

**D**iabetes melitus tipe 2 adalah penyakit metabolismik multifaktorial kronik yang disebabkan oleh interaksi kompleks antara berbagai faktor lingkungan dan genetik. Diabetes melitus tipe 2 menjadi penyebab kecacatan dan kesakitan, terutama akibat komplikasi vaskuler yang mendasari retinopati, nefropati, neuropati, penyakit jantung iskemik, dan vaskulopati perifer. Komplikasi diabetes melitus dapat terjadi karena penumpukan glukosa dalam sel sehingga dapat terjadi penyakit jantung koroner. Peningkatan kadar glukosa darah pada penderita diabetes melitus dapat menimbulkan produksi radikal bebas yang dapat mengganggu metabolisme protein, DNA, dan lemak sehingga berdampak pada kerusakan jaringan. Teh merupakan jenis minuman yang paling banyak dikonsumsi manusia setelah air dan diperkirakan manusia mengkonsumsi teh tak kurang dari 120 ml setiap harinya. Tradisi pengobatan Cina telah merekomendasikan minum teh hijau sebagai minuman untuk mencegah dan mengobati berbagai penyakit. Komponen biotik utama dalam teh adalah polifenol khususnya *catechins* yang berperan sebagai antioksidan. Senyawa polifenol berperan sebagai penangkap radikal bebas hidroksil (OH) sehingga tidak mengoksidasi lemak, protein, dan DNA dalam sel. Teh hijau klon GMB-4 dengan kandungan *catechins* dengan kandungan polifenol, khususnya *catechins* menangkap radikal bebas 100 kali lebih efektif dibanding vitamin C dan 25 kali lebih efektif dibanding vitamin E. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Yuly Peristiowati et. al. mulai tahun 2013 sampai dengan 2016 pada hewan coba DM Tipe 2 (*Invivo*) dan kultur sel Huvec dan EPC (*Invitro*) menunjukkan hasil bahwa pemberian *catechins* Teh hijau klon GMB-4 dapat digunakan sebagai antidiabetik melalui mekanisme mencegah stres oksidasi dan melindungi sel beta pankreas, sehingga produksi insulin tetap stabil dan gula darah normal. Hasil penelitian secara bermakna membuktikan bahwa pemberian *catechins* Teh hijau klon GMB-4 dapat menurunkan glukosa darah, menurunkan kolesterol total dan LDL (*Low Density Lipoprotein*), meningkatkan HDL (*High Density Lipoprotein*), meningkatkan kadar insulin, memperbaiki sel beta pancreas, menurunan kadar MDA (*malondialdehyde*) dan meningkatkan kadar SOD (*Superoxidase Dismutase*), menurunkan NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotida Phosphat Hydrogen*) dan meningkatkan NO (*Nitric Oxide*), meningkatkan mobilisasi EPC (*Endothelial Progenitor Cells*) melalui peningkatan CD 34<sup>+</sup>, CD 133<sup>+</sup>, SDF-1 $\alpha$  dan CXCR4. Berdasarkan hasil penelitian tersebut perlu di lakukan penelitian lebih lanjut pada manusia sehingga penggunaan *catechins* Teh hijau klon GMB-4 dapat digunakan dalam tatanan klinis sebagai antidiabetik.



Yuly Peristiowati

**MONOGRAF**

**Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Antidiabetik**



# MONOGRAF

## Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Antidiabetik

**Yuly Peristiowati**



# MONOGRAF

## Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Antidiabetik

**Yuly Peristiowati**



## MONOGRAF

### *Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Antidiabetik*

Yuly Peristiowati., S.Kep Ns.,M.Kes



Edisi Asli

Hak Cipta © 2016, Indomedia Pustaka  
Gebang No. 59 RT. 03 RW. 44 Wedomartani  
Ngemplak, Sleman, Yogyakarta, 55583  
Telp. : (0274) 2830613  
Website : [www.indomediapustaka.com](http://www.indomediapustaka.com)  
E-mail : [info@indomediapustaka.com](mailto:info@indomediapustaka.com)

**Hak cipta dilindungi undang-undang.** Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apa pun, baik secara elektronik maupun mekanik, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan menggunakan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari Penerbit.

#### UNDANG-UNDANG NOMOR 19 TAHUN 2002 TENTANG HAK CIPTA

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak mengumumkan atau memperbanyak suatu ciptaan atau memberi izin untuk itu, dipidana dengan pidana penjara paling lama **7 (tujuh) tahun** dan/ atau denda paling banyak **Rp 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah)**.
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1), dipidana dengan pidana penjara paling lama **5 (lima) tahun** dan/atau denda paling banyak **Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)**.

---

Peristiowati, Yuly

Monograf—*Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Antidiabetik*/Yuly Peristiowati  
Edisi Pertama  
—Yogyakarta: Indomedia Pustaka, 2016  
1 jil., 17 × 24 cm, 208 hal.

ISBN: 978-602-6417-07-7

- |              |                       |
|--------------|-----------------------|
| 1. Kesehatan | 2. Monograf           |
| I. Judul     | II. Yuly Peristiowati |



## Kata Pengantar

Alhamdulillah, setelah disiapkan dalam waktu yang cukup lama akhirnya buku ini bisa terselesaikan. Pengobatan herbal adalah jenis penyembuhan dengan menggunakan tanan dan sumber alami untuk mengobati penyakit dan cedera daripada menggunakan obat farmasi modern. Pengobatan herbal dianggap sebagai metode penyembuhan alternatifdi Amerika Serikat saat ini. Tanaman obat dan herbal telah memainkan peran sentral dalam pengobatan selama ribuan tahun. Saat ini banyak Universitas dan Perguruan Tinggi menawarkan gelar sarjana pengobatan tradisional.

Pengobatan herbal dan penyembuhan alternatif telah menjadi populer karena keprihatinan atas efek langsung dan efek samping jangka panjang dari penggunaan obat-obatan farmasi. Banyak penelitian yang dilakukan untuk memvalidasi penggunaan obat herbal. Pengobatan herbal yang paling populer adalah pengobatan tradisional barat dan pengobatan cina. Sementara berbagai tumbuhan dan tanaman yang di gunakan dalam jenis pengobatan herbal sangat berbeda.

Banyak tumbuhan yang mengandung berbagai zat aktif yang di gunakan sebagai sumber perawatan medis tetapi juga sebagai sumber nutrisi dan pencegahan penyakit. Pengobatan dapat di kemas dalam bentuk suplemen yang dapat memberikan nutrisi



yang di butuhkan oleh organ tubuh. Pengobatan herbal dengan menggunakan berbagai zat aktif yang terdapat dalam bunga, daun, akar suatu tanaman mempunyai efek baik secara keseluruhan maupun pada organ-organ tertentu sebagai target dari pengobatan.

Dalam kesempatan ini penulis menyajikan buku monograf salah satu pengobatan herbal dengan menggunakan zat aktif yang ada dalam teh hijau yaitu *Catechins* yang telah dikembangkan di Pusat Penelitian teh dan Kina (PPTK) Gambung Jawa Barat Indonesia dengan Klon GMB-4 dimana mempunyai kandungan *polyphenol* yang tinggi dimana digunakan sebagai pengobatan Diabetes Melitus baik sebagai pencegahan, pengobatan dan dalam menghambat komplikasi yang bisa terjadi.

Tentunya dalam penyusunan Buku ini masih banyak kekurangan, penulis mengharapkan masukan guna penyempurnaan penulisan buku ini sehingga dapat dimanfaatkan bagi kalangan yang membutuhkan. Semoga buku ini bermanfaat rangka penyelenggaraan dan peningkatan pendidikan kesehatan khususnya ilmu biomedik di Indonesia, sehingga buku ini dapat menjadi amal shaleh bagi penulis dalam wujud ilmu yang manfaat bagi kemaslahatan umat. Amin

#### Penulis

Yuly Peristiowati



# Daftar Isi

<b>Kata Pengantar .....</b>	<b>iii</b>
<b>Daftar Isi .....</b>	<b>v</b>
<b>Pendahuluan.....</b>	<b>1</b>
<b>Bab 1 Keunggulan Teh Hijau (<i>Catechins Green Tea GMB-4</i>) untuk Pencegahan dan Pengobatan Diabetes Melitus .....</b>	<b>5</b>
1.1 Abstrak.....	5
1.2 Latar Belakang.....	7
1.3 Tinjauan Pustaka .....	8
1.3.1 Klasifikasi <i>Catechins Green Tea</i> .....	8
1.3.2 Struktur Kimia <i>Catechins Green Tea</i> .....	10
1.3.3 Komposisi <i>Green Tea</i> .....	10
1.3.4 Metabolisme <i>Green Tea</i> .....	11
1.3.5 Isolasi <i>Catechins Green Tea GMB-4</i> .....	13
1.3.6 Keunggulan <i>Catechins Green Tea</i> sebagai Antidiabetik.....	18
1.4 Stres Oksidasi.....	20
1.4.1 Definisi Stres Oksidasi.....	20
1.4.2 Etiologi Stres Oksidasi.....	21



1.5	Disfungsi Endotel .....	22
1.5.1	Definisi Disfungsi Endotel.....	22
1.5.2	Etiologi Disfungsi Endotel.....	22
1.6	Mekanisme Stres Oksidasi pada Diabetes Melitus.....	22
1.6.1	Pertahanan Antioksidan.....	23
1.6.2	Kerusakan Oksidatif .....	23
1.6.3	Glikasi Non Enzimatik pada Protein.....	23
1.6.4	Jalur Poliol-Sorbitol (Aldosa Reduktase).....	26
1.6.5	Autooksidasi Glukosa.....	26
1.7	Mekanisme Disfungsi Endotel pada Stres Oksidasi Hiperglikemia ...	27
1.7.1	Respon Sel Endotel Akibat Hiperglikemia .....	27
1.7.2	Penanda Disfungsi Endotel Akibat Hiperglikemia .....	28
1.7.3	Mekanisme Reistensi Insulin.....	29
1.8	Daftar Pustaka .....	32

**Bab 2 Eksplorasi Aktivitas Antioksidan Catechins Green Tea GMB-4**

	<b>Sebagai Therapi Penyakit Diabetes Melitus .....</b>	<b>37</b>
2.1	Abstrak.....	37
2.2	Latar Belakang.....	38
2.3	Tinjauan Pustaka .....	40
2.3.1	<i>Catechins Green Tea</i> Sebagai Antioksidan .....	40
2.3.2	Mekanisme Penghambatan Oksidasi NADPH.....	41
2.3.3	Mekanisme Produksi <i>Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)</i> .....	43
2.3.4	Mekanisme Penghambatan <i>Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)</i> .....	44
2.3.5	Mekanisme Reduksi <i>Asymmetric Dimethylarginine (ADMA)</i> .....	45
2.3.6	<i>Catechins Green Tea</i> sebagai Antiinflamasi .....	46
2.3.7	Mekanisme Penghambatan Jalur <i>Arachidonic</i> .....	47
2.3.8	Meningkatkan Sistesis <i>Nitric Oxide (NO)</i> .....	48
2.3.9	Menurunkan Aktivitas Sitokin .....	49
2.3.10	Menghambat Jalur <i>NFκβ</i> .....	49
2.3.11	Melalui Jalur MAPK.....	51
2.4	Daftar Pustaka .....	51

**Bab 3 Potensi Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4 Terhadap  
Penurunan Kadar Glukosa Darah (Studi *Invivo* pada**

	<b>Tikus Strain Wistar dengan DM Type-II) .....</b>	<b>59</b>
3.1	Abstrak.....	59
3.2	Latar Belakang.....	60
3.3	Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	62



3.3.1 Tujuan Umum.....	62
3.3.2 Tujuan Khusus .....	62
3.3.3 Manfaat Penelitian .....	63
3.4 Metode Penelitian .....	63
3.5 Hasil dan Pembahasan .....	64
3.6 Daftar Pustaka .....	66

**Bab 4 Identifikasi Peningkatan Kadar Insulin pada Tikus  
*Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Type 2 yang  
Terjadi Resistensi Insulin Setelah Pemberian**

<b>Catechins Green Tea (CGT) GMB-4 .....</b>	<b>69</b>
4.1 Abstrak.....	69
4.2 Latar Belakang.....	70
4.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	73
4.3.1 Tujuan Umum.....	73
4.3.2 Tujuan Khusus .....	73
4.3.3 Manfaat Penelitian .....	73
4.4 Metode Penelitian .....	74
4.5 Hasil dan Pembahasan .....	75
4.6 Kesimpulan dan Saran.....	76
4.7 Daftar Pustaka .....	77

**Bab 5 Efek Pemberian Catechins Green Tea GMB-4 Terhadap  
Perbaikan Sel Beta Pankreas pada Tikus *Strain Wistar* dengan  
Diabetes Melitus Type 2 .....**

<b>79</b>	
5.1 Abstrak.....	79
5.2 Latar Belakang.....	80
5.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	81
5.3.1 Tujuan Umum.....	81
5.3.2 Tujuan Khusus .....	81
5.3.3 Manfaat Penelitian .....	81
5.4 Metode Penelitian .....	82
5.5 Hasil dan Pembahasan .....	82
5.5.1 Gambaran Umum Penelitian.....	82
5.5.2 Data Khusus Penelitian .....	83
5.6 Kesimpulan dan Saran.....	86
5.6.1 Kesimpulan.....	86
5.6.2 Saran .....	87
5.7 Daftar Pustaka .....	87



<b>Bab 6</b>	<b>Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Antioksidan Melalui Mekanisme Penurunan Kadar MDA dan Peningkatan Kadar SOD pada Tikus Strain Wistar dengan Diabetes Melitus Type 2 .....</b>	<b>89</b>
6.1	Abstrak.....	89
6.2	Latar Belakang.....	90
6.3	Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	92
6.4	Metode Penelitian .....	93
6.5	Hasil dan Pembahasan .....	93
6.6	Kesimpulan dan Saran .....	101
6.7	Daftar Pustaka .....	103
<b>Bab 7</b>	<b>Efek Catechins Green Tea GMB-4 Terhadap Kadar Kolesterol Total, Kadar HDL dan LDL pada Tikus Strain Wistar dengan Diabetes Melitus Tipe II .....</b>	<b>107</b>
7.1	Abstrak.....	107
7.2	Latar Belakang.....	108
7.3	Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	111
7.4	Metode Penelitian .....	111
7.5	Hasil dan Pembahasan .....	114
7.5.1	Hasil Penelitian.....	114
7.5.2	Pembahasan .....	115
7.6	Kesimpulan dan Saran.....	118
7.6.1	Kesimpulan.....	118
7.6.2	Saran .....	119
7.7	Daftar Pustaka .....	119
<b>Bab 8</b>	<b>Efek Isolat Catechins dari Green Tea GMB-4 Terhadap Kadar NADPH dan Nitric Oxide pada Sel Endotel yang Dipapar Glukosa Tinggi.....</b>	<b>123</b>
8.1	Abstrak.....	123
8.2	Latar Belakang.....	124
8.3	Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	126
8.3.1	Tujuan Penelitian .....	126
8.3.2	Manfaat .....	126
8.4	Metode Penelitian .....	126
8.5	Hasil dan Pembahasan .....	127
8.6	Kesimpulan dan Saran .....	129
8.7	Daftar Pustaka .....	130



<b>Bab 9 Efek Isolat Catechins dari Green Tea GMB-4 Terhadap Mobilisasi Endothelial Progenitor Cells (EPC) Melalui Aktivasi Stromal Cells Derived Factor-1 (SDF1-<math>\alpha</math>) dan CXCR4 pada Tikus Diabetes Melitus Tipe II .....</b>	<b>133</b>
9.1 Abstrak.....	133
9.2 Latar Belakang.....	134
9.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	138
9.3.1 Tujuan Penelitian.....	138
9.3.2 Manfaat Penelitian .....	138
9.4 Metode Penelitian .....	138
9.4.1 Bahan dan Alat Penelitian.....	138
9.4.2 Prosedur Penelitian .....	139
9.5 Hasil dan Pembahasan .....	144
9.5.1 Hasil Penelitian .....	144
9.5.2 Pembahasan.....	148
9.6 Kesimpulan dan Saran.....	152
9.6.1 Kesimpulan .....	152
9.6.2 Saran .....	152
9.7 Daftar Pustaka .....	152
<b>Bab 10 Efek Isolat Catechins dari Green Tea GMB-4 Terhadap Mobilisasi Endothelial Progenitor Cells (EPC) Melalui Peningkatan CD 34 dan CD 133 pada Tikus Diabetes Melitus Tipe II .....</b>	<b>165</b>
10.1 Abstrak.....	165
10.2 Latar Belakang.....	166
10.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	168
10.3.1 Tujuan Penelitian.....	168
10.3.2 Manfaat Penelitian .....	168
10.4 Metode Penelitian .....	169
10.4.1 Prosedur Pengukuran NO .....	169
10.4.2 Prosedur Identifikasi EPC pada Hewan Coba.....	169
10.4.3 Prosedur Deteksi EPC dengan <i>Flow Cytometry</i> .....	170
10.5 Hasil dan Pembahasan .....	171
10.5.1 Hasil Penelitian.....	171
10.5.2 Pembahasan.....	177
10.6 Kesimpulan dan Saran.....	181
10.6.1 Kesimpulan.....	181
10.6.2 Saran .....	181
10.7 Daftar Pustaka .....	182
<b>Daftar Riwayat Hidup Penulis.....</b>	<b>195</b>





## Pendahuluan

**H**erbal medicine atau *phytopharma* yang dikenal sebagai obat tradisional adalah “ pengetahuan, ketrampilan dan praktek berdasarkan teori, keyakinan dan pengalaman, adat budaya yang berbeda, digunakan dalam pemeliharaan kesehatan dan pencegahan” (WHO, 2005). Ada banyak sistem yang berbeda dari sistem tradisional kedokteran, filsafat dan praktek. Masing-masing dipengaruhi oleh kondisi yang berlaku, lingkungan, dan wilayah geografis dimana dia pertama kali berevolusi (WHO, 2005), bagaimanapun filsafat umum adalah pendekatan holistik untuk hidup, keseimbangan pikiran, tubuh dan lingkungan, dan penekanan pada kesehatan daripada penyakit. Umumnya berfokus pada keseluruhan kondisi individu, bukan pada penyakit tertentu atau penyakit yang diderita pasien. Penggunaan herbal adalah bagian inti dari semua sistem pengobatan tradisional ( Engebretson 2002, Conboy et al., 2007., Rishton, 2008; Schmidt et al., 2008).

Obat tradisional dikenal secara luas di negara berpenghasilan rendah sampai menengah. Di beberapa negara berkembang, obat-obatan tradisional telah banyak digunakan untuk pelayanan kesehatan. Disisi lain penggunaan pengobatan tradisional dibanyak negara maju telah berkembang populer. Penggunaan obat tradisional di Indonesia merupakan bagian dari budaya nasional dan telah mulai dari abad yang lalu, namun efektivitas dan keamaanan belum didukung oleh penelitian yang

konperhensif. Mempertimbangkan fakta yang ada di masyarakat ini maka perlu untuk menetapkan kebijakan untuk obat-obat tradisional Indonesia yang aman digunakan untuk semua pihak.

Salah satu obat tradisional Indonesia adalah jamu, yang telah dinyatakan sebagai herbal Indonesia oleh Susilo Bambang Yudhoyono, Presiden Republik Indonesia. Ada 3 Klasifikasi obat tradisional Indonesia yaitu: 1. Herbal berbasis Empiris (JAMU), adalah obat tradisional yang telah di produksi dalam bentuk tradisional, seperti dalam bentuk seduhan, pil, atau cairan mendidih bercampur herbal. Secara umum jenis obat berdasarkan turun-temurun dari nenek moyang. Jamu tidak memerlukan persetujuan ilmiah melalui studi klinis, tetapi hanya dari empiris membuktikan dari kasiat yang telah di gunakan dan terbukti selama bertahun-tahun. 2. Herbal berbasis Ilmiah ( Ekstrak distandarisasi) adalah obat tradisional yang dihasilkan dari ekstraksi bahan-bahan alami, dapat didasarkan dari tanaman herbal, hewan, atau bahan alami. Untuk proses itu sendiri membutuhkan peralatan canggih mahal dan lebih kompleks dan tenaga ahli yang trampil dan berpengatahuan tinggi. Selain itu juga dibuktikan dengan penelitian ilmiah seperti studi pra-klinik untuk efisiensi bahan aktifnya, standarisasi proses ekstraksinya dan studi toksisitasnya. 3. Klinis obat berasis herbal (fitomarmaka) adalah bentuk obat tradisional yang dapat dilihat sebagai obat moderen untuk proses standarisasi, didukung oleh sebuah studi klinis pada manusia. Dengan studi klinis, akan lebih meyakinkan bagi para profesional medis untuk menggunakan jenis obat pada pasien mereka.

Tanaman teh pada umumnya ditanam di perkebunan, dipanen secara manual, dan dapat tumbuh pada ketinggian 200 – 2.300 m dpl. Teh berasal dari kawasan India bagaian utara dan Cina Selatan. Ada dua kelompok varietas teh yang terkenal yaitu var. *assamica* yang berasal dari Assam dan var. *sinensis* yang berasal dari Cina. Varietas *assamica* daunnya agak besar dan ujung yang runcing, sedangkan varietas *sinensis* daunnya lebih kecil dan ujungnya agak tumpul. Daunnya tunggal, bertangkai pendek, letak berseling, helai daun kaku seperti kulit tipis, bentuknya elip memanjang, ujung dan pangkal runcing, tepi bergerigi halus, pertulangan menyirip, panjang 6-18 cm, lebar 2-6 cm, warna hijau, permukaan mengkilap. Bunga diketiak daun, tunggal atau beberapa bunga bergabung jadi satu, berkelamin dua, garis tengah 3-4 cm, warnanya putih cerah dengan kepala sari berwarna kuning, harum. Buahnya kotak berdinding tebal, pecah menurut ruang, masih muda hijau setelah tua coklat kehitaman. (Dalimarta, Setiawan, 2006)

*Green tea* atau teh hijau merupakan daun teh yang berasal dari tumbuhan *camellia sinensis* yang diproses dengan cara pengeringan dengan membunuh enzyme polyphenol oxidase tanpa menggunakan fermentasi. Dimana proses produksi melalui *drying* dan *steaming* daun yang masih segar menjadi *polyphenol oksidase* inaktif atau nonoksidasi (Cabrera *et al.*, 2006). Komposisi kimia dari teh hijau bervariasi berdasarkan iklim, musim, bentuk pertanian dan umur dari daun. Komponen dari

teh hijau yang paling menarik adalah poliphenol. *Poliphenol* yang paling banyak didapatkan pada teh hijau adalah flavonoids sekitar 70%nya adalah *catechins* diantaranya: *catechin*, *epicatechin*, *epicatechin gallate*, *epigallocatechin gallate*, dan *proanthocyanidins* (Rosalind et al., 2009).

*Green tea* mengandung sejumlah besar berbagai *flavonoid*, yang mempunyai karakteristik adanya dua atau lebih cincin aromatik, masing-masing membawa setidaknya satu hidroksil aromatik yang dihubungkan dengan jembatan karbon. *Flavanoid* utama *catechin*, meliputi *epikatekin* (EC), *epigallocatechin* (EGC), *epikatekin-3-gallate* (ECG), dan *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG). EGCG merupakan senyawa fisiologis aktif yang paling ampuh, terutama memperhitungkan efek biologis dari teh hijau (Verena et al., 2006).

Lembaga penelitian Teh dan Kina Gambung telah berhasil mengembangkan teknologi pengolahan teh klon GMB-4 sehingga menghasilkan senyawa aktif EGCG klon GMB-4 tetapi belum diproduksi untuk komersial. Study secara *in vitro* dan *in vivo* sudah dilaksanakan, untuk mengetahui potensi yang dimiliki oleh EGCG klon GMB-4 sehingga bisa dijadikan sumber kekayaan alam yang bermanfaat khususnya pada produk hilir dan bisa dimanfaatkan sebagai alternatif penangulangan Diabetes Melitus dan komplikasinya.

Pada Buku ini akan di bahas tentang penyakit diabetes millius dari segi biomolekulernya dan mekanisme komplikasi yang bisa terjadi pada diabetes melitus. Selain itu pada buku ini juga membahas secara khusus penelitian yang telah di publikasikan terkait dengan peran *catechins* *Green tea* GMB-4 sebagai antidiabetes pada studi pra klinik baik menggunakan kultur sel maupun hewan coba.

Semoga buku ini bermanfaat untuk dasar penelitian selanjutnya dan dapat dikembangkan pada tatanan klinis.





# BAB 1

## Keunggulan Teh Hijau (*Catechins Green Tea GMB-4*) untuk Pencegahan dan Pengobatan Diabetes Melitus

---

### 1.1 Abstrak

Teh merupakan jenis minuman yang paling banyak dikonsumsi manusia setelah air dan diperkirakan manusia mengkonsumsi teh tak kurang dari 120 ml setiap harinya (Yang & Landau., 2000; McKay & Blumber., 2002). Konsumsi teh di Indonesia masih sangat rendah yakni 0,2 kg/kapita/tahun. Diduga hal ini karena masyarakat Indonesia belum banyak mengetahui tentang khasiat teh bagi kesehatan. Walaupun minum teh sudah menjadi semacam budaya setidaknya dikalangan masyarakat Jawa/Sunda, namun teh belum menjadi primadona untuk masyarakat Indonesia (Sibuea., 2003). Di Negara Cina minum teh telah dikenal lebih dari 4000 tahun. Tradisi pengobatan Cina telah merekomendasikan minum teh hijau sebagai minuman untuk mencegah dan mengobati berbagai penyakit (Brannon, 2007). Komponen bioaktif utama dalam teh adalah polifenol khususnya *catechins* yang berperan sebagai antioksidan. Senyawa polifenol berperan sebagai penangkap radikal bebas hidroksil (OH) sehingga tidak mengoksidasi lemak, protein, dan DNA dalam sel. Kemampuan polifenol khususnya *catechins* menangkap radikal bebas 100 kali lebih efektif dibanding vitamin C dan 25 kali lebih efektif dibanding vitamin E (Sibuea, 2003). *Catechins* banyak terdapat pada teh hijau yaitu the yang diproses tanpa oksidasi

enzimatis. *Catechins* akan berubah menjadi *theaflavin* dan *thearubigin* pada saat proses reaksi oksidasi enzimatis. Oleh karena itu diyakini *catechins green tea* lebih berkhasiat dibanding dengan teh Oolong (teh semi reaksi oksidasi enzimatis) dan teh hitam (teh yang diproses dengan reaksi oksidasi enzimatis secara penuh) (Yudana & Luize, 2006; Sibuea, 2003).

*Catechins Green tea* mempunyai kandungan *polyphenol* dan *flavonol* dimana berperan dalam mengabsorbsi ion metal, menjaga keseimbangan metabolisme karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya adalah menghambat aktivasi enzim  $\alpha$  *glucosidase*, menghambat absorbsi glukosa pada intestinal, melindungi sel  $\beta$  pankreas, meningkatkan sekresi insulin, mengaktifkan AMPK, sebagai antioksidan yang bekerja menghambat stres oksidasi, sebagai antiinflamasi pada endotel dan proliferasi pada pertumbuhan sel endotel (Kati Hanhinhineva, et al., 2010).

Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Teh dan Kina (PPTK) Gambung Jawa Barat teh selain mengandung polifenol hingga 25-35% juga mengandung metilxantin, asam amino, peptides, karbohidrat, vitamin (C,E, dan K), karotenoid, mineral seperti kalium, magnesium, mangan, fluor, zinc, selenium, copper, iron, calcium dan alkaloid lain. Kandungan polifenol teh yang berasal dari Indonesia mempunyai komponen aktif untuk kesehatan ± 1,34 kali lebih tinggi dibanding negara lain. Catechins merupakan senyawa polifenol utama pada teh sebesar 90% dari total kandungan polifenol. Rata-rata kandungan catechins pada teh Indonesia khususnya klon Gambung 4 dan 9 berkisar antara 7,02-11,60% b.k, sedangkan pada negara-negara lain hanya berkisar 5,06-7,4% b.k. (PTPN VIII, PPTK Gambung dan ATI, 2007). Pada penelitian ini *catechins green tea* yang digunakan berasal dari klon Gambung-4 PPTK Gambung Jawa Barat yang telah dilakukan penelitian oleh Mariam, 2011 dengan hasil kandungan katekinnya (komponen utama campuran EGCG dan ECG = 54,4: 17,6) dari teh hijau adalah sekitar 2,68% dari 25 gram berat kering teh hijau atau 10,76%.

Diharapkan dengan pemberian *catechins green tea* GMB-4 dapat memperbaiki kerusakan endotel sehingga dapat mencegah terjadinya komplikasi lanjut pada penyakit diabetes melitus seperti terjadinya penyakit cardiovaskuler. Pada penelitian yang dilakukan dengan hewan coba diketahui bahwa menghambat proses penyakit degeneratif, mempunyai aktivitas sebagai antiproliferasi pada sel hepatoma dan juga mempunyai aktivitas hipolipidemik pada hepar tikus yang dibuat hepatoma (Vanessa et al., 2004).

Pada studi yang dilakukan oleh Tsuneki, 2004 perlakuan pada hewan coba menunjukkan bahwa *polyphenols* dalam *catechin green tea* mempunyai efek sebagai antioksidan menurunkan tekanan darah, memproteksi perkembangan penyakit koroner dengan mengontrol kadar gula darah dan berat badan.

## 1.2 Latar Belakang

Tanaman teh (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze) dibudidayakan secara luas di lebih dari 30 negara dan telah memberikan kontribusi yang tidak sedikit bagi perekonomian negara-negara tersebut ( Fernandez *et al.*, 2002). Indonesia tercatat sebagai salah satu penghasil teh terbesar didunia (Kumar *et al.*, 2005). Kondisi tanah dan iklim di Indonesia menunjukkan hampir 100% tanaman teh di Indonesia adalah *Camellia sinensis* varietas assamica. Varietas ini mempunyai kandungan polifenol yang lebih tinggi dibandingkan dengan varietas sinensis lainnya yang dibudayakan di Jepang, China dan Taiwan sehingga potensinya sebagai antioksidan klon teh unggulan Indonesia yang berbasis varietas *assamica* juga sangat tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa klon Gambung 4 mempunyai aktivitas yang paling kuat dibanding klon unggulan lainnya. Hal ini ditandai dengan rendahnya nilai absorbansi. Tinggi rendahnya aktivitas antioksidan dapat dilihat dari nilai slope. Tingginya nilai slope menunjukkan aktivitas antioksidan yang rendah. Klon gambung 4 mempunyai nilai slope yaitu 0,3512. Gambung 4 mampu menghambat terjadinya oksidasi asam linoleat sebesar 59,10% ( Rohdiana dan Widiantara 2011)

*Green tea* atau teh hijau merupakan daun teh yang berasal dari tumbuhan *camellia sinensis* yang diproses dengan cara pengeringan dengan membunuh enzyme polyphenol oxidase tanpa menggunakan fermentasi. Dimana proses produksi melalui *drying* dan *steaming* daun yang masih segar menjadi *polyphenol oksidase* inaktif atau nonoksidasi (Cabrera *et al.*, 2006). Komposisi kimia dari teh hijau bervariasi berdasarkan iklim, musim, bentuk pertanian dan umur dari daun. Komponen dari teh hijau yang paling menarik adalah poliphenol. Poliphenol yang paling banyak didapatkan pada teh hijau adalah flavonoids sekitar 70%nya adalah *catechins* diantaranya: *catechin*, *epicatechin*, *epicatechin gallate*, *epigallocatechin gallate*, dan *proanthocyanidins* (Rosalind *et al.*, 2009).

