan protein dengan berat molekul tinggi, yang menyebabkan penurunan tingkat kelarutan protein dan merusak kejernihan lensa serta terjadi katarak. Kombinasi glikasi dan oksidasi glukosa menghasilkan pembentukan AGE (*advanced glycation end products*). Akumulasi AGE pada protein lebih lanjut diikuti dengan *browning*, peningkatan *fluorescence* dan *cross-linked*. Proses pembentukan AGE merupakan proses irreversibel yang berlangsung lama dan dapat menimbulkan kerusakan jaringan.^{15,16}

Keseimbangan antara ketersediaan antioksidan dan terbentuknya radikal bebas mempunyai arti penting dalam menjaga lingkungan di dalam sel. Apabila ketersediaan antioksidan tidak mampu menetralkan radikal bebas, akan timbul stres oksidatif yang berujung pada kerusakan membran sel, lisosom, mitokondria, DNA, maupun serabut lensa. Stres oksidatif diyakini merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam terjadinya katarak.¹⁵⁻¹⁸

Suatu stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid membran plasma serabut lensa. Pada proses peroksidasi lipid, bahan teroksidasi akan mengambil atom hidrogen dari asam lemak tidak jenuh, sehingga terbentuk radikal asam lemak dan seterusnya dengan oksigen akan terbentuk radikal peroksi lipid. Reaksi ini dapat memperbanyak rantai, yang menyebabkan pembentukan lipid peroksida (LOOH) serta akhirnya terjadi hasil utama pemecahan berupa MDA. Malondialdehid dihipotesiskan mampu bereaksi silang dengan lipid membran maupun protein membran, yang akhirnya fungsi normal membran terganggu.^{15,16}

Radikal bebas dapat bereaksi langsung dengan molekul-molekul DNA dan menimbulkan kerusakan. Radikal bebas dapat juga merusak protein maupun lipid membran sel pada korteks lensa. Kerusakan dalam serabut lensa mengakibatkan polimerisasi dan ikatan silang antara lipid dan protein, serta akhirnya terjadi

peningkatan jumlah protein lensa yang tidak larut air, yang selanjutnya akan mengganggu transparansi lensa atau menyebabkan lensa menjadi keruh.^{12,15-17}

2.2.4. Gambaran Klinis

Diabetes mellitus dapat mempengaruhi kejernihan lensa, indeks refraktif, dan amplitudo akomodatif lensa. Dimana kadar glukosa darah tinggi, demikian juga halnya dengan kadar glukosa di humor akuos. *Myopic shift* akut mengindikasikan diabetes mellitus yang tidak terdiagnosa atau tidak terkontrol. Pasien dengan diabetes tipe 1 memiliki penurunan amplitudo akomodasi dibandingkan dengan kontrol sesuai usia, dan presbiopia dapat terjadi pada usia yang lebih muda pada pasien seperti ini.^{3,19}

Katarak adalah penyebab umum gangguan penglihatan pada pasien dengan diabetes mellitus. Katarak diabetik akut, atau katarak "*snowflake*", terjadi bilateral, dan perubahan subkapsular lensa meluas dengan onset cepat, serta biasanya muncul pada individu usia muda dengan diabetes mellitus yang tidak terkontrol. Kekeruhan subkapsular multipel *gray-white* (abu-abu keputihan) dengan gambaran *snowflake* tampak di awal pada korteks superficial anterior dan posterior lensa. Bentuk vakuola and *cleft* pada korteks. Dan selanjutnya katarak kortikal *intumescence* dan matur dalam jangka waktu pendek dapat terjadi.^{3,19}

Meskipun katarak diabetik akut jarang ditemukan pada praktek klinik sehari-hari, katarak kortikal bilateral dengan maturitas yang cepat pada pasien dewasa muda atau anak – anak perlu diwaspadai kemungkinan adanya diabetes mellitus. Pasien dengan diabetes mellitus yang mengalami perubahan lensa oleh karena usia susah dibedakan dari pasien katarak nondiabetik, kecuali perubahan lensa mulai muncul pada usia yang lebih muda dibandingkan yang nondiabetes. Peningkatan resiko atau onset yang lebih awal pada katarak oleh karena usia pada pasien diabetes dapat merupakan hasil dari akumulasi sorbitol di dalam lensa, yang diikuti perubahan hidrasi, peningkatan nonenzimatik glikosilasi (glikasi) protein lensa, atau stres oksidatif yang lebih besar sehingga membuat perubahan pada metabolisme lensa.³

2.2.5 Penatalaksanaan

Katarak hanya dapat diatasi melalui prosedur operasi. Akan tetapi jika gejala katarak tidak mengganggu, tindakan operasi tidak diperlukan. Kadang kala

cukup dengan mengganti kaca mata. Terapi farmakologis untuk katarak sedang dalam penelitian.¹⁶

– **Prosedur operatif**

Penatalaksanaan definitif untuk katarak, termasuk katarak diabetik adalah operasi ekstraksi lensa dengan implantasi IOL. Teknik bedah katarak merupakan teknik dengan perkembangan yang paling pesat dalam bidang ilmu penyakit mata. Fakoemulsifikasi saat ini telah menjadi teknik operasi katarak yang lebih dipilih pada sebagian besar tipe katarak. Saat ini pembedahan katarak dengan fakoemulsifikasi semakin populer di seluruh dunia, lebih dari 85% pembedahan katarak di Inggris dan Amerika menggunakan teknik ini. Berdasarkan data statistik *American Academy of Ophthalmology*, angka keberhasilan operasi katarak tanpa penyulit adalah sekitar 95%.^{15,20}

Operasi katarak pada pasien diabetes disarankan sebelum kekeruhan lensa menutupi detail gambaran funduskopi. Secara keseluruhan *outcome* operasi katarak adalah baik, namun pada pasien dengan diabetes mungkin bisa memiliki *outcome* tajam penglihatan yang lebih buruk dibandingkan dengan pasien nondiabetes. Operasi katarak dapat menyebabkan progresifitas retinopati lebih cepat, menginduksi rubeosis, atau memicu edema makula. *Outcome* yang paling buruk dapat terjadi pada mata dengan retinopati proliferasi aktif dan/atau *preexisting macular edema* mata yang dioperasi.^{15,20-24}

Pada diabetes dengan atau tanpa retinopati diabetik yang dilakukan operasi katarak, dimana terdapat gangguan *blood-aqueous barrier* dapat memicu peningkatan inflamasi dan terjadinya macular edema postoperasi. Faktor yang mempengaruhi inflamasi postoperatif dan insiden *cystoid macular edema* adalah lama operasi, lebar luka, atau adanya komplikasi seperti ruptur kapsul posterior atau *vitreous loss*. Liu et al. menunjukkan bahwa operasi katarak mempengaruhi *blood-aqueous barrier* lebih berat pada pasien diabetes dengan *proliferative diabetic retinopathy* (PDR) dibandingkan dengan *nonproliferative diabetic retinopathy* (NPDR) atau nondiabetes. Beberapa studi klinis juga telah menginvestigasi peran operasi katarak fakoemulsifikasi pada progresifitas retinopati diabetik. Satu tahun setelah operasi katarak, tingkat progresifitas retinopati diabetik berkisar antara 21-32%. Borrillo et al. melaporkan tingkat progresifitas sebesar 25% setelah periode *follow-up* 6 bulan.^{15,25-27}

Sebuah studi prospektif yang mengevaluasi onset atau perburukan dari edema makula pada 6 bulan paska operasi katarak pada pasien dengan NPDR ringan atau sedang dilaporkan sebesar 29% terdapat edema makula berdasarkan data angiografi. Krepler et al juga melaporkan bahwa terdapat progresifitas retinopati diabetik sebesar 12% pada mata yang dioperasi dibandingkan dengan mata yang tidak dioperasi (10.8%) dalam *follow-up* 12 bulan. Liao and Ku menemukan pada sebuah studi retrospektif pasien NPDR ringan-sedang yang menjalani operasi, 57.9% menunjukkan progresifitas retinopati diabetik dalam 1 tahun paska operasi, dan 63.2% memiliki progresifitas pada 3 tahun paska operasi. Tingkat progresifitas signifikan secara statistik jika dibandingkan pada mata tanpa retinopati preoperatif.¹⁵

Sebuah studi prospektif juga yang mengevaluasi mata pasien diabetes dengan dan tanpa retinopati diabetik yang menjalani operasi katarak, melaporkan bahwa insiden macular edema paska operasi katarak sebesar 42%, sementara macular edema tidak muncul pada mata tanpa retinopati. Perubahan minimal dari nilai *baseline* ketebalan makula diobservasi pada mata tanpa retinopati dan mata dengan NPDR sedang atau PDR mengalami peningkatan dari *baseline* sebesar 145 μm pada 1 bulan dan 131 μm pada 3 bulan paska operasi.^{15,28-30}

– **Aldose Reductase Inhibitor (ARI)**

Beberapa studi eksperimental mendukung peran ARI dalam mencegah dan menghambat pembentukan katarak diabetik. Studi pada tikus model diabetes, yang diberi perlakuan ARI Renirestat, dilaporkan terdapat penurunan akumulasi sorbitol pada lensa dibandingkan dengan yang tidak diberi perlakuan. Selain itu, tikus yang diberi perlakuan tidak terdapat kerusakan lensa seperti degenerasi, pembengkakan, atau hancurnya serat lensa selama periode perlakuan, kontras dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan.^{15,31}

ARI lainnya dengan efek yang bermanfaat untuk pencegahan katarak diabetika termasuk Alrestatin, Imrestat, Ponalrestat, Epalrestat, Zenarestat, Minalrestat, atau Lidorestat.^{15,32}

– **Terapi antioksidan**

Kerusakan oksidatif muncul secara tidak langsung sebagai hasil dari akumulasi polyol dalam pembentukan katarak diabetik, dan penggunaan agen antioksidan mungkin memberikan manfaat. Berbagai antioksidan telah dilaporkan

untuk menghambat pembentukan katarak pada hewan coba model diabetes, misalnya antioksidan *alpha lipoic acid*, yang telah terbukti efektif dalam mencegah dan menurunkan progresifitas katarak pada tikus model diabetes. Yoshida et al. juga membuktikan bahwa terapi kombinasi vitamin E dan insulin secara sinergis mencegah perkembangan dan progresifitas katarak pada tikus model diabetes.^{15,33}

Pemberian berbagai nutrisi dan antioksidan metabolik, seperti bioflavonoids, vitamin E, kafein, dan piruvat telah terbukti mencegah pembentukan katarak pada sebagian besar studi eksperimental hewan coba. Hipotesis juga didukung oleh studi yang menunjukkan bahwa insiden katarak lebih rendah berhubungan dengan konsumsi vitamin C dan E yang lebih tinggi.³⁴

2.3. Kecambah Brokoli

Kecambah brokoli adalah bentuk muda dari brokoli. Kecambah brokoli biasanya dipanen saat mereka berusia 3 – 5 hari dan sangat mirip alfalfa atau tauge. Brokoli sendiri adalah tanaman hijau yang dapat dimakan dan termasuk dalam keluarga kubis - kubisan yang memiliki bunga besar. Kata brokoli berasal dari plural Italia, *broccolo*, yang berarti "kubis dengan puncak bunga". Brokoli merupakan tanaman sayuran subtropik, cocok ditanam pada daerah pegunungan (dataran tinggi) yang beriklim sejuk.^{9,35-37}



Gambar 1. Tanaman Brokoli. Keterangan: A. Brokoli dewasa; B. Kecambah brokoli, bentuk muda dari brokoli, yaitu sekitar usia 3 – 5 hari. ^{38,39}

2.3.1. Morfologi

Tanaman brokoli merupakan tanaman yang tergolong perdu dengan sistem perakaran yang dapat mencapai kedalaman 60-70 cm, sehingga tanaman ini tumbuh dengan baik dan subur bila ditanam pada tanah berpori dan gembur. Brokoli memiliki batang yang berukuran pendek, bentuk bulat, berwarna hijau, tebal dan lunak. Pertulangan daun yang sejajar dan daun yang berbentuk bulat telur tersusun berseling pada batang merupakan ciri dari daun pada tanaman brokoli. Massa bunga (krop) merupakan kumpulan dari ratusan bunga – bunga

kecil yang bersatu membentuk rumpun yang rapat dan kompak. Buah pada tanaman brokoli berbentuk polong dengan ukuran 3-5 cm dan mengandung 10-30 benih pada setiap polongnya. Di dalam buah tanaman brokoli terdapat biji yang memiliki bentuk bulat kecil dan berwarna cokelat kehitaman.⁴⁰

Panen bunga brokoli dilakukan setelah umurnya mencapai 60-90 hari sejak ditanam, yaitu sebelum bunganya mekar dan sewaktu kropnya masih berwarna hijau. Jika bunganya mekar, tangkai bunga akan memanjang dan keluarlah kuntum-kuntum bunga berwarna kuning. Sedangkan kecambah brokoli adalah bentuk muda dari brokoli. Kecambah brokoli biasanya dipanen saat mereka berusia 3-5 hari dan sangat mirip alfalfa atau tauge.³⁷

2.3.2. Taksonomi

Taksonomi brokoli (*Brassica oleracea*), adalah sebagai berikut:³⁶

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*

Sub divisi : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledoneae*

Ordo : *Brassicales*

Suku : *Cruciferae / Brassicaceae*

Genus : *Brassica*

Species : *Brassica oleracea*

2.3.3. Kandungan

Tanaman brokoli memiliki berbagai kandungan seperti protein, lemak, karbohidrat, serat, mineral penting (N, K, Ca, Fe, selenium dan lain – lain), vitamin A, C, E, K, asam folat, tiamin, riboflavin, nikotinamid, glutation dan karotenoid (lutein). Brokoli juga mengandung metabolit sekunder yang penting termasuk glukosinolat dan senyawa fenolik (asam fenolik and flavonoid, termasuk gallic, chlorogenic, ferulic, asam sinapinat, benzoat, dan salisilat, quercetin, kaempferol, dan metabolit endogen lainnya).^{9,38,41-45}

Tabel 1. Profil Nutrisi Brokoli Mentah (100 g).⁴⁶

	Jumlah	DV		Jumlah	DV
Kalori	34		Vitamin C	89.2 mg	149 %
Total Lemak	0.4 g	1 %	Vitamin D	0.00 IU	0 %
Total Karbohidrat	6.66 g	2 %	Vitamin E	0.78 mg	3 %
Fiber	2.6 g	10 %	Tocopherol, alpha	0.78 mg	
Sugar	1.70 g		Tocopherol, beta	0.01 mg	
Protein	2.82 g	6 %	Tocopherol, delta	0.00 mg	
Vitamin			Tocopherol, gamma	0.17 mg	
Betaine	0.1 mg		Tocotrienol, alpha	0.04 mg	
Choline	18.7 mg		Tocotrienol, beta	0.00 mg	
Folate	63.00 mcg		Tocotrienol, delta	0.00 mg	
Folic acid	0.00 mcg		Tocotrienol, gamma	0.00 mg	
Niacin	0.639 mg	3 %	Vitamin K	101.6 mcg	127 %
Pantothenic acid	0.573 mg	6 %	Mineral		
Riboflavin	0.117 mg	7 %	Calcium, Ca	47.00 mg	5 %
Thiamin	0.071 mg	5 %	Copper, Cu	0.049 mg	2 %
Vitamin A	623.00 IU	12 %	Iron, Fe	0.73 mg	4 %
Vitamin A, RAE	31.00 mcg		Magnesium, Mg	21.00 mg	5 %
Carotene, alpha	25.00 mcg		Manganese, Mn	0.210 mg	10 %
Carotene, beta	361.00 mcg		Phosphorus, P	66.00 mg	7 %
Cryptoxanthin, beta	1.00 mcg		Potassium, K	316.00 mg	7 %
Lutein + zeaxanthin	1403.00 mcg		Selenium, Se	2.5 mcg	4 %
Lycopene	0.00 mcg		Sodium, Na	33.00 mg	1 %
Vitamin B12	0.00 mcg	0 %	Zinc, Zn	0.41 mg	3 %
Vitamin B6	0.175 mg	9 %	Kholesterol	0 mg	0 %

Keterangan:

g = gram; µg = microgram; mg = milligram; IU = International unit; DV (*Daily Value*) = nilai harian yang ditetapkan oleh Food and Drug Administration AS, berdasarkan diet 2.000 kalori.

Sedangkan pada kecambah brokoli sendiri kandungan vitamin atau nutrisi tertentu mungkin berbeda secara kuantitas, seperti misalnya kandungan vitamin A dimana kecambah brokoli hanya mengandung sekitar setengah vitamin A dan sepertiga vitamin C brokoli dewasa. Namun, kecambah brokoli adalah sumber vitamin K yang lebih baik, dengan hampir 38 mikrogram per 36 gram (*1/2 cup*), melebihi brokoli dewasa, yang mengandung hanya 0,4 mikrogram per setengah *cup*.⁴⁷

Glukosinolat dan Sulforafan

Glukosinolat adalah kelompok fitokimia yang secara eksklusif ada pada tanaman *Cruciferous*. Secara kimia, glukosinolat adalah β -thioglucoside *N*-hydroxysulphate. Terdapat hingga 120 glukosinolat yang berbeda telah teridentifikasi dengan struktur inti yang sama, namun berbeda dalam rantai sampingnya. Glukosinolat yang ditemukan di *Brassica spp.* ditunjukkan pada tabel 2.⁴⁸

Tabel 2. Glukosinolat yang terkandung dalam *Brassica spp.*⁴⁸

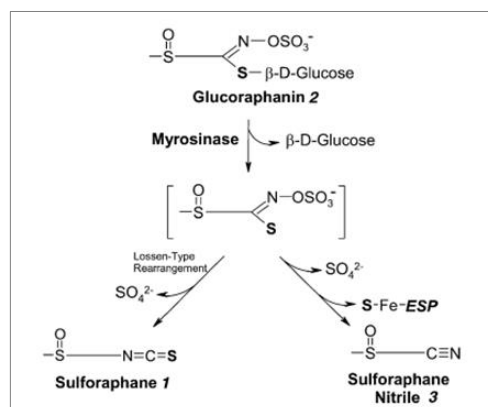
Kelas Kimia	Nama Kimia	Nama lain
Sulphur-containing GLS	4-Methylsulphinyl-3-butenyl	Glucoraphenin
	4-(Methylsulphinyl)butyl	Glucoraphanin
	5-(Methylsulphinyl)pentyl	Glucoalyssin
	3-(Methylsulphinyl)propyl	Glucoiberin
	4-(Methylthio)butyl	Glucoberteroiin
	5-(Methylthio)pentyl	Glucoberteroiin
Branched aliphatic GLS	3-(Methylthio)propyl	Glucoiberiverin
	1-Methylethyl	Glucoputranjivin, isopropyl
	2-Methylethyl	
	1-Methylpropyl	Glucochlearin, glucojiabutin, sec-butyl, 2-butyl
	3-Butenyl	Gluconapina
	2(R)-2-Hydroxy-3-butenyl	Progoitrina
Aliphatic olefins	2-Hydroxy-4-pentenyl	[Gluco]napoleiferin
	4-Pentenyl	Glucobrassicinapina
	1-Pentenyl	
	2-Propenyl	Allyl, sinigrin
	4-Hydroxybenzyl	[Gluco]sinabin
	2-Phenylethyl	Gluconasturtiina, phenethyl
Aromatic aryl GLS	Indol-3-ylmethyl	Glucobrassicina
	4-Hydroxy-3-indolylmethyl	4-Hydroxyglucobrassicina
	1-Methoxyindol-3-ylmethyl	Neoglucobrassicina
	4-Methoxyindol-3-ylmethyl	4-Methoxyglucobrassicina

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa potensi induksi enzim detoksifikasi fase 2 (seperti: *glutathione transferase*, *epoxide hydrolase*, *NAD(P)H: quinone reductase*, dan *glucuronosyltransferase*) dari ekstrak kecambah brokoli berkisar 10 hingga 100 kali dari brokoli dewasa. Aktivitas *inducer* timbul terutama dari *glucoraphanin* (glukosinolat sulforafan), dimana sulforafan merupakan antioksidan *long acting* yang sangat poten. Perbedaan kuantitatif potensi *inducer* kecambah brokoli dengan brokoli dewasa adalah terletak pada perbedaan profil glukosinolat yang terkandung. Glukosinolat utama yang terkandung pada brokoli dewasa, adalah *indole glucosinolate* (*glucobrassicin*, *neoglucobrassicin* dan *4-hydroxyglucobrassicin*) rata – rata sekitar 67% dari total glukosinolat. Sebaliknya, pada kecambah brokoli, kurang dari 10 % total glukosinolat adalah *indole glucosinolate* dan kandungan glukosinolat utamanya adalah *methylsulfinylalkyl glucosinolate* (*glucoraphanin*, *glucoerucin* dan *glucoiberin*). Kandungan total glukosinolat adalah sebesar 22,7 mmol untuk kecambah brokoli dan 3,37mmol untuk brokoli dewasa. Glukosinolat indol, hanya menyumbang 3% dari total glukosinolat dalam kecambah brokoli, dibandingkan dengan 68% dari mereka yang ada di tanaman dewasa. Ada 20 kali lebih banyak *methylsulfinylalkyl glucosinolates* dalam kecambah dibandingkan dengan brokoli dewasa. Brokoli dewasa 100 g memberi 108 mmol *methylsulfinylalkyl glucosinolate* dan 229 mmol *indole glucosinolate*, dimana jumlah *methylsulfinylalkyl glucosinolate* sesuai dengan konsumsi kecambah brokoli yang lebih sedikit (5 g) dan 11,2 mmol of *indole glucosinolate*.³⁵

Studi oleh Tian et al., 2017 menunjukkan bahwa kandungan sulforafan lebih tinggi pada kecambah brokoli usia 2–5 hari dibandingkan dengan kecambah pada usia lainnya, nilai maksimum diamati pada hari ke 5 (berat kering: 233,80 µg/g). Kecenderungan total aktivitas antioksidan adalah meningkat pada hari pertama dan kemudian menurun seiring dengan pertumbuhan.⁴⁹

Hasil serupa dilaporkan oleh Fahey et al., 1997 yang menemukan bahwa kecambah brokoli usia 3 hari mengandung jumlah sulforafan maksimal (20 kali lipat dibandingkan dengan brokoli matang). Penelitian sebelumnya oleh Pe'rez-Balibrea et al., 2008 telah menunjukkan bahwa kecambah brokoli menunjukkan penurunan produksi sulforafan selama 3-7 hari pertama. Guo et al., 2014 menunjukkan bahwa glucoraphanin dan pembentukan sulforafan juga menurun seiring dengan pertumbuhan kecambah.^{35, 50-51}