Kandungan *polyphenol* dalam teh khususnya jenis *catechins* dan turunannya yang berperan sebagai antioksidan dapat berperan sebagai penangkap radikal hidroksil (OH) sehingga tidak mengoksidasi lemak, protein dan DNA dalam sel. Kemampuan *polyphenol* dalam menangkap radikal bebas 100 kali lebih efektif dibanding vitamin C dan 25 kali lebih efektif dibanding vitamin E (Sibuea, 2003). *Catechins* banyak terdapat pada teh hijau yaitu teh yang diproses tanpa oksidasi enzymatis. *Catechins* akan berubah menjadi theaflavin dan thearubigin pada saat proses reaksi oksidasi enzimatis. Oleh karena itu diyakini bahwa teh hijau lebih berkhasiat bagi kesehatan dibanding teh Oolong (teh semi reaksi oksidasi enzimatis) dan teh hitam ( teh yang diproses dengan reaksi oksidasi enzimatis secara penuh) (Yudana dan Luize, 2006; Sibuea, 2003).

Berdasarkan penelitian yang dikalukan oleh Pusat Penelitian teh dan Kina (PPTK) Gambung-Jawa Barat, teh selain mengandung *polyphenol* 25-35% juga mengandung komponen lain metilxantin, asam amino, peptides, karbohidrat, vitamin (C,E, dan K), karotenoid, mineral seperti kalium, magnesium, mangan, fluor, zinc, selenium, copper, iron, calcium dan alkaloid lain. Kandungan polifenol teh yang berasal dari Indonesia mempunyai komponen aktif untuk kesehatan ± 1,34 kali lebih tinggi dibanding negara lain. *Catechins* merupakan senyawa polifenol utama pada teh sebesar 90% dari total kandungan polifenol. Rata-rata kandungan *catechins* pada teh Indonesia khususnya klon Gambung 4 dan 9 berkisar antara 7,02-11,60% b.k, sedangkan pada negara-negara lain hanya berkisar 5,06-7,4% b.k. (PTPN VIII, PPTK Gambung dan ATI, 2007). Pada penelitian ini *catechins* green tea yang digunakan berasal dari klon Gambung-4 PPTK Gambung Jawa Barat yang di ekstraksi oleh IPB (Damayanthi *et al.*, 2008)

Teh mengandung sejumlah besar berbagai flavonoid, yang mempunyai karakteristik adanya dua atau lebih cincin aromatik, masing-masing membawa setidaknya satu hidroksil aromatik yang dihubungkan dengan jembatan karbon. Flavanoids utama *catechin*, meliputi epikatekin (EC), epigallocatechin (EGC), epikatekin-3-gallate (ECG), dan epigallocatechin-3-gallate (EGCG). EGCG merupakan senyawa fisiologis aktif yang paling ampuh, terutama memperhitungkan efek biologis dari teh hijau ( Verena *et al.*, 2006).

## 1.3 Tinjauan Pustaka

### 1.3.1 Klasifikasi Catechins Green Tea

*Catechins Green tea* atau *polyphenol* di dalam green tea diklasifikasikan menjadi 5 yaitu:

- a. Epicatechin
- b. Catechin
- c. Epigallocatechin
- d. Epicatechin gallate
- e. Epigallocatechin gallate

Pada tabel 1 akan ditampilkan komponen *polyphenol* pada green tea beserta konsentrasiannya.

Struktur dari *catechins* terdiri dari 2 cincin benzen (cincin A dan cincin B) dan satu cincin hidropiran heterosit (cincin C) dengan satu grup hidroksil pada 3 rantai karbon. Pada cincin A menyerupai separuh *resorcinol* dan pada cincin B menyerupai separuh catechol. Keduanya adalah 2 pusat *chiral* pada molekul rantai

karbon 2 dan 3. Cincin A dn cincin B mempunyai 4 diasteroisomir. Dua isomer itu adalah transkonfigurasi disebut *catechin* dan yang satunya merupakan konfigurasi *Cis* disebut dengan *epicatechin* (Rosalind et al., 2009).

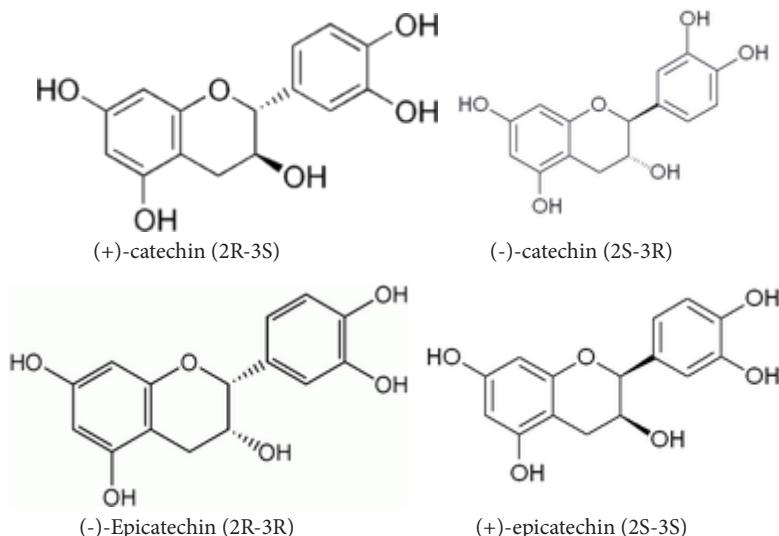
**TABEL 1.1**

*Polyphenol green tea* (*Camellia sinensis*) pada 3 gram daun dalam 300 ml air (Rosalind et al., 2009)

Komponen	Konsentrasi (mh/l)	
	Rata-rata	SD
Total flavonols	778	-
Total hydroxycinnamoyl quinic acids	451	-
Total gallic acid derivatives	128	-
Total flavan-3-ols	4572	-
(-) Epigallocatechin gallate	1255	109
(-) Epigallocatechin	1565	31
(-) Epicatechin	738	29
(-) Epicatechin gallate	361	21
(+)-Catechin	270	16
(+)-Gallocatechin	383	5.4

Isomer *catechin* yang paling umum adalah (+)-catechin. Sedangkan isomer yang lainnya adalah *stereoisomer* yaitu (-)-catechin atau *ent-catechin*. Isomer *epicatechin* yang paling umum adalah (-)-epicatechin (yang juga diketahui nama lainnya adalah L-*epicatechin*, *epicatechol*, (-)-*epicatechol*, 1-*acacatechol*, *epi-catechin*, 2,3-*cis-epicathechin* atau (2R,3R)-(-)-*epicatechin*). Perbedaan primer dapat dicirikan dengan menggunakan kromatografi *column chiral*. Sebagai acuan yang partikular isomer adalah suatu molekul yang disebut dengan *catechin*. Percampuran perbedaan enantiomers dapat disebut (+/-)-catechin atau DL-*catechin* dan (+/-)-*epicatechin* atau DL-*epicatechin*. Lebih dari itu feksibilitas cincin C dipertahankan untuk 2 isomer konfigurasi, dimanapun letaknya cincin B berada dalam posisi *pseudoequator* (E *conformer*) atau di dalam posisi *pseudoaxial* (A *conformer*). Pada penelitian dikonfirmasikan bahwa (+)-catechin diambil dari percampuran conformer A dan E dalam larutan yang mengandung air dan keduanya berada dalam keseimbangan dan dapat dievaluasi dengan perbandingan 33:67. Aktivitas antioksidan *catechin*, (+)-catechin mempunyai kemampuan sebagai scavenger yang dapat dibedakan dengan klas flavonoid (Rinaldo et al., 2010). Kemampuan *catechins* dalam menghasilkan oksigen dapat dilihat didalam hubungannya pada struktur kimia *catechin* dengan ditunjukkannya setengah *catechol* pada cincin B dan ditunjukkan juga pada aktivitas kelompok hidroksil pada ikatan rangkap rantainya (Patricia et al., 2004).

### 1.3.2 Struktur Kimia Catechins Green Tea



**GAMBAR 1.1**

Struktur kimia *catechins green tea* (Rosalin *et al.*, 2009)

### 1.3.3 Komposisi Green Tea

Komposisi green tea secara kimia sangat kompleks yaitu terdiri dari: (Sabu *et al.*, 2010)

- Protein: yang merupakan 15-20% dari berat kering. Enzim penting yang terdapat dalam protein ini adalah asam amino 1-4% seperti teanin atau 5-N-etylglutamin, asam glutamik, triptopan, glisin, serin, asam aspartik, tirozin, valin, leusin, treonin, arginin, dan lisin.
- Karbohidrat terdapat pada 5-7% berat kering seperti: selulosa, pektin, glukosa, fruktosa, dan sukrosa
- Mineral dan elemen lain terdapat dalam 5% berat kering seperti: kalsium, magnesium, kromium, sodium, fosforus, kobalt, strontium, nikel, potasium, fluorin, dan aluminium dan sejumlah lemak diantaranya linoleik dan asal alfa linolenik, sterol(stigmasterol)
- Vitamin yaitu vitamin B,C,E dan zat lain seperti kafein, teophilin, pegmen (klorofil, karotin, dan komponen yang mudah menguap seperti aldehid, alkohol, eter, lakton dan hidrokarbon.

**TABEL 1.2**

Komposisi (%) greentea, black tea dan infus black tea (Sabu et al., 2010)

Komponen	Green tea	Black Tea	Infusion
Protein	15	15	-
Asam Amino	4	47	3.5
Fiber	26	262	0
Karbohidrat	7	7	4
Lemak	7	7	-
Pigmen	2	2	-
Mineral	5	5	4.5
Komponen fenolik	30	5	4.5
Oksidasi fenolik	0	25	4.5

### 1.3.4 Metabolisme Green Tea

*Catechins green tea* merupakan golongan *polyphenol* dimana dimetabolisme dalam tubuh melalui 2 tahapan yaitu dimetabolisme di lemak dan dimetabolisme bersama karbohidrat. Setelah dimetabolisme *poliphenol* dalam jumlah sedikit bersirkulasi didalam plasma. Sebagian besar *polyphenol* diabsorbsi di colon kemudian dimetabolisme oleh microbiota dan selanjutnya masuk kedalam sirkulasi sistemik. *Poliphenol* merupakan *phytochemicals* yang diyakini berperan penting dalam meningkatkan kesehatan. *Polyphenol* merupakan tamanan yang dimetabolisme secara original dari jalur *shikimic* dan dibagian salah satu struktur cincin aromatic dengan sau atau lebih kelompok hydroxyl (Duynhoven et al., 2011).

Disamping itu *polyphenol* mempunyai strukktur motif yang lebih simpel dan mempuayai nomer klas yang lebih besar termasuk flavonoid, *stilbenes*, *cumarins*, *ligans*, *lignins*, *cinnamic* dan asam benzoic. Secara studi epidemiologi *polyphenol* prospektif untuk mengurangi resiko pnyakit kardiovaskuler. Studi intervensi dilakukan baik pada manusia dan hewan coba dengan menggunakan *polyphenol* untuk memodulasi fungsi vaskuler dan platelet, tekanah darah, dan peningkatan profil plasma lipid. Mekanisme yang digunakan adalah melalui penghambatan stres oksidasi, inflamasi, dan ditargetkan untuk meningkatkan fungsi endotel (Higdon et al., 2003).

*Polyphenol* mempunyai efek sebagai antioksidan melalui mekanisme menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai *scavengers* (peredam) terhadap ROS (*reactive oxigen species*) seperti O<sub>2</sub><sup>-</sup>, radikal hidroksil (OH<sup>0</sup>). Cara kerjanya dengan memberikan donor atom H kepada

radikal peroksil membentuk radikal flavanoid dan akan bereaksi dengan oksigen reaktif (superoksida) sehingga menjadi netral. Dengan adanya reaksi tersebut, reaksi berantai peroksidasi lipid dapat dihentikan (Wahyu *et al.*, 2010). Catechins juga menghambat kerja faktor transkripsi gen inflamasi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF $\kappa$ B) sehingga reaksi inflamasi dapat dihentikan.

### 1.3.4.1 Absorbsi

Proses absorpsi ekstrak *catechins green tea* setelah masuk kedalam tubuh secara oral adalah *catechins green tea* dapat dideteksi dalam plasma dan berada dalam sirkulasi sistemik.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Lourdes *et al.*, 2008 dengan menggunakan komponen *catechins green tea* yang diberikan pada hewan coba diketahui terdapat dua *catechins* dengan *galloyl moiety* yang terlihat didalam plasma yaitu EGCG dan ECG, dan ada 3 konjugasi juga terdeteksi dimana EC dan EGC terkonjugasi dan terdeteksi dalam urin. Catechin yang terkonjugasi dalam plasma adalah EGC dimana terlihat dalam bentuk *glucoronide* dan EC terlihat dalam bentuk *glucuronide* dan *sulphate*. Sedangkan dalam urin *catechins* EGC dan EC terlihat terkonjugasi dalam bentuk *glucuronides* dan *sulphates*. *Catrehins green tea* yang mengandung polyphenol diabsorbsi diusus halus mempunyai rentang dari 0 – 60 % dari dosis dan memiliki waktu paruh antara 2-28 jam (Lakhappal *et al.*, 2007). Polyphenol *catechins green tea* ditemukan dalam plasma manusia berkonjugasi dengan asam glukoronik, sulfatan golongan metil dan tidak ditemukan antara 0,1-10  $\mu$ mol/liter dalam sirkulasi.

### 1.3.4.2 Distribusi

*Catechins green tea* setelah diabsorbsi didalam usus polyphenol ditransport ke liver melalui sirkulasi portal dimana mengalami fistpost metabolisme. Selanjutnya didistribusikan keseluruh tubuh dalam plasma diberbagai organ target yang membutuhkan efek dari *catechins green tea*. Puncak level didalam plasma terjadi 0,7-7 jam setelah konsumsi. EGC dalam bentuk *glucuronide* dapat didistribusikan dan disabsorsi di liver melalui aktivitas *uridine disposphate glucuronosyl transferase*. Menghasilkan produk terkonjugasi EGC-glucuronide yang dapat diekskresikan pada lumen intestinal melalui empedu. Konjugasi ini dapat berupa *hydrolysed* oleh aktivitas enzym  $\beta$ -glucuronidase dalam intestinal. Pada beberapa organisme proses ini berlangsung dalam waktu yang cukup lama (Lourdes *et al.*, 2008).

*Catechins green tea* dapat mempengaruhi metabolisme fase II seperti antioksidan protein inhibitor pada multidrug resistensi protein I dan 2 pada manusia dan mempengaruhi interaksi monosit dan sel endotel (Van Zanden *et al.*, 2007). Farmakokinetik ekstrak *catechins green tea* dimetabolisme dalam plasma dan urin setelah masuk kedalam tubuh secara oral. *catechins green tea* diabsorsi dari intestinal

selanjutnya berkonjugasi dalam tubuh organisme pada periode waktu yang lama dan masuk kedalam siklus enterohepatik. Metabolisme *catechins green tea* ini sangat menarik sebab jika terjadi metabolisme konjugasi *catechins green tea* akan dapat mengaktifasi berbagai molekul yang tentunya mempengaruhi potensial efek dari *catechins green tea* (Lourdes *et al.*, 2008).

### 1.3.4.3 Ekskresi

Proses selanjutnya adalah Ekskresi. Setelah diabsorbsi dan didistribusikan dalam organ target, hasil sisa metabolisme *catechins green tea* akan diekskresikan melalui urin. Ekskresi *catechins green tea* melalui urin secara langsung mempengaruhi kulitas komponen yang diabsorbsi (Shargel *et al.*, 1999).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Lourdes *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa jumlah akumulasi ekskresi masing-masing sampel memiliki periode bermacam-macam. Misalnya periode 0-2 jam dengan rata-rata waktu ekskresi 1 jam. Periode 2-6 jam dengan rata-rata ekskresi 4 jam. Periode 6-8 jam rata-rata ekskresi 7 jam. EC konjugasi mempunyai waktu ekskresi lama merupakan salah satu komponen sulphates, sedangkan (-) epicatechin sulphate dimetabolesme dengan waktu ekskresi maksimum paling lama.

Akumulasi dalam urin diekskresi selama 24 jam setelah dicerna dalam bentuk ekstrak 1,12 dan 0,58% untuk EC dan EGC (Swezey *et al.*, 2003).

### 1.3.5 Isolasi Catechins Green Tea GMB-4

Ekstrak *catechins green tea* dengan kemurnian 80% dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, program studi Kimia, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Bandung dan laboratorium pengolahan teh hijau di Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung, Ciwidey, Bandung.

#### 1.3.5.1 Prosedur Ekstraksi Catechine Green Tea

Prosedur ekstraksi *Catechine green tea* sebagai berikut (Mariam, 2011):

##### a. Persiapan alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kolom kromatografi biasa, kolom kromatografi cair vakum (KCV), kolom kromatografi radial, peralatan gelas seperti corong pisah, gelas kimia, gelas ukur, labu takar, pipet tetes, botol-botol vial, corong buchner dan chamber KLT. Alat *rotary evaporator* Buchi B-480, alat destilasi, pengaduk magnetik berpemanas *Heater Thermolyne Cimarec*, melting point *Fisher-Johns*, melting point *Stuart*, dan neraca analitis *Ohaus Explorer*.

Instrumen yang digunakan untuk karakterisasi adalah spektrofotometer FTIR Perkin Elmer Spectrum ONE yang terdapat di Laboratorium Kimia Analitik,

spektrofotometer IR Buck Scientific 500 yang terdapat di Laboratorium Kimia Organik, Kromatografi cair kinerja tinggi Waters 2487 dengan kolom silika C-18 dan detektor UV, dan spektrometer NMR JEOL ECP 400 yang beroperasi pada frekuensi 500 MHz yang terdapat di LIPI Serpong.

### b. Bahan Kimia

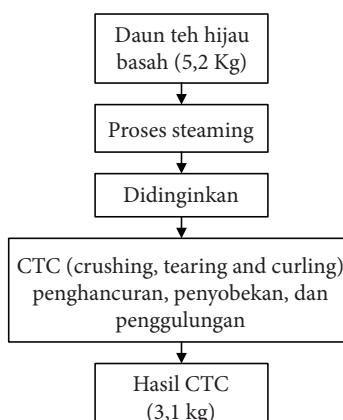
Bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk isolasi senyawa meliputi pelarut-pelarut organik teknis dan pro analisis (n-heksan, etanol, metanol, iso propanol, etil asetat, asetonitril, asam asetat glasial), silika gel, silika gel C18, poliamida dan reagen penampak noda, untuk kromatografi lapis tipis. Sebelum digunakan, semua pelarut organik teknis dimurnikan terlebih dahulu dengan cara destilasi biasa. Selain itu juga digunakan aqua dm sebagai pelarut dan larutan NaOH 0,38% digunakan untuk regenerasi kolom poliamida CC6. Sebagai zat pengering digunakan natrium sulfat anhidrat.

Pada penelitian ini digunakan silika gel yaitu pelat aluminium berlapis silika gel Merck 60 GF<sub>254</sub> dengan ketebalan 0,25 mm untuk kromatografi lapis tipis (KLT), dan silica gel Merck 60 PF<sub>254</sub> untuk kromatografi radial. Digunakan juga poliamida CC6 dan Silica gel C18, untuk kolom kromatografi fasa terbalik. Reagen penampak noda untuk kromatografi lapis tipis adalah larutan serium sulfat ( $Ce(SO_4)_2 \cdot 2H_2O$ ) 1,5% dalam  $H_2SO_4$  2M.

Bahan-bahan yang digunakan untuk karakterisasi senyawa adalah aqua bidestilata (HPLC grade), asetonitril (HPLC grade), metanol (p.a.) dan asam asetat glasial untuk kromatografi. Untuk pengukuran spektrum IR bahan yang digunakan adalah KBr, sedangkan untuk pengukuran spektrum <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR digunakan pelarut aseton-d<sub>6</sub>.

### c. Persiapan Sampel

Secara umum persiapan sampel ini dilakukan dalam dua metode yaitu metode oven dan metode CTC.



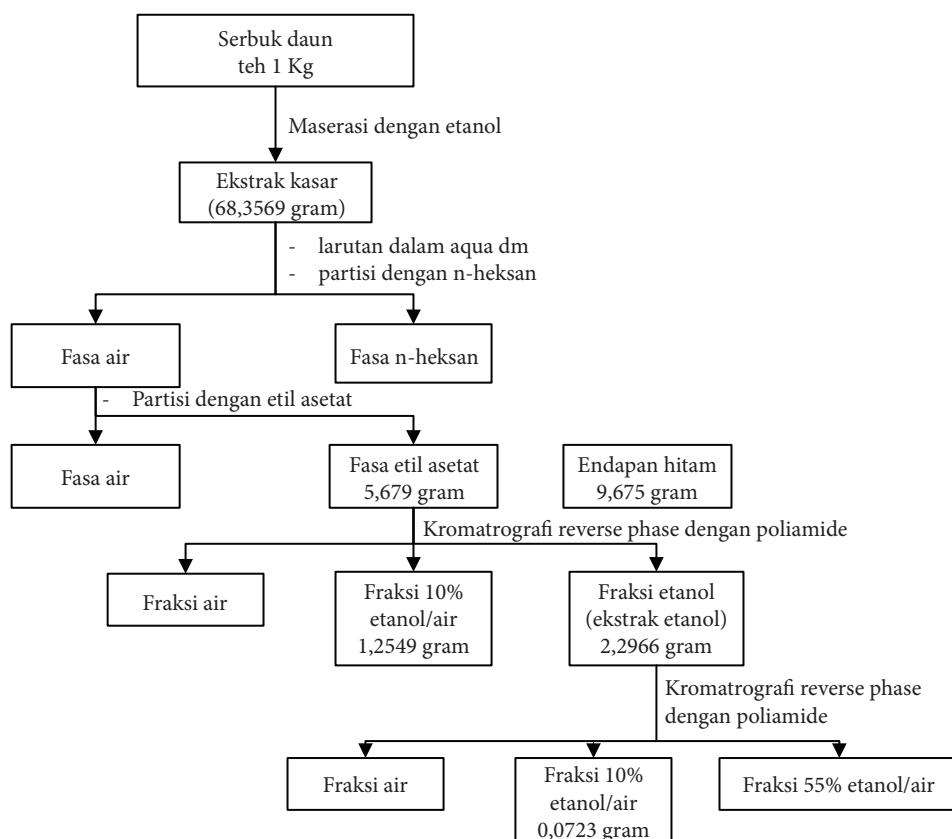
**GAMBAR 1.2**

Diagram kerja penyiapan sampel metode CT

#### d. Ekstraksi dan Isolasi senyawa

##### 1) Metode oven

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan etanol teknis. Serbuk daun *camellia sinensis* varietas *assamica* sebanyak 1,017 kg direndam dengan 2 liter etanol teknis selama 24 jam. Kemudian disaring secara vakum. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan menggunakan evaporator hingga dihasilkan 68,3569 gram (A) ekstrak etanol kering. Selanjutnya tahap isolasi yaitu fraksinasi. Fraksinasi merupakan bentuk pembagian senyawa berdasarkan kepolaran dari ekstrak kasar menjadi fraksi-fraksi yang lebih sederhana sehingga memudahkan dalam mengisolasi senyawa target.



**GAMBAR 1.3**

Diagram kerja metode oven

Fraksinasi I dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair antara fasai *n*-heksana dengan fasa air. Ekstrak etanol kering (68,3569 gram) dilarutkan dalam 500 mL aqua dm 50°C kemudian diekstraksi dengan *n*-heksana

sebanyak 3 kali @ 300 mL. Proses ini dilakukan untuk mengekstrak senyawa nonpolar. Selanjutnya dilakukan ekstraksi cair-cair antara fasa air dari hasil ekstraksi pertama dengan etil asetat sebanyak 3 kali @ 500 ml Dari tahap ini diperoleh ekstrak etil asetat kering (B) sebanyak 5,679 gram dan endapan hitam sebanyak 9,675 gr.

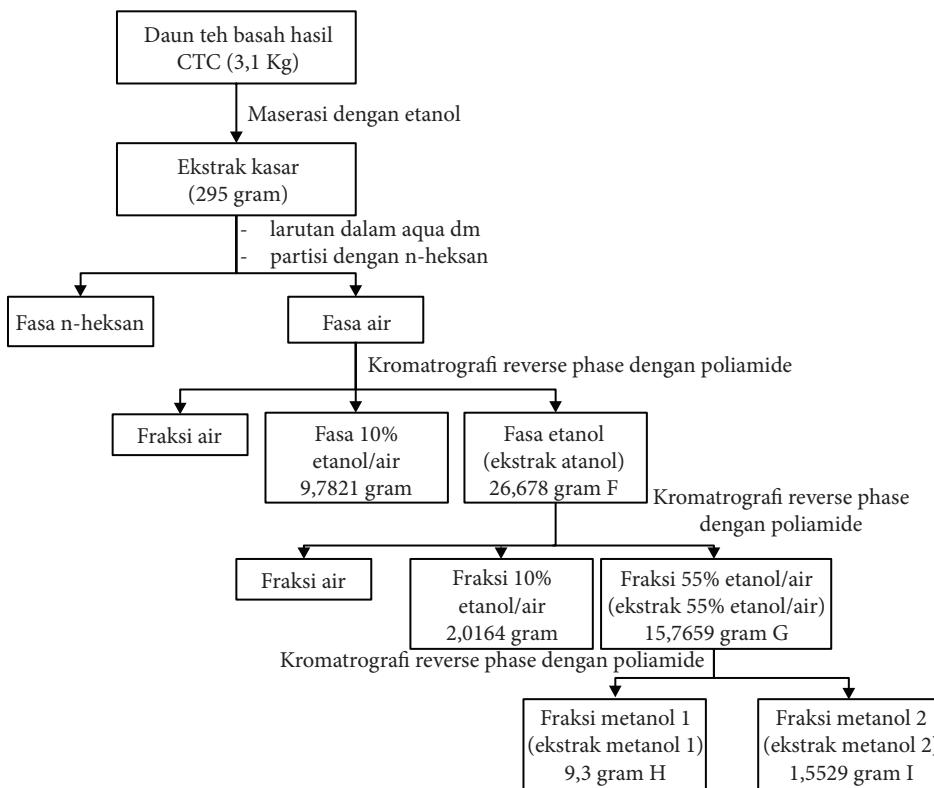
Fraksinasi II dilakukan dengan menggunakan kromatografi *reverse phase* dengan poliamida menggunakan ekstrak etil asetat kering sebanyak 3,0048 gram. Setelah itu cuci kolom dengan aqua dm sebanyak 4 kali volume kolom. Fraksi air ditampung. Kemudian elusi dengan 10 % etanol/air sebanyak 8 kali volume kolom.

## 2) Metode CTC

Pada tahap penyiapan sampel, hasil CTC diperoleh sebanyak 3,1 kg yang direndam dalam 10 liter etanol teknis. Hasil tersebut dilakukan maserasi selama 24 jam. Setelah itu hasil tersebut disaring secara vakum. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan menggunakan evaporator hingga dihasilkan 295 (E) gram ekstrak etanol kering. Selanjutnya tahap isolasi yaitu pemurnian. Pada tahap pemurnian adalah tahap untuk menghilangkan pengotor atau senyawa-senyawa lain dari senyawa target hingga diperoleh senyawa murni.

Fraksinasi I dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair antara fasa *n*-heksana dengan fasa air. Ekstrak etanol kering (295 gram) dibagi dua bagian yaitu ekstrak etanol kering I sebanyak 190 gram dan ekstrak etanol kering II sebanyak 105 gram. Ekstrak etanol kering I dilarutkan dalam 100 mL aqua dm 50°C kemudian diekstraksi dengan *n*-heksana sebanyak 3 kali @ 200 mL. Proses ini dilakukan untuk mengekstrak senyawa nonpolar. Kemudian fasa air I ditampung. Kemudian pada ekstrak etanol kering II dilarutkan dalam 100 mL aqua dm 50°C kemudian diekstraksi dengan *n*-heksana sebanyak 3 kali @ 200 mL. hasil tersebut ditampung sebagai fasa air II.

Fraksinasi II dilakukan dengan menggunakan kromatografi *reverse phase* dengan poliamida. Hasil fasa air I dari hasil ekstraksi tersebut dibagi dua bagian dan dimasukkan dalam kolom poliamida. Kolom tersebut dielusi dengan aqua dm sebanyak 4 kali volume kolom. Fraksi air ditampung. Kemudian elusi dengan 10 % etanol/air sebanyak 8 kali volume kolom. Dan yang terakhir elusi dengan etanol sebanyak 9 kali volume kolom. Hasil elusi tersebut ditampung dalam beberapa fraksi kemudian diuapkan dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) kloroform:metanol 9:1. Hasil fasa air I diperoleh ekstrak etanol kering sebanyak 14,9009 gram. Selanjutnya fasa air II dari hasil ekstraksi dilakukan dengan cara yang sama dengan fasa air I dan diperoleh ekstrak etanol kering sebanyak 11,7771 gram.



**GAMBAR 1.4**

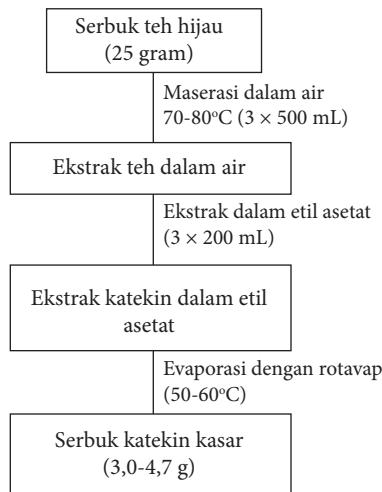
Diagram kerja metode CTC

Kromatogram di atas dielusi dengan kloroform: metanol = 9:1 (), menunjukkan bahwa pada fraksi metanol kering II terdapat dua noda senyawa yang memiliki perbedaan R<sub>f</sub> yang cukup signifikan sehingga diasumsikan kedua noda tersebut dapat dipisahkan dengan eluen tersebut. Sebanyak 202 mg fraksi metanol kering II dipisahkan menggunakan kromatografi radial dengan eluen kloroform: metanol 15%. Pemisahan tersebut menghasilkan 3 fraksi yang kemudian diuji dengan KLT untuk melihat hasil pemisahannya.

3) Modifikasi isolasi katekin dan pemisahan polifenol.

Untuk mendapatkan hasil isolasi yang optimal, dilakukan modifikasi pada tahap isolasi katekin dari teh hijau, yaitu dengan menyeduhan teh menggunakan air panas (80°C) dan diaduk selama 30 menit. Selanjutnya hasil seduhan didinginkan dan kemudian diekstraksi dengan pelarut etil asetat, untuk memisahkan katekin dari karbohidrat terlarut dalam air. Ekstrak tersebut dievaporasi kemudian ditimbang dan selanjutnya dilakukan pemisahan komponen-komponen polifenolnya dengan cara

kolom khromatografi fasa terbalik poliamida CC6, dilanjutkan dengan kolom khromatografi fasa terbalik dalam Silica C18, Gambar 21.



**GAMBAR 1.5**

Diagram alir isolasi katekin dari teh hijau (metode 3)

### 1.3.6 Keunggulan *Catechins Green Tea* sebagai Antidiabetik

#### 1.3.6.1 Diabetes Melitus dan Komplikasinya

Tanda spesifik penyakit diabetes melitus adalah keadaan hiperglikemia / peningkatan kadar glukosa. Effek peningkatan kadar glukosa yang tinggi menimbulkan komplikasi - komplikasi.

Komplikasi - komplikasi Diabetes Melitus dibagi menjadi dua kategori:

1. Komplikasi akut yang merupakan akibat dari perubahan yang relatif akut dan kadar glukosa plasma. Ketoasidosis merupakan komplikasi metabolismik akut yang paling serius adalah ketaosidosis diabetik. Defisiensi insulin menyebabkan hiperglikemi dengan berkurangnya penggunaan glukosa oleh jaringan tepi dan bertambahnya glukoneogenesis oleh hati. Defisiensi insulin juga menyebabkan bertambahnya kadar glukagon. Perubahan rasio ini menimbulkan peningkatan lipolisis di jaringan lemak dan katogenesis di hati. Lipolisis terjadi karena defisiensi insulin merangsang kegiatan lipase di jaringan lemak dengan akibat bertambahnya pasokan asam lemak bebas ke hati.

Di dalam mitokondria hati, enzim karnitil asil transferase I terangsang untuk mengubah asam lemak bebas ini menjadi benda keton. Proses ketosis ini menghasilkan asam lemak bebas hidroksibutirat dan asam asetoasetat yang menyebabkan asidosis (Supraptono, 1997).