Sulforafan dan *isothiocyanate* lainnya disintesis dan disimpan pada tanaman dalam bentuk prekursor glukosinolat yang tidak aktif. Glukosinolat diubah menjadi *isothiocyanate* oleh β -thioglucosidase (*myrosinase*). Enzim ini dipisahkan secara fisik dari glukosinolat dalam sel tumbuhan namun dilepaskan saat sel-sel rusak, misalnya oleh karena serangan mikroba, dimakan serangga, pengolahan makanan secara mekanik, seperti mengunyah atau memasak makanan. Hidrolisis ini dapat juga dimediasi oleh mikroflora saluran cerna mamalia. Glukosinolat utama yang terkandung dalam brokoli adalah *glucoraphanin*, yang dihidrolisis oleh *myrosinase* menjadi sulforafan dan sulforafan nitril (nitril non-bioaktif analog). Untuk mencegah kerusakan tanaman itu sendiri, glukosinolat dan *myrosinase* disimpan dalam kompartemen sel yang berbeda dan datang bersamaan setelah kerusakan sel pertama. Itu berarti sebagian konversi glukosinolat sudah ada, sebelum zat ini mencapai saluran pencernaan. Dalam pengolahan saluran cerna lebih lanjut glukosinolat terjadi dengan *myrosinase* mikroflora.⁹



Gambar 2. Mekanisme Pembentukan Sulforafan. Glukosinolat dan *myrosinase* disimpan di kompartemen sel yang terpisah. Hancurnya sel, misalnya dengan mengunyah, memotong atau memasaknya, menyebabkan pelepasan glukosinolat dan *myrosinase*. *Myrosinase* menyebabkan pemecahan hidrolitik glukosinolat menjadi sulforafan dan sulforafan nitril.⁴⁹

Sulforafan nitril baru-baru ini telah ditunjukkan tidak memiliki sifat anti kanker seperti sulforafan. Mithen et al, 2003 melaporkan bahwa sekitar 80% dari glucoraphanin dihidrolisis menjadi sulforafan nitril dan hanya 20% dikonversi menjadi sulforafan.⁵²⁻⁵⁴

– Efek proses penyimpanan dan pengolahan

Sistem *glucosinolate-myrosinase* menunjukkan hasil yang bervariasi selama proses pengolahan dan proses memakan sayuran *brassica*. Konsentrasi glukosinolat dipengaruhi oleh suhu dan waktu penyimpanan, sementara pemotongan bisa memberikan efek yang bervariasi. Memasak *brassica* dengan berbagai metode dapat mempengaruhi konsentrasi glukosinolat, aktivitas *myrosinase* dan konsentrasi kofaktornya, serta mengubah proses pencernaan glukosinolat setelah dikonsumsi.⁵⁵

Pengujian terbaru menyatakan bahwa pada proses merebus kubis selama 10 menit dapat menghilangkan glukosinolat lebih dari 50%. Glukosinolat adalah senyawa yang larut dalam air yang bisa larut dalam proses pemasakan yang menggunakan air. Metode memasak yang menggunakan sedikit air, seperti mengukus, bisa mengurangi kehilangan glukosinolat. Namun, beberapa proses memasak, termasuk merebus, mengukus dan menggunakan *microwave* dengan daya tinggi (850-900W) dapat menonaktifkan *myrosinase*, enzim yang mengkatalisis hidrolisis glukosinolat. Beberapa studi pada manusia ditemukan bahwa inaktivasi *myrosinase* pada sayuran *cruciferous* menurunkan bioavailabilitas *isothiocyanate*.⁹

Investigasi tentang efek pembekuan pada glukosinolat masih sedikit. Perbedaan yang mencolok antara produk segar dan beku dilaporkan pada kubis, dimana kandungan rata-rata tiosianat dalam sampel segar hampir dua kali lipat daripada yang ditemukan pada sampel beku. Tidak jelas apakah kandungan tiosianat yang berkurang dalam keadaan beku adalah karena proses pembekuan atau lebih pada proses pemasakan sebelum pembekuan, yang telah merubah rute penghancuran hidrolitik oleh karena inaktivasi enzim.⁹

Namun pada penelitian oleh Guo et al, 2015 yang menginvestigasi efek pembekuan kecambah brokoli selama 48 jam. Kesimpulan dari penelitian ini didapatkan kadar *glucoraphanin* tidak signifikan terpengaruh oleh perlakuan pembekuan pada suhu -20°C dan -40°C. Namun perlakuan ini meningkatkan aktivitas *myrosinase* dan menurunkan kadar asam ascorbic. Peningkatan aktivitas *myrosinase* setelah pembekuan paralel dengan pembentukan sulforafan yang lebih banyak dan sulforafan nitril yang lebih sedikit. Selain itu, didapatkan hasil bahwa membekukan pada suhu -20°C mampu membentuk sulforafan yang lebih banyak dibandingkan pada suhu -40°C.⁵⁶

Namun pada penelitian sebelumnya yang mengamati efek pembekuan pada kecambah bokoli, menunjukkan hasil yang tidak signifikan pada perubahan kandungan glukoraphanin dalam kecambah brokoli, dimana glukoraphanin tidak dihidrolisis oleh *myrosinase*. Salah satu alasannya mungkin adalah bahwa kerusakan yang disebabkan oleh kristal es tidak cukup untuk membawa glukoraphanin kontak dengan *myrosinase* sehingga hidrolisis tidak terjadi. Alasan lain mungkin adalah bahwa kandungan kecambah tersebut hilang larut bersama proses mencairnya kristal es yang terbentuk, dan *myrosinase* tidak menunjukkan efek katalitik suhu -20°C dan -40°C. Penelitian oleh Brown et al., juga melaporkan bahwa jika jaringan tanaman tetap beku, glukosinolat stabil di jaringan tersebut.^{57,58}

Dalam satu studi oleh Rungapamestry et al, yang menginvestigasi penyerapan sulforafan setelah mengkonsumsi 150g brokoli yang dimasak ringan (*microwave* selama 2 menit) dibandingkan dengan yang dimasak sempurna (*microwave* selama 5,5 menit) pada dua belas sukarelawan manusia, didapatkan hasil bahwa hidrolisis *glucoraphanin* menjadi sulforafan dan penyerapan sulforafan ditemukan tiga kali lebih tinggi setelah konsumsi brokoli yang dimasak ringan daripada brokoli matang sempurna ($p < 0,001$). Aktivitas *myrosinase* ditemukan empat kali lebih tinggi pada brokoli yang dimasak ringan daripada

brokoli matang sempurna ($p < 0,001$), hal ini menjelaskan bahwa total sulforafan yang dihasilkan lebih tinggi pada kelompok brokoli yang dimasak ringan dibandingkan yang dimasak sempurna.⁵⁹

Proses memasak ringan dapat melestarikan aktivitas *myrosinase*, sehingga menghasilkan konversi hampir 100% ke sulforafan. Sedangkan proses pemasakan yang lebih lanjut dapat mendenaturasi *myrosinase*, dan glukosinolat utuh tertelan. Namun, ini dapat dikonversi menjadi sulforafan di usus besar dengan aktivitas *thioglucosidase* mikroba.⁶⁰

– Farmakokinetik

Secara singkat, setelah glukosinolat dikonversi menjadi isothiocyanate, baik oleh *myrosinase* endogen atau thioglucosidas dalam usus, mereka cepat diserap dan diubah menjadi konjugat larut air, diubah melalui jalur asam merkapturic, dan diekskresikan dalam urin. Tempat penyerapan glukosinolat dan/atau *isothiocyanate* tergantung pada bentuk yang dikonsumsi, serta apakah mereka dikonsumsi dengan *myrosinase*. Jika glukosinolat telah diubah menjadi *isothiocyanate*, mereka cenderung melewati lambung dan diserap di usus kecil. Namun, jika glukosinolat belum diubah, mereka akan lolos ke usus besar dan, sampai taraf tertentu, dihidrolisis menjadi *isothiocyanate* oleh mikroflora usus dan diserap di usus besar.⁶¹⁻⁶³

Studi-studi hewan oleh Brüsewitz et al, 1977 dan Görler et al, 1982 menunjukkan bahwa, setelah penyerapan, metabolisme *isothiocyanate* diprakarsai oleh konjugasi ke glutathione, diikuti oleh konversi berurutan untuk konjugat *cysteinylglycine*, *cysteine*, dan *N-acetylcysteine*. Jalur yang identik telah diamati pada manusia oleh Gasper et al, 2005. Konjugat dapat berfungsi sebagai "kendaraan" untuk mengangkut isothiocyanate melalui sirkulasi. Telah dilaporkan bahwa beberapa konjugat *isothiocyanate* memiliki aktivitas biologis sendiri.⁶³⁻⁶⁸

Puncak total metabolit *isothiocyanate* dalam plasma adalah antara 0-8 jam, sedangkan ekskresi urin puncak total *isothiocyanate* dan SFN-NAC (*sulforaphane-N-acetylcysteine*) antara 2 – 12 jam. Ekskresi *isothiocyanate* dan metabolitnya terutama terjadi melalui urin. Namun, jumlah kecil dapat dikeluarkan melalui jalur feses dan pernapasan. Pada manusia, sulforafan dan metabolitnya diekskresikan dengan *first-order kinetic* dan sebagian besar data mengindikasikan bahwa sulforafan dan metabolitnya dibersihkan dari tubuh dalam 72 jam per dosis.⁶⁹⁻⁷²

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa ketika sayuran *cruciferous* dikonsumsi dengan *myrosinase* aktif, penyerapan, metabolisme, dan ekskresi metabolit *isothiocyanate* terjadi sangat cepat, dan dikaitkan dengan peningkatan tajam, dan penurunan berikutnya, dalam tingkat *isothiocyanate* plasma. Sebaliknya, jika glukosinolat utuh dikonsumsi tanpa *myrosinase*, mereka tidak diserap sampai hidrolisis di usus besar. Akibatnya, metabolit *isothiocyanate* membutuhkan waktu lebih lama untuk muncul dalam plasma, dan mereka hadir pada konsentrasi yang lebih rendah untuk periode waktu yang lebih lama.^{73,74}

– Konsentrasi aktif farmakologi

Berbagai target dan mekanisme kemoprevensi yang dimediasi *isothiocyanate* memerlukan konsentrasi fisiologis yang relatif tinggi, seperti induksi apoptosis, yang dapat dicapai setelah pemberian dosis *isothiocyanate* yang tinggi. Namun, target lain, seperti induksi enzim fase II, dapat merespon dengan baik dengan dosis lebih rendah.^{73,74}

Kecambah brokoli adalah sumber sulforafan terbaik sejauh ini. Konsentrasi sulforafan, yang menghambat pertumbuhan *human cancer xenograft* pada tikus adalah 4,4 mg/kg per hari. Penelitian lain, pada tikus suplementasi 0,1 – 0,5 mg/kg sulforafan telah dinyatakan bioaktif. Jumlah sulforafan sulit dijangkau oleh asupan brokoli sendiri, karena enam kepala brokoli utuh dan mentah harus dimakan tiap hari, sesuai dengan 55 mg *glucoraphanin* yang ada pada rata – rata 500 g brokoli standar. Jauh lebih efisien adalah asupan *glucoraphanin* pada kecambah brokoli, yang mengandung sekitar 20 – 100 kali lebih banyak *glucoraphanin* daripada kepala brokoli dewasa. Jadi, satu sendok teh kecambah brokoli bisa mengandung *glucoraphanin* sebanyak pada kepala brokoli.^{9,75,76}

Namun dosis aktif terapeutik sulforafan belum ditentukan pada studi – studi klinis sejauh ini dan dosis aktif pada tikus belum tentu bisa disamakan dengan dosis aktif pada manusia. Dalam menghitung jumlah sulforafan yang berdasarkan dari nutrisi, harus dipertimbangkan, bahwa hanya sekitar 20% *glucoraphanin* yang bioavailable dan diubah menjadi sulforafan di dalam tubuh. Konversi *glucoraphanin* dapat ditingkatkan dengan mengunyah sayuran dengan baik untuk memastikan pelepasan *myrosinase* dan menghindari merebus sayuran dimana akan menginaktivasi *myrosinase*.⁹

- **Keamanan dan toleransi glukosinolat pada manusia dan hewan**

Sebuah studi tahap 1 yang dilakukan oleh Murashima et al. meneliti efek dari kecambah brokoli pada induksi berbagai biokimia marker stres oksidatif. Dua belas subyek sehat mengkonsumsi 100 g kecambah brokoli segar (= 600 μmol glukosinolat = 440 μmol *glucoraphanin*) setiap hari selama satu minggu, dan menjaga gaya hidup. Studi ini menunjukkan peningkatan metabolisme kolesterol dan pengurangan beberapa biomarker oksidatif oleh asupan kecambah brokoli tanpa efek samping.⁹

Studi lain yang dilakukan pada tikus yang mengevaluasi keamanan dosis *glucoraphanin* yang tinggi. Tikus diberi dosis *glucoraphanin* yang berbeda sampai 240 mg/kg (sesuai dengan 550 $\mu\text{mol/kg}$) dengan lavage setiap hari selama empat hari. Pemeriksaan histopatologis menunjukkan tidak ada jaringan abnormal kecuali sekum, dimana radang ringan terjadi pada 120 mg/kg dan radang berat pada 240 mg/kg. Oleh karena itu, penulis menyimpulkan konsentrasi *glucoraphanin* hingga 60 mg/kg adalah aman.⁹

- **Peran sulforafan pada stres oksidatif**

Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa sulforafan dapat memberikan perlindungan melawan stres oksidatif. Sulforafan merupakan *inducer* paling ampuh dari enzim detoksifikasi fase 2 yang telah diidentifikasi sampai saat ini dan dianggap berperan melalui aktivasi faktor transkripsi Nrf2 dan *antioxidant response element* (ARE).⁷⁷

Sistem Nrf2-Keap1 dikenal sebagai salah satu pertahanan seluler utama mekanisme perlawanan terhadap stress oksidatif. Nrf2 adalah *vital nuclear transcriptional inducer*, yang mengikat ARE pada promotor DNA dan mengontrol transkripsi beberapa gen antioksidan, termasuk *glutathione* (GSH), *glutathione-S-transferase* (GST), *glutathione reductase* (GR), *thioredoxin* (Trx), *thioredoxin reductase* (TrxR), dan katalase. Diatur oleh protein kinase RNA - seperti retikulum kinase endoplasma (PERK), MAPK, protein kinase C, *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K), dan lain-lain, Nrf2 berfungsi sebagai saklar molekuler yang menghidupkan/mematikan *Nrf2-mediated antioxidant system*. Keap1 berfungsi sebagai sensor stress oksidatif dan penghambat Nrf2 utama. Demetilasi DNA pada promotor Keap1 akhirnya mengganggu perlindungan *Nrf2/Keap1-dependent antioxidant*. Keap1 terus menargetkan Nrf2 untuk ubiquitinasi dan selanjutnya

terjadi degradasi proteasomal 26S, mempertahankan Nrf2 pada kadar rendah/basal.⁸

Dalam kondisi normal, lokasi Nrf2 terbatas pada sitoplasma dengan terikat dengan Keap1 dalam bentuk kompleks Nrf2/Keap1. Sedangkan dalam kondisi stress, seperti stres oksidatif atau retikulum endoplasma (ER), Nrf2 fosforilasi, memisahkan dari Keap1, dan translokasi ke dalam nukleus, kemudian menginduksi gen antioksidan yang dikendalikan ARE transkripsi, yang memulai detoksifikasi ROS melalui peraturan GSH.⁸

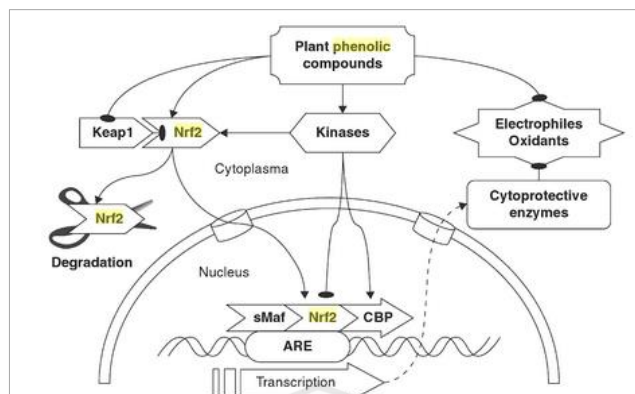
Stres ER berat atau berkepanjangan mengaktifasi *unfolded protein response* (UPR), meningkatkan pelepasan retikulum endoplasma (ER)-Ca²⁺, pembentukan ROS, dan demetilasi Keap1 DNA promoter, menyebabkan kematian sel. ROS yang berlebihan juga menghambat sistem *Nrf2-dependent antioxidant* melalui akselerasi degradasi enzim metilasi DNA, memicu demetilasi DNA pada promotor Keap1 dan ekspresi berlebih dari Keap1, yang meningkatkan degradasi protease Nrf2.⁸

Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik banyak terdapat pada berbagai sumber makanan, seperti buah-buahan, sayuran, biji-bijian dan minuman. Senyawa fenolik adalah metabolit sekunder pada tumbuhan dengan cincin aromatik umum yang mengandung satu atau lebih kelompok hidroksil. Lebih dari 8000 senyawa fenolik alami telah diidentifikasi hingga saat ini. Senyawa fenolik yang diisolasi dari sumber tanaman termasuk fenol sederhana, flavonoid, lignin dan lignan, tanin, xanthone, dan coumarin. Senyawa fenolik ini diketahui menunjukkan aktivitas anti kanker yang kuat juga sebagai perlawanan berbagai penyakit yang terkait dengan stress oksidatif. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa efek menguntungkan dari fenol pada makanan bagi kesehatan adalah kemampuan mereka sebagai antioksidan, antiinflamasi dan aktivitas antiklastogenik.⁷⁸

Senyawa fenolik secara *in vitro* menunjukkan kemoprotektif dan sifat antioksidan yang superior. Komponen fenolik tanaman dapat secara langsung berfungsi sebagai antioksidan untuk mengambil elektrofil dan oksidan. Lebih penting lagi, senyawa fenolik meregulasi ekspresi enzim sitoprotektif melalui modulasi Nrf2/ARE signalling pada level yang bertingkat. Komponen fenolik pada tanaman dapat secara langsung memodifikasi keap 1 atau Nrf2, memicu stabilisasi dan translokasi Nrf2. Berbagai kinase dapat dimodulasi oleh senyawa fenolik

tanaman, kemudian memfosforilasi Nrf2 atau koaktivaktor untuk meregulasi stabilitas, lokalisasi dan transaktivasi Nrf2.⁷⁸



Gambar 3. Fungsi sitoprotektif senyawa fenolik pada tanaman. Aktivitas antioksidan langsung dan modulasi enzim sitoprotektif melalui Nrf2/ARE signalling.⁷⁸

Heimler, et al., membandingkan fenolat utama dalam beberapa tanaman *B. oleracea* dan melaporkan bahwa varietas brokoli dan kale menunjukkan kandungan tertinggi dari total fenolik dan flavonoid. Pada studi oleh Lopez et al., yang membandingkan komposisi senyawa biokimia yang ada pada brokoli pada tahap usia yang berbeda. Pada penelitian ini didapatkan bahwa kandungan kandungan polifenol ditemukan yang signifikan meningkat ($P \leq 0,05$) antara biji dan kecambah brokoli pada usia 3, 5, 8 dan 11 hari. Pada biji brokoli menunjukkan kandungan dengan konsentrasi yang sedikit dan konsentrasi tertinggi ditemukan di kecambah usia 11 hari. Kecambah brokoli meningkat pada kandungan polifenol dalam proporsi 47%, 100%, dan 115% pada kecambah usia 5, 8 dan 11 hari, masing-masing mengacu pada kecambah usia 3 hari. Hasil sebelumnya serupa dilaporkan oleh Fernandez-Orozco et al., yaitu dengan peningkatan kandungan polifenol pada kecambah brokoli yang lebih tua. Sedangkan untuk kandungan flavonoid total dari kecambah brokoli meningkat secara signifikan dengan waktu germinasi, kecambah usia 11 hari meningkat di atas 55% dengan mengacu pada kecambah usia 3 hari. Hasil ini serupa dengan yang dilaporkan oleh Perez-Balibrea et al.⁷⁹⁻⁸²

2.3.4. Manfaat

Brokoli mengandung sedikit lemak, rendah energi, dan merupakan sumber vitamin, mineral, dan serat - semua aspek terkait dengan perlindungan kanker. Mereka juga mengandung sejumlah besar fitokimia, beberapa di antaranya melindungi terhadap karsinogenesis dalam berbagai sistem pengujian invitro dan

hewan. Penelitian *in vitro* dan *in vivo* telah melaporkan bahwa *isothiocyanate* yang terkandung di dalam brokoli menghambat pertumbuhan kanker, termasuk modulasi enzim detoksifikasi fase 1 dan 2. Mereka berfungsi sebagai antioksidan langsung atau sebagai antioksidan tidak langsung.^{47,48,83}

Kecambah brokoli juga berperan sebagai antiinflamasi, melalui kandungan flavonoid (kaempferol) yang mempunyai manfaat antiinflamasi. Kecambah brokoli juga kaya akan serat. Hal ini tidak hanya menunjang saluran cerna, tetapi juga membantu meningkatkan kadar kolesterol sehat. Sebuah studi pilot dari *Tokyo University of Agriculture & technology* pada efek kolesterol pada orang yang mengonsumsi kecambah brokoli, menunjukkan adanya penurunan kolesterol jahat dan peningkatan HDL hanya dalam 1 minggu. Kecambah brokoli juga meningkatkan kesehatan sistem kardiovaskular. Sulforafan yang menginduksi enzim fase 2 meningkatkan kesehatan kardiovaskular dengan menurunkan inflamasi dan memperbaiki fungsi jantung, arteri, dan ginjal.^{48,84}

Manfaat kecambah brokoli pada penderita diabetes terutama adalah peran dari sulforafan dengan mengurangi produksi glukosa, sebagian melalui translokasi NRF2 dan penurunan ekspresi enzim penting pada glukoneogenetik, serta sulforafan juga melindungi terhadap komplikasi diabetes pada hewan model karena efek antioksidannya.⁸⁵

Stres oksidatif dan inflamasi berperan pada patogenesis gangguan kognitif schizophrenia. Sulforafan mungkin memiliki efek profilaksis dan terapeutik pada gangguan kognitif schizophrenia. Kecambah brokoli juga telah ditemukan dapat membantu pasien autisme. Hal ini oleh karena aktivitas antioksidan yang kuat pada kecambah brokoli ini, yang mana membantu dalam perkembangan normal otak.^{86,87}

Penelitian oleh Fahey, et al menginvestigasi peran sulforafan yang memiliki aktivitas bakteriostatik terhadap *Helicobacter pylori* serta efeknya pada tumor lambung. Hasil penelitian ditemukan bahwa sulforafan, adalah agen bakteriostatik yang potensial terhadap 3 strain referensi dan 45 isolat klinis *H. pylori*, terlepas dari resistensi mereka terhadap antibiotik konvensional. Selanjutnya, paparan singkat terhadap sulforafan bersifat bakterisidal, dan menghilangkan *H. pylori* intraseluler pada *human epithelial cell line*.⁸⁸

Manfaatnya untuk kulit, pada studi *invitro* menunjukkan bahwa kecambah brokoli memiliki efek menghambat *tyrosinase* (enzim yang mengontrol produksi

melanin). Penelitian lebih lanjut, ekstrak kecambah brokoli juga menunjukkan efek penghambatan terhadap produksi melanin pada sel melanoma B16.⁸⁹