Defisiensi insulin juga menyebabkan berkurangnya penggunaan glukosa oleh jaringan tepi dan bertambahnya glukoneogenisis di hati, keduanya menyebabkan hiperglikemia. Karena sifat glukosa yang tidak dapat dengan mudah berdifusi melewati pori-pori membran sel, maka keadaan hiperglikemia ini menyebabkan peningkatan tekanan osmotik cairan ekstraselular dan menyebabkan timbulnya perpindahan air secara osmotik keluar dari sel.

Selain itu, hiperglikemia menyebabkan keluarnya glukosa ke dalam urin yang akan menimbulkan keadaan diuresis osmotik. Efek keseluruhan adalah kehilangan cairan yang sangat besar dalam urin, sehingga menyebabkan dehidrasi cairan ekstraselular, yang selanjutnya menimbulkan dehidrasi kompensatorik cairan intraselular (Guyton, 1997). Efek lain yang jauh lebih penting dalam menyebabkan asidosis adalah berkurangnya konsentrasi natrium yang disebabkan oleh hal berikut.

Asam keto mempunyai nilai ambang yang rendah untuk diekskresikan oleh ginjal, oleh karena itu, bila pada diabetes konsentrasi asam keto meningkat, maka setiap hari dalam urin dapat diekskresikan 100 - 200 gram asam keto. Oleh karena asam keto ini merupakan asam kuat, yang pH-nya sebesar 4,0 atau kurang, maka asam keto dalam jumlah kecil dapat diekskresikan dalam bentuk asam, ternyata, asam keto diekskresikan dalam ikatan dengan natrium yang dilepaskan dari cairan ekstraselular. Akibatnya, konsentrasi natrium dalam cairan ekstraselular biasanya berkurang dan riatrium digantikan oleh bertambahnya jumlah ion hidrogen, jadi semakin memperberat asidosis (Guyton, 1997).

## 2. Komplikasi khronik yang berupa komplikasi vaskular jangka panjang

Komplikasi khronik diabetes melitus dapat dibagi menjadi komplikasi non vaskular yang terdiri dari gastroparesis, disfungsi seksual, dan perubahan kulit, dan komplikasi vaskular yang terdiri dari komplikasi mikrovaskuler (mikroangiopati). Komplikasi mikrovaskuler pada diabetes melitus terdiri atas retinopati, dan nefropati. Sedangkan Komplikasi makrovaskuler meliputi penyakit arteri koroner, kelainan pembuluh darah perifer, dan kelainan pembuluh darah serebral (Powers, 2001). Komplikasi mikrovaskuler

Glikosilasi non enzimatis. Jika kita amati struktur glukosa, tampak bahwa pada atom C pertama (C1) glukosa terdapat gugus aldehid. Gugus ini memiliki sifat reaktif, sehingga glukosa mudah membentuk produk kovalen melalui proses non-enzimatik, produk proses ini bermacam-macam, misalnya Hb terglikasi yang terbentuk melalui adisi nukleofilik glukosa dengan grup amino molekul protein mungkin juga pada DNA. Reaksi lambat dan tergantung waktu paruh dan protein tersebut. Produk ini mempunyai peranan penting dalam terbentuknya advanced glycosilation end-product (AGE). Reaksi yang serupa juga dapat terjadi pada protein dengan waktu paruh yang panjang seperti LDL, dan albumin. Produk AGE yang terbentuk akan terakumulasi terutama

pada protein yang mempunyai waktu paruh yang panjang (King, 1994). Dalam ruang ekstraselular, LDL yang terglikosilasi dapat mengadakan cross linked dengan kolagen atau bahan-bahan penyusun membran basal (laminin, heparan, fibronektin dan lain-lain) (Soeatmadji, 1997).

Di samping itu, LDL terglikosilasi dapat merubah ikatan LDL dengan reseptornya. Produk AGEs yang dikeluarkan ke sirkulasi dapat merubah fungsi vaskular dengan berikatan dengan makrofag dan selanjutnya akan mendatangkan beberapa respon imun seperti peningkatan TNF IL-1 dan sitokin-sitokin yang lain. TNF dan IL-1 mempunyai reseptor pada endotel sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas (King, 1994).

## 1.4 Stres Oksidasi

### 1.4.1 Definisi Stres Oksidasi

Stres oksidasi adalah suatu kondisi terjadinya produksi radikal bebas yang berlebih sehingga bersifat reaktif dan dapat bereaksi dengan molekul lain dan membentuk radikal baru (Suhartono., *et al.*, 2007).

Stres oksidatif didefinisikan sebagai suatu ketidakseimbangan terus-menerus antara antioksidan dan pro-oksidan yang mengakibatkan kerusakan sel ireversibel (Sukandar, 2006).

Stres oksidatif dapat dipandang sebagai gangguan keseimbangan antara produksi oksidan dan antioksidan defense atau destruksi reactive oxygen species (ROS); seperti anion superokida ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radikal nitrit oksida ( $\cdot\text{NO}$ ) dan periksonitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Ketidakseimbangan preoksidan ini dapat menyebabkan oksidasi makromolekul; meliputi lipid, karbohidrat, asam amino, protein dan DNA, diikuti dengan kerusakan selular dan jaringan (Sukandar, 2006).

Produksi radikal bebas dipercaya menginduksi disfungsi endotel dan merupakan tahap awal dari aterogenesis. Stres oksidasi berasal dari adanya oksidasi LDL yang dihubungkan karena adanya peningkatan jumlah makrofag pada sel otot polos. Adanya hipercolesterolemia juga menstimulus produksi superokside anion radicals( $\text{O}_2^-$ ) dari otot polos pembuluh darah sehingga dapat meningkatkan oksidasi LDL. Peningkatan produksi ROS akan menyebabkan ketidak keseimbangan produksi NO, vasokonstriksi, agregasi platelet dan adesi neutrofil pada endotelium (Tousoulis, *et all.*, 2007).

### 1.4.2 Etiologi Stres Oksidasi

Stres oksidatif yang disebabkan karena produksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akan meningkatkan phosphorylation tyrosin kinase dimana menunjukkan kaitan yang kuat antara sel netrofil pada endotelium dan permeabilitas pembuluh darah. Mekanisme dimana stres oksidatif oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menyebabkan aterogenesis adalah melalui produksi transkripsi faktor κβ (NFκβ) dan aktivator protein 1 (AP-1), dimana berpartisipasi dalam ekspresi molekul adesi seperti *vascular cellular adhesin molecules* (VCAM-1), *intracellular adhesin molecules* (ICAM-1), E-selestin dan sitokin yang lain (Akerman,2009).

Pada kondisi stres oksidasi sel mengalami penurunan kadar oxigen atau disebut sebagai kondisi peningkatan *reactive oxygen species* (ROS). Dimana molekul oksigen akan mengalami reaksi akhir seperti pembentukan superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dan peroxynitrite (OONO<sup>-</sup>), hypochlorous acid (HOCL), hydroxyl radical (OH<sup>-</sup>), aldhehydes reactif, lipid peroxide dan oksidasi nitrogen merupakan oksidan pada vaskuler. Vaskuler endotel dapat mengalami peningkatan stres oksidasi melalui beberapa mekanisme dan berimplikasi pada komplikasi patologik vaskuler seperti penyakit diabetes melitus. Mekanisme yang mendasari adalah relaksasi vaskuler dan lamanya status hiperglikemia( Cheng, 2007).

ROS meningkatkan sensitivitas kontraktil elemen Ca<sup>2+</sup> dan mengaktivasi mobilisasi cystisolic Ca<sup>2+</sup> dalam sel otot polos. ROS akan memodifikasi fungsi endotel secara langsung melalui aktivasi beberapa faktor transkripsi dengan adanya upregulasi molekul adesi pda platelet dan menurunkan keseimbangan produksi NO. Mekanisme secara tidak langsung melalui penurunan laju glycosi dan produksi AGEs atau melalui peningkatan osidasi LDL. O<sub>2</sub><sup>-</sup> diyakini dapat secara langsung menyebabkan kontraksi sel otot polos dan juga sebagai scavenger NO ( Asunta, 2009).

Pada kondisi diabetes melitus dapat menyebabkan peningkatan ROS akibat adanya peningkatan glukosa dalam darah. Overeksprepsi superoxide anion secara langsung mempengaruhi interaksi antara NO dengan *oxygen derived radical* yang secara mekanisme patologik merupakan faktor resiko aterosklerosis termasuk hipertensi, hipercolesterolemia dan diabetes melitus (Ulvi Bayraktutan, 2009)

Produksi ROS dapat menyebabkan penurunan produksi NO melalui penurunan produksi eNOS dan kofaktor BH4 (Hodnett and Hester, 2007). Ros dapat meningkatkan arginin yang berfungsi dalam metabolisme urea dan ornithine ( Berkowitz, et all., 2003).

## 1.5 Disfungsi Endotel

### 1.5.1 Definisi Disfungsi Endotel

Disfungsi endotel adalah suatu kondisi dimana pada sel endotel dalam fisiologis memburuk sehingga dapat menyebabkan terganggu fungsinya. Disfungsi endotel juga diartikan sebagai ketidakseimbangan antara faktor-faktor relaksasi dan kontraksi endotel, antara mediator proagulan dan koagulan atau antara zat-zat yang memicu dan menghambat pertumbuhan (*Raffaele, et al., 2007*).

Pada kondisi disfungsi endotel dapat terjadi peningkatan produksi mediator endotelial sehingga dapat mempunyai efek pada fungsi endotel vaskuler (*Mather, et al., 2004*).

### 1.5.2 Etiologi Disfungsi Endotel

Disfungsi endotel dapat disebabkan oleh berbagai mekanisme diantaranya adalah karena stres oksidasi (*Raffaele, et al., 2007*).

---

## 1.6 Mekanisme Stres Oksidasi pada Diabetes Melitus

Pada diabetes melitus, pertahanan antioksidan, dan sistem perbaikan seluler akan terangsang sebagai respon tantangan oksidatif. Sumber stress oksidatif yang terjadi berasal dari peningkatan produksi radikal bebas akibat autooksidasi glukosa, penurunan konsentrasi antioksidan berat molekul rendah di jaringan, dan gangguan aktivitas pertahanan antioksidan enzimatik (*Kowluru RA., 2001*). Kebermaknaan stress oksidatif pada patologi penyakit sering tidak tentu (*Halliwell B., et ll., 1999*). Dengan demikian stress oksidatif dan gangguan pertahanan antioksidan merupakan keistimewaan diabetes melitus yang terjadi sejak awal penyakit. Disamping itu, juga memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi (*Nuttal SL., et al., 1999*).

Beberapa studi mengungkapkan reduksi status antioksidan dalam sampel plasma dan serum dibanding kontrol berdasarkan usia. Fenomena ini dapat terjadi sejak anak-anak serta berjalan secara progresif dan semakin memburuk sesuai perjalanan waktu dan berkembangnya komplikasi (*Nuttal SL., et al., 1999*).

Pada diabetes anak ditemukan penurunan glutathion eritrosit, glutathion total,  $\alpha$ -tokoferol plasma, dan  $\beta$ -karoten plasma secara bermakna. Reduksi berbagai antioksidan ini terkait dengan pembentukan senyawa penanda adanya stress oksidatif, misalnya: peningkatan lipid hidroperoksida, diena terkonjugasi, dan protein karbonil secara bermakna (*Haffner SM., 1999*). Pada diabetes usia 50-60 ditemukan peningkatan peroksidasi lipid sejak onset diabetes (*Nuttal SL., et al., 1999*).

### 1.6.1 Pertahanan Antioksidan

Berbagai studi secara konsisten menunjukkan defisiensi status pertahanan antioksidan total pada pasien diabetes. Status pertahanan tersebut meliputi glutathion, vitamin C, antioksidan enzim superoksida dismutase (SOD), dan katalase (Nuttal SL.,*et al.*, 1999).

Beberapa peneliti mengungkapkan adanya penurunan vitamin E pada penderita diabetes (Barbagallo M.,*et al.*, 1999). Selain vitamin E, glutation juga ditemukan menurun pada penderita diabetes. Glutathion dalam bentuk tereduksi (GSH) terdapat dalam plasma manusia; intraseluler; dengan kemampuan sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas dengan fungsi secara umum sebagai buffer redoks, (Kowluru RA,2001) dan kofaktor enzim GPX. Bukti terbaru mengungkapkan bahwa GSH berperan penting pada diabetes melitus (Barbagallo M.,*et al.*, 1999). Perubahan terhadap ratio GSH tereduksi/teroksidasi (GSH/GSSG) mempengaruhi respon sel beta terhadap glukosa dan perbaikan aksi insulin, (Barbagallo M.,*et al.*, 1999), serta menurunkan aktivitas enzim GPX.

Nuttal SL.,*et al.*, 1999 menemukan penurunan status antioksidan total secara bermakna pada pasien diabetes lanjut usia. Meskipun demikian, pada kelompok tersebut tidak didapatkan perbedaan konsentrasi vitamin E serum secara bermakna.

### 1.6.2 Kerusakan Oksidatif

Hiperglykemia menjadi "*hallmark*" pada penyakit kronik serta kematian sel (Nuttal SL.,*et al.*, 1999). Pada diabetes dengan komplikasi, studi oleh Armstrong menunjukkan adanya korelasi antara peningkatan lipid hidroperoksid serum dengan prevalensi retinopati pada pasien diabetes (Ueno Y,2002). Penanda lain, yaitu isoproststan F2 juga ditemukan meningkat pada kedua tipe diabetes melitus (Beckman JA.,*et al.*,2001).

Kerusakan oksidatif pada DNA yang berkorelasi dengan peroksidasi asam lemak membran dan status antioksidan yang rendah juga ditemukan pada diabetes melitus (Ueno Y,2002). Fenomena ini bahkan sudah ditemukan sejak pra diabetes, yakni ketika resistensi insulin muncul, (Facchini FS.,*et al.*, 2000). atau saat toleransi glukosa terganggu (Nuttal SL.,*et al.*, 1999). Semakin tinggi derajat resistensi insulin pada individu sehat maka semakin besar peroksidasi lipid pada plasmany (Facchini FS.,*et al.*, 2000).

### 1.6.3 Glikasi Non Enzimatik pada Protein

Pada keadaan hiperglykemia, produksi berbagai gula pereduksi antara lain glukosa, glukosa-6-fosfat, dan fruktosa, akan meningkat melalui proses glikolisis dan jalur poliol. Glukosa sebagai gula pereduksi dapat menjadi agen yang bersifat toksik. Sifat

toksik tersebut disebabkan oleh kemampuan kimiawi gugus karbonil aldehid yang dimilikinya (Rahbani-Nobar ME.,1999). Meskipun sebagian besar keberadaan gula pereduksi dalam larutan sebagai struktur cincin non-aldehid, glukosa dalam bentuk rantai lurusnya merupakan aldehid (Rahbani-Nobar ME.,1999). Aldehid merupakan senyawa yang mampu berikatan secara kovalen sehingga terjadi modifikasi protein. Modifikasi tersebut dapat dibangkitkan dalam tubuh melalui berbagai mekanisme enzimatik dan non-enzimatik (Anderson MM.,*et al.*, 1999).

Selain glukosa, semua jenis gula pereduksi juga mampu menyelenggarakan reaksi glikasi pada bermacam protein. Selain protein, target kerusakan lain adalah lipid-amino seperti fosfatidiletanolamin, dan DNA (Rahbani-Nobar ME.,1999).

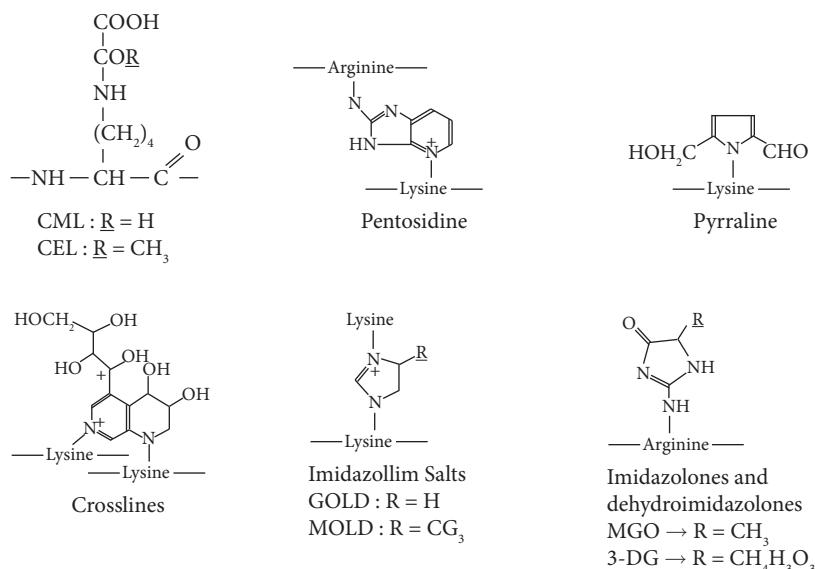
Reaksi pengikatan aldehid pada protein dikenal sebagai reaksi glikasi. Reaksi ini memiliki kemaknaan patologis yang besar. Berbagai contoh reaksi glikasi protein antara lain hemoglobin glikosilat, albumin, dan kristal lensa mata. Reaksi secara non-enzimatik glukosa darah dengan protein di dalam tubuh akan berlanjut sebagai reaksi *browning* dan oksidasi. Reaksi tersebut selanjutnya dapat menyebabkan akumulasi modifikasi kimia protein jaringan (Haffner SM,1999). Pada binatang diabetes, proses glikasi dapat teramatii secara luas pada berbagai organ dan jaringan termasuk ginjal, hati, otak, paru, juga saraf (Oldfield MD.,*et al* 2001). Secara keseluruhan perubahan kimia ini dikenal sebagai reaksi Maillard (Beckman JA.,*et al.*,2001).

Reaksi Maillard dapat terjadi pada kondisi penuaan fisiologis *in vivo* sebaik kondisi *in vitro* serta meningkat pada keadaan hiperglikemia, (Ueno Y.,2002). Disamping itu, juga berkaitan dengan komplikasi kronik diabetes melitus (Ueno Y.,2002). Reaksi ini secara umum terdiri atas empat tahap, yaitu:

1. Kondensasi non-enzimatik gula pereduksi, aldehid atau ketosa dengan gugus amino bebas dari protein atau asam nukleat membentuk glikosilamin. Reaksi ini dikenal sebagai fase 1 serta secara alamiah bersifat reversibel dan terjadi dalam beberapa jam (kurang dari 24 jam) (Soesilowati S., 2003).
2. Pada fase 2 akan terjadi penataan ulang glikosilamin menjadi produk Amadori. Reaksi ini terjadi akibat kadar glukosa yang masih tinggi dalam waktu lebih dari 24 jam (Soesilowati S.,2002). Produk Amadori tersebut bersifat toksik bagi jaringan namun masih reversibel (Simanjuntak D, 1998). Kadar produk Amadori pada sejumlah protein meningkat sebanding dengan derajat hiperglikemia pada diabetes melitus (Niwa T, *et al.*,1997).
3. Penataan ulang dan dehidrasi berganda produk Amadori menjadi amino atau senyawa karbonil reaktifitas tinggi seperti 3-deoxyglucosane (Niwa T, *et al.*,1997).
4. Reaksi antara senyawa karbonil dengan gugus amino lain dilanjutkan proses penataan ulang membentuk beragam *advance glycosylation ends products* (AGE-

products/AGEs) sebagai petunjuk *cross linking* dan *browning* pada protein (Niwa T, *et al.*, 1997).

AGEs merupakan salah satu produk sebagai penanda modifikasi protein sebagai akibat reaksi gula pereduksi terhadap asam amino (Carr A, 1999). Akumulasi AGEs di berbagai jaringan merupakan sumber utama radikal bebas sehingga mampu berperan dalam peningkatan stress oksidatif, (Beckett AH, 2003), serta terkait dengan patogenesis komplikasi diabetes mirip pada penuaan yang normatif. Pada diabetes, akumulasi AGEs secara umum mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati, serta katarak. (Beckett AH, 2003). Pengikatan AGEs terhadap reseptor makrofag spesifik (RAGE) mengakibatkan sintesis sitokin dan faktor pertumbuhan serta peningkatan stress oksidatif (Shoda H., *et al*, 1997).



### GAMBAR 1.6

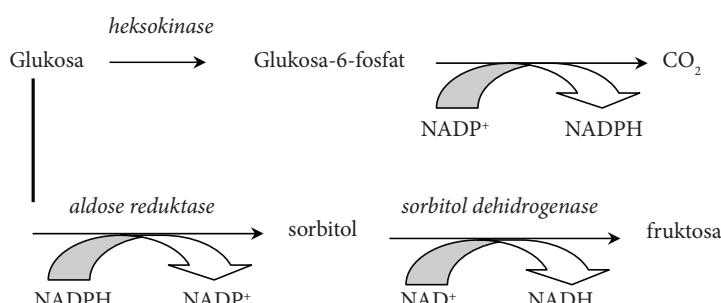
Struktur kimiawi berbagai AGEs (CML: N-(carboxymethyl) lysine; CEL: N-(carboxyethyl)lysine; GOLD: Glyoxal-lysine dimer; MOLD: methylglyoxal-lysine dimer; MGO: methylglyoxal; 3-DG (3-deoxyglucosone). Baynes JW, 1999

Terapi pada jalur ini dapat diupayakan melalui penekanan pembentukan AGEs, menghalangi interaksi AGEs-RAGE, dan/atau pengurangan peningkatan stress oksidatif seluler yang diperantarai AGEs-RAGE (Miyata T, 1996).

#### 1.6.4 Jalur Poliol-Sorbitol (Aldosa Reduktase)

Pada normoglikemia, sebagian besar glukosa seluler mengalami fosforilasi menjadi glukosa-6-fosfat oleh enzim heksokinase (Rahbani-Nobar, 1999). Bagian kecil dari glukosa yang tidak mengalami fosforilasi memasuki jalur poliol, yakni jalur alternatif metabolisme glukosa (Rahbani-Nobar, 1999). Melalui jalur ini, glukosa dalam sel dapat diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase (AR). Enzim aldose reduktase dapat ditemukan pada sejumlah jaringan mamalia termasuk lensa dan retina. Enzim tersebut mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol melalui reduksi gugus aldehid glukosa (Rahbani-Nobar, 1999).

Dalam keadaan normal, konsentrasi sorbitol di dalam sel, rendah. Akan tetapi, apabila terjadi keadaan hiperglikemia, konsentrasi sorbitol meningkat. Sorbitol, dengan bantuan enzim sorbitol dehidrogenase (SDH) akan diubah menjadi fruktosa. Degradasi sorbitol ini berjalan lambat sehingga sorbitol menumpuk dalam sel, sehingga dapat menyebabkan peningkatan tekanan osmotik dan selanjutnya dapat merusak sel (Nishimura CY.,1998).



**GAMBAR 1.7**

Jalur metabolisme utama dan alternatif glukosa (Ueno Y, 2002)

Masuknya substrat (*substrat flux*) melalui jalur poliol, selain dapat meningkatkan kadar sorbitol dan fruktosa intraseluler, juga menurunkan rasio NADPH terhadap NADP<sup>+</sup>. Disamping itu, rasio NADH terhadap NAD<sup>+</sup> sitosolik juga menurun. Berkurangnya NADPH di dalam sel akibat meningkatnya AR, dapat menghambat aktivitas enzim lain yang membutuhkan NADPH (Nishimura CY,1998).

#### 1.6.5 Autooksidasi Glukosa

Proses autooksidasi glukosa dikatalisis oleh senyawa logam dalam jumlah kecil seperti besi dan seng. Hasil katalisis tersebut adalah senyawa oksigen reaktif (Soesilowati S., 2003). Autooksidasi glukosa terjadi pada fase I proses glikasi non enzimatik pada protein yang secara alamiah masih bersifat reversibel (Soesilowati

S., 2003). Fase ini merupakan sumber hidrogen peroksida yang mampu menghambat Cu/ZnSOD. Selain hidrogen peroksida, radikal superoksida juga dihasilkan oleh proses autooksidasi glukosa tersebut serta terkait dengan pembentukan protein glikasi dalam plasma pasien diabetes (Droge W., 2002). Akibat yang ditimbulkan berupa peningkatan aktivitas radikal superoksida serta kerusakan enzim superoksida dismutase.

## 1.7 Mekanisme Disfungsi Endotel pada Stres Oksidasi Hiperglikemia

### 1.7.1 Respon Sel Endotel Akibat Hiperglikemia

Hiperglikemia merupakan suatu kondisi dimana terjadi peningkatan kadar glukosa dalam darah. Hal ini bisa disebabkan oleh ketidakseimbangan metabolisme glukosa (Sweeney, 2002).

Hiperglikemia dapat mereduksi stres oksidatif, meningkatkan radikal bebas dan peningkatan sitokin proinflamasi, meningkatkan aktivitas Akt dan meningkatkan apoptosis dalam kultur endotel (Fiordaliso, *et al.*, 2004). Adanya kondisi hiperglikemi juga dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxigen Species* (ROS) melalui jalur fosforilasi IRS-1 dimana akan mempengaruhi kemampuan peingkatan aktivitas PI3 kinase. Insulin meningkatkan produksi NO di sel endotel melalui jalur IRS-1 dan PI3-kinase yang menyebabkan fosforilasi dari eNOS melalui Akt yang tergantung kalsium (Montagnani, *et al.*, 2002; Yu, *et al.*, 2002)

Aktivasi insulin secara dependent akan mengaktifasi sistem sinyaling PI3 Kinase yang berperan penting dalam efek kardioproteksi (Malmberg, *et al.*, 2005). Kondisi disfungsi endotel oleh karena paparan glikosa tinggi dapat mengakibatkan ketidakseimbangan vasodilator dengan penurunan produksi NO dan meningkatkan ROS (Assunta, *et al.*, 2009)

Pemberian glikosa tinggi dapat mempengaruhi kematian sel endotel pada model kurkur endotel. Dilaporkan oleh Hinonori, 2005 bahwa sel endotel yang diberikan perlakuan dengan D-glukosa akan menunjukkan adanya apoptosis pada sel endotel. Disfungsi endotel disebabkan oleh berkurangnya beberapa susbtansi pada sel endotel diantaranya PGI2, NO, dan CNP. Hipotesa ini memegang peranan penting dalam perkembangan penyakit vaskuler karena diabetes.

Pemberian D-glukosa pada sel endotel mempengaruhi kematian sel endotel melalui induksi apoptosis. Apoptosis dapat terjadi melalui peningkatan secara signifikan bax yang merupakan faktor proapoptotik dengan pemberian perlakuan D-glukosa tinggi. Dengan meningkatnya rasio bax menjadi bcl-2 yang dipengaruhi oleh D-glukosa akan meningkatkan percepatan kematian sel retina dalam kondisi

hiperglikemia pada invivo. Hiperglikemia dapat meningkatkan ekspresi bax dimulai dengan tahap preimplantasi blastosit pada tikus. Defisiensi bax pada blastosit tikus dapat memproteksi/ melindungi apoptosis karena pengaruh glukosa. Pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Hinonari, 2005 dapat diketahui bahwa bax bisa menjadi kunci terjadinya apoptosis karena pengaruh hiperglikemia.

Respon pertahanan sel endotel pada kondisi hiperglikemia melibatkan peran *hepatosit growth factor* (HGF) sebagai anti apoptotik pada sel endotel. Produksi HGF pada vaskuler dipengaruhi secara *down reguasi* oleh adanya glukosa tinggi melalui aktivitas transformasi *growth factor -β*. HGF secara signifikan meningkatkan bcl2 tanpa mempengaruhi protein bax dalam kondisi glukosa tinggi. Peningkatan bcl-2 akan mengaktifasi caspase 3 dan 9. HGF mempunyai peran sebagai anti apoptotik melalui induksi bcl-2 tidak hanya pad kondisi hiperglikemia saja tetapi juga adanya stimulasi lain yang mengaktifkan jalur mitokondria. HGF dapat menurun oleh karena ktivasi caspase 3 yang dpengaruhi oleh TNF $\alpha$  melalui jalut PI3 Kinase, dimana juga dipengaruhi oleh aktivasi Akt ( Bouloumie *et al.*, 1999).

Peran HGF sebagai anti apoptotik seperti VEGF dan fibroblas growth factor yang mempunyai peran yang sama. Sebagai penghambat apoptosis ekspresi VEGF dan reseptornya dapat menurunkan myocardium pada tikus dengan diabetes melitus seperti halnya HGF. Bagaimanapun mekanisme HGF petensial mempunyai kemampuan secara langsung berhubungan dengan bcl-2 dan c-met(reseptor spesifik HGF) melalui protein bag-1. Protein bag-1 dilaporkan berinteraksi dengan protein bcl-2 dan bekerjasama dengan bcl-2 dalam menekan apoptosis. Protein bcl-2 mempunyai peran sangat penting dalam mencegah kematian sel melalui ikatan bcl-2, protein raf-1 kinase dan c-met (Hironari.*et al.*, 2005).

Kerjasama antara protein bcl-2 berperan dalam mencegah kematian sel melalui peran HGF. Diyakini bahwa bcl-2 sebagai anti apoptotik melalui 2 mekanisme yaitu pro caspa se 8 dan pro caspase 9 dan menghambat perubahan apoptosis mitokondrial termasuk memunculkan cytochrome C dan menurunkan apoptosis melalui jalur mitokondria. Dilaporkan bahwa HGF dapat memproteksi kematian sel melalui fosforilasi PI3 Kinase I dan peningkatan bcl-xL serat adanya translokasi bax dapat merugalasi perubahan BH3. PI3 kinase dapat menyebabkan apoptosis melalui penghambatan bax BH3 epitop. Kematian sel endotel karena apoptosis dapat terjadi karena hiperglikemia dan faktor-faktor lain yang mempunyai kemampuan manghambat anti apoptotik (Nakagami., *et al*, 2001).

### 1.7.2 Penanda Disfungsi Endotel Akibat Hiperglikemia

Sel endotel yang mengalami kerusakan akibat paparan glukosa tinggi dapat mengalami perubahan yang nantinya dapat digunakan sebagai marker atau pertanda

adanya disfungsi endotel akibat hiperglikemia diantaranya adalah (Asunnta, *et al.*, 2009):

1. Perubahan struktur barier endotel dan perubahan matrik dengan ditemukan adanya: peningkatan basal membran. Reduksi *glycocalyx*
2. Mikroalbuminemia
3. Perubahan respon vasodilator ditunjukkan dengan: penurunan produksi *Nitric Oxide* (NO), peningkatan sintesis endotel ditandai dengan peningkatan produksi *vascular endothelial growth factor* (VEGF)
4. Peningkatan respon inflamatori ditunjukkan dengan peningkatan ekspresi molekul adesin dan adesi leukosit seperti VCAM, ICAM, dan E-selectin, peningkatan produksi dan respon mediator sirkulasi termasuk potein C-reactive.
5. Perubahan hemostasis ditunjukkan dengan adanya peningkatan kadar faktor von willebrand dalam plasma, peningkatan plasminogen aktivator inhibitor-1.