Manfaatnya pada beberapa penyakit mata juga telah dibuktikan pada beberapa penelitian, contohnya efek pemberian sulforafan sistemik pada tikus model retinitis pigmentosa, dimana didapatkan hasil bahwa sulforafan sistemik secara signifikan mengupregulasi Trx, TrxR, dan Nrf2 di tingkat retina, dan efektif melindungi sel fotoreseptor. Induksi respon fase 2 oleh sulforafan ditemukan memberikan perlindungan sel epitel pigmen retina terhadap kerusakan fotooksidatif dan gangguan penglihatan akibat *age-related macular degeneration*.⁹⁰

Manfaat sulforafan pada katarak juga telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya. Penelitian oleh Liu et al, 2013 yang menginvestigasi efek sulforafan dalam menghambat onset katarak menggunakan sel line epitelial lensa manusia dan kultur lensa babi, menunjukkan bahwa pemberian sulforafan pada konsentrasi rendah (1 μ M dan 2 μ M) menunjukkan kemampuan melindungi sel lensa manusia terhadap stress oksidatif yang berpotensi menghambat onset katarak melalui signaling Nrf2, dimana Nrf2 translokasi ke nukleus pada pemberian sulforafan 0,5 – 2,0 μ M.⁷³

2.4. Streptozotocin-Induced Diabetic pada Tikus Model

Streptozotocin (STZ) pertama kali diisolasi dari *Streptomyces achromogenes* pada tahun 1960, dan fungsinya sebagai diabetogenik pertama kali diperkenalkan tahun 1963. Kemudian selanjutnya dikemukakan oleh Junod et al. pada tahun 1969, dimana efek diabetogenik diakibatkan oleh karena destruksi selektif sel β pankreas yang memproduksi insulin. Sehingga hewan mengalami defisiensi insulin, hiperglikemia, polydipsia, dan polyuria, yang merupakan ciri khas dari *human type 1 diabetes mellitus* (T1DM). Hewan T1DM dapat berkembang dengan komplikasi diabetes, seperti neuropati diabetik, nefropati diabetik, dan atherosklerosis diabetik.⁹¹⁻⁹⁴

Diabetes pada manusia dapat menginduksi komplikasi kronis seperti kerusakan kardiovaskular, katarak dan retinopati, nefropati dan polineuropati. Tikus diabetes STZ kronis sebagian besar mirip, tetapi tidak semua komplikasi kronis dapat diamati pada manusia diabetes. Tikus diabetes STZ kronis dapat menjadi model untuk menguji pendekatan terapeutik guna memperbaiki komplikasi diabetes kronis pada manusia.⁹²

Pengobatan STZ dengan cepat menghasilkan tanda-tanda khas diabetes seperti peningkatan asupan air dan makanan, kegagalan penambahan berat badan dan meningkatnya konsentrasi glukosa darah; perubahan ini dipertahankan selama 24 minggu pengamatan. Seperti pada manusia, diabetes yang tidak diobati pada tikus meningkatkan kematian karena hanya 52% tikus diabetes yang diinduksi STZ selamat dari diabetes 24 minggu.⁹²

Beberapa spesies hewan, termasuk tikus, kelinci dan kera sensitif terhadap efek sitotoksik STZ ke sel β pankreas. Saat ini STZ sering digunakan untuk menginduksi tikus model diabetes. Terdapat 2 protokol dasar induksi hewan model diabetes. Protokol dasar 1 adalah memberikan STZ dengan dosis rendah secara berulang untuk menginduksi diabetes. Kemudian yang kedua adalah memberikan STZ dengan dosis tinggi sekali. Sebagian prosedur yang sering digunakan adalah menggunakan dosis STZ 40 hingga 70 mg/kg. Banyak peneliti menggunakan *single dose* dengan dosis sekitar 65 mg/kg untuk membuat diabetes. STZ dosis 50 – 65 mg/kg dapat menyebabkan hiperglikemia (20 – 30 mM) tetapi tidak menjadi ketosis berat bahkan jika insulin tidak diberikan. Dosis yang lebih tinggi (≥ 75 mg/kg) menghasilkan ketosis spontan dan kematian dalam beberapa hari jika insulin tidak diberikan. Sebagian besar penelitian menggunakan tikus model diabetes yang diinduksi STZ selama 4 – 6 minggu, kadang-kadang 8 minggu. Namun, beberapa penelitian telah memperpanjang periode pengukuran mereka hingga 24 minggu yang diperlukan untuk mempelajari mekanisme komplikasi kronis diabetes seperti neuropati, retinopati dan nefropati.^{91,92}

Untuk stabilitas dari streptozotocin sendiri, STZ harus disimpan pada suhu -20°C untuk menghindari dehisasi (kekeringan). Kemudian setelah ditimbang, tabung mikrosentrifus yang berisi sampel STZ harus ditutup dengan aluminium foil untuk melindunginya dari cahaya. Karena STZ tidak stabil dalam larutan, bahkan pada pH asam, sehingga larutan STZ harus disiapkan segar dan disuntikkan dalam 5 menit setelah melarutkan karena STZ dapat terurai dalam sitrat buffer dalam 15 hingga 20 menit.⁹¹

Namun beberapa hewan dapat mati dengan cepat setelah perlakuan STZ karena sel β pankreas mengalami nekrosis yang luas dan pelepasan insulin secara tiba-tiba yang berakibat fatal pada keadaan hipoglikemia dan biasanya dalam 48 jam injeksi STZ. Untuk mencegah hal ini, yang terbaik adalah secara rutin berikan hewan dengan air sukrosa 10% setelahnya. Jika jumlah kematian hewan $> 20\%$ ketika menggunakan dosis tunggal, maka beri penatalaksanaan hewan dengan 1

ml larutan glukosa 5% intra peritoneal 6 jam sesudah injeksi STZ atau memberikan air sukrosa 10% selama 2 hari setelah injeksi STZ.^{91,95}

Pada protokol pembuatan tikus model diabetes dengan induksi STZ dengan dosis tunggal 65 mg/kg yang diamati selama 120 hari, didapatkan kondisi hiperglikemia yang mulai dapat diamati stabil sejak hari kedua hingga 120 hari dengan kadar glukosa darah puasa diatas 250 mg/dL.⁹¹

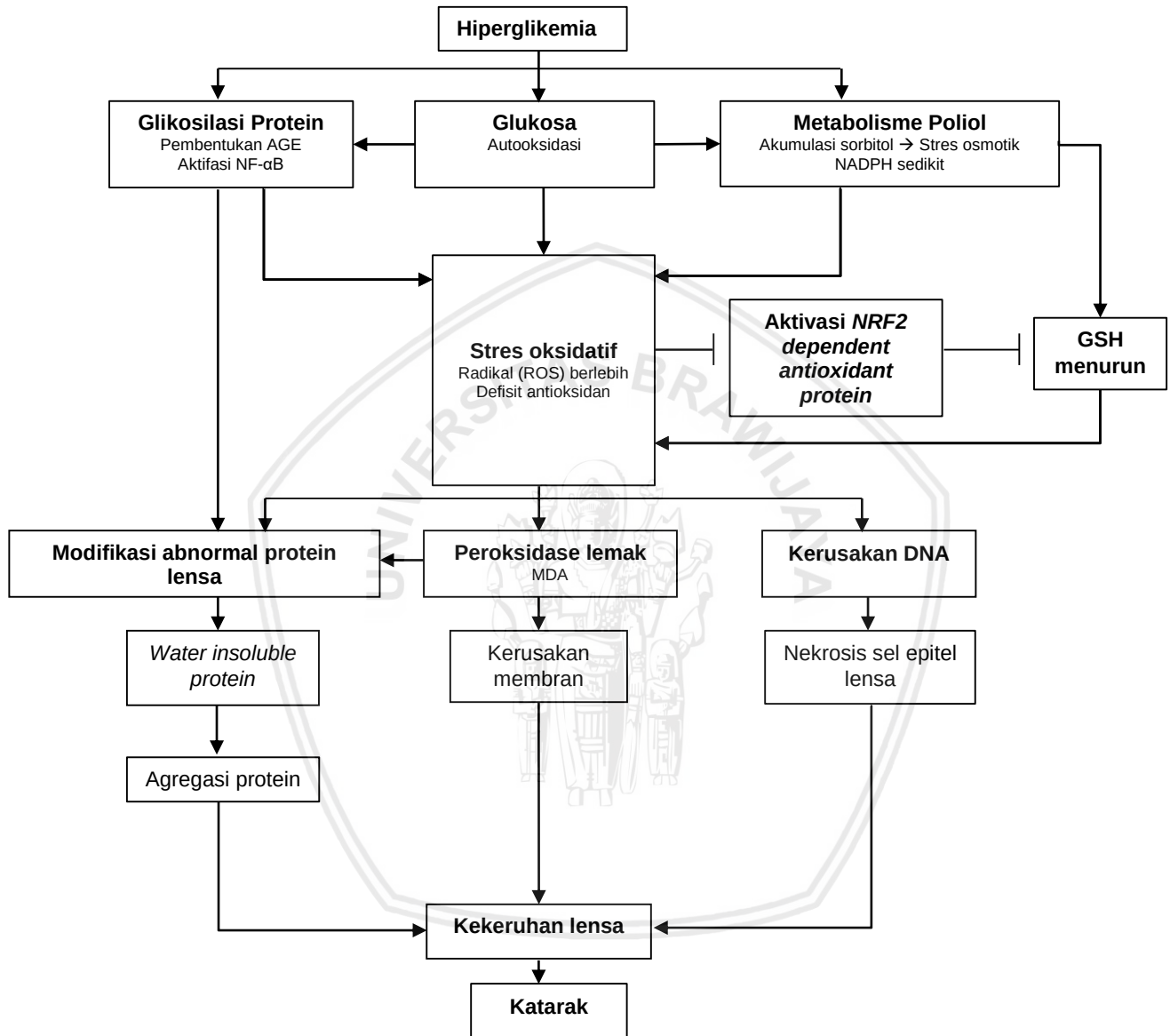
Hasil pengukuran kadar glukosa darah puasa dan acak sangat berbeda. Kadar glukosa darah dalam keadaan puasa lebih rendah dan kurang variabel daripada kadar glukosa darah acak. Tidak ada tingkat hiperglikemia standar untuk tikus. Namun, ada dasar umum yang digunakan, yaitu: menggunakan pendekatan membandingkan tes kadar glukosa darah pada kontrol dan kelompok perlakuan STZ dalam eksperimen yang sama; dan hiperglikemia didefinisikan sebagai kadar glukosa darah dalam kelompok perlakuan STZ jauh lebih tinggi dibanding di kelompok kontrol. Secara umum, kadar glukosa darah acak dalam kelompok perlakuan STZ dikatakan hiperglikemia harus diatas 200 mg/dl (11,1 mmol/liter), sedangkan untuk puasa hewan diabetes glukosa darah harus diatas 150 mg/dl (glukosa 18 mg/dl = 1 mM). Yang paling penting adalah bahwa harus ada perbedaan yang signifikan secara statistik antara kelompok STZ dan kontrol. Biasanya, pada 3 minggu setelah injeksi STZ, lebih dari 50% hewan mengalami hiperglikemia berat, dengan kadar glukosa darah mencapai 300 sampai 600 mg/dL. Jika penelitian melibatkan kondisi kronis atau komplikasi diabetes (misalnya, aterosklerosis yang diinduksi STZ), dosis kedua suntikan STZ diperlukan pada minggu ke 7 untuk memastikan kondisi diabetes.^{91,96}

Pada penelitian oleh Wei et al yang mengamati beberapa komplikasi kronis yang timbul akibat perlakuan STZ 65 mg/kg pada tikus Wistar jantan usia 8 minggu. Komplikasi katarak bilateral berkembang lebih awal, dengan perubahan lensa dalam bentuk kekeruhan dibagian posterior yang diamati pada 4 minggu pada tikus yang diberi STZ. Perkembangan katarak bersifat progresif dengan katarak yang parah dengan kebutaan yang diduga di semua mata 16 minggu paska perawatan.⁹⁷

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA

3.1. Kerangka Teori

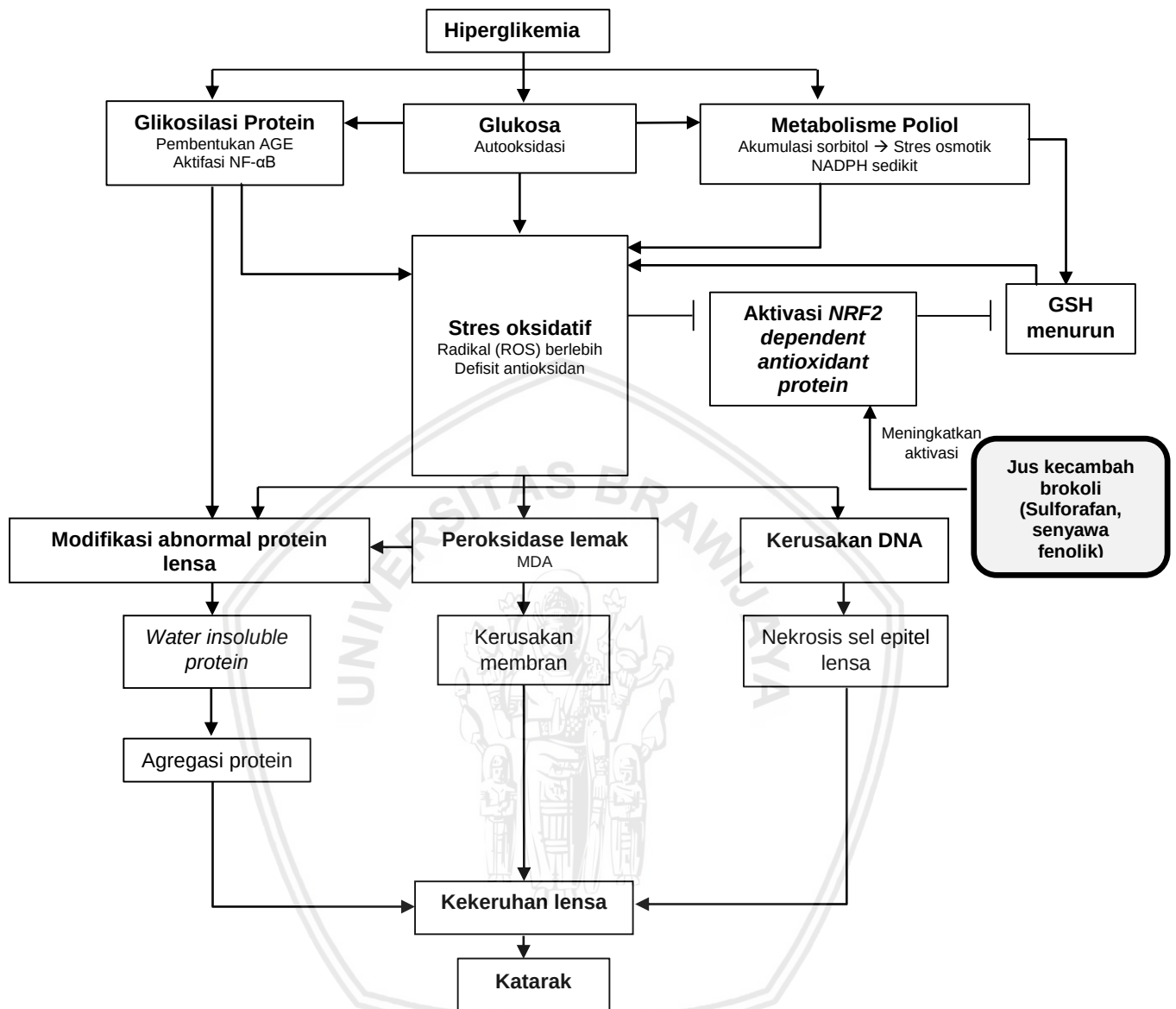


Keterangan:

→ : memicu

—| : menghambat

3.2. Kerangka Konsep



Keterangan:

→ : memicu

—| : menghambat

3.3. Hipotesis Penelitian

Asupan jus kecambah brokoli dapat mencegah agregasi protein lensa tikus model diabetes.



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true eksperimental* menggunakan model *in vivo*.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli - Oktober 2018.

4.3. Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian pada percobaan ini adalah tikus jantan *Rattus novergicus strain Wistar* yang dibagi kedalam 5 kelompok, yaitu:

- Kelompok kontrol negatif: kelompok tikus yang hanya memperoleh injeksi *sodium citrate buffer*
- Kelompok kontrol positif: kelompok tikus yang telah dibuat diabetes mellitus yang tidak mendapatkan paparan jus kecambah brokoli
- Kelompok perlakuan 1 (P1): kelompok tikus yang telah dibuat diabetes mellitus dengan paparan jus kecambah brokoli dosis 0,25 gram/hari
- Kelompok perlakuan 2 (P2): kelompok tikus yang telah dibuat diabetes mellitus dengan paparan jus kecambah brokoli dosis 0,5 gram/hari
- Kelompok perlakuan 3 (P3): kelompok tikus yang telah dibuat diabetes mellitus dengan paparan jus kecambah brokoli dosis 1 gram/hari

4.3.1. Kriteria Inklusi

- Tikus jantan *Rattus novergicus strain Wistar*, usia enam minggu, dengan berat badan 200 ± 15 g
- Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, mata jernih dan tidak katarak, dan memiliki bulu yang berwarna putih mengkilap dan tebal

4.3.2. Kriteria Eksklusi

- Mati selama penelitian
- Infeksi dan peradangan pada mata selama perlakuan

4.3.3. Penentuan Besar Dosis

Jus kecambah brokoli yang diberikan ditentukan berdasarkan “*dose doubling design*”, yaitu 0,25, 0,5 gram, dan 1 gram.

Dosis	Dosis (gram)
D	0,25
2 x D	0,5
4 x D	1

4.4. Definisi Operasional

1. Tikus model diabetes adalah tikus jantan *Rattus novergicus* strain Wistar yang diperoleh dari yang diperoleh dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang yang yang diinjeksi dengan *streptozotocin single dose* (STZ 65 mg/kg, yang dilarutkan dalam 0,1 M buffer sitrat, pH 4.5) yang mencapai konsentrasi glukosa darah puasa > 150 mg/dL setelah 72 jam post injeksi STZ.
2. Jus kecambah brokoli adalah kecambah brokoli (*Brassica oleracea L. botrytis Var.*) usia 3 hari yang dijus memakai alat *blender juice*.
3. Derajat katarak adalah kekeruhan lensa yang dilihat menggunakan slitlamp biomokroskopi Topcon DC3 perbesaran 25x dengan pupil lebar, digolongkan menurut klasifikasi kekeruhan lensa sebagai berikut: lensa normal jernih (derajat 0); vesikel di perifer (derajat 1); vesikel di perifer dan kekeruhan kortikal (derajat 2); kekeruhan sentral difus (derajat 3); dan katarak matur/keruh rata (derajat 4).
4. Ekspresi αB -crystallin lensa adalah nilai kuantifikasi intensitas pita pada protein target (αB -crystallin) yang muncul pada *Western blot* di kisaran berat molekul 20kDa sebagai αB -crystallin *native* lensa dan di kisaran berat molekul 45kDa αB -crystallin agregasi lensa. Nilai kuantifikasi pita berupa persentase yang didapatkan melalui penghitungan menggunakan *software* (ImageLab 5.0 Biorad).
5. Dosis jus kecambah brokoli adalah jus kecambah brokoli dengan 3 macam dosis, yaitu 0,25 gram/hari, 0,5 gram/hari, dan 1 gram/hari, yang masing – masing diberikan sekali sehari.

4.5. Perkiraan Replikasi

Berdasarkan rancangan penelitian eksperimental, maka perhitungan jumlah replikasi adalah sebagai berikut :

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

Dimana t adalah banyaknya kelompok penelitian dan r adalah jumlah replikasi. Pada penelitian ini terdapat kelompok penelitian (t) = 5 maka diperlukan jumlah replikasi (r) pada tiap kelompok = 5. Dengan demikian jumlah subyek penelitian yang diperlukan pada penelitian ini sebanyak 25 tikus.

4.6. Variabel Penelitian

4.6.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis jus kecambah brokoli dalam tiga dosis. Skala yang digunakan adalah skala ordinal.

4.6.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah derajat katarak (kekeruhan lensa), ekspresi αB -crystallin lensa tikus.

4.6.3. Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah jenis kelamin tikus (jantan), usia tikus (6 minggu), berat badan tikus (200 ± 15 gram), waktu pengujian (lama pemberian jus kecambah brokoli), faktor lingkungan laboratorium, dan diet.

4.7. Alat dan Bahan Penelitian

- Blood glucose test meter (Nesco MultiCheck)
- Slitlamp biomikroskop (Topcon DC3)
- Alat pemeliharaan hewan coba: kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, kawat kasam dan sekam
- Neraca Ohaus
- Alat pengembangbiakan kecambah brokoli dan pembuatan jus kecambah brokoli: wadah dengan lubang di bagian tutupnya, *blender juice*, wadah plastik tertutup, timbangan, spuit 10 cc
- Spuit yang pada ujungnya dipasang sonde

- Sduit 1 cc
- Homogenizer
- Sentrifuge
- Tetra Cell Protein (BioRad)
- Semidry Transblot (BioRad)
- Nanodropspektrofotometer (ND-1000)
- Chemidoc Gel Imaging (BioRad)
- Tikus jantan *Rattus novergicus* strain Wistar, usia enam minggu sesuai dengan kriteria inklusi yang diperoleh dari Laboratorium Biosains Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- Bahan makanan dan minuman hewan coba: makanan ternak berupa pellet, air PDAM
- *Streptozocin* (Roche diagnostic, Germany)
- *Ketamine hydrochloride*
- Benih kecambah brokoli (*Brassica oleracea L. botrytis* Var.)
- *Tris-HCl* (20 mM *Tris-HCl*, *Protease inhibitor*)
- 12% SDS-PAGE slab gel (gel elektroforesis)
- *Immubilon nitrocellulose membrane*
- α B-crystallin (Ser59) antibody
- Nonfat dry milk powder (NFDM)
- Peroxidase-tagged anti-rabbit antibody
- Diaminobenzidine (0.01%) dan H_2O_2
- Midriatil (tropicamide) 1% eye drop

4.8. Metode Percobaan

4.8.1. Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba dilakukan pada kandang dalam laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang selama 5 hari. Hewan coba tersebut dipelihara dalam kandang berukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm dimana setiap kandang berisi 1 ekor tikus pada ruangan dengan suhu 22-25°C dan siklus terang gelap 12/12jam. Makanan hewan coba berupa pellet dan diberi minum air yang berasal dari PDAM. Selama pelaksanaan penelitian, tikus diperlakukan dengan hati-hati dan memperhatikan kelayakan etik penelitian dengan hewan coba.

4.8.2. Pembuatan Tikus Model Diabetes

Tikus yang akan dijadikan model diabetes dipuasakan terlebih dahulu selama 6 – 8 jam pada hari pertama penelitian namun tetap diberikan air seperti normal, kemudian tikus diberikan injeksi intraperitoneal *single dose streptozotocin* (STZ 65 mg/kg, yang dilarutkan dalam 0,1 M buffer sitrat, pH 4.5). Kemudian kembalikan tikus pada kandang masing – masing dan berikan makanan sesuai normal dan air sukrosa 10%. Pada hari kedua penelitian, air sukrosa 10% diganti air biasa. Selanjutnya kadar gula darah puasa (GDP) diukur pada 72 jam post injeksi STZ menggunakan glukometer. Sebelum pengukuran gula darah puasa, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 6 – 8 jam, kemudian darah dari ekor tikus diteteskan pada strip yang terhubung dengan glukometer kemudian dibiarkan selama 6 detik dan dibaca skala yang terlihat pada layar dengan satuan skala mg/dL. Tikus dengan kadar gula darah puasa > 150 mg/dL berarti telah mengalami Diabetes Mellitus (DM).⁹¹

4.8.3. Pembuatan Kecambah Brokoli dan Sediaan Jus Kecambah Brokoli

- Benih brokoli direndam dalam air dan disimpan pada tempat hangat dan gelap selama 8-10 jam.
- Kemudian kuras airnya dan cuci dengan air bersih.
- Kuras kembali airnya dan pastikan seluruh air terkuras, kemudian simpan benih di tempat hangat dan gelap selama 2 hari. Ulangi prosedur ini hingga 3 – 4 x dalam sehari. Kemudian benih akan mulai memanjang dan memiliki daun berwarna kuning.
- Selajutnya kecambah dapat dipindahkan ke tempat yang mendapatkan paparan sinar matahari secara tidak langsung. Tetap lakukan prosedur menguras dan mencuci 3 – 4 x sehari hingga daun menjadi berwarna hijau.
- Kecambah dipanen pada usia 3 hari germinasi, kemudian cuci bersih kecambah brokoli dan jika tidak langsung digunakan, simpan dalam keadaan kering dalam wadah/plastik tertutup di lemari es (dapat bertahan sekitar 1 – 2 minggu).
- Jika kecambah brokoli akan digunakan, siapkan 10 gram kecambah brokoli, kemudian haluskan dalam air dengan blender sampai halus menjadi 30ml larutan jus kecambah brokoli.

- Disiapkan sesuai dosis yang akan diberikan, yaitu dosis 0,25 gram (0,75ml larutan jus kecambah brokoli), dosis 0,5 gram (1,5ml larutan jus kecambah brokoli), dan dosis 1 gram (3ml larutan jus kecambah brokoli), dibuat masing – masing 5 tiap kelompok perlakuan.
- Pembuatan jus dilakukan setiap hari selama 28 hari.

4.8.4. Perlakuan Penelitian

- Tikus model diabetes terbagi menjadi kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan.
- Tikus pada kelompok kontrol hanya akan mendapatkan makanan ternak berupa pellet serta diberi minum yang berasal dari PDAM.
- Pada kelompok tikus model diabetes yang mendapat perlakuan dibagi menjadi 3 grup yang masing-masing mendapatkan makanan ternak berupa pellet serta diberi minum yang berasal dari PDAM dan ditambahkan jus kecambah brokoli dengan dosis 0,25 gram, 0,5 gram, dan 1 gram per hari yang diberikan secara oral sekali sehari menggunakan sonde. Paparan diberikan selama 28 hari.

4.8.5. Pemeriksaan Derajat Kekeruhan Lensa/Katarak

- Setelah perawatan empat minggu, dilakukan pemeriksaan derajat kekeruhan lensa tikus dengan pupil yang lebar.
- Sebelum pemeriksaan, tikus dianastesi dengan injeksi intramuskular *ketamine hydrochloride* 50 mg/kgBB.
- Setelah tikus lemas, masing-masing mata tikus ditetesi midriatikum yang mengandung tropicamide 1%. Setelah pupil dilatasi maksimal, dilakukan pengamatan lensa secara mikroskopis menggunakan slitlamp biomikroskopi (Topcon DC3) dengan perbesaran 25x dan selanjutnya dilakukan pengambilan gambar (foto) lensa menggunakan foto slitlamp .
- Pemeriksaan derajat kekeruhan lensa dilakukan oleh 1 orang observer yang sudah berpengalaman dan tidak mengetahui tentang kelompok penelitian dan temuan yang ada pada penelitian ini.
- Derajat kekeruhan lensa dinilai menurut klasifikasi kekeruhan lensa sebagai berikut: lensa normal jernih (derajat 0); vesikel di perifer (derajat 1); vesikel di perifer dan kekeruhan kortikal (derajat 2); kekeruhan sentral difus (derajat 3); dan katarak matur/keruh rata (derajat 4).^{4,98}

4.8.6. Pemeriksaan Ekspresi α B-Crystallin Lensa

- Kemudian tikus dikorbankan dengan cara mematahkan batang lehernya hingga fraktur.
- Dilakukan diseksi lensa melalui posterior dengan cara membuat insisi kecil pada sisi posterior bola mata menggunakan pisau, kemudian lensa dikeluarkan dengan cara menekan sisi yang berlawanan dengan luka insisi.⁴
- Lensa kemudian dicuci dengan *ice-cold saline* untuk menghilangkan darah, dan jika tidak langsung dianalisis, maka lensa mata disimpan pada suhu -70°C untuk analisis selanjutnya.⁹⁹

Pemeriksaan *Western blot* ⁹⁹

- Analisis *Western blot* menggunakan α B-crystallin (Ser59) antibody. Analisa ini dilakukan untuk mendeteksi α B-crystallin di lensa.
- Lensa mata kanan dan kiri dari masing – masing subyek penelitian dihomogenisasi dalam 0.1 M *Tris buffer* (pH 8.0) dan disentrifugasi pada 20,000 g selama 20 menit, 4°C. Supernatan digunakan sebagai pemeriksaan protein lensa. Supernatan dielektroforesis dalam 12,5% *polyacrylamide gel* menggunakan *Tris–glycine* sebagai *running buffer*.
- Setelah pemisahan elektroforesis, protein dipindahkan ke *Immubilon nitrocellulose membrane*.
- *Imunoblotting* dilakukan dengan antibodi primer (α B-crystallin antibody, pengenceran 1: 1,000) setelah diblok dengan susu bubuk kering tanpa lemak (NFDM), dan kemudian diinkubasi dengan *peroxidase tagged anti-rabbit IgG antibody*. Kompleks imun dideteksi menggunakan *diaminobenzidine* (0,01%) dan H₂O₂.
- Kuantifikasi intensitas pita dilakukan dengan menggunakan sistem *gel doc* dengan menggunakan *software* (ImageLab 5.0 Biorad).
- Pemeriksaan *western blot* dilakukan oleh 1 orang observer yang sudah berpengalaman dan tidak mengetahui tentang kelompok penelitian dan temuan yang ada pada penelitian ini.

4.9. Teknik Analisa Data

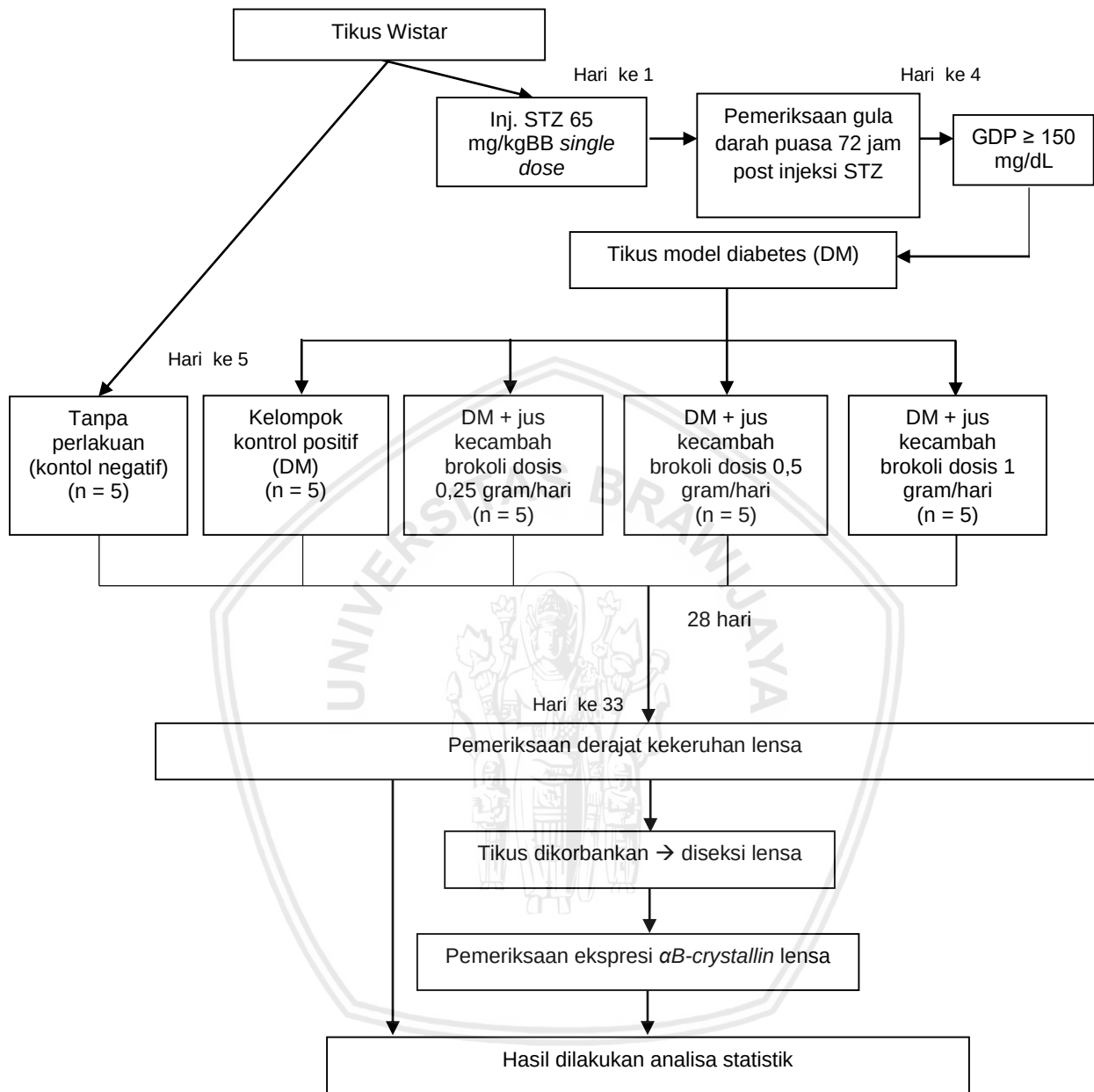
Analisa data untuk mengetahui efek pemberian jus kecambah brokoli (*Brassica oleracea Sp.*) dalam mencegah agregasi protein lensa pada tikus model diabetes dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

- Untuk menguji distribusi normal data numerik pada variabel *dependent* maka dilakukan uji Kolmogorof-smimof terhadap data pada tiap kelompok.
- Untuk mengetahui homogenitas ragam data numerik pada variabel *dependent* maka dilakukan uji Levene.
- Jika asumsi data (normalitas dan homogenitas) terpenuhi, maka dilakukan analisa data dengan statistik parametrik *one way ANOVA*.
- Apabila dari uji *one way ANOVA* didapatkan perbedaan yang signifikan antar kelompok maka dilanjutkan dengan uji rentang ganda (*multiple comparison, Tukey*), dimana dengan uji *Tukey* ini dapat diketahui perbedaan antar kelompok sehingga bisa diketahui kelompok mana saja yang berbeda signifikan atau tidak berbeda signifikan.
- Jika asumsi data (normalitas dan homogenitas) tidak terpenuhi maka dapat dilakukan analisa dengan statistik non parametrik yaitu uji *Kruskal-walis* dan *Mann-whitney*.
- Untuk mengetahui hubungan antara pemberian dosis jus kecambah brokoli dengan agregasi protein lensa antar kelompok perlakuan maka dilakukan uji korelasi, dan untuk melihat adanya pengaruh dilakukan uji regresi linier sederhana.
- Kemaknaan ditentukan berdasarkan nilai $p < 0.05$. Data disajikan dalam bentuk tabulasi dengan menggunakan program SPSS 22.0 for windows.

4.10. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Tim Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan No. 108 / EC / KEPK-PPDS / 04 / 2018. Secara *in vivo*, hewan coba diperlakukan sebaik mungkin supaya tidak menyakiti saat perlakuan. Setiap proses pemeriksaan menggunakan metode anastesi yang tidak menyakiti hewan coba. Lembar persetujuan *ethical clearance* terlampir.

4.11. Alur Kerja Penelitian



4.12. Organisasi Penelitian

Peneliti : dr. Ayu Puspitasari

Pembimbing : dr. Nina Handayani, Sp.M(K)

4.13. Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	2017 – 2018										Okt	Nov
		Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni	Juli	Agst	Sept		
1.	Studi kepustakaan												
2.	Pengajuan Judul												
3.	Pembuatan usulan penelitian												
4.	Konsultasi usulan penelitian												
5.	Presentasi usulan penelitian												
6.	Pengajuan Etik Penelitian												
7.	Pelaksanaan penelitian												
8.	Pembuatan laporan penelitian												
9.	Presentasi laporan penelitian												
10.	Pengumpulan laporan penelitian												

BAB V

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 25 tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian, terdiri dari 5 kelompok dimana masing – masing kelompok terdiri dari 5 tikus. Kelompok penelitian, yaitu kelompok kontrol negatif yang merupakan kelompok tikus yang hanya memperoleh injeksi *sodium citrate buffer*; kelompok kontrol positif adalah kelompok tikus model diabetes yang tidak mendapatkan paparan jus kecambah brokoli; kelompok perlakuan 1 (P1) adalah kelompok tikus model diabetes yang diberi perlakuan jus kecambah brokoli dosis 0,25 gram/hari; kelompok perlakuan 2 (P2) adalah kelompok tikus model diabetes yang diberi perlakuan jus kecambah brokoli dosis 0,5 gram/hari; dan kelompok perlakuan 3 (P3) adalah kelompok tikus model diabetes yang diberi perlakuan jus kecambah brokoli dosis 1 gram/hari. Pembuatan tikus model diabetes dilakukan dengan menginjeksikan STZ 65 mg/kg *single dose* intraperitoneal dan dilakukan pemeriksaan kadar GDP 3 hari (72 jam) post injeksi STZ, dimana tikus dengan kadar GDP > 150 mg/dL akan dimasukkan sebagai tikus diabetes. Setelah 28 hari perlakuan, semua tikus dilakukan pemeriksaan gula darah puasa akhir, derajat kekeruhan lensa dengan slit lamp biomikroskopi dan pemeriksaan ekspresi α B-crystallin lensa dengan metode *Western blot* menggunakan α B-crystallin (Ser59) antibody. Data yang telah didapatkan dianalisa dengan menggunakan program SPSS 22.0 for Windows.

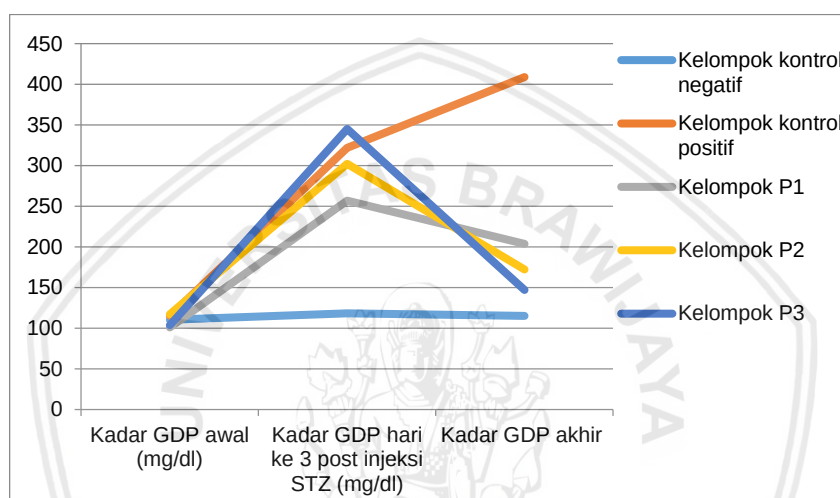
5.1. Kadar Gula Darah Puasa (GDP)

Pemeriksaan kadar gula darah puasa (GDP) dilakukan pada semua tikus pada sebelum, 3 hari sesudah injeksi STZ, dan setelah perlakuan selama 28 hari atau di akhir penelitian. Pemeriksaan GDP awal sebelum injeksi STZ dilakukan untuk membuktikan bahwa tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus normoglikemia (tidak diabetes), dan menjadi diabetes (hiperglikemia) setelah injeksi STZ 65 mg/kg *single dose* pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan yang diperiksa pada 72 jam post injeksi STZ. Pada akhir penelitian juga dilakukan pemeriksaan GDP kembali guna memastikan bahwa tikus pada kontrol positif tetap menderita diabetes dan tikus pada kontrol negatif tetap memiliki kadar GDP yang normal. Berikut data GDP masing – masing tikus penelitian.

Tabel 3. Rerata kadar GDP tikus selama penelitian

Kelompok	Kadar GDP awal (mg/dl)	Kadar GDP hari ke 3 post injeksi STZ (mg/dl)	Kadar GDP post perlakuan selama 28 hari (mg/dl)
Kontrol negatif	110,4±6,23	118,4±7,64	115,2±9,65
Kontrol positif	115,2±11,03	321,8±90,53	409±128,88
P1	101±17,2	257±69,38	203,6±61,88
P2	117±16,32	302,2±82,96	172,4±26,27
P3	103,6±12,68	345,2±103,78	147±32,09

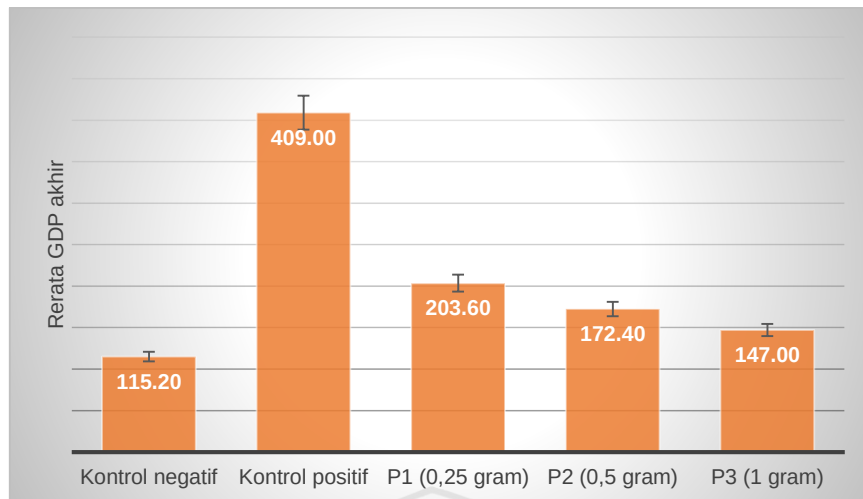
Keterangan: Data adalah rerata±SD (*standard deviation*)



Grafik 1. Grafik rerata GDP tikus selama penelitian. Keterangan: GDP pada kelompok kontrol negatif tetap pada normoglikemia selama penelitian, sedangkan GDP kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan, mengalami kondisi hiperglikemia post injeksi STZ dan tetap hiperglikemia pada kelompok kontrol positif hingga akhir penelitian. Sedangkan pada kelompok perlakuan didapatkan GDP yang mengalami penurunan setelah mendapatkan perlakuan jus kecambah brokoli.

Tabel 4. Kadar GDP tikus pada akhir penelitian

GDP akhir	Ulangan					Mean	Std. Deviasi	CI 95%	
	1	2	3	4	5			Lower	Upper
Kontrol negatif	106	104	126	120	120	115,20	9,65	103,21	127,19
Kontrol positif	549	419	488	210	379	409,00	128,88	248,97	569,03
Perlakuan 1	287	234	205	166	126	203,60	61,88	126,76	280,44
Perlakuan 2	196	130	178	167	191	172,40	26,27	139,78	205,02
Perlakuan 3	112	112	169	167	175	147,00	32,09	107,16	186,84



Grafik 2. Grafik rerata GDP tikus pada akhir penelitian. Keterangan: Rerata kadar GDP tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol positif dan semakin besar dosis jus kecambah brokoli yang diberikan, tampak memberikan penurunan kadar GDP yang lebih besar.

Pada pemeriksaan GDP awal, semua tikus memiliki GDP normal yaitu < 150 mg/dL, sedangkan dari hasil pengamatan selanjutnya terhadap kadar GDP, didapatkan semua tikus yang diinjeksikan STZ (kelompok kontrol positif dan perlakuan) telah menjadi hiperglikemia pada hari ke 3 ($GDP > 150$ mg/dL) dan hasil GDP pada akhir penelitian didapatkan bahwa kelompok kontrol positif tetap hiperglikemia ($GDP > 150$ mg/dL) dan kontrol negatif tetap memiliki GDP yang normal. Namun hasil lain yang juga diamati dalam penelitian ini adalah bahwa pada kelompok perlakuan yang diberikan jus kecambah brokoli mengalami penurunan kadar GDP dibandingkan sebelum perlakuan dan dengan kelompok kontrol positif.

Selanjutnya dilakukan pengujian menggunakan metode uji beda rata-rata yaitu uji *one-way Anova* (untuk lebih dari 2 kelompok perlakuan), jika asumsi data (normalitas dan homogenitas) terpenuhi. Berdasarkan hasil uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorof-Smirnof* didapatkan bahwa data hasil analisa gula darah puasa memiliki nilai signifikansi 0.584 ($p > 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data GDP tersebut menyebar mengikuti sebaran normal. Sedangkan berdasarkan uji homogenitas data menggunakan uji *Levene* didapatkan hasil analisa data GDP memiliki nilai signifikansi 0.192 ($p > 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data GDP tersebut masih relatif homogen. Dengan demikian dapat dilakukan pengujian dengan *one-way Anova*, karena asumsi kenormalan distribusi data dan homogenitas ragam data telah terpenuhi.

5.1.1. Uji Perbedaan

Tabel 5. Hasil uji perbedaan rerata GDP akhir

Uji F hitung	Signifikansi	F table
16,316	0,000	2,866

Pada uji perbedaan, diperoleh nilai F hitung yang lebih besar dari F tabel dan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata GDP akhir pada masing-masing kelompok. Sedangkan untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Tukey.

Tabel 6. Hasil uji lanjut perbedaan GDP akhir

Perbedaan Kelompok		Sig.	CI 95%		Kesimpulan
			Lower Bound	Upper Bound	
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	0,000	-1,704	-0,737	Signifikan
	Perlakuan 1	0,026	-1,017	-0,050	Signifikan
	Perlakuan 2	0,143	-0,879	0,088	Tidak Signifikan
	Perlakuan 3	0,635	-0,710	0,258	Tidak Signifikan
Kontrol Positif	Perlakuan 1	0,003	0,203	1,171	Signifikan
	Perlakuan 2	0,000	0,341	1,308	Signifikan
	Perlakuan 3	0,000	0,510	1,478	Signifikan
Perlakuan 1	Perlakuan 2	0,911	-0,346	0,621	Tidak Signifikan
	Perlakuan 3	0,349	-0,176	0,791	Tidak Signifikan
Perlakuan 2	Perlakuan 3	0,830	-0,314	0,653	Tidak Signifikan

Pada uji lanjut perbedaan GDP akhir didapatkan bahwa kelompok kontrol positif memiliki perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3. Namun antar kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

5.1.2. Uji Korelasi

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara dosis jus kecambah brokoli dengan GDP akhir (setelah perlakuan jus kecambah brokoli) pada tikus model diabetes.