### 1.7.3 Mekanisme Resistensi Insulin

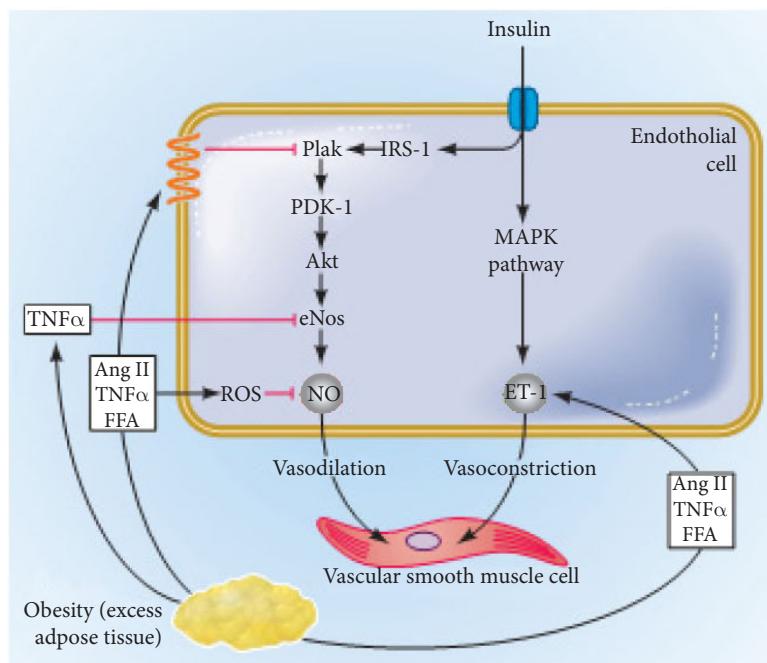
Efek nyata dari metabolisme glukosa dan lipid adalah peningkatan insulin. Insulin mempunyai peran secara fisiologi pada pembuluh darah, termasuk mereabsorpsi sodium dalam renal, menstimulasi aktivitas sympathetic dan menstimulus produksi ET-1 dan NO untuk menjaga keseimbangan fungsi endotel (Muniyappa, *et al.*, 2007).

Secara fisiologis insulin mempunyai peran dalam endotel sebagai mediator pada ikatan antara insulin dan reseptornya pada sel endotel. Stimulasi insulin pada sel endotel merupakan awal dari aktivasi eNOS dan produksi NO melalui peningkatan vasodilatasi, peningkatan aliran darah dan transport nutrisi. Penggunaan insulin secara efisien dapat meminimalkan *uptake* glukosa pada jaringan target. Produksi NO melalui respon insulin dihasilkan dari aktivasi reseptor insulin tyroxin kinase (IR), fosforilasi dari reseptor insulin substrate-1 (IRS-1), aktivasi jalur sinyaling phospotidilinositol (PI3) Kinase pada fosforilasi dan aktivitas Akt. Akt kemudian secara langsung memfosforilasi eNOS pasca ser menghasilkan peningkatan aktivitas eNOS dan produksi NO (Montagnani, *et al.*, 2001).

Resistensi insulin ditandai dengan penurunan sensitivitas *uptake* glukosa yang dimediasi oleh insulin. Kerja utama insulin di otot dan jaringan adipose adalah translokasi transporter glukosa (GLUT4) pada permukaan sel yang menyebabkan *uptake* glukosa di jaringan perifer. Sebelum insulin berinteraksi dengan reseptor pada membran plasma, insulin dan glukosa harus dibawa terlebih dahulu ke sel otot pada jumlah yang normal dan waktu yang tertentu. Hal ini membutuhkan jalur sinyal yang tergantung PI3-kinase (Montagnani, *et al.*, 2002).

Pada kerja metabolik, insulin mempunyai dua mekanisme kerja yang terpisah pada vaskulatur arterial untuk meningkatkan pengiriman insulin dan glukosa di otot skeletal. Insulin untuk melebarkan pembuluh darah yang resisten sehingga

meningkatkan aliran darah total otot skeletal. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan sekumpulan aliran darah seiring dengan peningkatan uptake glukosa yang dimediasi insulin. Meskipun beberapa studi mengkonfirmasi kerja insulin di vaskuler (Cardillo, et al., 2004), namun beberapa studi tidak dapat membuktikan perubahan total aliran darah oleh insulin. Selanjutnya perubahan uptake glukosa yang dimediasi oleh insulin sering didahului oleh perubahan pada aliran darah di kaki, dan beberapa studi membuktikan selama hiperinsulinemia dan manipulasi aliran darah total di otot dengan beberapa vasodilator berbeda menunjukkan bahwa aliran darah total di otot dapat meningkat tanpa adanya perubahan pada uptake glukosa yang dimediasi oleh insulin. Dengan demikian dalam menstimulasi uptake glukosa, kemampuan insulin dalam meningkatkan aliran darah total masih meragukan (Montagnani, et al., 2001).



**GAMBAR 1.8**

Mekanisme insulin memediasi produksi nitric oxide dan endotelin 1. Mekanisme insulin dalam memediasi produksi *nitric oxide* (NO) dan endotelin 1 (ET-1) yang menyebabkan vasodilatasi dan vasokonstriksi. Angiotensin II (AngII), *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), dan *free fatty acids* (FFA) menghambat jalur *PI3-kinase* (PI3-K) dan merangsang jalur MAPK. IRS-1, *insulin receptor substrate* 1; PDK-1, *phosphoinositide-dependent kinase* 1; Akt, *protein kinase B*; eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*. *Physiology*, 2007

Kerja vasodilatasi insulin memerlukan jalur sinyal PI3-kinase. Insulin menginduksi stimulasi Akt yang secara langsung meningkatkan aktivitas endotelial NO synthase (eNOS), yang menyebabkan peningkatan produksi NO (Potenza, *et al.*, 2005; Kim, *et al.*, 2006). Disamping kerjanya sebagai vasodilator, insulin juga mempunyai efek vasokonstriktor. Efek vasokonstriktor ini terutama dimediasi oleh peptide vasokonstriktor *endotelin-1* (ET-1) (Kim JA, 2006). ET-1 diproduksi oleh endotel vaskuler melalui stimulasi jalur sinyal intraseluler MAP-kinase dan ERK1/2 (Eringa, *et al.*, 2004). Dalam hal ini jalur PI3-kinase tidak termasuk. (gambar 2.5). Dengan demikian insulin mempunyai dua efek yang berlawanan sebagai vasodilator dan vasokonstriktor yang efek selanjutnya tergantung dari keseimbangan keduanya. Dalam keadaan normal akan menyebabkan keadaan netral atau vasodilator.

### 1.7.3.1 Mekanisme Asam Lemak Bebas

Obesitas berhubungan dengan disfungsi endotel dapat disebabkan karena terdapat efek yang mempengaruhi keseimbangan ini. Pertama, obesitas berhubungan dengan peningkatan produksi ROS (Cecilia *et al.*, 2004; Kim, *et al.*, 2006). ROS membatasi bioavailabilitas NO melalui penurunan produksi NO dan secara langsung menyebabkan inaktivasi NO melalui *superoxide* ( $O_2^-$ ). Kedua, ekspresi dan aktivitas eNOS di otot dan ginjal sangat minimal pada obesitas, sehingga membatasi produksi NO (Caballero dan Enrique, 2003; Kim, *et al.*, 2006). Pada akhirnya jalur transduksi sinyal insulin intraseluler mengalami kegagalan. Peningkatan asam lemak menginduksi fosforilasi IRS-1 melalui reseptor insulin dan menyebabkan kegagalan aktivasi PI3-kinase (Kim, *et al.*, 2006). Sebagai konsekuensi adanya defek seluler ini, vasodilatasi oleh endotel termasuk dilatasi oleh insulin juga mengalami gangguan pada obesitas. Sebaliknya jalur sinyal insulin yang memediasi vasokonstriksi terlihat *intake* atau hanya sebagian yang mengalami kegagalan pada obesitas (Cardillo, *et al.*, 2007).

Insulin menginduksi vasokonstriksi ditunjukkan pada otot skeletal arteriolikus obes. Dengan demikian terdapat ketidakseimbangan produksi NO dan ET-1 pada obesitas yang menyebabkan vasoresistifitas bergeser dari vasodilatasi ke vasokonstriksi. Disfungsi endotel ini berkontribusi terhadap obesitas yang berkaitan dengan resistensi insulin (Gao, *et al.*, 2003).

Pada obesitas dan diabetes ditemukan terjadi abnormalitas metabolik termasuk peningkatan kadar sitokin di sirkulasi seperti TNF- $\alpha$  dan beberapa metabolit seperti FFA, diacylglycerol, dan fatty acyl-coenzyme A. Resistensi beberapa jaringan target terhadap efek insulin menunjukkan terdapat gangguan respon seluler terhadap insulin yang dimediasi oleh penurunan sinyal insulin. FFA meningkatkan fosforilasi serin dari IRS-1 pada kultur miosit skeletal, menurunkan fosforilasi tirosin IRS-1 dan penurunan aktivasi PI3-kinase (Yu, *et al.*, 2002). Hal serupa juga ditunjukkan

pada sel endotel yang terpapar TNF- $\alpha$  terdapat kegagalan insulin yang tergantung produksi NO dengan penurunan fosforilasi tirosin IRS-1 dan peningkatan fosforilasi serin IRS-1 (Kim, et al., 2002). Hal ini menunjukkan bahwa FFA menganggu insulin yang tergantung fosforilasi tirosin IRS-1 yang selanjutnya menurunkan produksi NO.

FFA dan TNF- $\alpha$  juga ditunjukkan dapat mengaktifkan IKK- $\beta$  di adiposit dan hepatosit, yang dapat meningkatkan fosforilasi serin IRS-1 yang diikuti penurunan insulin yang tergantung fosforilasi tirosin IRS-1, aktivasi PI3-kinase dan akhirnya transport glukosa (Yu, et al., 2002; Gao, et al., 2003). IKK- $\beta$  merupakan serin kinase yang mengontrol aktivasi NF-kB, suatu faktor transkripsi yang berhubungan dengan inflamasi. Data terakhir menunjukkan bahwa IRS-1 secara langsung mengalami fosforilasi oleh I $\kappa$ B- $\beta$  pada residu serin dan bahwa IRS-1 mewakili kelompok substrat I $\kappa$ B- $\beta$  (Gao, et al., 2003). Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme oleh jalur inflamasi berkontribusi terhadap kegagalan sinyal insulin.

### 1.7.3.2 Mekanisme Hiperinsulinemia

Resistensi insulin dapat terjadi karena adanya gangguan dalam metabolisme insulin sehingga dapat menyebabkan kondisi hiperinsulinemia. Hiperinsulin dapat menyebabkan terganggunya jalur MAP kinase, dimana jalur ini mempunyai peran penting pada resistensi insulin. Hiperinsulin dapat menstimulasi peningkatan sekresi ET-1 dan peningkatan aktivasi ET-1 melalui vasokonstriksi sehingga dapat menyebabkan keabnormalan fungsi vaskuler (Naruse, et al., 2006)

Peningkatan kadar insulin menstimulasi peningkatan ekspresi VCAM-1 dan E-selectin pada endotel melalui jalur MAPK. Pada kondisi ini dapat berdampak pada fungsi endotel dengan manifestasi hiperselluler, eningkatan sintesis dan akumulasi dari matriks ekstraselluler sehingga dapat memengaruhi struktur pembuluh darah (Assunnta, et al., 2009).

---

## 1.8 Daftar Pustaka

- Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase of human phagocytes generates N-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2000, 104(1):103-113.
- Assunta Maria Potenza, Sara Gagliardi, Carmela Nacci, Maria Rosaria Carratu and Monica Montagnani. Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Target. *Current Medical Chemistry*, 2009. 16. 94-112.
- Bambang dan Soehartono. 2005. Stres Oksidatif dan peran antioksidan pada Diabetes Malitus. Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Bagian Kimia Kedokteran.

- Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. 2001. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilatation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 2001; 103:1618-23.
- Casper G. Schalkwijk and Coen D.A. Stehouwer, 2005 Vascular complication in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction, *Clinical Science* (2005) 109, 143-159
- Droge. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95
- Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser Lango, Jameson, Lascalzo. 2008. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17 th edition. By The Mc Graw-Hill Companies, Inc
- Facchini FS, Humphreys MH, DoNascimento C, Abbasi F, Reaven GM. 2000. Relation between insulin resistance and plasma concentrations of lipid hydroperoxides, carotenoids, and tocopherols. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:776-9.
- Gu D Reynolds K, Duan X. InterASIA Collaborative Group. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in the Chinese adult population: International Colaborative Study of Cardiovascular Disease in Asia. *Diabetologia*, 2005. 46(9): 1190-1198.
- Goldschmidt-Clermont, M. A. Creager, D. W. Lorsordo, G. K. W. Lam, M. Wassef, and V. J. Dzau. Atherosclerosis: recent discoveries and novel hypotheses. *Circulation*, 2005 vol. 112, no. 21, pp. 3348-3353.
- Haag M. Dippenaar NG. Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: Short review of a multifaceted connectin. *Med Sci Monit*, 2005. 11(12):RA359-RA367
- Hussein F.Sakr. Endothelial Dysfunction Induce by Type 2 Diabetes Mellitus and Fibrinolytic Activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 6(2): 103- 110.
- Huxley R James WP, Barzi F. Obesity in Asia Callaboration. Ethnic comparisons of the cross sectional relationship between measures of body size with diabetes and hypertension. *Obes Rev*, 2008. 9 (suppl1): 53-61.
- Hinonori Nakagami, Yusufumi Kaneda, Toshio Ogihara and Ryuichi Morishita. Endothelial Dysfunction in Hyperglycemia as a trigger of Atherosclerosis. *Current Diabetes Reviews*, 2005. J, 59-63.
- Haffner. Pre-diabetes, insulin resistance, inflammation and CVD risk. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2003. vol. 61, supplement 1, pp. S9-S18
- Inge A. M. van den Oever, Hennie G. Raterman, Mike T. Nurmohamed, and Suat Simsek. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus, *Mediators of Inflammation Article*, 2010.ID 792393, 15 pages doi: 10.1155 / 2010 / 792393
- Jansson. 2007. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *Journal of Internal Medicine*, vol. 262, no. 2, pp. 173-183
- Juliana C.N.C, Vasanti M, Weiping J, Takashi K, Chittaranjan S Y, Kun-Ho Y, Frank Diabetes in Asia, Epidemiology, Risk factor, and Pathophysiology. *American Medical Association, JAMA*, 2009. Vol 301, No.20: 2129-2140
- Jia WP, Pang C, Chen L. Epidemiological characteristic of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in a Chinese adult population: the Shanghai Diabetes Studies, a cross-



sectional 3 year follow-up study in Shanghai urban communities. *Diabetologia*, 2007. 50(2): 286-292.

Jorge Calles-escandon and Marilyn Cipolla. Diabetes and Endothelial Dysfuntion: A Clinical perspective, *Endocrine reviews* 22(1):36-52.

Park Y, Lee H, Koh CS. 2005. Prevalence of diabetes and IGT in Yonchon County, South Korea. *Diabetes care* 18(4): 545-548. Kabir Z, Clancy L, Connoly GN. 2007. Tobacco control efforts: where is India now? *Lancet*, 2001;370(9582):61

Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experiment galactosemia. *Diabetes* 2001; 50:1938-42.

Libby. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 868-874

Misra A, Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in deveoping countries, *J Cli Endocrinol Metab*, 2008. 93(11) (suppl 1): 59- 63.

Oates, P.J. Polyol pathway and Diabetic peripheral neuropathy. *Int Rev Neurobiol*, 2002. 50, 325-392

Ramachandran A. Epidemiology of diabetes in India-three decades of research. *J Assoc Physicians India*, 2005. 53:34-38.

Schalkwijk and C. D. A. Stehouwer. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*, 2005 vol. 109, no. 2, pp. 143 – 159.

Shetty PS. Nutrition transition india. *Public Health nutr.*, 2002.5(A): 175-182.

Soesilowati S. Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment. *Acta Medica Indonesiana*, 2003.; 35(1):27-34.

Shoda Shoda H, Miyata S, Liu BF. Inhibitory effect of tenilsetam on the Maillard reaction. *Endocrinology*, 2007.; 138(5):1886-92.

Soeatmadji DW. Peran stress oksidatif dalam patogenesis angiopati mikro dan angiopati makro diabetes melitus. *Medika*, 2007; (5):318-25.

Sekaran Muniandy, Rajes Gvist, Gracie Ong Siok Yan, Chook Jack Bee, yiaw Koon Chu and Arokiasamy Vinsent Rayappan. The oxidative stress of hyperglycemia and the inflammatory proces in endothelial cells. *The Journal of Medical Investigation*, 2009. Vol 56: 6-9.

Tan, W.-S. Chow, V. H. G. Ai, and K. S. L. Lam. Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasomotor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2002. vol. 18, no. 1, pp. 71-76.

Ueno, Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T, Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr.* 2002; 132:897-900.

Way, N. Katai, and G. L. King. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*, 2001, vol. 18, no. 12, pp. 945-959.

Wong KC, Wang Z. Prevlence of type 2 diabetes mellitus of Chinese population in Mainland China, Hongkong and Taiwan. *Diabetes Res Clin pract*, 2006. 73(2):26-134.



- Wang Y, Mi J, Shan xy, Wang OJ, Ge KY. Is china facing an obesity epidemic and the consequences? The trend in obesity and chronic disease in China. *Int J Obes*, 2007. (Lond) 31(1):177-188.
- Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Comuz J. Active smoking and the risk of type diabetes: a systematis review nd meta-analysis. *JAMA*, 2007. 298 (22):2654-2664
- Wineke Bakker, Etto C. Eringa, Pieter Sipkema, Victor W, van Hinsbergh. Endothelial dysfunction and diabetes: role of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell tissue Res*, 2009. 335: 165-189 Doi 10.1007 / s00441-008-0685-6
- Yang, X. Mo, Q. Gong. Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose. *Apoptosis*, 2008. vol. 13, no. 11, pp. 1331-1343
- Verma and T. J. Anderson. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002. vol. 105, no. 5, pp. 546-549





## BAB 2

# Eksplorasi Aktivitas Antioksidan Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Therapi Penyakit Diabetes Melitus

---

### 2.1 Abstrak

*Catechins Green tea* merupakan salah satu minuman yang banyak dikonsumsi untuk kesehatan, karena didalam *green tea* terdapat kandungan *polyphenol* dan *flavonol* dimana berperan sebagai antioksidan dengan cara yaitu berfungsi dalam menghambat ROS, mengikat ion metal pada reaksi redok, menghambat reduksi transktipsi faktor, menghambat enzim prooksidan dan mempengaruhi produksi enzim antioksidanserta sebagai pendonor elektron hidrogen. Dengan demikian *catechins green tea* sebagai antioksidan dapat mengurangi terbentuknya ROS dan mencegah terjadinya disfungsi endotel melalui mekanisme: penghambatan oksidasi NADPH, penigkatan produksi prostasiklin, penghambatan ACE dan juga *catechins* berperan sebagai antiinflamasi yang bekerja dalam menghambat sitokin proinflamasi seperti TNF $\alpha$ , menghambat adesi molekul seperti VCAM, ICAM, P-selectin dan berperan juga dalam penghambat peningkatan ADMA yang merupakan salah satu marker disfungsi endotel.

Sehingga *catechin green tea* diyakini dapat menghambat stres oksidasi, dan antiinflamasi pada sel endotel sehingga dapat digunakan sebagai alternatif dalam perbaikan disfungsi endotel dan mencegah terjadinya komplikasi penyakit pada diabetes melitus.

## 2.2 Latar Belakang

Diabetes merupakan masalah kesehatan global. *International Diabetes Federation* memprediksi individu dengan diabetes melitus akan meningkat. Pada tahun 2007 tercatat 240 miliar penderita diabetes melitus tipe II, jumlah ini diperkirakan akan meningkat menjadi 380 miliar pada tahun 2025 pada negara-negara dengan pendapatan rendah dan menengah (Juliana *et al.*, 2009). Dari seluruh penderita diabetes melitus di dunia, lebih dari 60 % berasal dari Asia. Prevalensi diabetes melitus pada penduduk Asia mengalami peningkatan dengan cepat pada dekade terakhir mencapai lebih dari 110 miliar individu pada tahun 2007 (Wild *et al.*, 2004).

Hiperglikemia terjadi karena terganggunya metabolisme glukosa pada tingkat seluler. Hiperglikemia mempunyai kontribusi besar dan merupakan kunci pathway metabolismik yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan secara luas. Hal ini terjadi karena adanya reaksi nonenzimatik akibat kelebihan glukosa dan beberapa protein seperti hemoglobin dan albumin yang menghasilkan *advanced glycosylated end product* (AGE). Produksi AGE dapat menyebabkan terganggunya integritas sel dengan adanya modifikasi fungsi protein atau karena adanya pengaruh produk *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan senyawa oksigen reaktif (Thornally, 2002).

Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan (Ueno *et al.*, 2002). Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan prooksidan sehingga dapat meningkatkan produksi radikal bebas. Hal itu merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidasi (Casper *et al.*, 2005).

Stres oksidasi dapat menghambat fungsi endotel karena menyebabkan ketidakseimbangan produksi NO (Kadirvelu, 2002). Disfungsi endotel merupakan kondisi dimana adanya ketidakseimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilatasi pada sel endotel. Disfungsi endotel dapat disebabkan oleh berbagai kondisi diantaranya adalah kondisi resistensi insulin, hipertensi, obesitas, inflamasi, dislipidemia dan hiperglikemia (Inge *et al.*, 2010).

Disfungsi endotel pada hiperglikemia, dapat mengaktivasi transkripsi faktor NF $\kappa$ B sehingga menginduksi ekspresi adesi molekul, peningkatan kemokin, dan pengeluaran sitokin lainnya. Peningkatan ROS pada disfungsi endotel dapat menyebabkan ketidakseimbangan produksi NO sehingga memicu perkembangan aterosklerosis (Jean *et al.*, 2004).

Pada disfungsi endotel dapat menyebabkan terganggunya fungsi endotel sebagai pengatur keseimbangan hemostasis, sebagai mediator pertumbuhan sel otot polos

pembuluh darah dan proses inflamasi. Terganggunya keseimbangan homeostasis pembuluh darah dapat dilihat dengan adanya peningkatan *tissue plasminogen activator* (t-PA), peningkatan *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI1). Selain itu juga akan terjadi peningkatan mediator pertumbuhan *smooth muscle cells* (SMC) seperti VEGF, IGF1 dan bFGF. Bila terjadi respon inflamasi pada endotel maka akan terjadi peningkatan molekul adesi seperti ICAM, VCAM, E-Selectin serta terjadi penurunan produksi NO dan prostacyclin sebagai antagonis dari Angiotensin II (Alain, *et al.*, 2009).

Untuk itulah perlu adanya suatu perlakuan pada disfungsi endotel sebelum terjadi kerusakan lebih lanjut. Beberapa tindakan penangan terjadinya disfungsi endotel adalah pemberian suplemen L- arginin, terapi fibrate, pemberian folate, pengobatan dengan statins, penghambatan AGE, penghambatan PKC, penghambatan ACE dan antioksidan. ( J. Callaes *et al.*, 2001).

Penggunaan antioksidan saat ini merupakan alternatif dalam pencegahan dan perlakuan pada disfungsi endotel. Penelitian yang telah dilakukan oleh Keancy, 1994 bahwa antioksidan dalam vitamin C dan E dapat menurunkan P-selectin pada pasien hiperkolesterol. Ini diyakini bahwa antioksidan bisa sebagai penanganan kondisi disfungsi endotel (Anderson, *et al*, 2000). Sehingga penggunaan antioksidan sepertinya mulai dikembangkan pada disfungsi endotel.

*Catechins Green tea* mempunyai kandungan *polyphenol* dan *flavonol* dimana berperan dalam mengabsorbsi ion metal, menjaga keseimbangan metabolisme karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya adalah menghambat aktivasi enzim  $\alpha$  *glucosidase*, menghambat absorpsi glukosa pada intestinal, melindungi sel  $\beta$  pankreas, meningkatkan sekresi insulin, mengaktifasi AMPK, sebagai antioksidan yang bekerja menghambat stres oksidasi, sebagai antiinflamasi pada endotel dan proliferasi pada pertumbuhan sel endotel (Kati Hanhinhineva, *et al.*, 2010). Diharapkan dengan pemberian *catechins green tea* dapat memperbaiki kerusakan endotel sehingga dapat mencegah terjadinya komplikasi lanjut seperti penyakit cardiovascular.

Pada penelitian yang dilakukan dengan hewan coba diketahui bahwa *Catechin green tea* menghambat proses penyakit degeneratif, mempunyai aktivitas sebagai antiproliferasi pada sel hepatoma dan juga mempunyai aktivitas hipolipidemik pada hepar tikus yang dibuat hepatoma (Vanessa *et al.*, 2004).

Pada studi yang dilakukan oleh Tsuneki, 2004 perlakuan pada hewan coba menunjukkan bahwa *polyphenols* dalam *catechin green tea* mempunyai efek sebagai antioksidan menurunkan tekanan darah, memproteksi perkembangan penyakit koroner dengan mengontrol kadar gula darah dan berat badan.

Pada bab ini akan kami jelaskan secara detail bagaimana mekanisme *Catechin green tea* sebagai antioksidan dan antiinflamasi pada disfungsi endotel.

## 2.3 Tinjauan Pustaka

### 2.3.1 Catechins Green Tea Sebagai Antioksidan

*Catechins green tea* mempunyai kandungan senyawa aktif *polyphenol* bekerja sebagai antioksidan non enzimatik melalui 4 cara yaitu penangkap radikal bebas, pengelat logam transisi (*chelation ion logam*), inhibitor enzim oksidatif dan kofaktor enzim antioksidan (Tachibana, H, 2011).

*Reactive oxygen species* (ROS), merupakan senyawa yang sangat reaktif sehingga mudah berubah menjadi radikal bebas. Senyawa ROS yang berpotensi menjadi radikal bebas diantaranya adalah oksigen singlet ( $O_2$ ), hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan ion hipoklorit ( $HOCl$ ). Sedangkan senyawa ROS yang termasuk radikal bebas meliputi radikal hidroksil ( $OH^-$ ), radikal peroksil ( $ROO^-$ )-alkoksil ( $RO^-$ ) dan radikal superoksida ( $O_2^-$ ).

*Catechins green tea* mengandung vitamin C dan E yang merupakan antioksidan nonenzimatik yang kuat, karena antioksidan ini bersifat hidrofilik yang merupakan agen pereduksi (Tachibana., 2011). Kandungan vitamin C dalam *Catechins* mampu menghambat pembentukan radikal superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil ( $OH^-$ ), radikal peroksil ( $ROO^-$ ) oksigen singlet dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Sebagai reduktor, *catechins* akan mendonorkan satu elektronnya atau atom hidrogen (Michalak, 2006).

Dalam peranannya sebagai antioksidan *catechins* yang mengandung *polyphenol* mampu mengikat ion logam (Fe dan Cu) yang berpotensi menjadi radikal bebas baru bila terdapat bersama-sama dengan hidrogen perokdisa ( $H_2O_2$ ) (Michalak, 2006). Kemampuannya sebagai *chelating agent* ini mampu menghambat terjadinya reaksi Fenton yang dapat menyebabkan terbentuknya radikal hidroksil ( $OH^-$ ) dari  $H_2O_2$  yang menembus membran sel dan kemungkinan bereaksi dengan Fe atau Cu. Sehingga dengan penghambatan reaksi Fenton ini akan dapat mencegah produksi ROS (Michalak, 2006).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Lavid., et al 2001 komponen *polyphenol* mempunyai kemampuan mengikat logam seperti Mn, Cr, Pb dan Hg diikat secara langsung oleh *polyphenol* (Michalak, 2006).

*Catechins green tea* mempunyai karakteristik struktur *dihydroxyl* atau *trihydroxyl* pada cincin B dan *m-5,7-dihydroxyl* pada cincin A. Pada cincin B inilah merupakan lokasi yang prinsip pada reaksi antioksidan dan aktivitas antioksidan *catechins green tea* (Tachibana., 2011). Dengan peranannya sebagai *chelation ion logam* dan donor electron hydrogen maka produksi ROS akan dapat ditekan sehingga akan mencegah terjadinya disfungsi endotel.

Sebagai antioksidan *catechins green tea* berfungsi dalam menghambat ROS, mengikat ion metal pada reaksi redok, menghambat reduksi transktipsi faktor,



menghambat enzim prooksidan dan mempengaruhi produksi enzim antioksidan (Pon Velyutham *et al.*, 2009)

Keterlibatan *catechins* sebagai antioksidan ini dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Lorenz *et al.*, 2004 yang meneliti tentang peran EGCG dan vasorelaksasi endotel pada cincin aorta tikus. Diketahui bahwa EGCG dapat mengaktifasi endotelial NO synthase (eNOS).

Protein yang ada pada EGCG dapat mengkatalisis produksi NO dari L-arginin. Perlakuan pada sel endotel dengan diberikan 100 $\mu$ M EGCG dapat mengaktifasi protein kinase B (Akt) dan cAMP protein kinase A, dimana dapat menghambat peningkatan aktivitas eNOS (Lorenz *et al.*, 2004)

*Catechins green tea* sebagai antioksidan diyakini dapat mengaktifasi peningkatan aktivitas *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) melalui pospotidylinositol-3-kinase, cAMP dependent protein kinase, jalur AKt dan reaksi *endothelial vasorelaxation* (Weon Kim *et al.*, 2006). Pada penelitian yang dilakukan oleh Lorenz *et al.*, 2007 *Catechins green tea* sebagai antioksidan melalui mekanisme peningkatan aktivitas eNOS dapat ditunjukkan pada kultur sel endotel yang dipapar dengan 100 $\mu$ M EGCG dapat mengaktifasi protein kinase B (protein Akt) dan cAMP protein kinase A, peningkatan PI3K sehingga meningkatkan produksi eNOS (Alvarez *et al.*, 2009). Beberapa mekanisme *catechins green tea* sebagai antioksidan diantaranya adalah:

### 2.3.2 Mekanisme Penghambatan Oksidasi NADPH

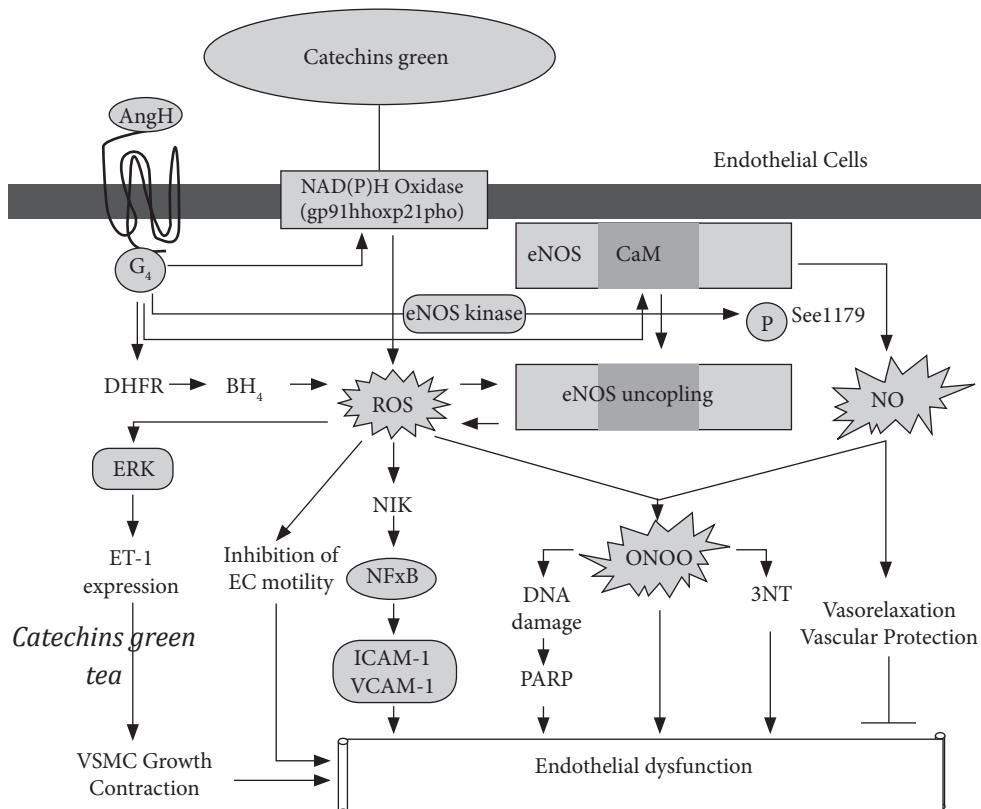
*Catechins* selain dapat mengaktifasi eNOS, juga berperan dalam penghambatan oksidasi NADPH. Oksidasi NADPH dapat terjadi pada proses proinflamasi, proliferasi dan proses apoptosis sel, dimana akan menghasilkan produksi radikal bebas *superoxide* ( $O_2^-$ ). Pada proses ini *catechins* dapat berperan membantu regulasi aktivitas oksidasi NADPH, mereduksi produksi  $O_2^-$  dan memproteksi NO dari perubahan *peroxynitrite* (Scewe *et al.*, 2008).