Tabel 7. Hasil analisis korelasi antara dosis jus kecambah brokoli dan GDP akhir pada tikus model diabetes.

Variabel	Koefisien Korelasi	Signifikansi
Dosis kelompok – GDP	-0,679	0,001

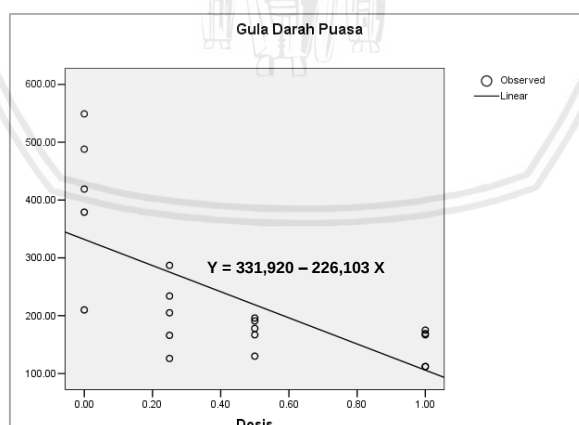
Pada hasil uji korelasi dosis jus kecambah brokoli dengan GDP akhir (setelah perlakuan jus kecambah brokoli) pada tikus model diabetes didapatkan nilai signifikansi 0,001, ($p < 0.05$) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan. Hubungan yang kuat dan berlawanan arah antara dosis jus kecambah brokoli dengan GDP akhir pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang negatif sebesar -0,679. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi dosis jus kecambah brokoli yang diberikan akan semakin menurunkan gula darah puasa tikus model diabetes.

5.1.3. Uji Pengaruh

Uji pengaruh menggunakan uji regresi linier sederhana dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis jus kecambah brokoli terhadap GDP akhir (setelah perlakuan jus kecambah brokoli) pada tikus model diabetes.

Tabel 8. Hasil analisa regresi linier sederhana antara dosis jus kecambah brokoli dengan GDP akhir pada tikus model diabetes.

Model	Koefisien	t hitung	Sig.	F	Sig.
Konstan	331,920	10.057	0,000		
Dosis	-226,103	-3.924	0,001	15,400	0,000



Grafik 3. Grafik regresi linier antara dosis jus kecambah brokoli dengan GDP akhir pada tikus model diabetes. Keterangan: persamaan regresi = $Y = 331,920 - 226,103 X$, Y = GDP akhir, X = Dosis jus kecambah brokoli.

Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dosis jus kecambah brokoli terhadap gula darah puasa akhir pada tikus model diabetes. Dapat dilihat pada

grafik 3 bahwa dosis jus kecambah brokoli berpengaruh nyata dan negatif terhadap gula darah puasa akhir tikus model diabetes, atau dengan kata lain dengan meningkatnya dosis jus kecambah brokoli dapat menurunkan gula darah puasa secara nyata pada tikus model diabetes. Besar pengaruh dosis jus kecambah brokoli terhadap penurunan GDP akhir dapat dilihat menggunakan koefisien determinasi (*R square*), dimana didapatkan nilai *R square* yaitu sebesar 0,461 (46,1%).

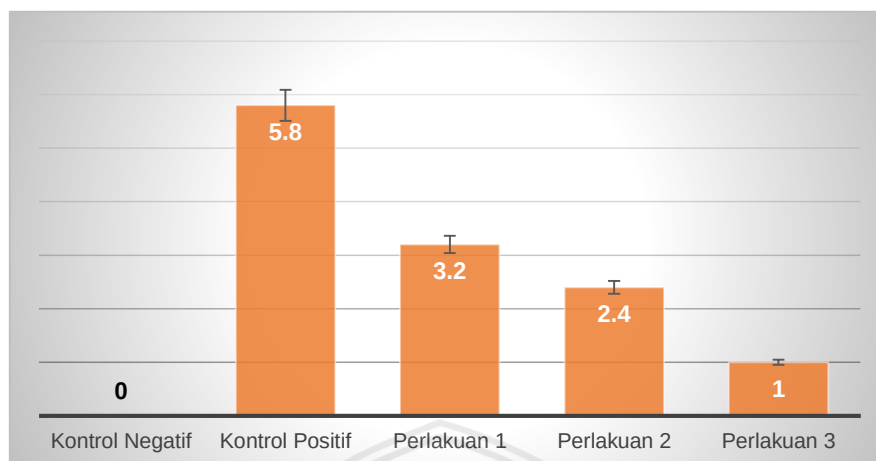
5.2. Derajat Kekeruhan Lensa/Katarak

Pada pemeriksaan derajat katarak menggunakan slit lamp biomikroskopi tampak pada kelompok kontrol negatif didapatkan semua lensa mata tikus normal jernih (derajat 0). Sedangkan pada kelompok kontrol positif, didapatkan lensa dengan kekeruhan kortikal (derajat 2), kekeruhan sentral difus (derajat 3) hingga keruh rata (derajat 4). Pada kelompok perlakuan 3 yaitu kelompok yang mendapatkan perlakuan jus kecambah brokoli dosis 1 gram/hari, didapatkan lensa normal jernih (derajat 0) hingga lensa dengan bentukan vesikel di perifer (derajat 1). Kelompok perlakuan 2 yaitu kelompok yang mendapatkan perlakuan jus kecambah brokoli dosis 0,5 gram/hari, didapatkan lensa normal jernih (derajat 0), mulai tampak bentukan vesikel di perifer (derajat 1) hingga kekeruhan kortikal (derajat 2). Kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok yang mendapatkan perlakuan jus kecambah brokoli dosis 0,25 gram/hari, didapatkan gambaran lensa mulai dengan bentukan vesikel di perifer (derajat 1), kekeruhan kortikal (derajat 2) hingga kekeruhan sentral difus (derajat 3). Pada perhitungan derajat katarak, kami menjumlahkan derajat kekeruhan lensa kanan dan kiri pada 1 tikus.

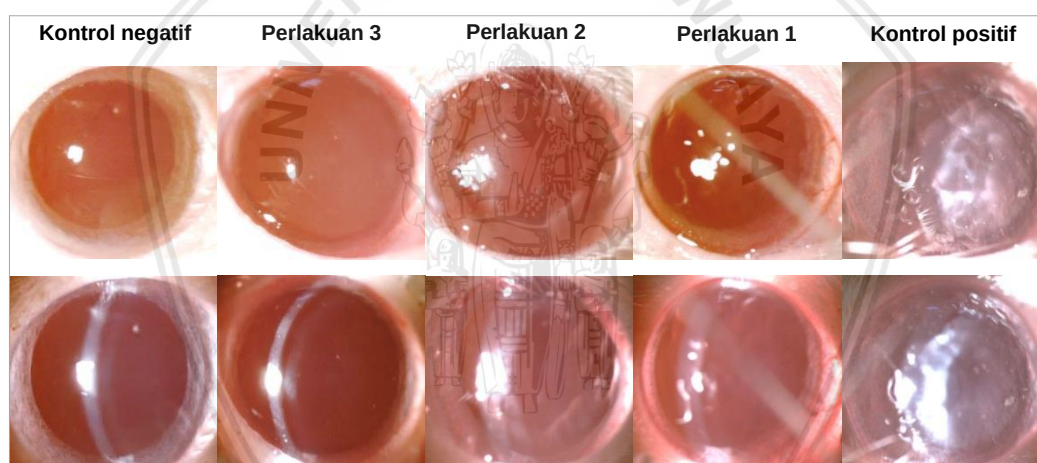
Dari hasil pemeriksaan derajat katarak didapatkan kontrol positif memiliki derajat kekeruhan paling tinggi dibandingkan kelompok lain, dan kelompok perlakuan 3 yaitu yang mendapatkan perlakuan jus kecambah brokoli dosis 1 gram/hari memiliki derajat kekeruhan katarak paling ringan dibandingkan kelompok perlakuan 1 dan 2.

Tabel 9. Rerata hasil pengamatan derajat kekeruhan lensa.

Derajat Katarak	Ulangan					Mean	Std. Deviasi	CI 95%	
	1	2	3	4	5			Lower	Upper
Kontrol negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol positif	6	5	7	6	5	5,8	0,8367	4,7611	6,8389
Perlakuan 1	3	4	3	3	3	3,2	0,4472	2,6447	3,7553
Perlakuan 2	3	3	2	2	2	2,4	0,5477	1,7199	3,0801
Perlakuan 3	0	1	1	2	1	1	0,7071	0,1220	1,8780



Grafik 4. Grafik derajat kekeruhan lensa. Keterangan: Kontrol positif memiliki derajat kekeruhan paling tinggi dibandingkan kelompok lain, dan kelompok perlakuan 3 memiliki derajat kekeruhan katarak paling ringan dibandingkan kelompok perlakuan 1 dan 2.



Gambar 4. Gambar pemeriksaan derajat kekeruhan lensa yang diamati dengan slit lamp biomikroskopi. Keterangan: pada kontrol negatif didapatkan derajat 0 pada semua lensa; kelompok perlakuan 3 dengan derajat 0 – 1; kelompok perlakuan 2 dengan derajat 0 – 2; kelompok perlakuan 1 dengan derajat 1 – 3; dan kontrol positif dengan derajat 2 – 4. *Diffuse illumination* (atas) dan *slit illumination* (bawah).

Pada uji normalitas data menggunakan uji Kolmogorof-smirnof didapatkan bahwa data hasil analisa derajat katarak memiliki nilai signifikansi 0,525 ($p > 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data derajat katarak tersebut menyebar mengikuti sebaran normal. Sedangkan pada uji homogenitas data menggunakan uji Levene didapatkan nilai signifikansi 0,078 ($p > 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data tersebut homogen. Karena asumsi homogenitas ragam

data terpenuhi maka untuk derajat katarak dilakukan pengujian dengan *one-way* Anova dan uji lanjut Tukey.

5.2.1. Uji Perbedaan

Tabel 10. Hasil uji perbedaan rerata derajat kekeruhan lensa

F hitung	Signifikansi	F table
73,118	0,000	2,866

Pada uji perbedaan, diperoleh nilai F hitung yang lebih besar dari K tabel dan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata derajat katarak pada masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Tukey.

Tabel 11. Hasil uji lanjut perbedaan rerata derajat kekeruhan lensa

Perbedaan Kelompok		Sig.	CI 95%		Kesimpulan
			Lower Bound	Upper Bound	
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	0,000	-1,704	-0,737	Signifikan
	Perlakuan 1	0,026	-1,017	-0,050	Signifikan
	Perlakuan 2	0,143	-0,879	0,088	Tidak Signifikan
	Perlakuan 3	0,635	-0,710	0,258	Tidak Signifikan
Kontrol Positif	Perlakuan 1	0,003	0,203	1,171	Signifikan
	Perlakuan 2	0,000	0,341	1,308	Signifikan
	Perlakuan 3	0,000	0,510	1,478	Signifikan
Perlakuan 1	Perlakuan 2	0,911	-0,346	0,621	Tidak Signifikan
	Perlakuan 3	0,349	-0,176	0,791	Tidak Signifikan
Perlakuan 2	Perlakuan 3	0,830	-0,314	0,653	Tidak Signifikan

Pada uji lanjut perbedaan didapatkan bahwa kelompok kontrol positif memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif, P1, P2, dan P3. Namun antar kelompok P1, P2, dan P3 tidak didapatkan perbedaan yang signifikan.

5.2.2. Uji Korelasi

Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan yang signifikan antara dosis jus kecambah brokoli dengan derajat kekeruhan lensa tikus model diabetes.

Tabel 12. Hasil analisis korelasi antara dosis jus kecambah brokoli dan derajat kekeruhan lensa

Variabel	Koefefisien Korelasi	Signifikansi
Dosis kelompok – Derajat kekeruhan lensa	-0,891	0,000

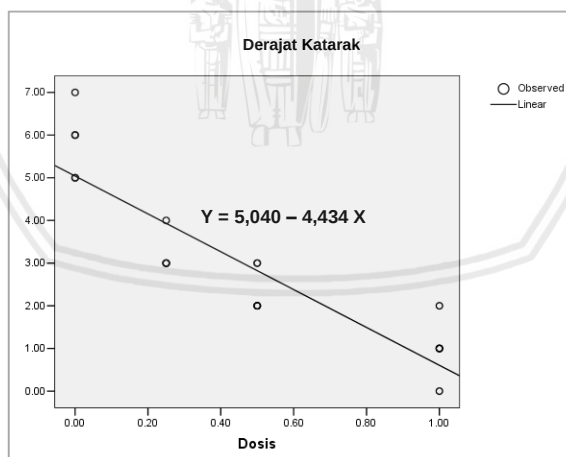
Pada hasil uji korelasi dosis jus kecambah brokoli dengan derajat kekeruhan katarak didapatkan nilai signifikansi 0,000, ($p < 0,05$) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan. Hubungan yang sangat kuat dan berlawanan arah antara dosis jus kecambah brokoli dengan derajat kekeruhan lensa pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang negatif sebesar -0,891. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi dosis jus kecambah brokoli yang diberikan akan semakin menurunkan derajat kekeruhan lensa tikus model diabetes.

5.2.3. Uji Pengaruh

Uji pengaruh menggunakan uji regresi linier sederhana dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis jus kecambah brokoli terhadap derajat kekeruhan lensa pada tikus model diabetes.

Tabel 13. Hasil analisa regresi linier sederhana antara dosis jus kecambah brokoli dengan derajat kekeruhan lensa pada tikus model diabetes.

Model	Koefisien	t hitung	Sig.	F	Sig.
Konstan	5,040	16,477	0.000	68,958	0,000
Dosis	-4,434	-8,304	0.000		



Grafik 5. Grafik regresi linier antara dosis jus kecambah brokoli dengan derajat katarak pada tikus model diabetes. Keterangan: persamaan regresi = $Y = 5,040 - 4,434 X$, Y = derajat katarak, X = dosis jus kecambah brokoli.

Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dosis jus kecambah brokoli terhadap derajat kekeruhan lensa pada tikus model diabetes. Dapat dilihat pada grafik 5 bahwa dosis jus kecambah brokoli berpengaruh nyata dan negatif

terhadap derajat kekeruhan lensa tikus model diabetes, atau dengan kata lain dengan meningkatnya dosis jus kecambah brokoli dapat menurunkan derajat kekeruhan lensa secara nyata pada tikus model diabetes. Besar pengaruh dosis jus kecambah brokoli terhadap penurunan derajat katarak sebesar 79,3% ($R^2 = 0,793$).

5.3. Ekspresi αB -crystallin lensa

Sedangkan pada pengujian ekspresi αB -crystallin lensa menggunakan metode *Western blot* didapatkan penurunan ekspresi αB -crystallin *native* lensa tertinggi pada kelompok kontrol positif yakni kelompok tikus diabetes yang tidak mendapatkan perlakuan jus kecambah brokoli. Sedangkan pada kelompok perlakuan didapatkan ekspresi αB -crystallin *native* lensa yang lebih besar dibandingkan yang ada kelompok kontrol positif. Semakin besar dosis jus kecambah brokoli yang diberikan, ekspresi αB -crystallin *native* lensa semakin besar.

Tabel 14. Rerata hasil pengamatan ekspresi αB -crystallin *native* lensa.

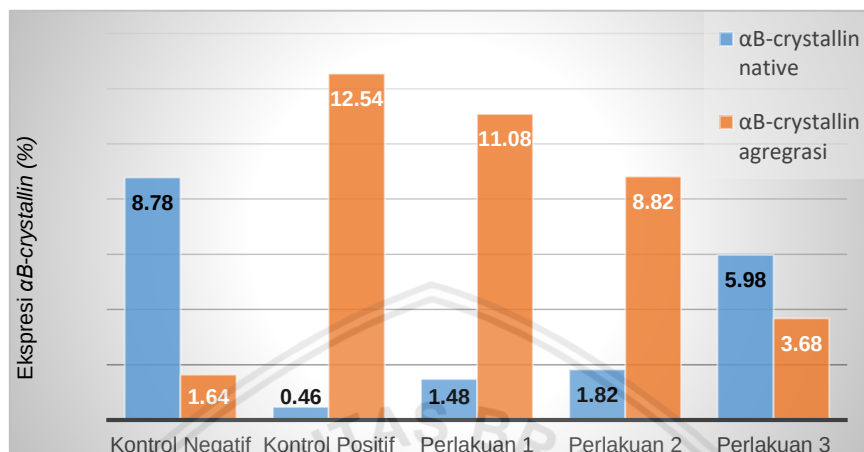
αB -crystallin lensa (%)	Ulangan					Mean	Std. Deviasi	CI 95%	
	1	2	3	4	5			Lower	Upper
Kontrol negatif	9,4	9,4	7,3	8,6	9,2	8,78	0,890	7,675	9,885
Kontrol positif	0,5	0,6	0,2	0,4	0,6	0,46	0,167	0,252	0,668
Perlakuan 1	1,4	0,8	1,9	1,7	1,6	1,48	0,421	0,958	2,002
Perlakuan 2	1,5	1,6	2,1	1,9	2	1,82	0,259	1,499	2,141
Perlakuan 3	7,5	6,9	6,3	3,8	5,4	5,98	1,445	4,186	7,774

Selain itu, kami juga mengamati pita dengan intensitas yang lebih besar pada berat molekul sekitar 45kDa yang mungkin merupakan agregrasi heteromik kompleks αB -crystallin lensa. Pada ekspresi agregrasi αB -crystallin lensa didapatkan kondisi yang berlawanan dibandingkan dengan αB -crystallin *native*, dimana pada ekspresi agregrasi αB -crystallin tertinggi terdapat pada kelompok kontrol positif, dan ekspresi terendah ada pada kelompok kontrol negatif. Sedangkan pada kelompok perlakuan jus kecambah brokoli didapatkan bahwa semakin besar dosis jus kecambah brokoli yang diberikan, ekspresi agregrasi αB -crystallin lensa juga semakin kecil.

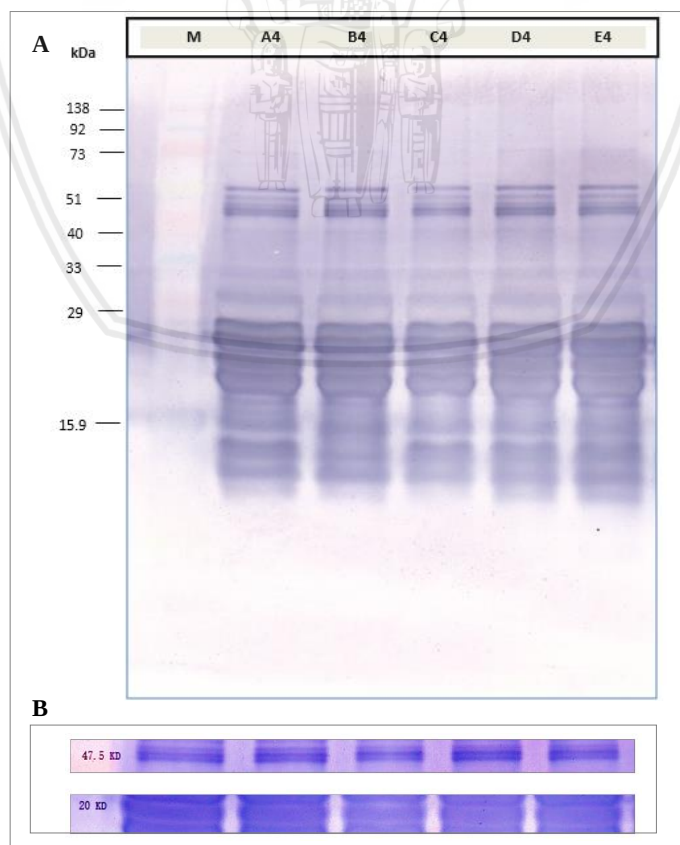
Tabel 15. Rerata hasil pengamatan ekspresi agregrasi αB -crystallin lensa.

αB -crystallin agregrasi (%)	Ulangan					Mean	Std. Deviasi	CI 95%	
	1	2	3	4	5			Lower	Upper
Kontrol negatif	1	0,8	2,9	2	1,5	1,640	0,844	0,592	2,688
Kontrol positif	16,5	10	9,6	15,8	10,8	12,540	3,333	8,402	16,678

Perlakuan 1	9,4	10,6	6,4	15,6	13,4	11,080	3,563	6,656	15,504
Perlakuan 2	9,1	9,3	5,2	11,9	8,6	8,820	2,395	5,846	11,794
Perlakuan 3	3,4	2,1	2,3	7,4	3,2	3,680	2,153	1,006	6,354



Grafik 6. Grafik rerata ekspresi α B-crystallin lensa. Keterangan: batang biru menunjukkan ekspresi α B-crystallin native; batang kuning menunjukkan ekspresi α B-crystallin agregrasi. Semakin besar dosis jus kecambah brokoli yang diberikan maka ekspresi α B-crystallin native semakin besar, sebaliknya ekspresi α B-crystallin lensa agregrasi semakin kecil pada tikus model diabetes.



Gambar 5. Hasil pengukuran ekspresi αB -crystallin lensa menggunakan metode Western blot. A: Immunoblot αB -crystallin lensa kelompok penelitian; M, marker protein standar pada rentang 15,9 – 138 kDa; A4, kontrol negatif; B4, kelompok P3; C4, kelompok P2; D4, kelompok P1; dan E4, kontrol positif. B: Pita pada berat molekul ± 20 kDa mewakili αB -crystallin native dan pita pada berat molekul ± 45 kDa mewakili αB -crystallin agregrasi.

Berdasarkan pengujian normalitas data menggunakan uji Kolmogorof-smirnof didapatkan data hasil analisa ekspresi αB -crystallin native memiliki nilai signifikansi sebesar 0,687 ($p > 0,05$), sedangkan αB -crystallin agregrasi sebesar 0,544 ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data ekspresi αB -crystallin lensa tersebut menyebar mengikuti sebaran normal. Selanjutnya pada uji homogenitas data menggunakan uji Levene, didapatkan nilai signifikansi pada hasil analisa ekspresi αB -crystallin native sebesar 0,191 ($p > 0,05$), dan αB -crystallin agregrasi sebesar 0,076 ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data tersebut homogen. Karena asumsi homogenitas ragam data terpenuhi maka untuk uji perbedaan ekspresi αB -crystallin lensa dapat dilakukan dengan uji one-way Anova.

5.3.1. Uji perbedaan

Tabel 16. Hasil Uji perbedaan rerata ekspresi αB -crystallin lensa

Ekspresi αB -crystallin lensa	F hitung	Signifikansi	Chi Square table
Native	83,966	0,000	2,866
Agregrasi	15,923	0,000	2,866

Pada uji perbedaan rerata ekspresi αB -crystallin lensa diperoleh nilai F hitung yang lebih besar dari F tabel dan nilai signifikansi sebesar 0,000 lebih kecil dari α (0,05), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata ekspresi αB -crystallin lensa pada masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaanya, dilakukan uji lanjut dengan uji Tukey.

Tabel 17. Hasil Uji lanjut perbedaan rerata ekspresi αB -crystallin native

Perbedaan Kelompok		Sig.	CI 95%		Kesimpulan
			Lower Bound	Upper Bound	
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	0,000	2,462	3,570	Signifikan
	Perlakuan 1	0,000	1,263	2,371	Signifikan
	Perlakuan 2	0,000	1,023	2,132	Signifikan
	Perlakuan 3	0,222	-0,148	0,960	Tidak Signifikan
Kontrol Positif	Perlakuan 1	0,000	-1,753	-0,645	Signifikan
	Perlakuan 2	0,000	-1,993	-0,884	Signifikan
	Perlakuan 3	0,000	-3,164	-2,056	Signifikan
Perlakuan 1	Perlakuan 2	0,699	-0,793	0,315	Tidak Signifikan

	Perlakuan 3	0,000	-1,965	-0,856	Signifikan
Perlakuan 2	Perlakuan 3	0,000	-1,725	-0,617	Signifikan



Tabel 18. Hasil Uji lanjut perbedaan rerata ekspresi αB -crystallin agregrasi

Perbedaan Kelompok		Sig.	CI 95%		Kesimpulan
			Lower Bound	Upper Bound	
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	0,000	-15.899	-5.901	Signifikan
	Perlakuan 1	0,000	-14.439	-4.441	Signifikan
	Perlakuan 2	0,003	-12.179	-2.181	Signifikan
	Perlakuan 3	0,740	-7.039	2.959	Tidak signifikan
Kontrol Positif	Perlakuan 1	0,903	-3.539	6.459	Tidak signifikan
	Perlakuan 2	0,210	-1.279	8.719	Tidak signifikan
	Perlakuan 3	0,000	3.861	13.859	Signifikan
Perlakuan 1	Perlakuan 2	0,663	-2.739	7.259	Tidak signifikan
	Perlakuan 3	0,002	2.401	12.399	Signifikan
Perlakuan 2	Perlakuan 3	0,042	0.141	10.139	Signifikan

Pada hasil uji lanjut perbedaan didapatkan bahwa ekspresi αB -crystallin lensa *native* pada kelompok kontrol positif memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok P1, P2, dan P3. Sedangkan pada ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan kelompok P1 dan P2, namun berbeda signifikan dengan kelompok P3. Kemudian baik pada ekspresi αB -crystallin lensa *native* maupun αB -crystallin lensa agregrasi, didapatkan perbedaan yang tidak signifikan pada kelompok P1 dan P2, namun berbeda signifikan pada kelompok P1 dan P3, serta kelompok P2 dan P3.

5.3.2. Uji Korelasi

Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan yang signifikan antara dosis jus kecambah brokoli dengan ekspresi αB -crystallin lensa tikus model diabetes.

Tabel 19. Hasil analisis korelasi antara dosis jus kecambah brokoli dan ekspresi αB -crystallin lensa

Variabel	Koefisien Korelasi	Sig.	Kesimpulan
Dosis kelompok – ekspresi αB -crystallin <i>native</i>	0,915	0,000	Signifikan
Dosis kelompok – ekspresi αB -crystallin agregrasi	- 0,785	0,000	Signifikan

Pada hasil uji korelasi dosis jus kecambah brokoli dengan ekspresi αB -crystallin lensa didapatkan nilai signifikansi 0,000, lebih kecil dari α (0,05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara dosis jus kecambah brokoli dengan ekspresi αB -crystallin lensa yang diukur. Dari nilai koefisien korelasi dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang sangat kuat dan searah pada

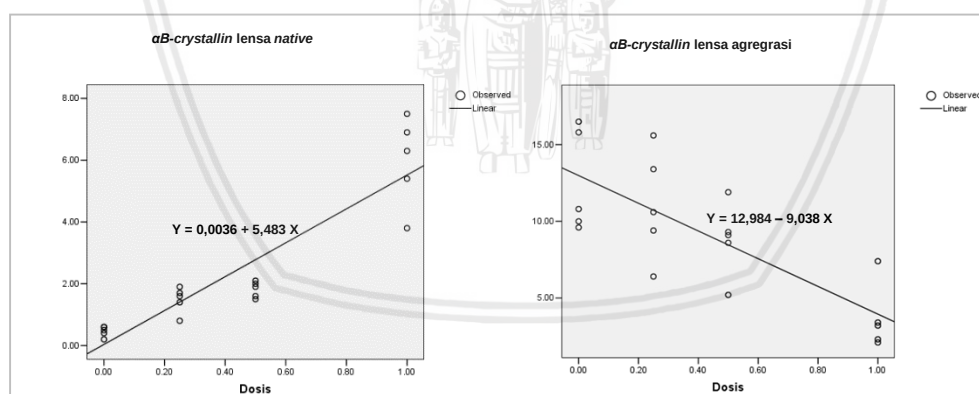
ekspresi αB -crystallin lensa native, serta hubungan kuat dan berlawanan arah pada ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi terhadap dosis jus kecambah brokoli pada taraf nyata 5%. Semakin tinggi dosis jus kecambah brokoli yang diberikan akan semakin meningkatkan ekspresi αB -crystallin lensa *native* dan menurunkan ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi pada tikus model diabetes.

5.3.3. Uji Pengaruh

Uji pengaruh menggunakan uji regresi linier sederhana dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis jus kecambah brokoli terhadap ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes.

Tabel 20. Hasil analisa regresi linier sederhana antara dosis jus kecambah brokoli dengan ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes.

Ekspresi αB -crystallin lensa	Model	Koefisien	t hitung	Sig.	F	Sig.
Native	Konstan	0,036	0,110	0,913	92,446	0,000
	Dosis	5,483	9,615	0,000		
Agregrasi	Konstan	12,984	13,474	0,000	26,861	0,000
	Dosis	-9,038	-5,372	0,000		



Grafik 7. Grafik regresi linier antara dosis jus kecambah brokoli dengan ekspresi αB -crystallin lensa *native* dan agregrasi pada tikus model diabetes. Keterangan: Y = ekspresi αB -crystallin lensa, X = dosis jus kecambah brokoli.

Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dosis jus kecambah brokoli terhadap ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes. Dapat dilihat pada grafik 7 bahwa dosis jus kecambah brokoli berpengaruh nyata dan positif terhadap ekspresi αB -crystallin lensa *native*, namun negatif terhadap ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi tikus model diabetes, atau dengan kata lain dengan

meningkatnya dosis jus kecambah brokoli dapat meningkatkan ekspresi αB -crystallin lensa native dan menurunkan ekspresi αB -crystallin lensa agregasi secara nyata pada tikus model diabetes. Besar pengaruh dosis jus kecambah brokoli terhadap peningkatan αB -crystallin lensa native sebesar 83,7% ($R^2 = 0,837$) dan terhadap penurunan αB -crystallin lensa agregasi sebesar 61,6% ($R^2 = 0,616$).

5.4. Hubungan antara GDP, derajat katarak, dan ekspresi αB -crystallin lensa pada tikus model diabetes

5.4.1. Uji Korelasi

Dari data sampel penelitian pada masing – masing variabel, kami coba menghubungkan satu sama lain untuk melihat apakah ada hubungan dari ketiga variabel tersebut, yaitu GDP, derajat kekeruhan lensa dan ekspresi αB -crystallin lensa.

Tabel 21. Hasil analisis korelasi antar variabel

Hubungan Variabel	R	Sig.	Keterangan
Gula darah puasa – Derajat katarak	0,803	0,000	Signifikan
Gula darah puasa – αB -crystallin native	-0,571	0,009	Signifikan
Derajat katarak – αB -crystallin native	-0,829	0,000	Signifikan
Gula darah puasa – αB -crystallin agregasi	0,418	0,067	Tidak Signifikan
Derajat katarak – αB -crystallin agregasi	0,708	0,000	Signifikan
αB -crystallin native – αB -crystallin agregasi	-0,794	0,000	Signifikan

Pada hasil uji korelasi didapatkan hasil bahwa hubungan antara GDP dengan derajat katarak memiliki nilai signifikansi 0,000, lebih kecil dari α (0,05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan. Hubungan yang sangat kuat dan searah antara GDP dengan derajat katarak pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang positif sebesar 0,803. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi GDP maka derajat katarak semakin berat. Sedangkan hubungan antara GDP dengan ekspresi αB -crystallin native lensa juga didapatkan nilai signifikansi 0,009, lebih kecil dari α (0,05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan. Hubungan yang sedang dan berlawanan arah antara GDP dengan ekspresi αB -crystallin native lensa pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang negatif sebesar 0,571. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi GDP maka ekspresi αB -crystallin native semakin turun. Namun pada hasil penelitian ini hubungan antara GDP dengan ekspresi αB -crystallin lensa agregasi tidak signifikan (nilai signifikansi 0,67). Hubungan yang sedang dan searah antara

GDP dengan ekspresi αB -crystallin lensa agregasi pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang positif sebesar 0,418, dimana semakin tinggi GDP akan semakin meningkatkan ekspresi αB -crystallin lensa agregasi pada tikus model diabetes.

Hubungan antara derajat katarak dengan ekspresi αB -crystallin baik *native* maupun agregasi lensa didapatkan nilai signifikansi 0,000, lebih kecil dari α (0,05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan. Hubungannya bersifat sangat kuat dan berlawanan arah pada taraf nyata 5% yang ditunjukkan dengan nilai korelasi yang negatif sebesar -0,829. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi kekeruhan lensa maka ekspresi αB -crystallin *native* lensa semakin menurun dan ekspresi αB -crystallin agregasi semakin meningkat.

Hubungan antara ekspresi αB -crystallin *native* dengan αB -crystallin agregasi didapatkan nilai signifikansi 0,000, lebih kecil dari α (0,05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan. Hubungan yang kuat dan berlawanan arah antara ekspresi αB -crystallin *native* dengan αB -crystallin agregasi pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang negatif sebesar -0,794. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi αB -crystallin *native* maka ekspresi αB -crystallin agregasi tikus model diabetes semakin rendah.

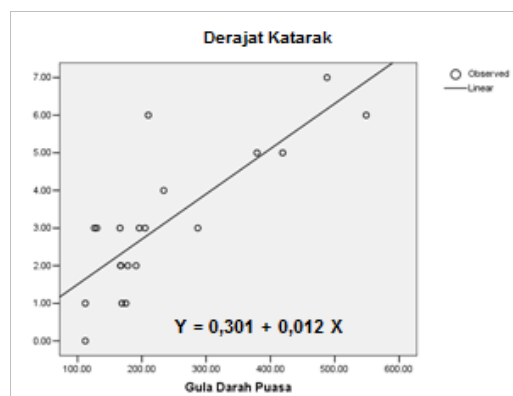
5.4.2. Uji Pengaruh Antar Variabel

a. Pengaruh GDP terhadap derajat katarak

Uji pengaruh menggunakan uji regresi linier sederhana dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya GDP terhadap derajat katarak/kekeruhan lensa pada tikus model diabetes.

Tabel 22. Hasil analisa regresi linier sederhana antara GDP dengan derajat katarak pada tikus model diabetes.

Model	Koefisien	t hitung	Sig.	F	Sig.
Konstan	0,301	0,544	0,593		
GDP	0,012	5,722	0,000	32,744	0,000



Grafik 8. Grafik regresi linier antara GDP dengan derajat katarak pada tikus model diabetes. Keterangan: persamaan regresi = $Y = 0,301 + 0,012 X$, Y = derajat katarak, X = gula darah puasa.

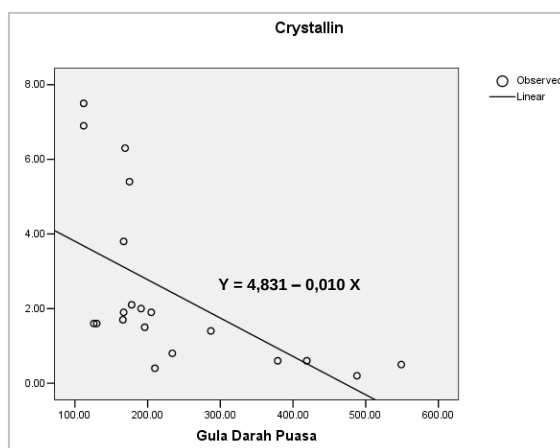
Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa terdapat pengaruh yang signifikan GDP terhadap derajat kekeruhan lensa pada tikus model diabetes. Dapat dilihat pada grafik 8 bahwa GDP berpengaruh nyata dan positif terhadap derajat kekeruhan lensa tikus model diabetes, atau dengan kata lain pada tikus model diabetes meningkatnya GDP dapat meningkatkan derajat kekeruhan lensa secara nyata. Besar pengaruh GDP terhadap derajat kekeruhan lensa sebesar 64,5% ($R^2 = 0,645$).

b. Pengaruh GDP terhadap ekspresi αB -crystallin native lensa

Uji pengaruh menggunakan uji regresi linier sederhana dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya GDP terhadap ekspresi αB -crystallin native lensa pada tikus model diabetes.

Tabel 23. Hasil analisa regresi linier sederhana antara GDP dengan ekspresi αB -crystallin native lensa pada tikus model diabetes.

Model	Koefisien	t hitung	Sig.	F	Sig.
Konstan	4,831	5,265	0,000		
GDP	-0,010	-2,953	0,009	8,722	0,009



Grafik 9. Grafik regresi linier antara GDP dengan ekspresi αB -crystallin native lensa pada tikus model diabetes. Keterangan: persamaan regresi = $Y = 4,831 - 0,010 X$, Y = ekspresi αB -crystallin lensa, X = gula darah puasa.

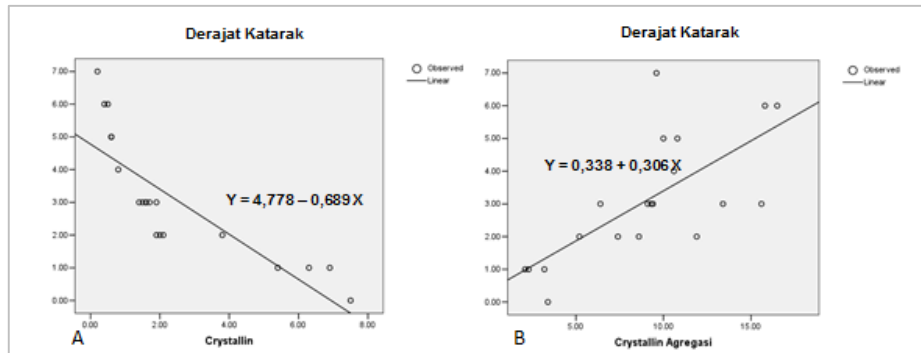
Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0.009 ($p < 0.05$) yang berarti bahwa terdapat pengaruh yang signifikan GDP terhadap ekspresi αB -crystallin native lensa pada tikus model diabetes. Dapat dilihat pada grafik 9 bahwa GDP berpengaruh nyata dan negatif terhadap ekspresi αB -crystallin native lensa tikus model diabetes, atau dengan kata lain pada tikus model diabetes meningkatnya GDP dapat menurunkan ekspresi αB -crystallin native lensa secara nyata. Besar pengaruh GDP terhadap ekspresi αB -crystallin native sebesar 32,6% ($R^2 = 0,326$).

c. Pengaruh ekspresi αB -crystallin lensa terhadap derajat katarak

Uji pengaruh menggunakan uji regresi linier sederhana dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya ekspresi αB -crystallin lensa terhadap derajat katarak pada tikus model diabetes.

Tabel 24. Hasil analisa regresi linier sederhana antara ekspresi αB -crystallin native lensa dengan derajat katarak pada tikus model diabetes.

Model	Koefisien	t hitung	Sig.	F	Sig.
Konstan	4.778	13.257	0.000		
αB -crystallin native	-0.689	-6.294	0.000	39,619	0,000
Konstan	0.338	0.469	0.644		
αB -crystallin agregrasi	0.306	4.248	0.000	18,041	0,000



Grafik 10. Grafik regresi linier antara ekspresi αB -crystallin lensa dengan derajat katarak pada tikus model diabetes. Keterangan: A. Ekspresi αB -crystallin native lensa; B. Ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi. Y = derajat katarak, X = ekspresi αB -crystallin lensa.

Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0.000 ($p < 0.05$) yang berarti bahwa terdapat pengaruh yang signifikan ekspresi αB -crystallin lensa terhadap derajat katarak/kekeruhan lensa pada tikus model diabetes. Dapat dilihat pada grafik 10 bahwa ekspresi αB -crystallin native lensa berpengaruh nyata dan negatif terhadap derajat kekeruhan lensa tikus model diabetes, sedangkan ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi berpengaruh nyata dan positif atau dengan kata lain dengan meningkatnya ekspresi αB -crystallin native lensa dan menurunnya ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi memberikan gambaran penurunan derajat katarak secara nyata pada tikus model diabetes. Besar pengaruh ekspresi αB -crystallin native lensa terhadap derajat katarak sebesar 68,8% ($R^2 = 0,688$) sedangkan besar pengaruh ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi terhadap derajat katarak sebesar 50,1% ($R^2 = 0,501$).

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Hewan coba model diabetes dan efek jus kecambah brokoli pada kadar gula darah puasa tikus model diabetes

Pemberian STZ dengan cepat menghasilkan tanda-tanda khas diabetes seperti peningkatan asupan air dan makanan, kegagalan penambahan berat badan dan meningkatnya konsentrasi glukosa darah; perubahan ini dipertahankan selama 24 minggu pengamatan. Seperti pada manusia, pada suatu studi, diabetes yang tidak diobati pada tikus meningkatkan kematian karena hanya 52% tikus diabetes yang diinduksi STZ selamat dari diabetes 24 minggu.⁹²

STZ menyebabkan destruksi selektif sel β pankreas yang memproduksi insulin. Sehingga hewan mengalami defisiensi insulin, hiperglikemia, polydipsia, dan polyuria, yang merupakan ciri khas dari *human type 1 diabetes mellitus* (T1DM). Pada penelitian ini, kami menggunakan protokol dasar induksi hewan diabetes dengan pemberian STZ 65mg/kgBB *single dose*. Pada literatur, STZ dosis 50-65 mg/kg dapat menyebabkan hiperglikemia (20-30 mM) tetapi tidak menjadi ketosis berat bahkan jika insulin tidak diberikan. Dosis yang lebih tinggi (≥ 75 mg/kg) menghasilkan ketosis spontan dan kematian dalam beberapa hari jika insulin tidak diberikan.^{91,92}

Namun beberapa hewan dapat mati dengan cepat setelah perlakuan STZ karena sel β pankreas mengalami nekrosis yang luas dan pelepasan insulin secara tiba-tiba yang berakibat fatal pada keadaan hipoglikemia dan biasanya dalam 48 jam injeksi STZ. Untuk mencegah hal ini, yang terbaik adalah secara rutin berikan hewan dengan air sukrosa 10% setelahnya. Jika jumlah kematian hewan $> 20\%$ ketika menggunakan dosis tunggal, maka beri penatalaksanaan hewan dengan 1 ml larutan glukosa 5% intra peritoneal 6 jam sesudah injeksi STZ atau memberikan air sukrosa 10% selama 2 hari setelah injeksi STZ.^{91,95}

Hasil pengukuran kadar glukosa darah puasa dan acak sangat berbeda. Kadar glukosa darah dalam keadaan puasa lebih rendah dan kurang variabel daripada kadar glukosa darah acak. Tidak ada tingkat hiperglikemia standar untuk tikus. Namun, ada dasar umum yang digunakan, yaitu: menggunakan pendekatan membandingkan tes kadar glukosa darah pada kontrol dan kelompok perlakuan STZ dalam eksperimen yang sama; dan hiperglikemia didefinisikan sebagai kadar glukosa darah dalam kelompok perlakuan STZ jauh lebih tinggi dibanding di

kelompok kontrol. Secara umum, kadar glukosa darah acak dalam kelompok perlakuan STZ dikatakan hiperglikemia harus diatas 200 mg/dl (11,1 mmol/liter), sedangkan untuk puasa hewan diabetes glukosa darah harus diatas 150 mg/dl (glukosa 18 mg/dl = 1 mM).^{91,96}

Pada penelitian ini kami menggunakan 5 kelompok tikus yang di awal penelitian merupakan tikus normoglikemik. Dari hasil pengamatan selanjutnya terhadap kadar gula darah puasa didapatkan bahwa kadar GDP > 150 mg/dL pada semua kelompok yang diinjeksi STZ, yaitu pada kelompok kontrol positif dan semua kelompok perlakuan yang didapatkan pada hari ke 3 postinjeksi STZ. Hal ini menandakan bahwa tikus – tikus telah menjadi hiperglikemia pada hari ke 3 setelah injeksi STZ 65mg/kgBB. Hasil ini sesuai dengan yang kami harapkan berdasarkan studi oleh Furman dimana semua tikus menjadi hiperglikemia (GDP > 150 mg/dl) pada hari ke 2 post injeksi STZ 65 mg/kg *single dose* intraperitoneal.⁹¹

Kemudian, pada penelitian ini didapatkan bahwa pada kelompok perlakuan yang diberikan jus kecambah brokoli tampak mengalami penurunan yang signifikan secara statistik pada kadar gula darah puasa akhir dibandingkan kelompok kontrol positif dan semakin besar dosis jus kecambah brokoli yang diberikan ternyata memberikan penurunan gula darah puasa akhir yang lebih besar pula. Tampaknya ini dapat menjadi temuan sekunder pada penelitian ini, bahwa juga terdapat hubungan dan pengaruh yang signifikan secara statistik antara dosis jus kecambah brokoli dengan gula darah puasa akhir tikus model diabetes. Walaupun perbedaan antar kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) tidak menunjukkan adanya perbedaan yang tidak signifikan pada kadar gula darah puasa setelah perlakuan jus kecambah brokoli. Perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan tersebut dapat dikarenakan karena mungkin rentang dosis yang digunakan tidak terlalu bermakna dalam memberikan efek penurunan gula darah puasa yang berbeda signifikan.