Pada kondisi disfungsi endotel karena hiperglikemia terjadi peningkatan aktivasi PKC (protein kinase C), oksidasi glukosa, perubahan formasi AGEs (advanced glycation end products) dan aktivasi jalur poliol maka akan berdampak pada fungsi vaskuler yaitu terjadi peningkatan produksi enzym superokside seperti *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxidasse, produksi *superoxide* ( $O_2^-$ ) dan melepaskan *endothelial nitric oxide synthase* (NOS III). PKC memperantai produksi superokside sehingga menghambat produksi nitric oxide (NO) ( Hadi *et al.*, 2007).

Dengan pemberian *catechin green tea* dapat memperbaiki keseimbangan NO karena dapat mereduksi produksi  $O_2^-$  pada sel endotel. Hal ini dapat dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Steffen *et al.*, 2008 pada eksperimen dengan sel HUVEC yang diberikan perlakuan dengan mono-*O*-methyl flavanols seperti 3'-*O*-methyl -EC. Pada penelitian ini *catechins* dapat mereduksi keduanya yaitu oksidasi

NADPH dan melepaskan sebsequen  $O_2^-$ . Struktur gabungan antara mono-*O*-methyl flavanols dan apocynin diketahui dapat menghambat oksidasi NADPH (Steffen *et al.*, 2000).

Pada gambar 4 akan dijelaskan peran catechins sebagai antioksidan:



**GAMBAR 2.1**

Mekanisme signaling receptor AT-1 pada disfungsi endotel (S.Higuchi, 2007) Angiotensin II meningkatkan produksi ROS melalui oksidasi NADPH dan pelepasan eNOS dimana menyebabkan terjadinya disfungsi endotel. Reaksi NO dengan *anion supeoxide* menghasilkan *peroxynitrite* (ONOO<sup>•</sup>). *Peroxynitrite* mempengaruhi terjadinya disfungsi endotel melalui produksi 3NT atau PARP. Sebagai jalur alternatif stimulasi reseptor AT1 memproduksi NO pada endotel melalui fosforilasi eNOS untuk memproteksi fungsi endotel. Sebagai tambahan Ang II mempengaruhi ICAM-1 dan VCAM-1 melalui aktivasi NF $\kappa$ B pada sel endotelium, dan jalur ini melibatkan aktivasi ROS dan p38MAPK.

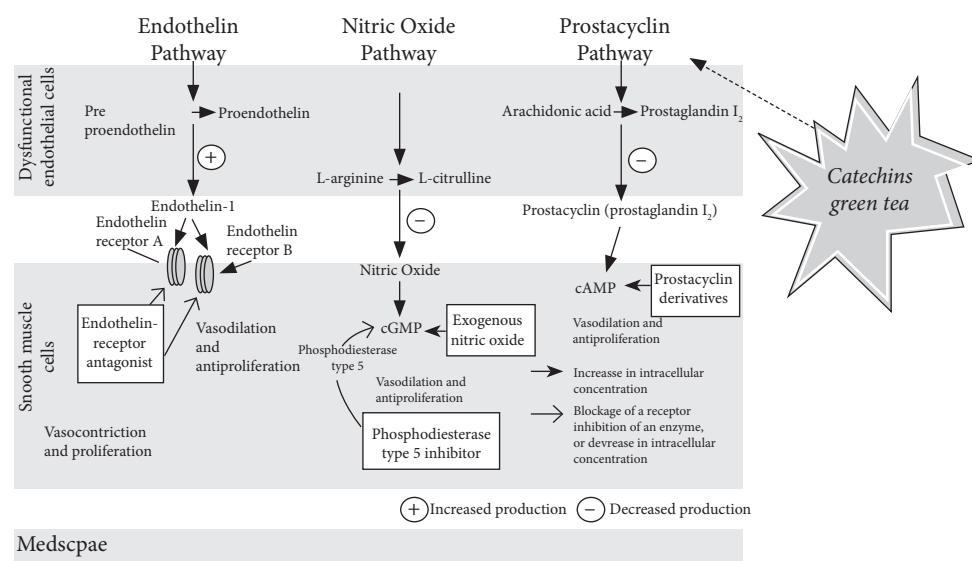
Pada gambar diatas terdapat modifikasi: bahwa *catechins green tea* dalam menghambat oksidasi NADPH sehingga pembentukan ROS akan terhenti dan proses terjadinya disfungsi endotel akan berhenti.

### 2.3.3 Mekanisme Produksi Prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ )

Disfungsi endotel dapat menyebabkan terjadi penurunan produksi NO dan  $\text{PGI}_2$  karena peningkatan ROS. Akibatnya akan terganggu vasoaktif endotel yaitu terganggunya relaksasi pembuluh darah, peningkatan aktivasi platelet, resiko terjadinya trombosis, dan terganggunya remodeling *smooth muscle cells*(SMC) ( Nakayama, 2006)

*Catechins green tea* sebagai antioksidan dapat berperan dalam meningkatkan produksi *prostacyclin* ( $\text{PGI}_2$ ) pada sel endotel. Sebagaimana kita ketahui bahwa *prostacyclin* berperan sebagai antagonis utama dari kerja ANG-II dalam merangsang pertumbuhan sel otot polos pembuluh darah (Mizugaki *et al.*, 2000).

Hal ini dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Mizugaki *et al.*, 2000 bahwa *prostacyclin* dapat diproduksi pada kultur sel endotel yang diberikan perlakuan dengan EGCG 25-200 $\mu\text{M}$ .  $\text{PGI}_2$  adalah vasodilator paling kuat yang dapat meningkat konsentrasi pada sel endotel yang diberi perlakuan dengan EGCG. Respon ini juga bisa terjadi serupa pada pemberian *catechin* lainnya seperti EC, *catechin* dan EGC.



**GAMBAR 2.2**

Mekanisme produksi prostacyclin setelah pemberian treatmen *catechins green tea*. Pada pemberian treatment dengan *catechin green tea* diharapkan dapat meningkatkan produksi prostacyclin, dimana dengan meningkatnya kadar prostacyclin pada endotel akan terjadi vasodilatasi dan prostacyclin dapat menghambat aktivasi platelet dan proliferasi. (modifikasi gambar dari Humbert M, *et al.*, 2004)

### 2.3.4 Mekanisme Penghambatan Angiotensin-Coverting Enzyme (ACE)

Pada sel endotel angiotensin II berfungsi sebagai prooksidan, proinflamatori dan promitogenik. *Angiotensin Coverting Enzyme* (ACE) merupakan enzim yang berfungsi merubah angiotensin I menjadi Angiotensin II, ACE mereduksi kadar angiotensin dalam sirkulasi dimana berfungsi menghambat atau memblokade *angiotensin receptor blocker* (ARBs) sebagai reseptor dari angiotensin II. Efek ACE dan ARBs dapat menurunkan tekanan darah dan menurunkan sirkulasi marker inflamasi. Keduanya baik ACE maupun ARBs menghambat reduksi persilangan antara sinyal reseptor Angiotensin II dan sinyal insulin reseptor pada tingkat IRS-1 dan PI3K (Assunta *et al.*, 2009).

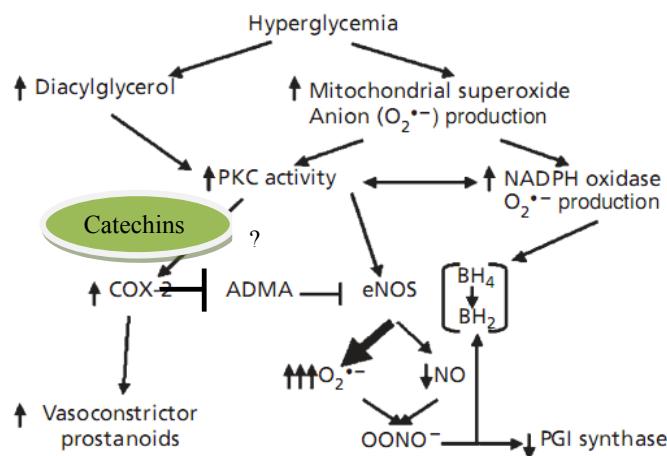
Mekanisme antioksidan dari *catechins green tea* adalah menghambat *angiotensin converting enzyme* (ACE). Pada endotel ACE berfungsi dalam mengatur konsentrasi lokal dari *bradykinin*, dimana ACE memecah *bradykinin* menjadi peptida yang inaktif. Kadar ACE yang tinggi akan menghambat aktivitas NO. ACE juga mempunyai peran yang sangat penting dalam meregulasi tekanan darah, menjaga kestabilan angiotensin akibat aktivitas vasokonstriksi, dan menginaktivasi secara kuat vasodilatasi bardikinin (Rosalind *et al.*, 2009).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Actis-Goretta *et al.*, 2006, green tea secara signifikan menghambat aktivitas purifikasi dan ikatan membran ACE pada pengamatan perubahan *hippuryl-L-histidyl-L-leucine* menjadi asam *hippuric*. Diketahui *green tea* dalam bentuk *polyphenol* EGC merupakan salah satu menghambat yang sangat bagus pada konsentrasi 50% (IC50) dalam batas micromolar. Hal ini dapat diyakini bahwa kelompok *hydroxyl* yang merupakan ikatan hidrogen ACE dan massa molekul tinggi (dimer dan hexamer) sangat penting dalam aktivitas penghambatan. Mekanisme ini memberikan kontribusi dalam peningkatan kesehatan vaskuler melalui peningkatan vasodilatasi dan penurunan tekanan darah (Warden *et al.*, 2001).

Mekanisme lain dari *catechins green tea* sebagai antioksidan adalah *catechins* mempunyai kemampuan dalam *scavenging* radikal dari respon stres oksidasi dan respon proinflamasi yang dihubungkan dengan aterogenik dan penurunan fungsi vaskuler. Dalam hal ini *catechin* berperan memproteksi oksidasi LDL ( penigkatan oksidasi LDL dalam pembentukan plak aterosklerosis), *catechins* juga membantu mencegah disfungsi vaskuler dengan kemampuannya dalam mengikat metal atau mencegah penurunan produksi NO oleh karena adanya radikal bebas. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Nanjo *et al.*, 2001 bahwa EGCG merupakan *catechin* yang efektif menghambat radikal bebas seperti *superoxide*, *hydroxyl*, dan *1,1-diphenyl-2-picrylhydral* (DPPH).

### 2.3.5 Mekanisme Reduksi Asymmetric Dimethylarginine (ADMA)

ADMA merupakan faktor penting dalam terjadinya disfungsi endotel. Pada kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan kadar ADMA. ADMA merupakan antagonis NOS yang berperan dalam menurunkan produksi NO melalui penghambatan terhadap eNOS sebagai enzim yang merubah L-arginin menjadi NO. Akibat peningkatan ADMA maka kadar NO akan menurun sehingga terjadinya disfungsi endotel. (Mark *et al.*, 2007)



GAMBAR 2.3

Mekanisme melalui hiperglikemia dapat menurunkan bioavailability NO pada endotel ( Mark *et al.*, 2007). Melalui peningkatan produksi anion superoksyde akibat oksidasi NADPH. Oksidasi NADPH dapat meningkatkan aktivasi PKC. Sehingga menurunkan sintesis eNOS sehingga produksi NO menurun. Sintesis eNOS juga dihambat oleh peningkatan produksi ADMA. Selain itu aktivasi PKC juga meningkatkan aktivitas COX-2 sehingga menyebabkan vasokonstriksi pada endotel. Modifikasi dari gambar: diharapkan dengan pemberian *catechins green tea* dapat menghambat produksi ADMA dapat memutus rantai penurunan produksi NO.

Mekanisme *catechins* dapat juga melalui penghambatan dari reduksi ADMA (*asymmetric dimethylarginine*). ADMA merupakan salah satu marker dari disfungsi endotel yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit arteri koroner. Peningkatan kadar ADMA dalam sel endotel akan menghambat produksi eNOS yang merupakan enzim yang berperan pada transformasi asam amino L-arginin menjadi sitrulin melalui jalur *L-arginine-nitric oxide*. Dimana peningkatan kadar ADMA dapat menurunkan produksi NO pada sel endotel. Pemberian *catechins* dalam hal ini adalah EGCG diyakini dapat menghambat peningkatan kadar ADMA dan meningkatkan produksi

NO (Jiang *et al.*, 2004). Mekanisme penghambatan ADMA ini dapat melindungi fungsi endotel yang diobservasi pada aorta tikus (Jang WJ *et al.*, 2006) Mekanisme lain menyebutkan bahwa EGCG dapat mereduksi sitokin proinflamasi seperti TNF $\alpha$  dan menghambat peroksidasi lemak melalui aktivitas *dimethylaminohydrolase* (Jang WJ *et al.*, 2006).

### 2.3.6 Catechins Green Tea sebagai Antiinflamasi

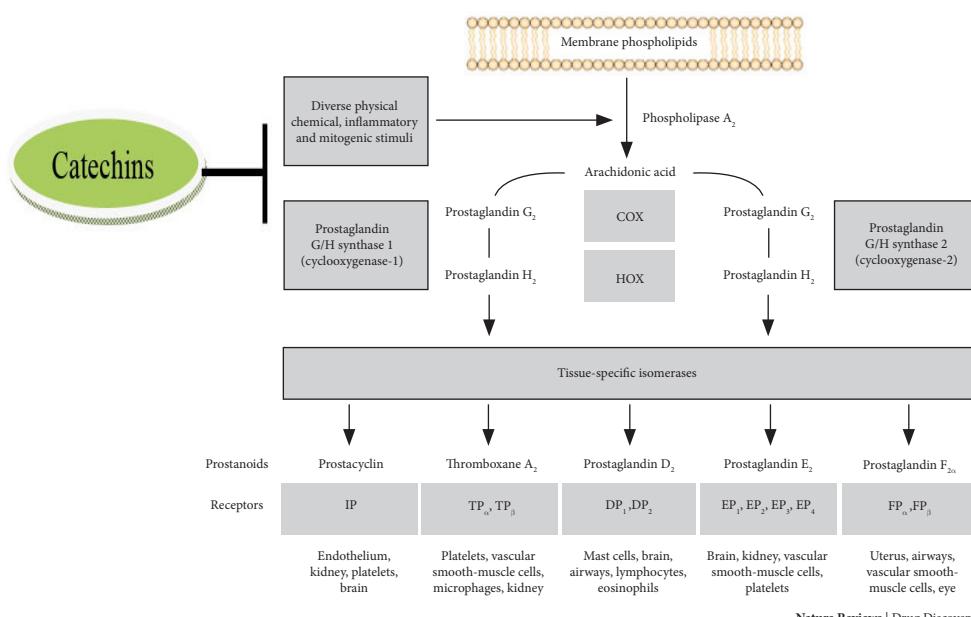
Sel endotel secara normal mempunyai fungsi homeostasis pada pembuluh darah. Sel endotel menjaga regulasi vasodilatasi dan vasokonstriksi pembuluh darah, pertumbuhan dan perubahan VSMC, keseimbangan proinflamatori dan antiinflamatori. Adanya kondisi hiperglikemia dan resistensi insulin pada diabetes tipe II dapat menyebabkan kondisi inflamasi pada sel endotel (Jian, *et al.*, 2009). Kondisi inflamasi ini dapat meningkatkan sejumlah mediator proinflamasi seperti sitokin TNF $\alpha$ , C-reactive protein, interleukin-6, dan plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (Jin *et al.*, 2009). Selain peningkatan sitokin proinflamasi, pada kondisi disfungsi endotel akibat hiperglikemia melalui jalur AGEs akan meningkatkan meningkatkan produksi ROS. Peningkatan produksi ROS ini akan menstimulasi oksidasi NADPH. Oksidasi NADPH akan mengaktifasi transcription nuclear factor -k $\beta$  (NFk $\beta$ ) sehingga akan mengaktifasi peningkatan adesi molekul seperti ICAM-1 dan VCAM-1, *P-selectin*, dan trombomodulin (Mark *et al.*, 2007).

*Catechins green tea* berperan sebagai antiinflamasi diantaranya adalah EGCG, dimana mekanismenya dalam menghambat *exocytosis* endotel dan menghambat ekspresi *P-selectin* pada kultur sel. *P-selectin* merupakan sitokin yang teraktivasi pada kondisi inflamasi pada endotel. Peningkatan *P-selectin* yang tidak terkontrol karena proses inflamasi ini dapat berakibat terjadinya disfungsi endotel. Pada penelitian yang dilakukan oleh Yamakuchi *et al.*, 2008 menjelaskan bahwa pada HUVEC yang dipapar dengan EGCG 0-10  $\mu$ M dan stimulasi pada trombin akan terjadi penghambatan pelepasan faktor *von Willebrand* dan juga terjadi blokade translokasi *P-selectin*. EGCG dapat menghambat *exocytosis* endotel yang dikonfirmasi dari pengukuran leukosit. EGCG mempunyai efek dalam meningkatkan produksi NO dan menghampat reduksi PI3K dan penghambatan pada L-name. Pada penelitian lain yang dikemukakan oleh Ludwig *et al.*, 2001, bahwa EGCG mempunyai fungsi sebagai anti inflamasi yang dapat menghambat produksi VCAM pada kultur HUVEC. Penelitian serupa yang dilakukan oleh Koga dan Meydani, 2001 bahwa catechins secara signifikan dapat menghambat adesi molekul pada proses inflamasi dilaporkan juga bahwa *catechins* dapat dapat menghambat ekspresi ICAM,VCAM dan E-selectin pada proses inflamasi endotel (Pon *et al.*, 2008).

*Catechins green tea* sebagai antiinflamasi dapat melalui beberapa mekanisme diantaranya adalah:

### 2.3.7 Mekanisme Penghambatan Jalur Arachidonic

Pada Gambar 10 menjelaskan tentang metabolisme *cyclooxygenase* (COX). Cox merupakan enzim yang berperan sebagai katalase *Acachidonic acid* (AA) menjadi *prostaglandins* (PGs). Cox mempunyai 2 isoform mayor yaitu Cox-1 dan Cox-2. Cox-1 mengkatalase perubahan *Acachidonic acid* (AA) menjadi prostaglandin yang berperan dalam vasokonstriksi endotel, menstimulasi thromboxan A2 (TXA2) yang membantu agregasi platelet. Sedangkan Cox-2 berperan dalam menghasilkan prostaglandin (PGI-2) sebagai vasodilator, antiagregasi dan mempunyai efek antiproliferasi (Carmela, et al., 2007).



**GAMBAR 2.4**  
Mekanisme metabolisme cox

Cox-2 akan meningkat pada kondisi inflamasi, yang distimulasi oleh makrofag, sitokin proinflamasi dan *growth factor*, sehingga akan menstimulasi produksi prostaglandin. Kondisi dari isoform Cox (Cox-1 dan Cox-2) dibawah normal akan memproduksi prostaglandin vasodilatasi seperti PCI, secara dominan dapat menurunkan keseimbangan NO dan meningkatkan stres oksidasi (dalam particular ONOO<sup>-</sup>), sintesis dari prostacyclin akan menjadi tidak aktif dan terjadi prostaglandin vasokonstriksi (Carmela et al., 2007).

*Catechins green tea* dengan kandungan polyphenol pada jalur ini berfungsi menghambat enzim yang mengkatalase *Acachidonic acid* (AA), seperti *phospholipase A2* (PLA2), *cyclooxygenase* (COX) dan *lipoxygenase* (LOX). Dengan penghambatan

reduksi *Acachidonic acid* (AA) menjadi prostaglandins maka catechins dapat berfungsi menekan reaksi inflamasi seperti peningkatan sitokin proinflamsi, molekul adesi dan infiltrasi leukosit (Mackenzie *et al.*, 2004).

*Green tea polyphenols* dalam bentuk pro-delphinidin B-4 3'-O-gallate dan pro-delphinidin B2 3,3' di-O-gallate diketahui dapat menghambat ekspresi mRNA dan COX-2 yang dapat menghasilkan PGE2 pada kultur sel makrofag RWA264 yang diaktivasi dengan induksi LPS (lypopolisaccharide). Aktivitas penghambatan ini akan menekan jalur NF $\kappa$ B dan jalur MAPK sehingga dapat menghambat proses inflamasi pada sel endotel (Hou *et al.*, 2007).

### 2.3.8 Meningkatkan Sistesis Nitric Oxide (NO)

NO pada sel endotel berperan dalam mengontrol tonus vasomotor dan homeostasis pembuluh darah. NO merupakan mediator seluler pada proses fisiologi dan pada kondisi patologi. NO sintesis dari asam amino L-arginine menjadi L-citrulline oleh enzim NO-synthase (NOS) termasuk isoform *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS), *neuronal nitric oxide synthase* (nNOS), *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Brian, *et all.*, 2005).

Pada kondisi inflamasi produksi NO khususnya iNOS yang diekspresikan. Sedangkan eNOS dan nNOS disintesis pada kondisi fungsi tubuh normal atau sebagai homeostatis. NO seperti iNOS meningkat secara signifikan seiring dengan peningkatan mediator inflamasi yang distimulasi oleh respon makrofag seperti lipopolisakarida bakteri, interferon - $\gamma$  dan kemampuan sel pembunuh ( Michel, 2011).

*Catechins green tea* dibuktikan dapat menghambat pelepasan NO dengan menekan ekspresi dan aktivitas enzim NOS. Hal ini dibuktikan pada penelitian dengan menggunakan kultur sel makrofag mononuclear RAW 264.7 yang diambil dari darah perifer manusia dan diaktivasi dengan stimulasi LPS/PMA (Lyu *et al.*, 2005).

Penelitian serupa dilakukan oleh Paquay *et al.*, 2000 dengan menggunakan EGCG dan *catechins* lainnya diketahui dapat menghambat induksi mRNA dan aktivitas iNOS pada sel line setelah dipapar dengan LPS atau IFN- $\gamma$ . Penghambatan transkripsi iNOS dapat dilihat pada ikatan NF $\kappa$ B sebagai promoter terhadap dengan demikian akan menginaktivasi gene iNOS (Carmela *et al.*, 2007).

*Catechins* juga bekerja pada jalur PI3K dengan cara menginduksi eNOS untuk memproduksi NO dimana akan mengaktifasi *guanylate cyclase* untuk memproduksi *cyclic guanosine monophosphate* dan menyebabkan vasorelaksasi endotel dengan mengaktifasi jalur sinyal PI3K, protein kinase A dan *Akt-dependent* (Lorenz *et al.*, 2004).

### 2.3.9 Menurunkan Aktivitas Sitokin

Sitokin merupakan mediator mayor pada sistem imun yang terstimulasi akibat respon inflamasi. Sitokin ada 2 macam yaitu sitokin proinflamasi dan sitokin antiinflamasi. Sitokin proinflamasi diantaranya adalah IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, dan IFN— $\gamma$ . Sedangkan sitokin antiinflamasi termasuk IL-4 dan TGF $\beta$  (Calixto *et al.*, 2004).

Pada kondisi inflamasi seperti adanya hiperglikemia dapat mengaktivasi transkripsi faktor untuk menstimulasi produksi sitokin proinflamasi. Bila produksi sitokin ini tidak dikendalikan maka akan menyebabkan kondisi disfungsi endotel. Kondisi Inflamasi akan meningkatkan produksi protein C-reactive (CRP), interleukin-6 dan plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) yang akan menyebabkan peningkatan stres oksidasi sehingga terjadi disfungsi endotel (Jian *et al.*, 2009).

Komponen *phenolic* termasuk *catechins* dapat menurunkan sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1 pada sel makrofag tikus yang diinduksi LPS (Comalada *et al.*, 2006). Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Crouvezier *et al.*, 2001 menyebutkan bahwa *catechins* menghambat aktivasi IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  dengan meningkatkan pelepasan IL-10 sebagai sitokin antiinflamasi.

### 2.3.10 Menghambat Jalur NF $\kappa$ B

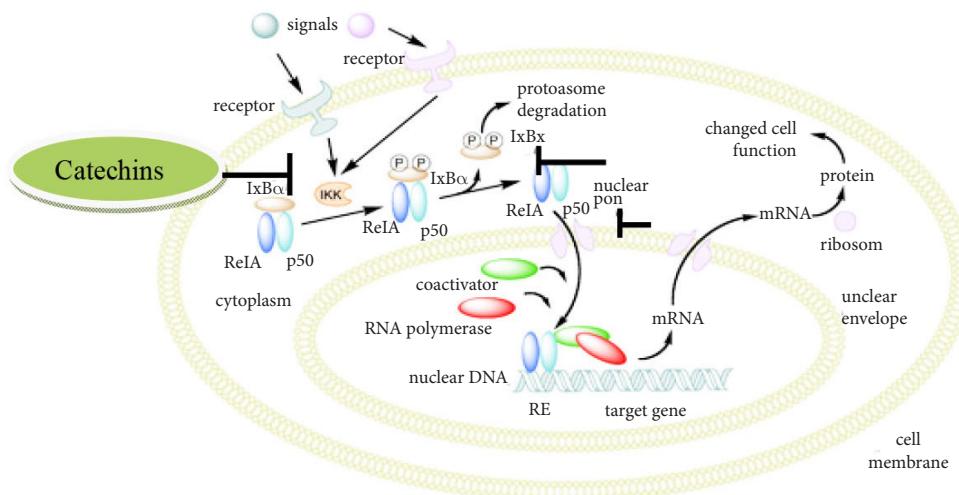
NF $\kappa$ B merupakan faktor transkripsi yang berperan dalam proses inflamasi. NF $\kappa$ B memegang peranan penting dalam respon imun, inflamasi, stres, proliferasi dan apoptosis sel. NF $\kappa$ B mengkoordinir induksi gen yang mengkode sitokin proinflamasi (IL-1, IL-2, IL-6, dan TNF $\alpha$ ), kemokin (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , dan MCP-1), molekul adesi (ICAM, VCAM dan E-Selectin), protein fase akut, reseptor imun, *growth factor*, dan *inducible enzymes* seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Cox-2, *matric metalloproteinases* (MMPs), iNOS, dan semua molekul yang mempunyai peran dalam proses angiogenesis, proliferasi sel, adesi, migrasi, da invasi (Ichikawa *et al.*, 2004). NF $\kappa$ B mempunyai 5 famili diantaranya adalah p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p50/105 (NF $\kappa$ B1) dan p52/p100 (NF $\kappa$ B2) merupakan anggota famili Rel yang berikatan dengan protein DNA dan dapat mengenali urutan sequensing DNA (Hayden *et al.*, 2004).

Penghambatan terhadap NF $\kappa$ B secara menyeluruh merupakan strategi dalam penanganan pada kerusakan endotel akibat inflamasi dan ini merupakan jalur yang penting sebagai target penanganan pada inflamasi (Karin *et al.*, 2004).

NF $\kappa$ B tidak aktif terletak di dalam sitosol dihambat oleh protein I $\kappa$ B $\alpha$ . Melalui reseptor membran, berbagai sinyal ekstraseluler dapat mengaktifkan enzim kinase I $\kappa$ B (IKK). IKK, difosforilasi oleh protein I $\kappa$ B $\alpha$  menghasilkan ubiquitination

memisahkan I $\kappa$ B $\alpha$  dari NF $\kappa$ B dan terjadi degradasi I $\kappa$ B $\alpha$  oleh protease. Dengan demikian maka NF $\kappa$ B akan menjadi aktif kemudian translokasi ke dalam inti dan mengikuti urutan spesifik dari DNA yang disebut respon elemen (RE). Kompleks DNA / NF $\kappa$ B kemudian merekrut protein lain seperti *coactivation* dan RNA polimerase yang mentranskripsikan DNA menjadi mRNA. Selanjutnya akan ditranslasi menjadi protein yang menghasilkan perubahan fungsi sel, Gambar 8 (Gilmore, 2006; Brasier, 2006 dan Perkins 2007).

Penanganan terhadap inflamasi melalui penghambatan NF $\kappa$ B dilakukan dengan menggunakan komponen *polyphenols* termasuk *catechins green tea*. Komponen *catechins* bekerja dalam memodulasi aktivasi NF $\kappa$ B dan secara bertahap mengaktifkan beberapa proses (Rahman *et al.*, 2004). Komponen dari *catechins* yaitu EGCG diyakini dapat menghambat efek NF $\kappa$ B dengan cara menetralkan aktivasi IKK dan mendegradasi I $\kappa$ B $\alpha$  (Wheeler *et al.*, 2004.) IKK merupakan kunci yang mengontrol aktivasi NF $\kappa$ B sehingga menjadi target dalam modulasi NF $\kappa$ B pada respon seluler (Yang *et al.*, 2001).



### GAMBAR 2.5

Mekanisme Aktivasi NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B tidak aktif terletak di dalam sitosol dihambat oleh protein I $\kappa$ B $\alpha$ . Melalui reseptor membran, berbagai sinyal ekstraseluler dapat mengaktifkan enzim kinase I $\kappa$ B (IKK). IKK, di fosforilasi oleh protein I $\kappa$ B $\alpha$  menghasilkan ubiquitination memisahkan I $\kappa$ B $\alpha$  dari NF $\kappa$ B dan terjadi degradasi I $\kappa$ B $\alpha$  oleh protease. Dengan demikian maka NF $\kappa$ B akan menjadi aktif kemudian translokasi ke dalam inti dan mengikuti urutan spesifik dari DNA yang disebut respon elemen (RE). Kompleks DNA / NF $\kappa$ B kemudian merekrut protein lain seperti *coactivation* dan RNA polimerase yang mentranskripsikan DNA menjadi mRNA. Selanjutnya akan ditranslasi menjadi protein yang menghasilkan perubahan fungsi sel (Gilmore, 2006; Brasier, 2006 dan Perkins 2007). Modifikasi dari gambar: diharapkan dengan pemberian *Catechins* dapat menghambat IKK sehingga NF $\kappa$ B tidak menjadi aktif dan dapat menghambat proses inflamasi.

Pada disfungsi endotel yang dipicu karena adanya inflamasi, NF $\kappa$ B berperan sebagai transkripsi gen pada protein membentuk sitokin proinflamasi. Peningkatan sitokin proinflamasi secara terus menerus akan menyebabkan kerusakan endotel dan memicu terjadinya penyakit kelainan vaskuler seperti penyakit kardiovaskuler (Raffaele *et al.*, 2007).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Terra *et al.*, 2007 dengan menggunakan komponen polyphenols yang di berikan pada kultur sel makrofag dapat menghambat ekspresi iNOS mRNA dan mereduksi NF $\kappa$ B (p65) serta menghambat produksi I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA. Sedangkan penelitian dengan menggunakan epicatechin dan catechin diketahui saat menurunkan aktivitas NF $\kappa$ B dengan jalan menghambat phosphorylation IKK $\beta$  dan mendegradasi I $\kappa$ B $\alpha$ , sebagai konsekuensinya terjadi ikatan NF $\kappa$ B dan DNA sehingga tidak terbentuk protein seperti sitokin proinflamasi (De Stefano *et al.*, 2007).

### 2.3.11 Melalui Jalur MAPK

Insulin dapat bekerja setelah berikatan dengan reseptor insulin (IRS) dan dapat mempengaruhi endotel melalui 2 mekanisme yang pertama melalui sinyal yang merangsang PI3K mengakibatkan vasodilatasi endotel dan *uptake* glukosa, yang kedua melalui jalur sinyal *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang mengakibatkan vasokonstriksi dan proliferasi sel endotel (Ahmed *et al.*, 2008).

Disfungsi endotel melalui mekanisme resistensi insulin terjadi akibat kerusakan pada jalur PI3K sedangkan jalur MAPK tidak terpengaruh. Ini memberikan implikasi penting karena resistensi insulin menyebabkan ketidakseimbangan antara efek insulin melalui jalur PI3K dan MAPK. Hal ini mengakibatkan peningkatan ET-1, aktivasi pompa kation dan peningkatan ekspresi VCAM-1 dan molekul adesi lainnya melalui jalur MAPK. Penurunan sinyal melalui jalur PI3K menyebabkan penurunan produksi NO dan peningkatan ET-1 yang merupakan tanda dari disfungsi endotel (Muniyappa *et al.*, 2007).