Diabetes mellitus tipe 1 ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel inflamasi ke dalam islet pankreas Langerhans, diikuti dengan destruksi selektif dan progresif sel beta yang mensekresi insulin. Leukosit yang menginfiltrasi islet mensekresikan sitokin seperti IL-1 β (interleukin-1 β) dan IFN- γ (interferon- γ), yang berkontribusi terhadap kematian sel beta. Bukti *in vitro* menunjukkan bahwa aktivasi sitokin dari faktor transkripsi NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) adalah komponen penting dari sinyal yang memicu apoptosis sel beta.^{100,101}

Kecambah brokoli adalah sumber yang kaya akan komponen bioaktif termasuk glukosinolat dan flavonoid. Komponen yang sangat penting adalah sulforafan yang merupakan inducer antioksidan kuat dan memiliki konsentrasi yang tinggi pada kecambah brokoli. Selain efek antioksidan, sulforafan juga telah dilaporkan efektif pada kondisi – kondisi yang berkaitan dengan peradangan melalui penghambatan aktivasi NF- κ B. Mekanisme SFN pada metabolisme glukosa ditunjukkan oleh Song et al., pada model diabetes yang diinduksi dengan STZ, yang menunjukkan penurunan produksi ROS dan penghambatan jalur NF- κ B di pankreas, yang menjaga sekresi insulin. Pada penelitian lain oleh Souza et al., yang meneliti efek metabolik pemberian sulforafan oral pada tikus model diabetes yang induksi STZ, juga memberikan hasil dimana pemberian sulforafan dosis 0,1 mg/kg, 0,25 mg/kg dan 0,5 mg/kg per oral melalui sonde sebelum tikus diinjeksi STZ 80 mg/kg menunjukkan kadar GDP, *insulin sensitivity*, dan konsentrasi glikogen hepatic, hampir sama dengan kelompok kontrol (non diabetes), dan berbeda signifikan dengan kelompok diabetes.^{102,103}

Studi lain oleh Axelsson et al, mempelajari efek sulforafan pada produksi glukosa menggunakan H4IIE (sel line tikus hepatoma) yang telah diberikan konsentrasi palmitat yang tinggi (250 mM) untuk menyerupai kondisi diabetogenik. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar pengurangan yang dimediasi oleh SFN pada produksi glukosa dimediasi melalui Nrf2, meskipun tidak menyingkirkan kemungkinan bahwa mekanisme lain juga terlibat. Pada penelitian tersebut juga dianalisis ekspresi gen yang terlibat dalam glukoneogenesis (*PCK1/Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1*), yaitu penentu utama produksi glukosa hati. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi *PCK1 down-regulation* oleh sulforafan sebagian besar dimediasi melalui Nrf2. Sehingga, pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sulforafan mengurangi produksi glukosa, sebagian melalui translokasi Nrf2 dan penurunan ekspresi enzim penting pada glukoneogenesis, serta sulforafan juga melindungi terhadap komplikasi diabetes pada hewan model karena efek antioksidannya.⁸⁵

6.2. Efek jus kecambah brokoli terhadap derajat kekeruhan lensa/katarak tikus model diabetes

Pemeriksaan derajat kekeruhan lensa tikus dilakukan dengan bantuan slit lamp biomikroskopi sebelum dilakukan enukleasi pada semua kelompok tikus. Secara teori kondisi hiperglikemia menyebabkan radikal bebas atau ROS yang berlebih, defisit antioksidan dan pada akhirnya menjadi stres oksidatif. Hiperglikemia meningkatkan konsentrasi radikal bebas melalui glikasi protein (glikasi enzimatis), autooksidasi glukosa (autooksidasi monosakarida) dan peningkatan jalur poliol. Stres oksidatif diyakini merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam terjadinya katarak, dimana stress oksidatif ini akan berujung pada kerusakan membran sel, lisosom, mitokondria, DNA, maupun serabut lensa, termasuk protein lensa sehingga mengganggu transparansi lensa dan menyebabkan lensa menjadi keruh.^{15,16}

Penelitian oleh Wei et al yang mengamati beberapa komplikasi kronis yang timbul akibat perlakuan streptozotocin (STZ; 65 mg/kg) pada tikus Wistar jantan usia 8 minggu, dimana komplikasi katarak bilateral berkembang lebih awal, dengan perubahan lensa dalam bentuk kekeruhan dibagian posterior yang diamati pada 4 minggu pada tikus yang diberi STZ. Perkembangan katarak bersifat progresif menjadi katarak berat hingga menyebabkan kebutaan pada kedua mata diduga telah terjadi di semua mata pada pengamatan 16 minggu paska perawatan.⁹²

Penelitian lain oleh Kametaka et al juga mengamati pembentukan katarak pada tikus model diabetes yang diinduksi STZ 65mg/kg *single dose*. Pada penelitian ini katarak ditemukan pada 50% lensa tikus diabetes pada minggu ke 2 setelah induksi diabetes. Selanjutnya, katarak mengalami progresifitas tergantung pada lama periode diabetesnya. Pada 9 minggu post induksi diabetes, didapatkan 78% lensa tikus diabetes berkembang menjadi katarak hiper matur. Sedangkan penelitian oleh Wang et al, katarak telah terjadi pada tikus model diabetes yang diinduksi STZ 65mg/kg *single dose* pada pengamatan minggu ketiga post injeksi STZ menggunakan pemeriksaan *slit lamp*.^{4,104}

Pada hasil penelitian ini didapatkan seluruh lensa jernih pada kelompok kontrol negatif (tikus normal), dan pada kelompok kontrol positif, didapatkan kekeruhan lensa dengan rentang derajat 2 – 4 pada akhir minggu ke 4 (akhir penelitian). Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 yaitu yang mendapatkan jus kecambah brokoli dosis 1 gram/hari memiliki derajat kekeruhan katarak paling

ringan dibandingkan kelompok perlakuan 1 dan 2. Didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan. Selain itu juga didapatkan hubungan dan pengaruh yang signifikan dan bernilai negatif antara dosis jus kecambah brokoli terhadap derajat kekeruhan katarak pada tikus model diabetes. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian jus kecambah brokoli yang semakin besar, maka semakin sedikit kekeruhan lensa yang terjadi. Namun perbandingan antar kelompok P1 dan P2, P1 dan P3, serta P2 dengan P3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Hal ini juga mungkin disebabkan karena rentang dosis yang kurang bermakna (terlalu kecil) dalam memberikan efek terhadap derajat kekeruhan lensa yang berbeda signifikan.

Menurut teori dan hipotesa kami bahwa jus kecambah brokoli yang mengandung banyak senyawa antioksidan yang akan menurunkan ROS dan mencegah agregasi protein lensa yang menyebabkan kekeruhan katarak. Efek antioksidan yang dihasilkan oleh jus kecambah brokoli adalah berasal dari sulforafan dan senyawa fenolik lainnya seperti flavonoid yang akan meningkatkan mekanisme pertahanan terhadap stress oksidatif melalui jalur Nrf2/ARE. Kedua senyawa bioaktif ini meningkatkan translokasi Nrf2 ke nukleus yang menyebabkan Nrf2 berikatan dengan ARE dan mengaktifkan transkripsi beberapa gen antioksidan, termasuk glutathione yang akan menurunkan stress oksidatif. Selain itu juga antioksidan yang tinggi juga mampu menurunkan kadar gula darah sebagian melalui translokasi Nrf2 dan sebagian lagi melalui penurunan ekspresi enzim penting pada glukoneogenesis, sehingga kadar gula darah yang turun juga akan menurunkan akumulasi sorbitol yang selanjutnya dapat mengurangi stress oksidatif akibat akumulasi sorbitol.⁸⁵

Penelitian oleh Liu et al, yang menginvestigasi efek sulforafan dalam menghambat onset katarak menggunakan sel line epitelial lensa manusia dan kultur lensa babi, menunjukkan bahwa pemberian sulforafan pada konsentrasi rendah (1 μM dan 2 μM) menunjukkan kemampuan melindungi sel lensa manusia terhadap stress oksidatif yang berpotensi menghambat onset katarak melalui signaling Nrf2, dimana Nrf2 translokasi ke nukleus pada pemberian sulforafan 0.5 - 2.0 μM .⁷³

6.3. Efek jus kecambah brokoli terhadap ekspresi αB -crystallin lensa tikus model diabetes

Protein α -crystallin, merupakan protein yang paling dominan di lensa mata, memiliki berat molekul monomer sekitar 20 kDa, sehingga pita – pita pada kisaran berat molekul 20kDa pada gel kemungkinan besar adalah αB -crystallin native. Sedangkan ekspresi αB -crystallin lensa pada pita dengan intensitas yang lebih besar pada berat molekul yang lebih tinggi yaitu di sekitar 45kDa mungkin merupakan agregasi heteromik kompleks αB -crystallin lensa. Pada *Western Blot*, adanya peningkatan ekspresi ditunjukkan melalui nilai intensitas pita yang lebih tebal pada protein target (αB -crystallin).¹⁰⁵

Crystallin lensa merupakan protein lensa yang berfungsi menjaga ketransparanan dari lensa dan α -crystallin memiliki fungsi tambahan sebagai *chaperone* yang menjaga struktur asli protein tersebut, protein lainnya serta enzim – enzim lainnya, sehingga dia berfungsi mencegah agregasi protein yang didenaturasi oleh oksidasi, panas, dan stressor lainnya, namun dia tidak mampu mengembalikan bentuk asli protein yang sudah mengalami modifikasi. *Crystallin* adalah protein yang stabil secara intrinsik, *tightly folded* dalam bentuk aslinya namun mengalami modifikasi non-enzimatik major terhadap struktur dan fungsinya sejak awal kehidupan. Perubahan meliputi tiolasi, deamidasi, glikasi, karbamilasi, cis-metilasi, fosforilasi dan asetilasi dan juga proteolisis, menyebabkan *crystallin* menjadi *unfolded* dan *insoluble*, serta terjadi pemotongan dan pelepasan fragmen *crystallin*. Pemotongan C-terminal αA - dan αB -crystallin mempengaruhi oligomerisasi dan pertukaran subunit dan menyebabkan hilangnya aktivitas *chaperone*, dengan menghapus bagian dari *sequence* yang mengatur *chaperone-substrate complex* dalam bentuk yang mudah larut.^{11,102}

Protein yang denaturasi dan *unfolded* rentan terhadap oksidasi dan protein lensa tidak terkecuali. Hal ini disebabkan oleh penurunan kemampuan antioksidan lensa, dan memicu akumulasi *mixed disulphide*, *disulphide cross-linked crystallin* dan *oxidized methionine residu*. Oksidasi αA - dan αB -crystallin juga terjadi, memicu perubahan struktural dan hilangnya aktivitas *chaperone*.¹¹

Serangan oksidatif pada *unfolded crystallin* atau yang telah mengalami modifikasi menyebabkan *cross-linked*, *insoluble* dan pembentukan agregat dengan berat molekul tinggi. Hal ini selanjutnya dapat mengganggu *short-range order* dari *crystallin*, di satu sisi menyebabkan kehilangan transparansi lensa dan pada sisi lain terjadi pengerasan progresif, terutama dari nukleus lensa.¹¹

Tingginya konsentrasi protein *crystallin* menentukan indeks refraksi yang tinggi yang diperlukan untuk transparansi lensa mata. Penurunan ekspresi α -*crystallin* dapat berakibat adanya gangguan densitas dan struktur protein α -*crystallin* tersebut yang dapat menyebabkan munculnya kekeruhan lensa dan agregasi *crystallin* lainnya. Perubahan ekspresi gen selama perkembangan katarak berhubungan dengan kerusakan lapisan sel epitel lensa atau sistem enzimatisnya. Perkembangan manifestasi klinis katarak pada stadium awal berhubungan dengan perubahan ekspresi gen *crystallin*. Pada penelitian oleh Rumyantseva et al menunjukkan bahwa stadium awal perkembangan katarak ditandai dengan penurunan secara signifikan pada ekspresi gen αA - dan αB -*crystallin* pada tikus OXYS, yang semakin nampak dengan progresifitas kataraknya.¹⁰⁶

Namun beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekspresi gen αB -*crystallin* berhubungan dengan stres oksidatif. Hiperglikemia persisten selama diabetes yang tidak terkontrol diketahui dapat menyebabkan stres oksidatif, yang telah terlibat dalam berbagai komplikasi sekunder diabetes. Stres oksidatif yang meningkat tampaknya menjadi stimulus utama untuk meningkatkan ekspresi dari αA - dan αB -*crystallin* dalam jaringan tikus diabetes dan peningkatan ekspresi α -*crystallin* mungkin memiliki peran protektif terhadap stres metabolik. Pada penelitian oleh Kumar et al, yang menyelidiki peningkatan ekspresi αA - dan αB -*crystallin* pada tikus model diabetes yang diinduksi streptozotocin (STZ) diberbagai jaringan menggunakan RT-PCR dan *immunoblotting*. Pada penelitian tersebut ekspresi αB -*crystallin* tercatat dalam berbagai jaringan yang diperiksa seperti kornea, lensa, saraf optik, retinal glia, astrosit, sel Muller, jantung, otot skeletal, kulit, ginjal, otak dan paru-paru. Sedangkan ekspresi αA -*crystallin* hanya terdeteksi pada lensa dan retina. Terdapat peningkatan kadar αA - dan αB -*crystallin* pada tikus model diabetes dibandingkan kontrol. Peningkatan stress oksidatif tampaknya menjadi stimulus utama untuk peningkatan ekspresi αA - dan αB -*crystallin* dalam jaringan tikus diabetes dan hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi αA - dan αB -*crystallin* di beberapa jaringan mungkin memiliki implikasi dalam patofisiologi komplikasi diabetes. Meningkatnya ekspresi αA - dan αB -*crystallin*, mungkin terkait dengan peningkatan kerusakan oksidatif pada jaringan diabetes dimana peningkatan ekspresi αA - dan αB -*crystallin* mungkin merupakan suatu adaptasi seluler sebagai mekanisme perlindungan terhadap stress metabolik dan lingkungan. Penelitian lain, yaitu oleh Manikandan et al yang

melihat ekspresi αA - dan αB -crystallin pada tikus model katarak juga menunjukkan adanya level αA - dan αB -crystallin lensa yang lebih tinggi pada tikus katarak yang diinduksi selenium dibandingkan kontrol. Pada penelitian oleh Manikandan et al, kadar αA - dan αB -crystallin diperiksa pada akhir penelitian yaitu setelah 24 jam perlakuan tikus. Sedangkan pada studi oleh Kamei et al, menunjukkan bahwa fosforilasi αA - dan αB -crystallin meningkat setelah terjadi katarak pada lensa tikus

99,107,108

Pada penelitian kami didapatkan penurunan ekspresi αB -crystallin native lensa disertai dengan peningkatan αB -crystallin agregrasi pada kelompok kontrol positif yakni kelompok tikus diabetes yang tidak mendapatkan perlakuan jus kecambah brokoli dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan perbedaannya signifikan secara statistik. Sebenarnya αA - and αB -crystallin termasuk dalam keluarga *small heat shock protein* (sHsp) yang dipicu atau ditingkatkan kadarnya oleh stres panas, stres osmotik dan stres oksidatif. Kemungkinan telah terjadi peningkatan kadar α -crystallin lensa sebagai respons seluler terhadap stres yang disebabkan kondisi hiperglikemia. Peningkatan ekspresi α -crystallin merupakan suatu adaptasi sel lensa yang sangat penting dan vital sebagai mekanisme perlindungan terhadap stres lingkungan dan/atau metabolik. Namun mungkin peningkatan α -crystallin yang berfungsi sebagai *chaperone* tidak seimbang dengan agregasi protein lensa oleh karena stress oksidatif yang ada. Stress oksidatif menyebabkan forforilasi *crystallin* lensa termasuk α -crystallin. αA - dan αB -crystallin yang teroksidasi memicu perubahan strukturalnya sendiri dan kehilangan aktivitas *chaperonenya*, sehingga tidak mampu mencegah agregasi protein lainnya maupun proteinnya sendiri yang dalam penelitian ini ditunjukkan dengan penurunan ekspresi *native αB -crystallin* dan peningkatan αB -crystallin agregrasi, yang selanjutnya berdampak pada kekeruhan lensa.

99,107,109

Sedangkan pada kelompok perlakuan pada penelitian ini juga didapatkan ekspresi αB -crystallin native lensa lebih tinggi dan ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif. Semakin besar dosis jus kecambah brokoli yang diberikan, terdapat peningkatan ekspresi αB -crystallin native dan penurunan ekspresi αB -crystallin lensa agregrasi. Nampaknya pemberian jus kecambah brokoli dengan kandungan antioksidannya mampu menekan stress oksidatif yang mengakibatkan agregasi protein lensa. Sehingga ekspresi αB -crystallin native lebih besar dibandingkan kontrol positif karena masih

lebih banyak konsentrasi *α B-crystallin* yang dalam bentuk asli atau tidak teroksidasi. *α B-crystallin* yang ada juga akan membantu memberikan perlindungan melalui aktivitas chaperonnya yang akan mencegah agregasi protein lainnya maupun proteinnya sendiri, sehingga kekeruhan lensa dapat dihambat. Salah satunya ditunjukkan dengan ekspresi *α B-crystallin* agregasi yang lebih rendah. Hal ini sesuai dengan gambaran kekeruhan lensa yang lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol positif. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian oleh Manikandan et al, namun hal ini mungkin dikarenakan perlakuan tikus pada penelitian oleh Manikandan et al adalah 24 jam sedangkan pada penelitian kami lebih lama yaitu 28 hari. Dalam tahap awal akibat stress oksidatif yang tinggi memicu peningkatan kadar dari *α -crystallin* yang merupakan suatu adaptasi sel lensa sebagai mekanisme perlindungan terhadap stres lingkungan dan/atau metabolik. Namun, pada keadaan dimana tidak tercapainya keseimbangan antara peningkatan *α -crystallin* yang berfungsi sebagai *chaperone* dengan agregasi protein lensa yang terjadi oleh karena stress oksidatif yang ada, kerusakan lensa mata terus terakumulasi dengan berjalannya waktu dan kekeruhan lensa/katarak tidak dapat dihindari di kemudian hari.^{99,109}

6.4. Hubungan antara kadar glukosa, derajat katarak dan ekspresi *α B-crystallin* lensa pada tikus model diabetes

Pada hasil penelitian kami didapatkan tikus dengan kadar glukosa paling tinggi memiliki derajat kekeruhan lensa yang paling berat, ekspresi *α B-crystallin* lensa yang paling sedikit dan ekspresi *α B-crystallin* lensa agregasi yang paling tinggi dibandingkan kelompok dengan kadar glukosa yang lebih rendah. Walaupun tidak semua hubungan antar variabel (GDP, derajat kekeruhan katarak, ekspresi *α B-crystallin* native lensa dan ekspresi *α B-crystallin* lensa agregasi) adalah signifikan. Pada kenyataannya mungkin kadar gula tikus tidak selalu sama selama perlakuan dengan GDP yang didapatkan pada akhir penelitian atau dengan kata lain terdapat fluktuasi kadar gula darah selama perlakuan. Selain itu, menurunnya derajat katarak yang didapatkan pada kelompok perlakuan jus kecambah brokoli dibandingkan kontrol positif adalah tidak selalu disebabkan oleh kadar gula darah yang normal atau terkontrol, karena tidak semua gula darah pada akhir penelitian kami menjadi normal, namun penurunan derajat katarak juga bisa disebabkan oleh karena efek langsung dari kandungan antioksidan dalam jus kecambah brokoli yang menurunkan stress oksidatif melalui aktivasi jalur Nrf2/ARE. Pada sesama

tikus diabetes, kami juga mengamati bahwa derajat katarak tidak sama dikedua mata pada 1 tikus, walaupun gula darah mereka sama. Hal ini juga disebabkan karena stres oksidatif yang ada akan mempengaruhi banyak organ dalam tubuh, salah satunya lensa. Sehingga kekeruhan lensa yang terjadi akibat stres oksidatif juga tidak serta merta sama pada kondisi stres oksidatif yang sama.

Secara teori kadar gula darah yang lebih rendah berarti juga akan menyebabkan akumulasi sorbitol yang lebih sedikit. Seperti yang kita tahu bahwa stres osmotik disebabkan oleh akumulasi sorbitol yang kemudian akan menginduksi stres di *endoplasmic reticulum* (ER), tempat utama terjadinya sintesa protein, sehingga memicu timbulnya radikal bebas. Stres ER juga dihasilkan dari fluktuasi kadar glukosa, kemudian menginisiasi *unfolded protein response* (UPR) yang menghasilkan ROS dan menyebabkan stres oksidatif yang dapat merusak serat lensa.^{15,16}

Selain itu perubahan glukosa menjadi sorbitol pada jalur poliol yang meningkat banyak memakai NADPH, sehingga NADPH yang tersisa tinggal sedikit dan banyak GSSH yang tidak bisa dikembalikan ke bentuk GSH lagi (terjadi penurunan aktifitas *gluthation redox cycle*). Penurunan kadar GSH akan menyebabkan banyak H_2O_2 tidak dapat dinetralkan sehingga terjadi stres oksidatif.^{15,16}

Sedangkan autooksidasi glukosa juga dapat menghasilkan senyawa dikarbonil yang reaktif dan senyawa oksigen reaktif seperti radikal superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH). Glukosa dapat teroksidasi sebelum berikatan dengan protein demikian juga glukosa setelah berikatan dengan protein (*glycated protein*) dapat teroksidasi menghasilkan ROS. Reaksi glikasi nonenzimatik protein kristalin akan menimbulkan *cross-linked* antar dan intra molekul protein sehingga terjadi penambahan protein dengan berat molekul tinggi, yang menyebabkan penurunan tingkat kelarutan protein dan merusak kejernihan lensa serta terjadi katarak. Kombinasi glikasi dan oksidasi glukosa menghasilkan pembentukan AGE (*advanced glycation end products*). Akumulasi AGE pada protein lebih lanjut diikuti dengan *browning*, peningkatan *fluorescence* dan *cross-linked*. Proses pembentukan AGE merupakan proses irreversibel yang berlangsung lama dan dapat menimbulkan kerusakan jaringan.^{15,16}

Keseimbangan antara ketersediaan antioksidan dan terbentuknya radikal bebas mempunyai arti penting dalam menjaga lingkungan di dalam sel. Apabila

ketersediaan antioksidan tidak mampu menetralkan radikal bebas, akan timbul stress oksidatif yang berujung pada kerusakan membran sel, lisosom, mitokondria, DNA, maupun serabut lensa. Stres oksidatif diyakini merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam terjadinya katarak.^{15,16}

Suatu stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid membran plasma serabut lensa. Pada proses peroksidasi lipid, bahan teroksidasi akan mengambil atom hidrogen dari asam lemak tidak jenuh, sehingga terbentuk radikal asam lemak dan seterusnya dengan oksigen akan terbentuk radikal peroksi lipid. Reaksi ini dapat memperbanyak rantai, yang menyebabkan pembentukan lipid peroksida (LOOH) serta akhirnya terjadi hasil utama pemecahan berupa MDA. Malondialdehid dihipotesiskan mampu bereaksi silang dengan lipid membran maupun protein membran, yang akhirnya fungsi normal membran terganggu.^{15,16}

Radikal bebas dapat bereaksi langsung dengan molekul-molekul DNA dan menimbulkan kerusakan. Radikal bebas dapat juga merusak protein maupun lipid membran sel pada korteks lensa. Kerusakan dalam serabut lensa mengakibatkan polimerisasi dan ikatan silang antara lipid dan protein, serta akhirnya terjadi peningkatan jumlah protein lensa yang tidak larut air, yang selanjutnya akan mengganggu transparansi lensa atau menyebabkan lensa menjadi keruh.^{15,16}

Sedangkan hubungannya dengan ekspresi αB -crystallin, menurut teori bahwa penurunan ekspresi αA - dan αB -crystallin dapat mengganggu homeostasis normal epitel lensa karena peran pentingnya dalam kelangsungan hidup dan proliferasi sel lensa. Penurunan α -crystallin mempengaruhi ikatan pada protein yang rusak atau protein yang sebagian *unfolded* dan selanjutnya mempengaruhi pencegahan agregasi protein yang luas.¹¹⁰

6.5. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini tidak lepas dari beberapa keterbatasan. Keterbatasan penelitian ini adalah bahwa pada penelitian ini kami tidak mengukur kadar dan jenis antioksidan yang terkandung dalam sekian gram jus kecambah brokoli. Sehingga kami tidak cukup mampu menunjukkan seberapa besar kadar antioksidan dan antioksidan mana yang lebih mampu memberikan efek dalam mencegah agregasi protein lensa. Penelitian ini juga merupakan penelitian pertama yang dilakukan untuk melihat efek jus kecambah brokoli terhadap agregasi protein lensa, sehingga dosis yang digunakan dan variasinya ternyata kurang memiliki rentang yang bermakna dalam memberikan efek mencegah

agregasi protein lensa. Selain itu, pada penelitian ini, kami hanya melakukan pemeriksaan pada akhir penelitian (tidak dilakukan secara berkala), sehingga kami tidak mampu menilai onset maupun progresifitas dari katarak diabetik itu sendiri.



BAB VII

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Pemberian jus kecambah brokoli dosis 0,25 gram, 0,5 gram dan 1 gram menunjukkan efek atau pengaruh yang signifikan dalam mencegah agregasi protein lensa pada tikus model diabetes, dimana semakin tinggi dosis yang diberikan akan semakin memberikan gambaran derajat kekeruhan lensa yang lebih ringan, ekspresi *α B-crystallin native* lensa yang lebih tinggi dan ekspresi *α B-crystallin* agregasi lensa yang lebih rendah.

7.2. Saran

Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang dilakukan untuk melihat efek jus kecambah brokoli terhadap agregasi protein lensa, yang salah satunya ditunjukkan melalui ekspresi *α B-crystallin* lensa, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk dengan menambahkan variasi dosis dan perlakuan sehingga dapat ditentukan dosis efektif dan lebih baik diketahui juga kandungan antioksidan yang ada dalam tiap gram dosis jus kecambah brokoli yang digunakan yang berperan dalam menjaga ekspresi *α B-crystallin* lensa. Selain itu perlu juga dilakukan penelitian lebih lanjut dengan pemeriksaan yang dilakukan secara berkala dimulai dengan waktu yang lebih singkat, misalnya pengamatan pada minggu pertama, kedua dan selanjutnya untuk melihat efek jus kecambah brokoli dalam menghambat onset dan progresifitas dari katarak.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mariotti SP, Pascolini D. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(5):614-8.
2. American Academy of Ophthalmology Staff. Epidemiology of Cataract. In: American Academy of Ophthalmology Staff, editors, Basic and Clinical Science Course: Lens and Cataract. San Francisco: American Academy of Ophthalmology. 2016-2017;11(1):28-31.
3. American Academy of Ophthalmology Staff. Pathology. In: American Academy of Ophthalmology Staff, editors, Basic and Clinical Science Course: Lens and Cataract. San Francisco: American Academy of Ophthalmology. 2016-2017;11(5):94-98.
4. Wang F, Ma J, Han F, Guo X, Meng L, Sun Y, Jin C, Duan H, Li H, Peng Y. DL-3-n-butylphthalide delays the onset and progression of diabetic cataract by inhibiting oxidative stress in rat diabetic model. *Scientific Reports*. 2016;6:1-9.
5. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, Fernandes DC, Ohlrogge AW, Malanda B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*. 2018;138:271-281.
6. Villarreal-García D, Jacobo-Velázquez DA. Glucosinolates from broccoli: Nutraceutical properties and their purification. *iMedPub Journals. Current Trends in Nutraceuticals*. 2016;1(1):1-6.
7. Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2012;64:503– 508.
8. Liu X, Hao J, Xie T, Malik TH, Lu C, Liu C, Shu C, Lu C, Zhou D. Nrf2 as a target for prevention of age-related and diabetic cataracts by against oxidative stress. *Aging Cell*. 2017:1-9.
9. Herr I, Büchler MW. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2010;36:377-383.
10. American Academy of Ophthalmology Staff. Anatomy. In: American Academy of Ophthalmology Staff, editors, Basic and Clinical Science Course: Lens and Cataract. San Francisco: American Academy of Ophthalmology. 2016– 2017;11(2):32-38.
11. Michael R, Bron AJ. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2011;366:1278–1292.
12. American Academy of Ophthalmology Staff. Biochemistry and Physiology. In: American Academy of Ophthalmology Staff, editors, Basic and Clinical Science Course: Lens and Cataract. San Francisco: American Academy of Ophthalmology. 2016– 2017;11(3):39-49.
13. Giblin FJ. Glutathione: A Vital Lens Antioxidant. *Journal Of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2000;16(2):121-135.
14. Reddy VN. Glutathione and its Function in the Lens-An Overview. *Exp. Eye RCS*. 1990; 50:771-778.
15. Pollreis A, Schmidt-Erfurth U. Diabetic Cataract – Pathogenesis, Epidemiology and Treatment. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Ophthalmology*. 2010:1-8.
16. Mandal A. Diabetic Cataract: Pathogenesis And Management with Focus on Potential Pharmacotherapeutics. *SIES Journal of Pharma-Bio Management*. 2013;1(1):1-13.

17. Obrosova IG, Chung SSM, Kador P. Diabetic cataracts: mechanisms and management. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2010;26(3):172-180.
18. Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology*. 2006;13:151-162.
19. Stanga PE, Boyd SR, Hamilton AMP. Ocular manifestations of diabetes mellitus. *Current Opinion in Ophthalmology*. 1999;10(6):483-489.
20. American Academy of Ophthalmology Staff. Surgery for Cataract. In: American Academy of Ophthalmology Staff, editors, *Basic and Clinical Science Course: Lens and Cataract*. San Francisco: American Academy of Ophthalmology. 2016-2017;11(8):128-176.
21. Sadiq SA, Chatterjee A, Vernon SA. Progression of diabetic retinopathy and rubeotic glaucoma following cataract surgery. *Eye*. 1995;9(6):728-738.
22. Tranos PG, Wickremasinghe SS, Stangos NT, Topouzis F, Tsinopoulos I, Pavesio CE. Macular edema. *Survey of Ophthalmology*. 2004;49(5):470-490.
23. Hykin PG, Gregson RMC, Stevens JD, Hamilton PAM. Extracapsular cataract extraction in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 1993;100(3):394-399.
24. Chew EY, Benson WE, Remaley NA. Results after lens extraction in patients with diabetic retinopathy: early treatment diabetic retinopathy study report number 25. *Archives of Ophthalmology*. 1999;117(12):1600-1606.
25. Pande MV, Spalton DJ, Kerr-Muir MG, Marshall J. Postoperative inflammatory response to phacoemulsification and extracapsular cataract surgery: aqueous flare and cells. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 1996;22:770-774.
26. Liu Y, Luo L, He M, Liu X. Disorders of the blood-aqueous barrier after phacoemulsification in diabetic patients. *Eye*. 2004;18(9):900-904.
27. Mittra RA, Borrillo JL, Dev S, Mieler WF, Koenig SB. Retinopathy progression and visual outcomes after phacoemulsification in patients with diabetes mellitus. *Archives of Ophthalmology*. 2000;118(7):912-917.
28. Krepler K, Biowski R, Schrey S, Jandrasits K, Wedrich A. Cataract surgery in patients with diabetic retinopathy: visual outcome, progression of diabetic retinopathy, and incidence of diabetic macular oedema. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2002;240(9): 735-738.
29. Squirrell D, Bhola R, Bush J, Winder S, Talbot JF. A prospective, case controlled study of the natural history of diabetic retinopathy and maculopathy after uncomplicated phacoemulsification cataract surgery in patients with type 2 diabetes. *British Journal of Ophthalmology*. 2002;86(5): 565-571.
30. Liao SB, Ku WC. Progression of diabetic retinopathy after phacoemulsification in diabetic patients: a three-year analysis. *Chang Gung Medical Journal*. 2003;26(11):829-834.
31. Matsumoto T, Ono Y, Kuromiya A, Toyosawa K, Ueda Y, Bril V. Long-term treatment with ranirestat (AS-3201), a potent aldose reductase inhibitor, suppresses diabetic neuropathy and cataract formation in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2008;107(3):340-348.
32. Drel VR, Pacher P, Ali TK, et al. Aldose reductase inhibitor fidarestat counteracts diabetes-associated cataract formation, retinal oxidative-nitrosative stress, glial activation, and apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*. 2008;21(6):667-676.

33. Yoshida M, Kimura H, Kyuki K, Ito M. Combined effect of vitamin E and insulin on cataracts of diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(3):338-344.
34. Ferlemi A, Makri OE, Georgakopoulos CD, Lamari FN. In Search of A Natural Treatment of Cataract. *Med Aromat Plants*. 2013;2(2):1-3.
35. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli Sprouts: An Exceptionally Rich Source Of Inducers Of Enzymes That Protect Against Chemical Carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*. 1997;94:10367–10372.
36. Jusuf NK. Pengaruh Ekstrak Bunga Brokoli (*Brassica Oleracea* L. Var. *Italica* Plenck) terhadap Penghambatan Penuaan Kulit Dini (Photoaging): Kajian pada Ekspresi Matriks Metalloproteinase-1 dan Prokolagen Tipe 1 Secara In Vitro Pada Fibroblas Kulit Manusia. Disertasi Universitas Sumatera Utara Medan. 2012:30-35.
37. Dalimarta S. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid 2. Jakarta: Niaga Swadaya. 1999:25-6.
38. Ravikumar C. Therapeutic Potential of *Brassica oleracea* (Broccoli) - A Review. *International Journal of Drug Development and Research*. 2015;7(2):9-10.
39. American Chemical Society. Ensuring broccoli sprouts retain their cancer-fighting compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017
40. Rukmana R. Brokoli. Yogyakarta: Penerbit Kanisius. 1994:15-26.
41. Sami FJ, Rahimah S. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Brokoli (*Brassica Oleracea* L. Var. *Italica*) dengan Metode Dpph (2,2 Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) dan Metode Abts (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 2015;2(2):107-110.
42. Palak, Soni K, Thakur A, Kohli K. Broccoli: An Insight into Formulation and Patentability Aspects. *Drug Designing*. 2016;5(3):1-12.
43. Ferruzza S, Natella F, Ranaldi G, Murgia C, Rossi C, Trošt K, Mattivi F, Nardini M, Maldini M, Giusti AM, Moneta E, Scaccini C, Sambuy Y, Morelli G, Baima S. Nutraceutical Improvement Increases The Protective Activity of Broccoli Sprout Juice in a Human Intestinal Cell Model of Gut Inflammation. *Pharmaceuticals*. 2016;9(48):1-18.
44. Bauman H, Darby S. Food as Medicine: Broccoli (*Brassica oleracea*, *Brassicaceae*). *HerbalEGram*. 2016;13(3):1-4.
45. Jeffery EH, Brown AF, Kurilich AC, Keck AS, Matusheski N, Klein BP, Juvik JA. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003;16:323–330.
46. Dominguez-Perles R, Martinez-Ballesta MC, Carvajal M, Garcia-Viguera C, Moreno DA. Broccoli-Derived By-Products—A Promising Source of Bioactive Ingredients. *JFS C: Food Chemistry*. 2019;75(4):383-393.
47. Nestle M. Broccoli sprouts as inducers of carcinogen-detoxifying enzyme systems: Clinical, dietary, and policy implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 11149–11151.
48. Moreno DA, Carvajal M, López-Berenguer C, García-Viguera C. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;41:1508–1522.
49. Tian M, Xu X, Hu H, Liu Y, Pan S. Optimisation of enzymatic production of sulforaphane in broccoli sprouts and their total antioxidant activity at different growth and storage days. *J Food Sci Technol*. 2017; 54(1):209–218

50. Guo L, Yang R, Wang Z et al. Glucoraphanin, sulforaphane and myrosinase activity in germinating broccoli sprouts as affected by growth temperature and plant organs. *J Funct Foods*. 2014;9:70–77.
51. Pe´rez-Balibrea S, Moreno DA, Garcı´a-Viguera C. Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. *J Sci Food Agric*. 2008; 88:904–910.
52. Matusheski NV, Jeffery EH., Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J. Agric. Food Chem*. 2001;49:5743–5749.
53. Basten GP, Bao Y, Williamson G. Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDPglucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis*. 2002;23:1399–1404.
54. Mithen R, Faulkner K, Magrath R, Rose P, Williamson G, Marquez J. Development of isothiocyanate-enriched broccoli, and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells. *Theor. Appl. Genet*. 2003;106:727–734.
55. Cramer JM, Jeffery EH. Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men. *Nutr Cancer*. 2011;63(2):196-201.
56. Guo L , Yang R, Wang Z, Gu Z. Effect of freezing methods on sulforaphane formation in broccoli sprouts. *RSC Adv*. 2015;5:32290-32297.
57. Brown PD, Morra MJ. Hydrolysis products of glucosinolates in Brassica napus tissue as inhibitors of seed germination. *Plant and Soil*. 1996;181: 307–316.
58. Bricker, GV. Thermally Processing Broccoli Sprouts Impacts the Metabolism of Bioactive Isothiocyanates in Mice. The Ohio State University. 2012:1-12.
59. Rungapamestry V, Duncan AJ, Fuller Z, Ratcliffe B. Effect of cooking brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *Proc Nutr Soc*. 2007;66(1):69-81.
60. Liu H. Investigating The Putative Therapeutic Effects Of Sulforaphane In The Human Lens. School Of Biological Sciences. 2013:1-177.
61. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1998; 7(12):1091-100.
62. Bheemreddy RM, Jeffery EH. The metabolic fate of purified glucoraphanin in F344 rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(8):2861-6.
63. Brüsewitz G, Cameron BD, Chasseaud LF, Görler K, Hawkins DR, Koch H, Mennicke WH. The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate. *Biochemical Journal*. 1977; 162(1):99-107.
64. Görler K, Krumbiegel G, Mennicke WH, Siehl HU. The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate in guinea-pigs and rabbits. *Xenobiotica*. 1982; 12(9):535-42.
65. Gasper AV, Al-Janobi A, Smith JA, Bacon JR, Fortun P, Atherton C, Taylor MA, Hawkey CJ, Barrett DA, Mithen RF. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 82(6):1283-91.
66. Conaway CC, Jiao D, Chung FL. Inhibition of rat liver cytochrome P450 isozymes by isothiocyanates and their conjugates: a structure-activity relationship study. *Carcinogenesis*. 1996; 17(11):2423-7.

67. Bhattacharya A, Li Y, Geng F, Munday R, Zhang Y. The principal urinary metabolite of allyl isothiocyanate, N-acetyl-S-(N-allylthiocarbamoyl) cysteine, inhibits the growth and muscle invasion of bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2012; 33(2):394-8.
68. Clarke JD, Hsu A, Williams DE, Dashwood RH, Stevens JF, Yamamoto M, Ho E. Metabolism and tissue distribution of sulforaphane in Nrf2 knockout and wild-type mice. *Pharmaceutical Research*. 2011; 28(12):3171-9.
69. Conaway CC, Getahun SM, Liebes LL, Pusateri DJ, Topham DK, Botero-Omary M, Chung FL. Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutrition and Cancer*. 2000; 38(2):168-78.
70. Bollard M, Stribbling S, Mitchell S, Caldwell J. The disposition of allyl isothiocyanate in the rat and mouse. *Food and Chemical Toxicology*. 1997; 35(10-11):933-4.
71. Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett*. 2008; 269(2): 291–304.
72. Shapiro TA, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Stephenson KK, Wade KL, Ye L, Talalay P. Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutrition and Cancer*. 2006; 55(1):53-62.
73. Liu H, Smith AJO, Lott MC, et al. Sulforaphane can protect lens cells against oxidative stress: implications for cataract prevention. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:5236–5248.
74. Egner PA, Chen JG, Wang JB, Wu Y, Sun Y, Lu JH, Zhu J, Zhang YH, Chen YS, Friesen MD, Jacobson LP, Muñoz A, Ng D, Qian GS, Zhu YR, Chen TY, Botting NP, Zhang Q, Fahey JW, Talalay P, Groopman JD, Kensler TW. Bioavailability of sulforaphane from two broccoli sprout beverages: results of a short-term, cross-over clinical trial in Qidong, China. *Cancer Prevention Research*. 2011; 4(3):384-95.
75. Ushida Y, Suganuma H, Yanaka A. Low-Dose of the Sulforaphane Precursor Glucoraphanin as a Dietary Supplement Induces Chemoprotective Enzymes in Humans. *Food and Nutrition Sciences*. 2015;6:1603-1612.
76. Okulicz M, Hertig I. Acute sulforaphane action exhibits hormonal and metabolic activities in the rat: in vivo and in vitro studies. *Czech J. Anim. Sci*. 2016;61(1): 22–31.
77. Riedl MA, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clinical Immunology*. 2009;130:244–251.
78. Anantharaju PT, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*. 2016;15(99): 1-16.
79. Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem*. 2006, 99, 464-469.
80. Lopez-Cervantes J, Tirado-Noriega LG, Sanchez-Machado DI, Campas-Baypoli ON, Cantu-Soto EU, Nuñez-Gastelum JA. Biochemical composition of broccoli seeds and sprouts at different stages of seedling development. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013;48:2267–2275.
81. Fernandez-Orozco R, Frias J, Zielinski H, Piskula MK, Kozłowska H, Vidal-Valverde C. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emmerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. *Food Chemistry*. 2008;111: 622–630.

82. Perez-Balibrea S, Moreno DA, Garcia-Viguera C. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chemistry*. 2011;125:348–354
83. López-Chillón MT, Baenas N, Villaño D, Zafrilla P, García-Viguera C, Moreno DA. Broccoli For Food And Health. *Research And Challenges*. Holticultura. 2015:60-66.
84. Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH, Talalay P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(8): 3147–3150.
85. Axelsson AS, Tubbs E, Mecham B, Chacko S, Nenonen HA, Tang Y, Fahey JW, Derry JMJ, Wollheim CB, Wierup N, Haymond MW, Friend SH, Mulder H, Rosengren AH. Sulforaphane reduces hepatic glucose production and improves glucose control in patients with type 2 diabetes. *Sci. Transl. Med*. 2017;9:1-12.
86. Shirai Y, Fujita Y, Hashimoto R, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Ishima T, Suganuma H, Ushida Y, Takeda M, Hashimoto K. Dietary Intake Of Sulforaphane-Rich Broccoli Sprout Extracts During Juvenile And Adolescence Can Prevent Phencyclidine-Induced Cognitive Deficits At Adulthood. *Plos One*. 2015; 10(6):1-22.
87. Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahey JW, Talalay P, Zimmermana AW. Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(43): 15550–15555.
88. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(11): 7610–7615.
89. Ohguchi K, Ozaki R, Sumiya M, Tsuruta N, Matsukawa I. Inhibitory Effects of Broccoli Seed Extracts on Melanin Production in B16 Melanoma Cells. *Asian Journal of Ethnopharmacology and Medicinal Foods*. 2016;2(4):16-18.
90. Elbarbry F, Elrody N. Potential health benefits of sulforaphane: A review of the experimental, clinical and epidemiological evidences and underlying mechanisms. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(4):473-484.
91. Furman, Brian L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol*. 2015;70:5.47.1-5.47.20.
92. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, and Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest*. 1969;48:2129-2139.
93. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab. Rev*. 1987;3:751-778.
94. Huang F and Wu W. Antidiabetic effect of a new peptide from *Squalus mitsukurii* liver (S-8300) in streptozocin-induced diabetic mice. *J. Pharm. Pharmacol*. 2005;57:1575-1580.
95. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, and Kudva YC. Single dose streptozotocin induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*. 2011;45:131-140.
96. Matusheski NV, Juvik JA, Jeffery EH. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry*. 2004;65:1273–1281.

97. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, Burstow D, Brown L. The Streptozotocin-Diabetic Rat as A Model of The Chronic Complications of Human Diabetes. *J Diab Complications* 2001; 15: 24-33.
98. Ji L, Li C, Shen N, Huan Y, Liu Q, Liu S, Shen Z. A simple and stable galactosemic cataract model for rats. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):12874-12881.
99. Manikandan R, Beulaja M, Thiagarajan R, Arumugam M. Effect of curcumin on the modulation of α A- and α B-crystallin and heat shock protein 70 in selenium-induced cataractogenesis in Wistar rat pups. *Molecular Vision*. 2011;17:388-394.
100. Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, Christofori G, Peled A, Carel JC, Boitard C, Klein T, Serup P, Eizirik DL, Melloul D. Conditional and specific NF-B blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *PNAS*. 2006;103(13): 5072–5077.
101. Negi G, Kumar A, Sharma SS. Nrf2 and NF- κ B Modulation by Sulforaphane Counteracts Multiple Manifestations of Diabetic Neuropathy in Rats and High Glucose-Induced Changes. *Current Neurovascular Research*. 2011;8(4):1-11.
102. Souza CG, Sattler JA, Assis AM, Rech A, Perry MLS, Souza DO. Metabolic Effects of Sulforaphane Oral Treatment in Streptozotocin-Diabetic Rats. *J Med Food*. 2012;15 (9):795–801.
103. Song MY, Kim EK, Moon WS, Park JW, Kim HJ, So HS, Park R, Kwon KB, Park BH. Sulforaphane protects against cytokine and streptozotocin-induced beta-cell damage by suppressing the NF-kappaB pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;235:57–67.
104. Kametaka S, Kasahara T, Ueo M, Takenaka M, Saito M, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Effect of Nifedipine on Severe Experimental Cataract in Diabetic Rats. *J Pharmacol Sci*. 2008;106: 651 – 658.
105. Sridhar, Supraja. Eye Lens Protein Composition in Aging Cataractous ICR/f Rats. Undergraduate Research Journal of University of Alabama at Birmingham. 2015;9:1-32.
106. Rumyantseva YV, Fursova AZ, Fedoseeva LA, Kolosova NG. Changes in Physicochemical Parameters and α -Crystallin Expression in the Lens during Cataract Development in OXYS Rats. *Biochemistry (Moscow)*. 2008;73(11):1176-1182
107. Kumar PA, Haseeb A, Suryanarayana P, Ehtesham NZ, Reddy GB. Elevated expression of α A- and B-crystallins in streptozotocin-induced diabetic rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005;444: 77–83.
108. Kamei A, Takamura S, Nagai M, Takeuchi N. Phosphoproteome Analysis of Hereditary Cataractous Rat Lens α -Crystallin. *Biol. Pharm. Bull*. 2004;27(12):1923—1931.
109. Boelens, Wilbert C. Cell biological roles of α B-crystallin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2014;115:3-10.
110. Yang J, Zhou S, Gu J, Guo M, Xia H, Liu Y. UPR Activation and the Down-Regulation of α -Crystallin in Human High Myopia-Related Cataract Lens Epithelium. *Plos One Journal*. 2015;10(9): 1-11.