Penghambatan pada jalur MAPK akan menyebakan keseimbangan aktivitas insulin pada kedua jalur baik PI3K dan MAPK sehingga akan memperbaiki kondisi disfungsi endotel (Soobrattee *et al.* 2005).

---

## 2.4 Daftar Pustaka

- Anderson, R.A. Evans, L.M. Ellis, G.R. Khan, N. Morris, K. Jacson, S.K. Rees A. Lewis, M.J.. Frenneaux, M.P. Prolonged deterioration of endothelial dysfunction in response to postprandial lipaemia is attenuated by vitamin C in type 2 diabetes. *Diabet. Med.*, 2006. 23. " 258-264".
- Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase of human phagocytes generates N-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for



producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2000. 104(1): "103-113".

Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2000. 34. " 631-638".

Assunta Maria Potenza, Sara Gagliardi, Carmela Nacci, Maria Rosaria Carratu and Monica Montagnani. Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Target. *Current Medical Chemistry*, 2009.16. "94-112".

Avogaro, A. Miola, M. Favoro,A. Gattardo,L. Pacini, G. Manzato, E. Zambon, S. Sacerdoti, D. De Kreutzenberg, S. Piliego,T. Tiengo, A. Del Prato, S. Gemfibrozil improves insulin sensitivity and flow-mediated vasodilatation in type 2 diabetic patients. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2001. 31. " 603-609".

Boger, R.H. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) modulates endothelial function – therapeutic implications. *Vasc Med*, 2003.8. " 149-151".

Bor-Ruu Lin, Chia-Jung Y, Wang-Chuan C, Hsuan-Shu L, Huei-Ming C, Yen-Chin L, Chiang-Ting C, and Chau-Fong C. Green tea extract supplement reduces D-galactosamine-induced acute liver injury by inhibition of apoptotic and proinflammatory signaling. *J. BioMed Central*, 2009. 16: 35. " 1-14".

Calixto J.B, Compos M.M, Otuki M.F, Santos A.R. Anti inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation pf pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 2004; 70: 93-103.

Carmela S, Rosaria V, Beatrice S, Roberta D. B, Carmela F, Roberta M. Polyphenols, intracellular signalling and inflamation. *Ann Ist Super Sanita*.2007;43(4): 394-405.

Carmen C, Reys A, Rafael G. 2006. Benefical effect of green tea. *J American College of nutrition* 25(2). "79-99".

Casper G. Schalkwijk and Coen D.A. Stehouwer. Vascular Complication in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*, 2005. 109. "143-159".

Chaiyavat C, Winthana K, Narissra L, Peerasak L, Maitree S, Somdet S. Effect of phenolic compounds of fermented thai Indigenous Plant on oxidative strees in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Mesicine*, 2011. "1-10".

Chad E.N, Jeong-a K, Michael J.Q. Greentea polyphenol Epigallocatechin Gallate reduce endothelin-1 expresion and secretion in vascular endothelial cells: Role for AMP-activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endo.endojournals*, 2010. 15(1). "103-114".

Comalada M, Balleter I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Madina F.S, Zaruelo A. Inhibition pf pro inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure activity relationshiop. *Biochem Pharmacoll.* 2006; 72:1010-1021.

Crouvezier S, Powell B, Keir D, Yaqoob P. The effect of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production of pro and anti inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine*, 2001.13. "280-286".

- Daniele V, Elena D, Agostino V, Lorenzo G, Stefano T. Endothelial dysfunction as a target for preventionn of cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 2009. 32. " 314-321".
- Economides, PA. Caselli, A. Tiani, E. Khoadhiar, L. Harton, E.S. Veves,A. The effects of atovastatin on endothelial function in diabrtic patients and subjecctc at risk for type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 2004. 89. " 740-747".
- Franklin, VL. Khan, F. Kennedy. G. Belch, JJ. Greene, S.A. Intensive Insulin therapy improves endothelial function and microvascular reactivity in young people with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2008. 51. " 353-360".
- Georg K, Rainer H. Molecular mechanism of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy. *Cardiovascular Research*, 2005. 67, "187-197".
- Goya, K. Sumitani,S. Xu, X. Kitamura, T. Yamamoto, H. Kurebayashi, S. Saito, H. Kouhara, H. Kasayama, S. Kawase, I. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 24. "658-663".
- Govers, R. Rabelink, TJ. Cellular regulation of endothelil nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2001., 280 " 196-206.
- Haffner. Pre-diabetes, insulin resistance, inflammation and CVD risk. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2003. vol. 61, supplement 1, pp. "S9-S18".
- Hayden M.S, Ghosh S. Signaling to NFkB. *genes Dev*. 2004;18: 2195-2224.
- Hinonori Nakagami, Yusufumi Kaneda, Toshio Oghara and Ryuichi Morishita. Endothelial Dysfunction in Hyperglycemia as a trigger of Atherosclerosis. *Current Diabetes Reviews*, 2005. J, "59-63".
- Hussein F.Sakr, Endothelial Dysfunction Induce by Type 2 Diabetes Mellitus and Fibrinolytic Activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2010. 6(2): "103- 110".
- Ichikawa D, Matsui A, Imai M, Sonoda Y, Kasahara T. Effect of various catechins on the IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line, J774.1. *Biol Pharm Bull*, 2004. 27. "1353-1358".
- Inge A. M. van den Oever, Hennie G. Raterman, Mike T. Nurmohamed, and Suat Simsek. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus, Mediators of Inflammation. *Article 2010.ID* 792393, 15
- Irukamaya-T. Miyauchi, T. Sakai, S. Kasuya Y. Goto, K. Yamaguchi, I. Activation of Peroxisome Proinflamator-activated Receptor-alpha Decreases Endothelin -1- induced p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 2004. 44. " S358 - S361".
- Israelian-Konarak, Z. Reaven, P.D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and atherosclerosis: from basic machanism to clinical implication. *Cadiol Rev*, 2005.13. "240- 246".
- Jane A,M, Ferhana A, Lucy B, Laura M, Louise S.H. Rple of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormons released by the endothelium. *Exp Physiol*, 2012. 93.1 pp "141-147".



- Jansson. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *Journal of Internal Medicine*, 2007. vol. 262, no. 2, pp. "173-183"
- Jian Xu, Ming-Hui Z. Molecular Insights and Therapeutic Target for Diabetic Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2009; 120(13):1266-1286.
- Juliana C.N.C, Vasanti M, Weiping J, Takashi K, Chittaranjan S Y, Kun-Ho Y, Frank B. *Diabetes in Asia, Epidemiology, Risk factor, and Pathophysiology*. American Medical Association, JAMA, 2009.Vol 301, No.20: 2129-2140
- Jun-ichi. Toyoki. M, Makoto. S, Kazuya. K, Ryuji. O, Ichiro.T, Sachiyo. T, Yoshihiro. H, and Naoki. M. Green tea Catechins Improve Human Forearm Vascular Function and Have Potent Anti Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects in Smokers. *Intern Med*, 2010. 49. "2553-2559"
- Jorge Calles-escandon and Marilyn Cipolla, Diabetes and Endothelial Dysfuntion: A Clinical perspective, *Endocrine reviews*, 2001 22(1)."36-52".
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 2004; 3:17-26.
- Kass, D.A. Shapiro, E.P. Kawaguchi,M. Capriotti,A.R. Scuteri, A. deGroof, R.C. Lakatta, E.G. Improved arterial complication by a novel advanced glycation end- products crosslink breaker. *Circulation*, 2001. 104. " 1464-1470".
- Katrina G.Y, Pam R.T, Maraliz BH, Maria M.R, Alexander C.Z, Guillermo C, Francisco J.V. Effect of (-) epicatechin on myocardial infarct size and left ventricular remodeling following permanent coronary occlusion. *J Am Coll Cardiol*, 2010. 22(25). " 2869-2876".
- Kim, J.A. Montagnani, M. Koh, K.K. Quon, M.J. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, 2004.113. "1888-1994".
- Koh, K.K. Han, S.H. Quon, M.J. Yeal Ahn, J. Shin, E.K. 2005. Benefical effects of fenofibrate to improve endothelial dysfunction and raise adiponectin levels in patients with primary hyperglyceridemia. *Diabetes Care*, 28.: 1419-1424".
- Koh,K.K. Quon, M.J. Han, S.H. Chung, W.J. Ahn, J.Y. Kim, J.A. Lee, Y. Shin, E.K. Additive beneficial effect of fenofibrate combined with candesartan in the treatment of hypertriglyceridemic hypertensive patients. *Diabetes Care*, 2006. 29. " 195-201".
- Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experiment galactosemia. *Diabetes*, 2001. 50. "1938-1942".
- Lin Y.L, Lim J.K. (-) Epigallocatechin 3-gallate Block the induction of nitric oxide synthase by down-regulation lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol*. 2000; 52:465-472.
- Little, W.C. Zile, M.R. Kitzman, D.W. Hundley, W.G. O'Brien, T.X. Degroof, R.C. The effect of alagebrium chloride (ALT-711), a novel glucose cross-link breaker, in the treatment of elderly patients with diastolic heart failure. *J. Card. Fail*, 2005. 11. " 191-195".
- Lorenz M, Wassler S, Follmann E, Michaelis W, Dusterhoft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide

synthase by a phosphatiylinositol-3-OH-kinase-cAMP-dependent protein kinase, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem*, 2004. 279.

Lyu SY, Park W.B, Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC *in vitro* incubation with flavonoids. *Arch Phrm Res*, 2005.28. "573-581".

Mackenzie GG, Carrasquedo F, Delfino J.M, Keen C.L, Fraga C.G, Oteiza P.I. Epicatechin, catechin and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappa B activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J*, 2004. 18. "167-169".

Mark A Creager, MD Josua A. Beckman, Vascular function and diabetes mellitus. Chapter 16 dalam Endothelial Dysfunction and Vascular Disease, Editor Raffaele De Caterina, *Peter Libby*, 2007.edisi 1, Blackweell Publishing.

Martin K.R, Lilach O.L, Amir L. Endothelial function expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med*, 2010. 4(3), "351-360".

Marx, N. Duez, H. Fruchart, J.C. Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulator of gene expression in vascular cells. *Circ. Res*, 2004. 94. "1168-1178".

Mehdi N, Shaghayegh H, Farzaneh M, Ali R.M. The prevention on endothelial dysfunction through endothelial cell apoptosis inhibition in a hypercholesterolemic rabbit model: the effect of L. Arginine supplementation. *Bio Med*, 2008. 7:27. "1-6".

Michael E.W, Naomi M.H, Eland A, Monika H, David F.K, James G.E, Elliott, John F.K, Joseph A.V. Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J.The American College of Nutrition*, 200; 26(2). "95-102".

Misra A, Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries, *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(11) (suppl 1): "59- 63".

Montagnani, M. Chen, H. Barr. VA. Quon, MJ. Insulin stimulating activation of eNOS is Independent of Ca++ but Requires phosphorylation by Akt at Ser 1179. *J. Biol. Chem*, 2001. 276 " 30392-30398".

Montagnani,M. Golovchenko, I. Kim,I. Koh. G.Y. Goalstone, M.L. Mundhekar, A.N. Johansen, M. Kucik, D.F. Quon, M.J. Draznin, B. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol. Chem*, 277. "1794-1799".

Muniyappa, R. Montagnani, M. Koh, K.K. Quon, M.J. Cardiovascular action of insulin. *Endocr Rev*, 2007. 28. "263-269".

Nathan, D.M. Cleary, P.A. Backlund, J.Y. Genuth, S.M. Lachin, M. Orchard, T.J. Raskin, P. Zinman, B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N. Engl. J. Med*, 2005.353. " 2643-2653".

Nileeka B. W, Vasantha R. Plant flavonoid as angiotensin converting enzyme inhibitor in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease*, 2012. 5. "172-188".

Oates, P.J. Polyol pathway and Diabetic peripheral neuropathy. *Int Rev Neurobiol*. 2002. 50, 325-392



- Paquay J.B, Haenen G.R, Stender G, Wiseman S.A, Tijburg L.B, Bast. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J. Agric Food Chem*, 2000; 48:5768-5772.
- Peixin Y, Hua L. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ameliorates hyperglycemia induce embryonic vasculopathy and malformtion by inhibition of Foxo3a activation. *Am J Obstet Gynecol*, 2010. 203 (1). "71-75".
- Pon Velayuthan, Anandh Babu, and Dongmin Liu. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Curr Med Chem*, 2008.15(18). " 1840-1850".
- Rahman I, Biswas S.K, Kirkham P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 2004;72: 1439-1452.
- Ramachandran A. Epidemiology of diabetes in India-three decades of research. *J Assoc Physicians India*. 2005. 53. "34-38".
- Rosalind, J.M. KimG.J and Anne M.M. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *British Journal of Nutrition*, 2009. 102. "1790-1802".
- Sabu M.C, Priya T.T, Ramadasan K, Ikuo N. Benefical effect of green tea: a Literatur review. *Chinese Medicine*, 2010. 5:13. " 1-9".
- Scalbert, A. Williamson, G. Diatary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr*, 2000. 130. "2073S - 2085S"
- Schalkwijk and C. D. A. Stehouwer. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*, 2005. vol. 109, no. 2, pp. "143 – 159".
- Schewe T, Steffen Y & Sies H. How do dietary flavonols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys*, 2007.476,"102-106".
- Sekaran Muniandy, Rajes Gvist, Gracie Ong Siok Yan, Chook Jack Bee, yiaw Koon Chu and Arokiasamy Vinsent Rayappan. The oxidative stress of hyperglycemia and the inflammatory proces in endothelial cells. *The Journal of Medical Investigation*, 2009. Vol 56: "6-9".
- Sherene M, Shenouda, Joseph A.V. Effect of flavonoid-contining beverages and EGCG on Endothelial Function. *J the American College of nutrition*, 2007. 26(4). " 366S- 372S".
- Shoda Shoda H, Miyata S, Liu BF. Inhibitory effect of tenilsetam on the Maillard reaction. *Endocrinology*; 138(5)."1886-1892".
- Soobrattee M.A, Neergheen V.S, Luximo- Ramma A, Aruoma O.I, Bahorun T. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agent: mechanism and actions. *Mutat Res*, 2005. 579. " 200-213".
- Soeatiadji DW. Peran stress oksidatif dalam patogenesis angiopati mikro dan angiopati makro diabetes melitus. *Medika*; 2007. (5), "318-325".
- Stirban, A. Negrean, M. Stratmann,B. Gowłowski,T. Hortmann, T. Gotting,C. Kleesiek,K. Mueller-Roesel,M. Koschinsky,T. Uribarri,J. Vlassara,H. Tschoepe,D. Benfotiamine prevent macro and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2006. 29. "2064-2071".

- Steffen Y, Gruber C, Schewe T. Mono-O-methyl-ated flavonols and other flavonoids as inhibitor of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 469. "209-219".
- Strom, C. Sander, B. Klemp, K. Aiello, L.P. Lund-Andersen, H. Larsen, M. Effect of ruboxistaurin on blood-retinal barrier permeability in relation to severity of leakage in diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. 46. " 3855-3858".
- Swen Wolfram. Effect of Green tea and EGCG on Cardiovascular and Matabolic Health. *J. The American College of Nutrition*, 2007. 25(4). "373S-388S".
- Tan, W.-S. Chow, V. H. G. Ai, and K. S. L. Lam. Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasomotor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2002.vol. 18, no. 1, pp. 71-76
- Tang, W.J. Hu, C.P. Chen M.F. Epigallocatechin gallate preserves endothelial function by reducing the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Can J. Physiol Pharmacol*, 2006. 84. " 163-171".
- Terra X, VallsJ, Vitrac X, Merrillon J.M. Arola L. Ardevol A, Blade C. Fernandez-Larrea J, Pujadas G, salvado J, Blay M. Grape-seed procyanidins act as antiinflamatory agent in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *J Agric Food Chem*. 2007;55:4357- 4365.
- Ueno, Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T, Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr*, 2002.; 132. "897-900".
- Ulrich Forstermann. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Eur J Physiol*, 2010. 459. "923-939".
- Wang Y, Mi J, Shan xy, Wang OJ, Ge KY. Is China facing an obesity epidemic and the consequences? The trend in obesity and chronic disease in China. *Int J Obes (Lond)*, 2007.3. "177-188".
- Wassmann, S. Laufs, U. Muller, K. Konkol, C. Ahlborg, K. Baumer, AT. Linz, W. Bohm, M. Nickenig, G. Cellular antioxidant effect of atorvastatin *in vivo* and *in vitro*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 2002. 22. " 300-305".
- Way, N. Katai, and G. L. King. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*, 2001. vol. 18, no. 12, pp. "945-959".
- Wheeler D.S, Catravas J.D, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong H.R. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibit IL-1 beta dependent proinflammatory signal transduction in culture respiratory epithelial cells. *J Nutr*. 2004;134:1039-1044.
- Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Comuz J. Active smoking and the risk of type diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2007. 298 (22):2654-2664.
- Wineke Bakker, Etto C. Eringa, Pieter Sipkema, Victor W, van Hinsbergh. Endothelial dysfunction and diabetes: role of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell tissue Res*, 2009. 335. "165-189".
- Yang, X. Mo, Q. Gong. Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose. *Apoptosis*, 2008. vol. 13, no. 11, pp. "1331-1343".



Yang F, Oz H.S, Berve S, de-Viliers W.J, McClain C.J, Varilek G.W. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin3-gallate block nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I ka-ppa B kinase activity in the intestinal apithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol*. 2001; 60:528-533.

Venera S, Henrynk D, Karl S, Mario L. Molecular target of tea polyphenol in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 2006. 73. "348-358".



# BAB 3

## Potensi Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4 Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah (Studi *Invivo* pada Tikus Strain Wistar dengan DM Type-II)

### 3.1 Abstrak

Diabetes melitus adalah merupakan kumpulan gejala yang timbul pada seseorang akibat peningkatan kadar glukosa darah yang disebabkan oleh kekurangan insulin baik absolut maupun relative. Kandungan *Catechins Green Tea GMB-4* dipercaya mampu mencegah stres oksidasi akibat radikal bebas yang menyebabkan kerusakan sel beta pankreas. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan *Potensi Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap Penurunan Kadar Gula darah, Studi *invivo* pada tikus strain wistar dengan Diabetes Melitus Tipe-2.

penelitian ini menggunakan desain *True Experimental Design* dengan sampel tikus strain wistar jantan 15 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kontrol Negatif, Kontrol Positif, kelompok perlakuan 1 dengan dosis 20mg/KgBB, kelompok perlakuan 2 dengan dosis 40mg/KgBB, kelompok perlakuan 3 dengan dosis 60mg/KgBB. Pemeriksaan glukosa darah menggunakan *Metode Cobas Mira*, selanjutnya dianalisa dengan *One-Way ANOVA*. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 28 Agustus 2013 sampai 27 November 2013.

Hasil analisa dengan menggunakan uji Parametrik *One-Way ANOVA*, pada  $\alpha = 0,05$  dengan hasil sig 0,002. Dengan hasil penelitian K.Neg 116,33, K.Post 153,00, K.P20mg

118,66, K.P.40mg 184,66, K.P.60mg 193,66. Dari ketiga perlakuan yang paling efektif dalam menurunkan kadar gula darah pada tikus Diabetes Melitus dengan dosis 60mg/KgBB, *Post Hoc Test* didapatkan sig 0,007 dengan rata-rata -77,33.

*Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis tepat mampu mencegah stres oksidasi dan melindungi sel beta pankreas, sehingga produksi insulin tetap stabil dan gula darah normal.

### 3.2 Latar Belakang

Meningkatnya prevalensi diabetes melitus akhir-akhir ini banyak disoroti di negara yang bersangkutan. Peningkatan pendapatan perkapita dan gaya hidup yang salah terutama di kota-kota besar, menyebabkan peningkatan prevalensi diabetes melitus di jaman sekarang ini. Diabetes melitus merupakan masalah kesehatan yang harus di perhatikan karena penyakit degeneratif ini berpengaruh pada produktifitas dan dapat menurunkan sumber daya manusia (Suyono, 2007).

Powers (2005) dalam Sihombing (2008) mengatakan bahwa komplikasi penyakit tersebut akan mempengaruhi kualitas hidup termasuk morbiditas dan mortalitas. Apabila dibiarkan hiperglikemia jangka panjang pada diabetes menyebabkan beberapa gangguan pada organ diantaranya mata, ginjal, jantung dan pembuluh darah.

Diabetes melitus menjadi salah satu ancaman utama bagi kesehatan manusia pada abad ke-21. Berdasarkan pola pertambahan penduduk saat ini di perkiraikan jumlah penderita diabetes melitus di dunia tahun 2010 sebanyak 306 juta jiwa, di negara-negara ASEAN 19,4 juta pada tahun 2010, dan di Indonesia pada tahun 2000 berjumlah 8,4 juta jiwa dan di perkiraikan pada tahun 2030 dapat mencapai 21,3 juta jiwa ( Depkes, 2009 ).

Prevalensi diabetes melitus di dunia diperkirakan sebesar 0,19% pada orang usia < 20 tahun dan 8,6 pada orang usia > 20 tahun pada tahun 2000. Prevalensi diabetes melitus sebesar 20,1% Orang usia > 65 tahun. Di tahun 2004 sekitar 3,4 juta orang meninggal akibat tingginya kadar gula darah pada orang yang menderita diabetes melitus dan lebih dari 80% kematian tersebut terjadi di negara-negara dengan pendapatan menengah ke bawah (WHO, 2011).

Hasil penelitian epidemiologi yang dilaksanakan di Indonesia angka kejadian diabetes melitus antara 1,4 sampai 1,6 kecuali di dua tempat yaitu di Pekajangan, suatu desa dekat dengan Semarang, sebesar 2,3% dan Manado sebesar 6% (Suyono, 2009). Sedangkan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007, penyebab kematian akibat diabetes melitus pada kelompok usia 45-54 tahun di daerah perkotaan menduduki ranking ke-2 yaitu 14,7%. Dan daerah pedesaan, Diabetes Melitus menduduki ranking ke-6 yaitu 5,8% ( Depkes, 2009).

Kelenjar endokrin pankreas tersusun atas pulau Langerhans yang merupakan *cluster* yang tersebar di sepanjang kelenjar eksokrin pankreas. Pulau Langerhans memiliki 4 sel yaitu sel alfa, sel beta, sel delta, dan sel PP (Polipeptida pankreas) (Seungbum *et al*, 2007).

Faktor penyebab diabetes type-2 adalah kelebihan lemak, faktor genetik, status gizi lebih (Obesitas) dan aktivitas fisik yang kurang. Diet rendah serat dan tinggi indeks glikemik berhubungan dengan peningkatan resiko diabetes melitus dan diet tinggi lemak akan mempengaruhi resistensi insulin dan resiko diabetes melitus (Hu F.B *et al*, 2001).

Kerusakan sel beta pankreas menyebabkan tubuh tidak bisa menghasilkan insulin sehingga menyebabkan kadar glukosa darah meningkat (terjadi keadaan hiperglikemia). Kondisi hiperglikemi dapat menghasilkan pembentukan spesies oksigen reaktif (*ROS=Reactive Oxygen Species*). *ROS* yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan sel beta pankreas (Robertson *et al*, 2003). Insulin yang di keluarkan oleh sel beta pankreas akan mentranspor glukosa untuk masuk kedalam sel, kemudian di dalam terjadi proses metabolisme menjadi tenaga. Apabila insulin tidak aktif maka glukosa dalam pembuluh darah akan terus meningkat sehingga kadar glukosnya tinggi yang di sebut hiperglikemi (Waspadji, 2002).

Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi adalah *EGCG* yang diisolasi dari tanaman teh (*Camellia Sinensis*). Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung telah mengembangkan klon tanaman teh yaitu klon *GMB-4* dengan kadar *Catechins* lebih tinggi daripada tanaman teh lainnya. Sumber antioksidan yang terdapat pada teh hijau yang paling utama adalah polifenol (catekin dan asam gallat) yang kandungannya lebih besar jika dibandingkan dengan teh hitam atau Oolong (Cabrera *et al*, 2007).

*Catechins* adalah senyawa dominan dari polifenol yang terdiri dari *epicatechin*, *epigallocatechin*, *epicatechin-3-gallate* dan *epigallocatechin-3-gallate*. *EGCG* merupakan komponen utama *Catechins* (59%) merupakan antioksidan kuat dengan kekuatan hingga 4-5 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin E dan C.

*Catechins* merupakan salah satu jenis flavonoid yang banyak di temukan pada daun teh dan merupakan antioxidant kuat. *Catechins* banyak di temukan pada teh hijau *Camellia Sinensis* klon *GMB-4* karena proses pembuatannya pada saat daun masih segar langsung di seduh tidak melewati tahap pengeringan sehingga kadar *Catechins* yang dihasilkan banyak (Joe, 2004).

Kandungan *polyphenol* dan *flavonol* pada *Catechins Green Tea* berperan dalam menjaga ion metal, menjaga keseimbangan karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya menghambat aktivasi enzim  $\alpha$  *glukosidase*, menghambat absorpsi glukosa pada intestinal, melindungi sel  $\beta$  pankreas, meningkatkan sekresi insulin, mengaktivasi AMPK, sebagai antioksidan yang menghambat stres oksidasi, sebagai



anti inflamasi pada endotel dan proliferasi pertumbuhan sel endotel (Hanhinhineva *et al*, 2010).

*Catechins* merupakan antioksidan kuat diharapkan mengurangi aterosklerosis. Di dukung penelitian Nagao 2005 yang menyatakan bahwa sifat antioksidan *Catechins* dapat menghambat LDL. *Catechins* juga dapat menurunkan kadar serum darah, faktor proinflamasi, kolesterol dan juga LDL dengan menghambat oksidasi (Lucas *et al*, 2007).

Melihat tingginya angka terjadinya penyakit diabetes melitus peneliti tertarik untuk membuat penelitian dengan judul "Potensi ekstrak *Catechins Green Tea (CGT) GMB-4* terhadap penurunan kadar gula dalam darah " Dengan melakukan studi invivo pada tikus strain wistar dengan diabetes melitus type II, di Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang.

### **3.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian**

#### **3.3.1 Tujuan Umum**

Mengetahui Potensi Ekstrak *Catechins Green Tea (Camellia Sinensis) GMB-4* terhadap penurunan kadar gula dalam darah " Dengan melakukan studi invivo pada tikus strain wistar dengan diabetes melitus type II.

#### **3.3.2 Tujuan Khusus**

- a. Mengidentifikasi Kadar gula darah pada tikus strain wistar non Diabetes Melitus Type II
- b. Mengidentifikasi Kadar gula darah pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type II yang tidak di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4*.
- c. Mengidentifikasi Kadar gula darah pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type II yang di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* 20 mg/Kg BB/hari.
- d. Mengidentifikasi Kadar gula darah pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type II yang di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* 40 mg/Kg BB/hari.
- e. Mengidentifikasi Kadar gula darah pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type II yang di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* 60 mg/Kg BB/hari.
- f. Menganalisa penurunan kadar gula darah pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type II.

### 3.3.3 Manfaat Penelitian

1. Manfaat akademis

Menambah wawasan ilmu pengetahuan mengenai potensi *Catechins Green Tea GMB-4* terhadap penurunan kadar gula dalam darah.

2. Manfaat klinis

Memberikan peluang strategi kepada peneliti selanjutnya untuk merancang penelitian lebih lanjut mengenai pemberian *Catechine Green Tea GMB-4* dalam upaya pencegahan terjadinya komplikasi diabetes melitus.

---

### 3.4 Metode Penelitian

Sebelum melakukan proses perlakuan hewan peneliti memilih Tikus wistar yang digunakan berdasarkan kriteria populasi sebanyak 15 ekor. Kemudian diadaptasikan pada kandang tempat pemeliharaannya selama 7 hari. Selama 40 hari selanjutnya diberikan diet *chow standart* pada kelompok kontrol negatif, sedangkan pada kelompok kontrol positif diberikan diet hipertoleran.

Pemberian diet hipertoleran (aterogenik) Pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/ PARS 30 gram, air 20 cc, tepung terigu 30 gram<sup>5</sup>. Diet aterogenik yang terdiri dari pakan standart ( PARS 30 gram dan tepung terigu 30 gram ) yang ditambahkan kuning telur bebek (2 gram ), asam kolat (0,06 gram ), minyak babi 3,22 gram (3,75 cc ), minyak kambing 4 gram (4 cc), minyak kelapa 0,4 gram (0,4 cc ), air ( 25cc )<sup>6</sup>. Kemudian diinjeksi secara intraperitoneal dengan Streptozotocin (STZ) *low dose* 30 mg/kg BB dibagi 3 hari (10 mg/kgBB/hari)<sup>7</sup>.

Setelah 3 hari dilakukan pemeriksaan gula darah. Bila gula darah mencapai >200 mg/dl sudah dikategorikan hiperglikemia. Selain itu juga dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol untuk mengetahui kadar kolesterol apabila > 200 mg/dl dikategorikan hipertoleran. Kadar gula darah tikus mencapai 200 mg/dl berarti sudah dikatakan diabetes<sup>8</sup>.

Kelompok dibagi menjadi 5 yang terdiri dari: Kelompok 1: Kontrol negatif tikus non diabet tanpa perlakuan, Kelompok 2: Tikus diabet yang tidak diberikan perlakuan dengan *Catechin Green Tea GMB-4*, Kelompok 3 : Tikus diabet dengan perlakuan *Catechin Green Tea GMB-4* 20 mg/KgBB/hari, Kelompok 4: Tikus diabet dengan perlakuan *Catechin Green Tea GMB-4* 40 mg/KgBB/hari, Kelompok 5: Tikus diabet dengan perlakuan *Catechin Green Tea GMB-4* 60 mg/KgBB/hari, Perlakuan diberikan selama 6 minggu, setiap 2 minggu sekali dilakukan pemeriksaan gula darah 8-12 jam setelah makan<sup>9</sup>.

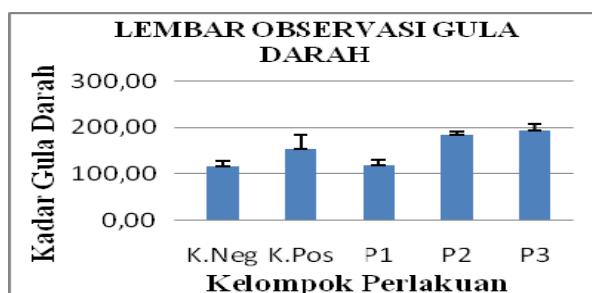
### 3.5 Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan kadar gula darah total serum dari tikus putih jantan *Strain Wistar* dilakukan pada akhir penelitian. Pemeriksaan kadar gula darah menggunakan menggunakan mesin *COBAS MIRA*.

**TABEL 3.1**

Rata-rata kadar gula darah puasa pada tikus percobaan

Kelompok	Jumlah Sampel	Nilai Rata-rata dan Standar Deviasi
K.Neg	3	116,33 ± 11,44
K.Post	3	153,00 ± 30,59
K.P1 (20 mg)	3	118,66 ± 10,53
K.P2 (40 mg)	3	184,66 ± 6,86
K.P3 (60 mg)	3	193,66 ± 13,20



**GRAFIK 3.1**

Kadar Gula Darah Pada Tikus Percobaan

Dari hasil *lavene test* tersebut yaitu 0,067 dengan memakai  $\alpha = 0,05$ , berarti terima Ho. Jika terima Ho berarti data dikatakan homogen dan dilanjutkan ke uji *One Way Anova* dengan hasil 0,002 dengan  $\alpha = 0,05$  berarti tolak Ho dengan kesimpulan *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* berpotensi terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar Diabetes Melitus*, Ditandai minimal ada 1 kelompok yang berbeda.

Dari hasil penelitian yang dilakukan peneliti menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap Penurunan kadar Gula Darah Puasa Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar Diabetes Melitus* terdapat perbedaan yang signifikan. Dimana dapat dilihat dari hasil Uji *One - Way ANOVA* dengan nilai signifikansi 0,002, dan dikatakan nilai signifikansi ( $\alpha < 0,05$ ) maka Ho di tolak. Sehingga Ada Potensi Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Puasa Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar Diabetes Melitus*.

Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi adalah *Catechins Green Tea GMB-4* yang diisolasi dari tanaman teh (*Camellia Sinensis*). Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung telah mengembangkan klon tanaman teh yaitu klon *GMB-4* dengan kadar *Catechins* lebih tinggi daripada tanaman teh lainnya. Sumber antioksidan yang terdapat pada teh hijau yang paling utama adalah *polipenol* (katekin dan asam gallat) yang kandungannya lebih besar jika dibandingkan dengan teh hitam atau Oolong<sup>10</sup>. *Catechins* merupakan antioksidan kuat diharapkan mengurangi aterosklerosis. Di dukung penelitian Nagao 2005 yang menyatakan bahwa sifat antioksidan *Catechins* dapat menghambat LDL. *Catechins* juga dapat menurunkan kadar serum darah, faktor proinflamasi, kolesterol dan juga LDL dengan menghambat oksidasi.

Mekanisme kerja *flavanoid* termasuk *catechins* adalah menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai scavenger (peredam) terhadap radikal bebas oksigen reaktif ( $O_2^{0-}$ ) maupun radikal hidroksil ( $OH^0$ ). Cara kerjanya dengan memberikan donor atom H kepada radikal peroksil membentuk radikal *flavanoid* dan akan bereaksi dengan oksigen reaktif (superokida) sehingga menjadi netral. Dengan reaksi tersebut, reaksi berantai peroksidasi lipid dapat dihentikan.

Berdasarkan hasil penelitian dan teori diatas dapat disimpulkan bahwa *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dapat digunakan sebagai obat alternatif (non farmakologi) untuk menurunkan kadar gula darah. Akan tetapi dosis yang digunakan harus tepat, dan dosis pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dari uji *Post Hoc Test* yang paling berpotensi yaitu dosis 60 mg/KgBB / tikus / hari karena nununjukkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0.007 dan dosis 40 mg/KgBB/ Tikus/Hari juga berpotensi menurunkan kadar gula darah karena menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0.015.

*Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 20 mg/KgBB kurang berpotensi menurunkan kadar gula dalam darah karena tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai sig 1.000, dalam dosis tepat kandungan *polyphenol* dan *flavonol* menjaga ion metal, menjaga keseimbangan karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya menghambat aktivasi enzim *a glukosidase*, menghambat absorpsi glukosa pada intestinal, melindungi sel  $\beta$  pankreas, meningkatkan sekresi insulin, mengaktifasi AMPK, sebagai antioksidan yang menghambat stres oksidasi, sebagai anti inflamasi pada endotel dan proliferasi pertumbuhan sel endotel.

Perlu diwaspadai *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terdapat kandungan *kafein* yang berlebihan dalam dosis tinggi dan akan menjadi *pro-oksidan* yang akan merusak *DNA*.

Penelitian sebelumnya menyebutkan *ekstrak EGCG* dari teh hijau bersifat sitotoksik. *EGCG* (*Epigallocatechin-gallate*) dalam Teh Hijau justru bersifat sebagai

*pro-oksidan* dan bukan sebagai *antioksidan* pada sel beta pankreas *in vivo*, Mengingat hal tersebut konsumsi teh hijau secara berlebihan dapat berbahaya bagi kesehatan. Perlakuan 2 dengan dosis 40 mg/Kg/BB dan perlakuan 3 dengan dosis 60 mg/Kg/BB, sama-sama berpotensi dalam menurunkan kadar gula darah pada tikus yang dibuat Diabetes Melitus Type 2, tetapi yang memiliki potensi paling tinggi dalam menurunkan gula darah pada dosis 60 mg//Kg/BB, karena menunjukkan penurunan yang signifikan, hal ini disebabkan tubuh merespon *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* sebagai anti oksidan bekerja dengan baik.

### 3.7 Kesimpulan dan Saran

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* Berpotensi menurunkan kadar gula darah pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type-II, Hasil uji statistik *One – Way ANOVA* didapatkan hasil nilai signifikansi 0,002, dimana ( $\alpha < 0,05$ ) sehingga hasil  $< \alpha$  Ho di tolak. Dosis yang paling berpotensi menurunkan kadar gula darah, pada perlakuan 3 dengan dosis 60 mg/Kg/BB,dari *Uji Post Hoc Test* didapatkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0,007 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, hasil uji *Tukey* rata-rata gula darah 193,66 mg/dl.

Saran bagi peneliti selanjutnya, Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi bagi peneliti yang berminat ingin meneliti tentang pengaruh pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap penurunan kadar gula darah maupun variabel lain dan bisa dikembangkan tidak pada tikus tetapi bisa pada manusia untuk menemukan dosis yang tepat untuk manusia.

---

## 3.6 Daftar Pustaka

- Suyono.S. 2007. *Kecendrungan peningkatan jumlah penyandang Diabetes*. Dalam *Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu*. Jakarta:Balai Penerbit FKUI.
- World Health Organization. 2011. *Global Prevalence of Diabetes in Epidemiology/ Health Service/ Psychosocial Research*: WHO.
- Hu F B, Manson J E, Stampfer M J, Colditz G, Liu S, Solomon C G, dan Willett W C. 2001. *Diet, Lifestyle, and The Risk of Type 2 Diabetes Mellitus In Woman*. New England Journal of Medicine.
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Kolehmainen, J. P. M., Mykkänen, H., Poutanen, K. 2010. *Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism*. *Int. J. Mol. Sci.*
- Murwani S, Ali M, Muliartha K. 2006. *Diet Aterogenik pada Tikus Putih (Rattus norvegicus strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis*. Journal Kesehatan Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.
- Mu'nisa. A. 2003. *Pengaruh Diet Asam Lemak Essensial Terhadap Kadar Kolesterol dan Permasalahanya*. IPB.



- Nakamura Tomonori, Terajima Tomoko, Ogata Taeko, Ueno K, Hashimoto N, Ono K, Yano S. 2006. *Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide*. Diabetic and metabolic disease.
- Zhang R. 2011. *Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK -Ay mice*. Nutrition & Metabolism.
- Chaiyasut C, Kusirisin W, Lailerd N, Lertratrakarnnon P, Suttajit M, Srichairatanakool S. 2011. *Effects of Phenolic Compounds of Fermented Thai Indigenous Plants on Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- Cabrera C, Atacho R, Gimenez R. 2007. *Beneficial Effect of Green Tea*. Journal of American College of Nutrition.
- Lucas A. edralin, arpita basu. 2007. *Mechanisms and effect of green tea on cardiovascular health*. Department of nutritional sciences. Oklahoma state university.
- Nagao, T., Komine, Y., Soga, S., Meguro S., Hase T. 2005. *Ingestion of a Tea Rich in Catechins Leads to a Reduction in Body Fat and Malondialdehydemodified LDL in Men*. The America Journal of Clinical Nutrition.
- Chacko, S., Thambi, P., Kuttan, R., Nishigaki, I. 2010. *Beneficial effects of green tea: A literature review*. Chinese Medicine.
- Priyo Bekti, Yuly Peristiowati, Intan Fazrin, Lia Dwi Wijayanti, 2014. Potensi Ekstrak Catechins Green Tea Gmb-4 Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah ( Studi Invivo Pada Tikus Strain Wistar Dengan Dm Type-II )







# BAB 4

## Identifikasi Peningkatan Kadar Insulin pada Tikus *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Type 2 yang Terjadi Resistensi Insulin Setelah Pemberian *Catechins Green Tea (CGT) GMB-4*

### 4.1 Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi peningkatan kadar insulin pada tikus strain wistar. Desain penelitian ini menggunakan *Tru-Eksperimental Design* dengan sampel tikus strain wistar jantan 15 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok, dengan pembagian K.Neg, K.Post, K.P.1 (20mg/KgBB), K.P.2 (40mg/KgBB), K.P.3 (60mg/KgBB). Pengumpulan data dengan menggunakan *Metode Ellisa Kit dengan reagen INS*, selanjutnya dianalisa menggunakan uji parametrik *One-Way ANOVA*.

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 28 Agustus 2013 sampai 28 November 2013. Hasil analisa dengan menggunakan uji Parametrik *One-Way ANOVA*, pada  $\alpha$  0,05 dengan hasil sig 0,000. Dengan hasil penelitian K.Neg 7,36 mU/L, K.Post 5,33 mU/L, K.P.20mg 7,70 mU/L, K.P.40mg 12,0 mU/L, K.P.60mg 13,40 mU/L. Dari ketiga perlakuan yang paling efektif dalam peningkatan kadar insulin pada tikus Diabetes Melitus dengan dosis 60mg/KgBB dengan uji Post Hoc Test nilai signifikan sebesar 0,001. *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis tepat memiliki kandungan EGCG (*Epigallocatechins gallate*) dapat berfungsi sebagai antioksidan yang kuat



sehingga mampu mencegah strees oksidasi dan melindungi sel  $\beta$  pankreas sehingga produksi insulin tetap stabil dan tidak terjadi resistensi insulin.

**Kata Kunci:** Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4, Insulin, Diabetes Melitus

## 4.2 Latar Belakang

Penyakit tidak menular (PTM) menjadi masalah kesehatan masyarakat yang cukup besar di Indonesia. Salah satunya adalah Diabetes Melitus yang telah menduduki sepuluh besar penyakit penyebab kematian (Achmadi, 2005). Diabetes Melitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolismik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau kedua-duanya (Purnamasari, 2009).

Insulin merupakan indulin yang digunakan oleh sel  $\beta$  di pankreas. Insulin berfungsi untuk meningkatkan penyimpanan karbohidrat, lemak dan protein. Hormon ini bertanggung jawab untuk proses glikogenesis, yaitu perubahan glukosa menjadi glikogen dalam hati dan otot, serta menyebabkan lipogenesis, yaitu pembentukan trigliserida dan lemak. Hormon ini juga menghambat pemecahan lemak dan meningkatkan penghasilan glukosa dalam hati. Mal fungsi dapat meningkatkan terjadinya Diabetes Melitus. (Djimanshiro, 2008).

Diabetes Melitus menjadi salah satu ancaman utama bagi kesehatan manusia. Menurut *world health organization* (WHO), pada tahun 2000 bahwa dari statistik kematian dunia, 57 juta jiwa kematian terjadi setiap tahunnya disebabkan oleh PTM (Penyakit Tidak Menular) dan diperkirakan bahwa sekitar 3,2 juta jiwa per tahun penduduk dunia meninggal akibat Diabetes Melitus. Selanjutnya pada tahun 2003, WHO memperkirakan 194 juta jiwa atau 5,1% dari 3,8 miliar penduduk dunia yang berusia 20-79 tahun menderita Diabetes Melitus dan pada 2025 akan meningkat menjadi 333 juta jiwa. WHO memprediksi Indonesia, bahwa ada kenaikan dari 8,4 juta diabetisi pada tahun 2000 akan meningkat sekitar 21,3 juta diabetisi pada tahun 2030. Hal ini akan menjadikan Indonesia menduduki rangking ke 4 (empat) dunia setelah Amerika Serikat, China dan India dalam prevalensi Diabetes (*Diabetes Care*, 2004). Dari seluruh penderita Diabetes Melitus di dunia, lebih dari 60 % berasal dari Asia. Prevalensi Diabetes Melitus pada penduduk Asia mengalami peningkatan dengan cepat pada dekade terakhir mencapai lebih dari 110 miliar individu pada tahun 2007 (Wild *et al*, 2004).

Di Indonesia sendiri diperkirakan bahwa pada tahun 2030 prevalensi Diabetes Melitus (DM) mencapai 21,3 juta orang (*Diabetes Care*, 2004). Menurut penelitian epidemiologi yang dilaksanakan di Indonesia, kekerapan diabetes di Indonesia

berkisar antara 1,4 sampai 1,6% kecuali di dua tempat yaitu di Pekajangan, suatu desa dekat Semarang, sebesar 2,3% dan di Manado sebesar 6% (Suyono, 2009). Hasil Riset kesehatan Dasar (Risksesdas) tahun 2007, diperoleh bahwa proporsi penyebab kematian akibat Diabetes Melitus pada kelompok usia 45-54 tahun di daerah perkotaan menduduki ranking ke-2 yaitu 14,7% dan daerah pedesaan, Diabetes Melitus menduduki ranking ke-6 yaitu 5,8% (Depkes, 2009).

Tingkat kejadian Diabetes Melitus type II lebih banyak dari pada type I. Pada tahun 2007 tercatat 240 miliar penderita Diabetes Melitus tipe II, jumlah ini diperkirakan akan meningkat menjadi 380 miliar pada tahun 2025 pada negara-negara dengan pendapatan rendah dan menengah (Juliana *et al*, 2004).

Tingginya jumlah penderita Diabetes Melitus type 2 di Indonesia di akibatkan perilaku makan orang Indonesia yang terlalu banyak mengkonsumsi karbohidrat. Hasil penelitian di Amerika menunjukan pada usia dewasa, asupan kalori rata-rata 3200 kalori. Dari jumlah tersebut, 47 % menghasilkan glukosa bagi tubuh. Di Indonesia, setiap orang dewasa memiliki asupan kalori 1700-1900 kalori. Akan tetapi, sumber kalori yang menghasilkan glukosa bagi tubuh mencapai 70%. Hal itu disebabkan oleh asupan makanan pada orang dewasa di Indonesia lebih banyak mengandung karbohidrat (Pikiran Rakyat Cyber Media, 2003).

Kelenjar endokrin pankreas tersusun atas pulau Langerhans yang merupakan *cluster* yang tersebar di sepanjang kelenjar eksokrin pankreas. Pulau Langerhans memiliki 4 sel yaitu sel alfa, sel beta, sel delta, dan sel PP (Polipeptida pankreas) (SEUNGBUM *et al*, 2007). Faktor penyebab diabetes tipe-2 adalah kelebihan lemak, faktor genetik, status gizi lebih (Obesitas) dan aktivitas fisik yang kurang. Diet rendah serat dan tinggi indeks glikemik berhubungan dengan peningkatan resiko Diabetes Melitus dan diet tinggi lemak akan mempengaruhi resistensi insulin dan resiko Diabetes Melitus (Hu F.B *et al*, 2001).

Kerusakan sel beta pankreas menyebabkan tubuh tidak bisa menghasilkan insulin sehingga menyebabkan kadar glukosa darah meningkat (terjadi keadaan hiperglikemia). Kondisi hiperglikemi dapat menghasilkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS=*reactive oxygen species*). ROS yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan sel beta pankreas (ROBERTSON *et al*, 2003). Insulin yang di keluarkan oleh sel beta pankreas diibaratkan anak kunci yang akan membuka glukosa untuk masuk kedalam sel, kemudian di dalam terjadi proses metabolisme menjadi tenaga. Apabila insulin tidak aktif maka glukosa dalam pembuluh darah akan terus meningkat sehingga kadar glukosanya tinggi yang di sebut hiperglikemi. Pada keadaan tadi anak kuncinya yang banyak, sebaliknya meskipun anak kuncinya banyak apabila lubang kuncinya sedikit (reseptornya) maka glukosa yang masuk ke sel juga sedikit sehingga akan kekurangan bahan bakar, dan terjadi hiperglikemi (Waspadji, 2002).



Penurunan kemampuan insulin untuk beraksi pada jaringan target perifer (terutama otot dan hati) merupakan ciri yang menonjol pada Diabetes Melitus type II dan merupakan kombinasi dari kerentanan genetik dan obesitas. (Powers, 2005). Pada prinsipnya resistensi insulin dapat terjadi di tingkat reseptor insulin atau di salah satu jalur sinyal pascareseptor. Pada Diabetes Melitus type II jarang terjadi defek kualitatif dan kuantitatif pada reseptor insulin. Oleh karena itu, resistensi insulin diperkirakan terutama berperan dalam pembentukan sinyal pascareseptor (Clare-Salzler, *et al.*, 2007).

Teh adalah minuman yang dihasilkan dari seduhan daun *Camelia sinensis* yang umumnya tumbuh di daerah yang beriklim tropis. Pada umumnya teh sebagai bahan minuman dikelompokan dalam tiga golongan, yaitu teh yang difermentasikan atau teh hitam (*black tea*), teh yang tidak difermentasikan atau teh hijau (*green tea*), dan teh yang setengah difermentasikan atau teh oolong (*oolong tea*) ( Fulder S).

*Catechins* merupakan salah satu jenis flavonoid yang banyak di temukan pada daun teh dan merupakan antioxidant kuat. *Catechins* banyak ditemukan pada teh hijau *Camelia Sinensis* klon GMB-4 karena proses pembuatannya pada saat daun masih segar langsung diseduh dan tidak melewati tahap pengeringan sehingga kadar *Catechins* yang di hasilkan banyak (Joe, 2004)

Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung telah mengembangkan klon tanaman teh yaitu klon GMB-4 dengan kadar *catechins* lebih tinggi dari pada tanaman teh lainnya, dimana teh hijau memiliki kandungan *catechins* lebih tinggi 10,4 sedangkan teh merah memiliki kandungan 9,49 dan teh hitam memiliki kandungan *catechins* 5,91 sementara itu Ratnawati *et al.*, (2009) telah melakukan isolasi dan purifikasi golongan senyawa *catechins* dan EGCG pada pucuk daun ketiga *camellia sinensis varitas assamica* (p+3) dari klon (GMB 4) yang diperoleh dari Lembaga penelitian teh dan kina (PPTK) Gambung, Ciwidey Bandung, Jawa Barat, dimana dari 100 gr teh hijau tersebut terdapat 14-16 % isolat golongan senyawa *catechins*.

Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi adalah EGCG dimana pemberian EGCG dapat mengurangi lemak dan berat badan, meningkatkan penggunaan energi, dan metabolisme, menurunkan absorpsi lemak dan meningkatkan oksidasi lemak melalui penghambatan adipogenesis dan mempengaruhi kerja gen sintesis asam lemak yaitu SREBP-1, sehingga EGCG dapat meningkatkan insulin karena EGCG digunakan sebagai anti obesitas dimana mempunyai kemampuan mensupresi adipo/lipogenesis dan pengambilan asam lemak ke dalam jaringan adiposa, dengan peningkatan sistesis dan oksidasi lemak oleh hepar, tanpa menyebabkan akumulasi lemak pada hepar (Wolfram S, *et al.*, 2005)

Dalam penelitian ini *Catechins Green Tea* merupakan keperawatan komplementer yang masuk dalam dasar keperawatan dan merupakan penatalaksanaan non farmakologi.

Berdasarkan uraian diatas maka penulis ingin membuktikan bahwa *Catechins Green Tea GMB-4* dapat meningkatkan kadar insulin darah pada tikus strain wistar jantan yang diberi diet tinggi lemak.

## **4.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian**

### **4.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui peningkatan kadar insulin pada tikus strain wistar setelah treatmen dengan *Catechins Green Tea GMB-4* di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### **4.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengidentifikasi peningkatan kadar insulin pada tikus strain wistar non Diabetes Melitus type 2 di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Mengidentifikasi peningkatan kadar insulin pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus tipe II yang tidak di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Mengidentifikasi peningkatan kadar insulin pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus tipe II setelah di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* 20 mg/kgBB/hari.
4. Mengidentifikasi peningkatan kadar insulin pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus tipe II setelah di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* 40 mg/kgBB/hari.
5. Mengidentifikasi peningkatan kadar insulin pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus tipe II setelah di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* 60 mg/kgBB/hari.
6. Menganalisa peningkatan kadar insulin pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus type 2.

### **4.3.3 Manfaat Penelitian**

1. Manfaat Teoritis

Dapat di gunakan sebagai tambahan informasi bagi masyarakat mengenai peningkatan kadar insulin pada Diabetes Melitus type 2 setelah diberi *Catechins Green Tea GMB-4*. Hasil penelitian ini di harapkan dapat menambah dan mengembangkan ilmu pendidikan khususnya di bidang kesehatan dan masyarakat dapat menghindari tindakan-tindakan yang merugikan kesehatan.



## 2. Manfaat Praktik

- Mengetahui mekanisme kadar insulin pada tikus Diabetes Melitus type 2 yang diberi terapi *Catechins Green tea GMB - 4*.
- Catechins Green Tea GMB - 4* dapat digunakan dalam pengobatan Diabetes Melitus type 2 dan untuk meningkatkan insulin.

## 4.4 Metode Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *True-Experiment* dengan pendekatan "*Control Group Post Test Design*". Populasi dalam penelitian ini adalah Semua Tikus Strain Wistar yang diberi diet standart selama 1 minggu untuk adaptasi di Lab. Fisiologi Universitas Brawijaya Malang. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah "*Random Sampling*", sehingga diperoleh sampel 20 Tikus jantan Strain Wistar di Lab. Fisiologi Universitas Brawijaya Malang. Variabel independen dalam penelitian ini adalah Pemberian Ekstrak *Catechins Green Tea GMB-4*. Variabel dependen adalah Kadar Insulin. Alat ukur pada penelitian ini adalah dengan menggunakan Metode ELISA Kit.

Sebelum melakukan proses perlakuan hewan coba peneliti memilih Tikus wistar yang digunakan berdasarkan kriteria populasi sebanyak 20 ekor. Kemudian diadaptasikan pada kandang tempat pemeliharaannya selama 7 hari dan diberikan diet standart. selanjutnya diberikan diet *chow standart* pada kelompok kontrol negatif, sedangkan pada kelompok kontrol positif diberikan diet hiperkolesterol selama 40 hari untuk membuat tikus Diabetes Melitus Type II.

Pakan standart yang terdiri dari pakan ayam / PARS 100 gram, air 25 cc, tepung terigu 50 gram<sup>4</sup>. Diet aterogenik yang terdiri dari pakan standart ( PARS 600 gram dan tepung terigu 30 gram ) yang ditambahkan kuning telur bebek 2 gr, asam kolat (1,2 gram ), minyak babi 50 cc, minyak kambing 50 cc, air 25 cc<sup>5</sup>. Kemudian diinjeksi secara intraperitoneal dengan Streptozotocin (STZ) *low dose* 30 mg/kg BB dibagi 3 hari (10 mg/kgBB/hari).

Kelompok dibagi menjadi 5 yang terdiri dari (Chaiyasut *et al.*, 2011).  
 Kelompok 1 : Kontrol negatif tikus non diabet tanpa perlakuan  
 Kelompok 2 : Tikus diabet yang tidak diberikan perlakuan dengan *catechins green tea GMB-4*  
 Kelompok 3 : Tikus diabet dengan perlakuan *catechins green tea* 20 mg/kgBB/hari  
 Kelompok 4 : Tikus diabet dengan perlakuan *catechins green tea* 40 mg/kgBB/hari  
 Kelompok 5 : Tikus diabet dengan perlakuan *catechins green tea* 60 mg/kgBB/hari.

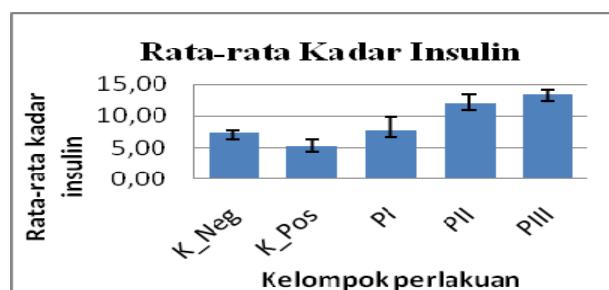
## 4.5 Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan kadar insulin pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dilakukan pada akhir penelitian. Pemeriksaan insulin menggunakan uji *Ellisa Kit*.

**TABEL 4.1**

Rata-rata kadar insulin pada tikus strain wistar

Kelompok	Jumlah Sampel	Nilai Rata-rata
K.Neg	3	7,36
K.Post	3	5,33
K.P1 (20 mg)	3	7,70
K.P2 (40 mg)	3	12,00
K.P3 (60 mg)	3	13,40



**GRAFIK 4.1**

Rata-rata kadar insulin Tikus Strain Wistar

Hasil uji statistik yang dilakukan menggunakan *One Way Anova* dengan jumlah sampel 15 ekor Tikus Strain Wistar maka diperoleh nilai p value = 0,000 jadi p value < 0,05 maka Tolak Ho. Artinya ada pengaruh pemberian *Catechins Green Tea GMB-4*.

Teh hijau mengandung *Catechins*, merupakan senyawa yang paling dominan dalam polyfenol. *Catechins* adalah senyawa yang larut dalam air, tidak berwarna dan memberikan rasa pahit. *Catechins* terutama terdiri dari EGCG, EGC, ECG, EC. Daun teh hijau mengandung polyfenol sampai dengan 30 % berat kering, dimana Catechins dari teh hijau merupakan 80-90 % flavonoid total, dan *EpigalloCatechins gallat* (EGCG) adalah *Catechins* yang terbanyak 48-55 %, di ikuti *Epigallocatechins* (EGC) 9-12 %, *epicatehins-3-gallat* (ECG) 9-12 %, dan epicatehins (EC) 5-7 %. Dari keempat senyawa EGCG merupakan anti oksidan yang paling banyak dan mempunyai efek anti oksidan terkuat.

Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk mengendalikan diabetes melitus, diantaranya dengan mengembangkan minuman fungsional yang mempunyai khasiat

antidiabetes, salah satunya yang banyak diteliti adalah khasiat dari daun teh. Minum teh merupakan kebudayaan timur yang selayaknya terus dipertahankan, karena dari berbagai hasil penelitian teh terbukti mempunyai aktivitas antioksidan yang cukup baik. Hal ini disebabkan oleh kandungan polifenol dalam teh hijau yang mampu menangkal radikal bebas dalam tubuh. Menurut<sup>8</sup>

Polifenol terutama *epigallocatechin gallat (EGCG)* dapat melindungi kerusakan sel beta pankreas dari pengaruh oksidasi. Selain itu penelitian dengan pemberian teh hijau bahwa pemberian teh hijau dapat menekan peningkatan kadar gula darah. *EGCG* pada teh hijau bekerja dengan cara menghambat *transporters sodium-glucose* pada mukosa.

Pemberian EGCG dapat mengurangi lemak dan berat badan, meningkatkan penggunaan energi dan metabolisme, menurunkan absorpsi lemak dan peningkatan oksidasi lemak, meningkatkan kerja insulin, menurunkan akumulasi trigleserida melalui penghambatan adipogenesis dan mempengaruhi kerja gen sintesis asam lemak yaitu SREB-1, sehingga EGCG dapat digunakan sebagai terapi pencegahan obesitas dan resistensi insulin.

Berdasarkan hasil penelitian dan teori di atas dapat disimpulkan bahwa *Catechins Green Tea GMB 4* dapat digunakan sebagai obat alternatif (non farmakologi) untuk meningkatkan kadar insulin. Akan tetapi dosis yang digunakan harus tepat, dan dosis yang digunakan dalam pemberian *Catechins Green Tea GMB 4*. Untuk dosis pemberian 40 mg/kgBB/hari kurang efektif yang paling efektif yaitu dosis 60 mg/kgBB/hari karena catechins bersifat antioksidan, antibakteri, antiradiasi, memperkuat pembuluh darah sehingga *catechins* sebagai radikal bebas yang mampu melindungi sel  $\beta$  pankreas dan meningkatkan sekresi insulin.

## 4.6 Kesimpulan dan Saran

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *Catechins Green Tea GMB 4* dapat meningkatkan kadar insulin pada tikus strain wistar dengan diabetes melitus type 2. Untuk dosis yang paling efektif untuk meningkatkan kadar insulin adalah dosis 60 mg/kgBB/hari dengan nilai rata-rata sebesar 13,3 mU/L karena jumlah yang diberikan lebih tinggi dibandingkan dosis sebelumnya. Dan ekstrak daun teh hijau mengandung polifenol yang dikenal sebagai *catechins* terutama *EGCG* yang dapat berfungsi sebagai antioksidan di dalam tubuh. Antioksidan ini dapat melindungi sel  $\beta$  pankreas dari pengaruh radikal bebas sehingga pankreas dapat menghasilkan insulin.

Saran bagi peneliti selanjutnya mampu meminimalisir keterbatasan-keterbatasan dalam penelitian antara lain dalam proses penggerjaannya karena

harus sepenuhnya dikerjakan oleh peneliti sendiri. mempengaruhi dalam penelitian. Peneliti harus mengevaluasi untuk mencegah bias hasil penelitian yang dilakukan. sehingga dalam meminimalisir keterbatasan yang ada peneliti bisa mendapatkan hasil penelitian yang sempurna.

## 4.7 Daftar Pustaka

- Achmadi, U.F., 2005, *Manajemen Penyakit Berbasis Wilayah*, PT. Kompas Media Nusantara, Jakarta
- Purnamasari D. 2009. *Diagnosis dan klasifikasi diabetes melitus*. Dalam: Sudoyo A, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S. *Buku ajar ilmu penyakit dalam jilid 3*. Edisi 5. Jakarta: Interna Publishing.
- Diabetes Care, 2004. *Nutrition Principle and recommendation for treatment and prevention of diabetes and related complication*. American Diabetes Association.
- Murwani S, Ali M, Muliartha K. 2006. *Diet Aterogenik pada Tikus Putih (Rattus norvegicus strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis*. Jurnal Kesehatan Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.
- Mu'nisa. A. 2003. *Pengaruh Diet Asam Lemak Essensial Terhadap Kadar Kolesterol dan Permasalahannya*. IPB.
- Nakamura Tomonori, et al. 2006. *Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide*. Diabetic and metabolic diseases
- Velayutham, P., Babu, A., Liu, D. 2008. *Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update*. Curr Med Chem. 15 (18): 1840–1850. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748751/pdf/nihms145237.pdf>. Accessed October 11th, 2010.
- Song EK, Hur H, & Han MK. 2003. Epigallo- catechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. PubMed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12934649?dopt=Abstract>. [ 20 Februari 2008].
- Kobayashi Y et al. 2000. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependet glucose transporter of intestinal epithelial cell by a competitive mechanism. J Agric Food Chem, 48,5618-5623
- Ratnawati R, Ciptati dan Satuman. (2009) *Isolasi EGCG dari Teh Hijau Klon GMB4 Jawa Barat*. Laporan Penelitian Program Insentif Riset Dasar, RISTEK Kemntrian Negara Riset dan Teknologi.
- Evi Setyaningrum, Yuly Peristiowati, Rahmania Ambarika 2013. Identifikasi Peningkatan Kadar Insulin Pada Tikus Strain Wistar Dengan Diabetes Melitus Type 2 Yang Terjadi Resistensi Insulin Setelah Pemberian Catechins Green Tea (Cgt) Gmb-4





# BAB 5

## Efek Pemberian *Catechins Green Tea GMB-4* Terhadap Perbaikan Sel Beta Pankreas pada Tikus Strain Wistar dengan Diabetes Melitus Type 2

### 5.1 Abstrak

Peningkatan kadar glukosa darah dapat terjadi pada penderita diabetes melitus yang disebabkan oleh kekurangan insulin baik absolut maupun relative. *Catechins Green Tea GMB-4* mampu mencegah stres oksidasi akibat radikal bebas yang menyebabkan kerusakan sel beta pankreas. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan *Efek Pemberian Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4 Terhadap Perbaikan Sel Beta Pankreas Pada Tikus Putih Strain Wistar Dengan Diabetes Melitus Tipe-2*.

Penelitian ini kurang lebih dilakukan selama 92 hari mulai 28 Agustus sampai 27 November 2013 Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah *True Experimental Design* dengan sampel 15 ekor tikus strain wistar jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok, dengan pembagian K.Neg, K.Post, K.P.1(20mg/KgBB), K.P.2 (40mg/KgBB), K.P.3(60mg/KgBB). Pengumpulan data dengan menggunakan *Metode Hematomycin eosin* selanjutnya dianalisa menggunakan uji parametrik *One-Way ANOVA*.

Hasil analisa dengan menggunakan uji Parametrik *One-Way ANOVA*, pada  $\alpha = 0,05$  dengan hasil sig 0,000. Dengan hasil penelitian K.Neg 1,67, K.Post 12,67, K.P.20mg 11,67, K.P.40mg 3,33, K.P.60mg 2,33. Dari ketiga perlakuan yang paling efektif dalam

menurunkan kadar gula darah pada tikus Diabetes Melitus dengan dosis 60mg/KgBB, *Post Hoc Test* didapatkan sig 0,968 dengan rata-rata -,667.

*Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis tepat mampu mencegah stres oksidasi dan melindungi serta mampu memperbaiki sel beta pankreas, sehingga produksi insulin tetap stabil dan gula darah normal.

**Kata Kunci:** Ekstrak *Catechins Green Tea GMB-4*, Sel Beta Pankreas, Diabetes Melitus

## 5.2 Latar Belakang

Meningkatnya prevalensi diabetes melitus akhir-akhir ini banyak disoroti di negara yang bersangkutan. Peningkatan pendapatan perkapita dan Gaya hidup yang salah terutama di kota-kota besar, menyebabkan peningkatan prevalensi diabetes melitus di jaman sekarang ini. Diabetes melitus merupakan masalah kesehatan yang harus di perhatikan karena penyakit degeneratif ini berpengaruh pada produktifitas dan dapat menurunkan sumber daya manusia (Suyono, 2007).

Prevalensi Diabetes Melitus di dunia diperkirakan sebesar 0,19% pada orang usia < 20 tahun dan 8,6 pada orang usia > 20 tahun pada tahun 2000. Prevalensi diabetes melitus sebesar 20,1% Orang usia > 65 tahun. Di tahun 2004 sekitar 3,4 juta orang meninggal akibat tingginya kadar gula darah pada orang yang menderita Diabetes Melitus dan lebih dari 80% kematian tersebut terjadi di negara-negara dengan pendapatan menengah ke bawah (WHO, 2011).

Faktor penyebab diabetes type-2 adalah kelebihan lemak, faktor genetik, status gizi lebih (Obesitas) dan aktivitas fisik yang kurang. Diet rendah serat dan tinggi indeks glikemik berhubungan dengan peningkatan resiko Diabetes Melitus dan diet tinggi lemak akan mempengaruhi resistensi insulin dan resiko Diabetes Melitus (Hu F.B *et al*, 2001).

Kerusakan sel beta pankreas menyebabkan tubuh tidak bisa menghasilkan insulin sehingga menyebabkan kadar glukosa darah meningkat (terjadi keadaan hiperglikemia). Kondisi hiperglikemi dapat menghasilkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS=Reactive Oxygen Species). ROS yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan sel beta pankreas. Apabila insulin tidak aktif maka glukosa dalam pembuluh darah akan terus meningkat sehingga kadar glukosnya tinggi yang di sebut hiperglikemi (Waspadji, 2002).

Kandungan *polyphenol* dan *flavonol* pada *Catechins Green Tea* berperan dalam menjaga ion metal, menjaga keseimbangan karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya menghambat aktivasi enzim *a glukosidase*, menghambat absorpsi glukosa pada intestinal, melindungi sel  $\beta$  pankreas, meningkatkan sekresi insulin, mengaktivasi AMPK, sebagai antioksidan yang menghambat stres oksidasi, sebagai

anti inflamasi pada endotel dan proliferasi pertumbuhan sel endotel (Hanhinhineva *et al*, 2010).

Melihat tingginya angka terjadinya penyakit diabetes melitus peneliti tertarik untuk membuat penelitian dengan judul "Efek Pemberian ekstrak *Catechins Green Tea* (CGT) GMB-4 terhadap perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar dengan Diabetes Melitus type II, di Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang.

## 5.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 5.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar setelah treatmen dengan *Catechins Green Tea* GMB-4 di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### 5.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar non Diabetes Melitus type 2 di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Mengidentifikasi perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus tipe II yang tidak di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea* GMB-4 di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Mengidentifikasi perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus tipe II setelah di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea* GMB-4 20 mg/kgBB/hari.
4. Mengidentifikasi perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus tipe II setelah di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea* GMB-4 40 mg/kgBB/hari.
5. Mengidentifikasi perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus tipe II setelah di berikan perlakuan dengan *Catechins Green Tea* GMB-4 60 mg/kgBB/hari.
6. Menganalisa perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus type 2.

### 5.3.3 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Dapat di gunakan sebagai tambahan informasi bagi masyarakat mengenai perbaikan sel beta pankreas pada Diabetes Melitus type 2 setelah diberi

*Catechins Green Tea GMB-4.* Hasil penelitian ini di harapkan dapat menambah dan mengembangkan ilmu pendidikan khususnya di bidang kesehatan dan masyarakat dapat menghindari tindakan-tindakan yang merugikan kesehatan.

## 2. Manfaat Praktik

Mengetahui mekanisme perbaikan sel beta pankreas pada tikus Diabetes Melitus type 2 yang diberi terapi *Catechins Green tea GMB - 4.* *Catechins Green Tea GMB – 4* dapat digunakan dalam pengobatan Diabetes Melitus type 2 dan untuk perbaikan sel beta pankreas.

---

## 5.4 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan metode *true experimen design*, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan kepada suatu gejala pada satu kelompok kontrol dengan beberapa kelompok perlakuan. Penelitian menggunakan tikus putih jantan strain wistar yang berumur ±12 minggu dengan berat badan 150-200 gram.

Pada kelompok kontrol negative diberikan diet standar (pars 100 gram, 25cc air, dan tepung terigu 50 gram) dan pada kelompok kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3, diberikan diet hiperkolesterol (pars 600 gr, asam kolat 1,2 gr, 2 kuning telur bebek, 30 gr tepung terigu, 25cc air, 50cc minyak babi dan minyak kambing), selama 40 hari dan injeksi *streptozotocin (STZ) low dose*.

Pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3, diberikan terapi *CTH* (P1 20mg/KgBB, P2 40mg/KgBB, P3 60mg/KgBB) selama 6 minggu melalui sonde. Darah tikus diambil pada daerah jantung dan sel beta pankreas pada akhir saat pembedahan.

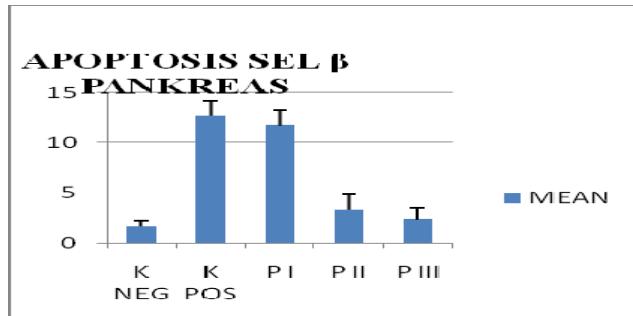
---

## 5.5 Hasil dan Pembahasan

### 5.5.1 Gambaran Umum Penelitian

Proses penelitian yang telah dilakukan di Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang, dalam penelitian ini menggunakan sampel perlakuan pada 15 ekor tikus putih *Strain Wistar* jenis kelamin jantan. Dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3, dan tiap sampel menempati kandang sendiri – sendiri.

Untuk mengetahui efek pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap perbaikan sel beta pankreas pada tikus *Strain Wistar* yang dibuat Diabetes Melitus Type-2. Penelitian ini dilakukan mulai tanggal 28 Agustus 2013 sampai 27 November 2013, di Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang.



**GAMBAR 5.1**

Rata-rata apoptosis sel beta pankreas

### 5.5.2 Data Khusus Penelitian

Pemeriksaan jumlah apoptosis sel beta pankreas dari tikus putih jantan *Strain Wistar* dilakukan pada akhir penelitian.

Dan hasil apoptosis sel beta pankreas tikus percobaan pada masing – masing perlakuan dapat dilihat pada gambar grafik berikut ini:

**TABEL 5.1**

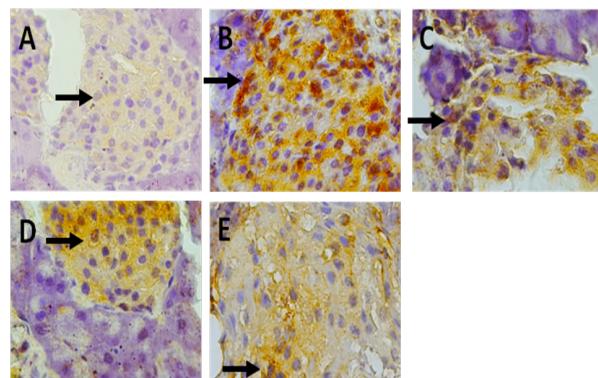
Rata-rata jumlah apoptosis sel beta pankreas pada tikus percobaan

Kelompok	Jumlah Sampel	Nilai Rata-rata
K.Neg	3	1.67
K.Post	3	12.67
K.P.1 (20 mg)	3	11.67
K.P.2 (40 mg)	3	3.33
K.P.3 (60 mg)	3	2.33

Dari tabel rata-rata kadar gula darah tikus dapat dijelaskan bahwa pada:

1. Kelompok 1 ( K.Neg ) nilai rata-rata yaitu 1,67
2. Kelompok 2 ( K.Post ) nilai rata-rata yaitu 12,67
3. Kelompok 3 ( K.P.20 mg) nilai rata-rata 11,67
4. Kelompok 4 ( K.P.40 mg) nilai rata-rata 3,33
5. Kelompok 5 ( K.P.60 mg) nilai rata-rata 2,33

Dari hasil *lavene test* tersebut yaitu 0,567 dengan memakai  $\alpha = 0,05$ , berarti terima  $H_0$ . Jika terima  $H_0$  berarti data dikatakan homogen dan dilanjutkan ke uji *One Way Anova* dengan hasil 0,000 dengan  $\alpha = 0,05$  berarti tolak  $H_0$  dengan kesimpulan *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* Memiliki efek terhadap Perbaikan sel beta pankreas Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* Diabetes Melitus, Ditandai minimal ada 1 kelompok yang berbeda.



**GAMBAR 5.2**

Apoptosis sel  $\beta$  pankreas dengan metode pemeriksaan HE dengan pembesara 400x A.kontrol negatif. B Kontrol Positif, C Perlakuan I, D Perlakuan II, E Perlakuan III

**A. Jumlah apoptosis sel beta pankreas Pada Kelompok Kontrol Negatif tanpa di beri perlakuan Hiperkolesterol dan *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4***

Dari hasil penelitian mengenai Efek pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap perbaikan sel beta pankreas Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Tipe-II, yang digunakan sebagai kontrol negatif sebanyak 3 sampel dan didapatkan hasil rata-rata 1,67.

**B. Jumlah apoptosis sel beta pankreas Pada Kelompok Kontrol Positif dengan perlakuan Hiperkolesterol tanpa diberi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4***

Dari hasil penelitian mengenai Efek Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap perbaikan sel beta pankreas Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Tipe-II, Dari 3 sampel yang digunakan sebagai kontrol positif, didapatkan hasil rata-rata apoptosis sel beta 12,67.

**C. Jumlah apoptosis sel beta pankreas Pada Kelompok Perlakuan dengan Dosis *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* 20mg/KgBB / tikus / hari**

Dari hasil penelitian mengenai Efek Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap perbaikan sel beta pankreas Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Tipe-II yang digunakan sebagai perlakuan 1 sebanyak 3 sampel dan didapatkan hasil rata-rata apoptosis sel beta pankreas 11,67

**D. Jumlah apoptosis sel beta pankreas Pada Kelompok Perlakuan dengan Dosis *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* 40 mg/KgBB / tikus / hari**

Dari hasil penelitian mengenai Efek Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap perbaikan sel beta pankreas Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Tipe-II yang digunakan sebagai perlakuan 2 sebanyak 3 sampel dan didapatkan hasil rata-rata apoptosis sel beta pankreas 3,33.

**E. Jumlah apoptosis sel beta Pada Kelompok Perlakuan Dengan Dosis *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* 60 mg/KgBB / tikus / hari**

Dari hasil penelitian mengenai Efek Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap perbaikan sel beta pankreas Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Tipe-II yang digunakan sebagai perlakuan 3 sebanyak 3 sampel dan didapatkan hasil rata-rata apoptosis sel beta pankreas 2,33.

**F. Efek Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap perbaikan sel beta pankreas pada tikus strain wistar dengan Diabetes Melitus tipe-II.**

Dari hasil penelitian yang dilakukan peneliti menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap Perbaikan sel beta pankreas Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* Diabetes Melitus terdapat perbedaan yang signifikan. Dimana dapat dilihat dari hasil Uji *One – Way ANOVA* dengan nilai signifikansi 0,000, dan dikatakan nilai signifikansi ( $\alpha < 0,05$ ) maka  $H_0$  di tolak. Sehingga Ada Efek Pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap Perbaikan sel beta pankreas Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* Diabetes Melitus.

Berdasarkan hasil penelitian dan teori diatas dapat disimpulkan bahwa *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dapat digunakan sebagai obat alternatif (non farmakologi) untuk menurunkan kadar gula darah. Akan tetapi dosis yang digunakan harus tepat, dan dosis pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dari uji *Post Hoc Test* yang paling memiliki Efek yaitu dosis 60 mg/KgBB / tikus / hari karena menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0.698 dan dosis 40 mg/KgBB/Tikus/Hari juga cukup memiliki efek memperbaiki sel beta pankreas karena menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0.556. *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 20 mg/KgBB kurang memiliki efek memperbaiki sel beta pankreas karena tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai sig 0.000, dalam dosis tepat kandungan *polyphenol* dan *flavonol* menjaga ion metal, menjaga keseimbangan karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya menghambat aktivasi enzim  $\alpha$  *glukosidase*, menghambat absorpsi glukosa pada intestinal, melindungi sel  $\beta$  pankreas, meningkatkan sekresi insulin, mengaktifasi AMPK, sebagai antioksidan yang menghambat stres oksidasi, sebagai anti inflamasi pada endotel dan proliferasi pertumbuhan sel endotel (Hanhinhineva *et al*, 2010).

Flavonoid juga dapat menstimulasi pengambilan glukosa pada jaringan perifer, mengatur aktivitas dan ekspresi enzim yang terlibat dalam jalur metabolisme karbohidrat serta dapat bertindak menyerupai insulin (*insulinomimetic*) dengan cara mepengaruhi mekanisme insulin signaling. *Flavonoid* dapat berperan dalam perbaikan kerusakan jaringan pankreas yang diakibatkan oleh alkilasi DNA akibat induksi STZ sebagai akibatnya dapat meningkatkan sekresi insulin dalam darah dan

kadar glukosa darah dapat diturunkan. Penangkapan radikal bebas oleh senyawa yang terkandung pada *catechins green tea* menyababkan berkurangnya kerusakan pada jaringan pankreas, sehingga infiltrasi sel mononuklear ke dalam jaringan pankreas pada proses fagositosis sel beta yang rusak juga berkurang. Keadaan ini menyababkan menurunnya proses inflamasi sehingga produksi TNF- $\alpha$  pun menurun dan terjadi perbaikan sel beta pankreas penghasil insulin. Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  dapat mempengaruhi panurunan derajat insulitis sehingga dapat terjadi perbaikan kerusakan jaringan pankreas (Ghosh *et.al*,2009).

## 5.6 Kesimpulan dan Saran

### 5.6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas dapat dirumuskan kesimpulan sebagai berikut:

1. Pada kelompok kontrol negatif, didapatkan dengan hasil uji Tukey rata-rata jumlah apoptosis sel 1.67.
2. Pada kelompok kontrol positif, didapatkan dengan hasil uji Tukey rata-rata jumlah apoptosis sel 12.67.
3. Pada kelompok perlakuan I, yaitu diberi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 20 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan dengan hasil uji Tukey rata-rata jumlah apoptosis sel 11.67.
4. Pada kelompok perlakuan II, yaitu diberi *Ekstrak Catechins Green Ttea GMB-4* dengan dosis 40 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan dengan hasil uji Tukey rata-rata jumlah apoptosis sel 3.33.
5. Pada kelompok perlakuan III, yaitu diberi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 60 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan dengan hasil uji Tukey rata-rata jumlah apoptosis sel 2.33.
6. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* Dapat menurunkan dan memperbaiki jumlah apoptosis dan memperbaiki sel beta pankreas pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type-II, Hasil uji statistik One – Way ANOVA didapatkan hasil nilai signifikansi 0.000, dimana ( $\alpha < 0.05$ ) sehingga hasil  $< \alpha$  Ho di tolak. Dosis yang paling berpotensi memperbaiki sel beta pankreas, pada perlakuan 3 dengan dosis 60 mg/Kg/ BB,dari Uji Post Hoc Test didapatkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0.968 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, hasil uji Tukey rata-rata jumlah apoptosis sel beta pankreas 2.33.

### 5.6.2 Saran

1. Bagi Institusi Pendidikan

Institusi pendidikan dapat menggunakan hasil penelitian ini sebagai masukan pembelajaran dalam penatalaksanaan perbaikan sel beta pankreas pada pasien Diabetes Melitus.

2. Bagi Masyarakat

Masyarakat bisa mengkonsumsi teh hijau sebagai minuman sehat tinggi antioksidan.

2. Bagi Tenaga Kesehatan

Tenaga kesehatan diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai masukan dalam penatalaksanaan pemberian terapi Non Farmakologi, *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* sebagai perbaikan sel beta pankreas.

3. Peneliti Selanjutnya

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi bagi peneliti yang berminat ingin meneliti tentang pengaruh pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap variabel lain, salah satunya yang belum diteliti terhadap perlemakan hepar dan bisa dikembangkan tidak pada tikus tetapi bisa pada manusia untuk menemukan dosis yang tepat untuk manusia.

### 5.7 Daftar Pustaka

- Hu F B, Manson J E, Stampfer M J, Colditz G, Liu S, Solomon C G, dan Willett W C. 2001. *Diet, Lifestyle, and The Risk of Type 2 Diabetes Mellitus In Woman*. New England Journal of Medicine.
- Waspadji, Sarwono. 2002. *Indeks Glikemik Bahan Makanan. Pedoman Diet Diabetes Melitus*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. Askep Diabetes Melitus.
- Ghosh S, Besra SE, Roy K, Gupta JK, and Vedasiromoni JR. (2009) *Pharmacological Effects of Methanolic Extract of Swietenia Mahagoni Jacq (meliaceae) Seeds*. International Journal of Green Pharmacy. 3:206-210.
- Suyono.S. 2007. *Kecendrungan peningkatan jumlah penyandang Diabetes*. Dalam *Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu*. Jakarta:Balai Penerbit FKUI.
- World Health Organization. 2011. *Global Prevalence of Diabetes in Epidemiology/ Health Service/ Psychosocial Research*: WHO.
- Akhmad Zainul Abidin, Yuly Peristiowati, Koesnadi, Nur Yeny Hidajaturrahmah. 2013 Efek Pemberian Catechins Green Tea Gmb-4 Terhadap Perbaikan Sel Beta Pankreas Pada Tikus Strain Wistar Dengan Diabetes Melitus Type 2





# BAB 6

## *Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Antioksidan Melalui Mekanisme Penurunan Kadar MDA dan Peningkatan Kadar SOD pada Tikus Strain Wistar dengan Diabetes Melitus Type 2*

### 6.1 Abstrak

Kandungan *Catechins Green Tea GMB-4* kaya akan *polyphenol* dan *flavonol* dimana mampu menghambat peningkatan *malondialdehid* (*MDA*) akibat radikal bebas yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada penderita Diabetes Melitus tipe 2. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan Efektivitas Pemberian *Cathechins Green Tea GMB-4* Sebagai *Antioksidan* Terhadap Penurunan *MDA* Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus tipe 2.

Penelitian ini dilakukan selama 92 hari mulai 28 Agustus 2013 sampai 27 November 2013, dengan menggunakan desain *True Experimental Design* dengan sampel tikus strain wistar jantan 15 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok, dengan pembagian K.Neg, K.Post, K.P.1(20mg/KgBB), K.P.2 (40mg/KgBB), K.P.3(60mg/KgBB). Pengumpulan data dengan menggunakan *Metode asam tiobarbiturat (TBA)*, selanjutnya dianalisa menggunakan uji parametrik *One-Way ANOVA*.

Hasil analisa dengan menggunakan uji Parametrik *One-Way ANOVA*, pada  $\alpha$  0,05 dengan hasil sig 0,000. Dengan hasil penelitian K.Neg 60, K.Post 74, K.P.20mg 57,17, K.P.40mg 65,5 K.P.60mg 85,67. Dari ketiga perlakuan yang paling efektif dalam

menurunkan kadar *malondialdehid* (*MDA*) pada tikus Diabetes Melitus dengan dosis 60mg/KgBB, *Post Hoc Test* didapatkan sig 0,001 dengan rata-rata -25,67.

*Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* mampu menghambat peningkatan *malondialdehid* dan melindungi sel dari radikal bebas, sehingga mempu mencegah kerusakan oksidatif.

**Kata Kunci:** Ekstrak *Catechins Green Tea GMB-4*, malondialdehid,radikal bebas, Diabetes Melitus

## 6.2 Latar Belakang

*American Diabetes Association* (ADA,2005) menyatakan diabetes melitus atau (DM) adalah suatu penyakit metabolismik dengan karakteristik hiperglikemia, yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau kedua-duanya. Diabetes melitus tipe 2 merupakan sekelompok kelainan yang di tandai dengan resistensi insulin, sekresi insulin terganggu, dan peningkatan produksi glukosa (Soegondo, 2007).

WHO memprediksi kenaikan jumlah penyandang DM di Indonesia dari 8,4 juta pada tahun 2000 menjadi sekitar 21,3 juta pada tahun 2030. International Diabetes Federation (IDF) memprediksi kenaikan jumlah penyandang DM dari 7,0 juta pada tahun 2009 menjadi 12,0 juta pada tahun 2030. Meskipun terdapat perbedaan angka prevalensi, laporan keduanya menunjukkan adanya peningkatan jumlah penyandang DM sebanyak 2-3 kali lipat pada tahun 2030 (PERKENI, 2011).

Prevalensi DM di Indonesia untuk usia diatas 15 tahun sebesar 5,7%. Prevalensi terkecil terdapat di Propinsi Papua sebesar 1,7%, dan terbesar di Propinsi Maluku Utara dan Kalimantan Barat yang mencapai 11,1%. Sedangkan prevalensi toleransi glukosa terganggu (TGT), berkisar antara 4,0% di Propinsi Jambi sampai 21,8% di Propinsi Papua Barat. Datadata tersebut menunjukkan bahwa jumlah penyandang diabetes di Indonesia sangat besar (Depkes, 2007). Prevalensi DM tipe 2 lebih dari 90% dari semua kasus diabetes. Di Kota Kediri angka kejadian Diabetes Melitus pada tahun 2011 mencapai 10.312 jiwa dan mengalami peningkatan di tahun 2012 menjadi 14.337 jiwa. Diabetes Melitus menduduki tingkat ke 5 dari 10 penyakit terbanyak Puskesmas di Kota Kediri (Dinkes Kota Kediri 2014).

Pada penderita DM tipe 2 mempunyai pola familial yang kuat. DM tipe 2 ditandai dengan kelainan dalam sekresi insulin maupun dalam kerja insulin. Pada penderita DM tipe 2 terdapat kelainan dalam pangikatan insulin dengan reseptor. Ini dapat disebabkan oleh berkurangnya jumlah tempat reseptor yang responsive insulin pada membrane sel, yang mengakibatkan hiperglikemia ( DepKes, 2008).

Berbagai komplikasi dapat diakibatkan oleh rendahnya kontrol diabetes. Komplikasi tersebut antara lain berupa penyakit vaskular sistemik (percepatan aterosklerosis), penyakit jantung, penyakit mikrovaskular pada mata sebagai penyebab kebutaan dan degenerasi retina (retinopati diabetik), katarak, kerusakan ginjal sebagai penyebab gagal ginjal serta kerusakan saraf tepi (neuropati diabetik) (Halliwel, 2007). Fenomena ini dapat disebabkan oleh kemampuan hiperglikemia secara *in vivo* dalam modifikasi oksidatif berbagai substrat. Selain itu, hiperglikemia juga terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas (Droge, 2002).

Hiperglikemia menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan (Ueno, 2002). Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas. Jika radikal bebas menyerang lipid pada LDL maka akan menginduksi terjadinya peroksidasi lipid. Ahirnya dari reaksi ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, seperti *malondialdehid* (*MDA*), *9-hidrosil-nonenal*, serta berbagai hidrokarbon seperti *etana* dan *pentana* (Sukmawati, 2005).

Hiperglikemia dapat menyebabkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) atau radikal bebas yang berlebih dan akan memicu terjadinya stress oksidatif, yaitu suatu keadaan dimana jumlah radikal bebas yang diproduksi melebihi kapasitas tubuh untuk menangkalnya (Wiryana, 2008). Dengan adanya paparan strees oksidatif, enzim *superoksid dismutase* (SOD) sebagai antioksidan endigen akan meningkat aktivitasnya untuk meredam stress oksidatif tersebut, yaitu dengan merubah anion *superokside* menjadi *hydrogen peroksida* ( $H_2O_2$ ) dan oksigen ( $O_2$ ) sehingga dapat melindungi sel-sel  $\beta$  pancreas. Peningkatan aktivitas SOD dilaporkan dapat memperlemah tekanan vaskuler pada diabetes, sehingga dapat menyebabkan kadar gula darah semakin tidak terkendali. Cuprum dan zink merupakan faktor dari SOD. Agar aktivitas SOD dapat berjalan, cuprum dan zink harus disertai dalam jumlah yang cukup. Hal ini akan mengakibatkan tubuh mengompensasi untuk memproduksi cuprum dan zink, misalnya dari pankreas untuk memproteksi stress oksidatif (Pande, dkk, 2010).

Hal dapat menimbulkan banyak kerusakan, antara lain terjadinya kerusakan protein termasuk oksidasi protein akan mengakibatkan kerusakan jaringan tempat protein itu berada, sebagai contoh kerusakan protein pada lensa mata mengakibatkan terjadinya katarak. Terutama komponen penyusun membran berupa asam lemak tak jenuh yang merupakan bagian dari fosfolipid dan mungkin juga protein. Serangan radikal hidroksil pada asam lemak tak jenuh dimulai dengan interaksi oksigen pada



rangkaian karbon pada posisi tak jenuh sehingga terbentuk lipid hidroperoksida, yang selanjutnya merusak bagian sel dimana hidroperoksida ini berada (Priyanto 2007).

Penggunaan antioksidan saat ini merupakan alternatif dalam pencegahan dan perlakuan pada *disfungsi endotel*. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Keancy, 1994 bahwa antioksidan dalam vitamin C dan E dapat menurunkan P-selectin pada pasien hipercolesterol. Ini diyakini bahwa antioksidan bisa sebagai penanganan kondisi *disfungsi endotel*. (Andreson, 2000). Sehingga penggunaan antioksidan sepertinya mulai dikembangkan pada *disfungsi endotel*.

*Catechins Green Tea* mempunyai kandungan *polyphenol* dan *flavonol* dimana berperan dalam mengabsorbsi ion metal, menjaga keseimbangan metabolisme karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya adalah menghambat aktivasi enzim  $\alpha$  *glucosidase*, menghambat absorpsi pada intestinal, melindungi *sel β pankreas*, meningkatkan sekresi insulin mengaktifkan AMPK, sebagai antioksidan yang bekerja menghambat stres oksidasi, sebagai antiinflamasi pada endotel dan poliferasi pada pertumbuhan sel endotel (Kati, 2010). Diharapkan dengan pemberian *catechins green tea* dapat memperbaiki kerusakan endotel sehingga dapat mencegah terjadinya komplikasi lanjut seperti penyakit kardiovaskular.

Pada penelitian yang dilakukan dengan hewan coba diketahui bahwa *catechins green tea* menghambat proses penyakit degeneratif, mempunyai aktivitas sebagai antipoliferasi pada sel hepatoma dan juga mempunyai aktivitas hipolipidemik pada hepar tikus yang dibuat hepatoma (Vanessa, 2004).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan pada hewan coba menunjukkan bahwa *polifenols* dalam *catechins green tea* mempunya efek sebagai antioksidan menurunkan tekanan darah, mencegah terjadinya stress oksidatif dan juga dapat memperbaiki kerusakan endotel. Maka peneliti ingin melakukan penelitian dengan judul "Efektivitas Pemberian *Catechins Green Tea GMB-4* Sebagai Antioksidan Terhadap Penurunan Kadar *MDA* dan Peningkatan kadar *SOD* pada Tikus *Strain Wistar* dengan diabetes melitus tipe II.

### 6.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

#### 1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian *catechins green tea* terhadap peningkatan kadar *MDA* dan peningkatan kadar *SOD* pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus tipe 2.

#### 2. Tujuan Khusus

- Mengidentifikasi kadar *MDA* pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus tipe 2 yang diberi perlakuan dengan *catechins green tea* dosis I yaitu 20 mg/kg BB.

- b. Mengidentifikasi kadar *MDA* dan peningkatan kadar *SOD* pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus tipe 2 yang diberi perlakuan dengan *catechins green tea* dosis II yaitu 40 ml/kg BB.
- c. Mengidentifikasi kadar *MDA* dan peningkatan kadar *SOD* pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus tipe 2 yang diberi perlakuan dengan *catechins green tea* dosis III yaitu 60 ml/kg BB.
- d. Mengidentifikasi kadar penurunan *MDA* dan peningkatan kadar *SOD* pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus tipe 2 tanpa perlakuan dengan *catechins green tea*.
- e. Menganalisa kadar *MDA* dan peningkatan kadar *SOD* pada tikus putih jantan *Strain Wistar* non Diabetes Melitus tipe 2.
- f. Menganalisa penurunan kadar *MDA* dan peningkatan kadar *SOD* darah pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type II.

## 6.4 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan metode *true experimental design*, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan kepada suatu gejala pada satu kelompok kontrol dengan beberapa kelompok perlakuan. Peneltian ini menggunakan tikus putih jantan *Strain Wistar* yang berumur  $\pm 12$  minggu dengan berat badan 150-200 gram.

Pada kelompok control negative di berikan diet standar (pars 100 gr, air 25cc dan tepung terigu 50 gr) dan pada kelompok kontrol positif, pelakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3, berikan diet hiperkolesterol (pars 600 gr, asam kolat 1,2 gr, 2 kuning telur bebek, 30 gr tepung terigu, 25 cc air, 50cc minyak babi dan minyak kambing,) selama 40 hari dan injeksi *streptozotocin (STZ) low dose*.

Pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 di berikan terapi *catechins green tea GMB-4* (P1 20mg/KgBB, P2 40 mg/KgBB, P3 60 mg/KgBB) selama

## 6.5 Hasil dan Pembahasan

### a. Mengidentifikasi Kadar *Superoksidasi Dismutase* pada Tikus Jantan *Strain Wistar* non Diabetes Melitus Tipe 2

Dari hasil penelitian mengenai kadar *superoksidasi dismutase* (SOD) pada tikus jantan *strain wistar* dengan non diabetes melitus tipe 2 didapat 3 sampel hasilnya Kelompok control negative, tikus (1) sebesar 4,83 ng/mL, tikus (2) sebesar 5,33 ng/mL, tikus (3) sebesar 6,44 ng/mL.

Dalam Penelitian ini menggunakan analisa data dengan uji *Oneway-ANOVA*, dan dari hasil *lavene's test* didapatkan signifikan 0,139 dengan memakai  $\alpha$

= 0,05, berarti terima Ho. Jika terima Ho berarti data dikatakan homogen dan dilanjutkan ke uji *One Way Anova* dengan hasil pengujian Hipotesis dilakukan pembacaan hasil dari *Output ANOVA*. Berdasar hasil yang diperoleh didapatkan nilai F hitung = 14,40 dengan probabilitas 0,000. Oleh karena probabilitas <  $\alpha$  ( $0,000 < 0,05$ ) maka Ho ditolak, atau berarti Ada Pengaruh Pemberian *Catechins Green Tea* Terhadap Penurunan Kadar *Malondialdehid* (MDA) Pada Tikus Putih *Strain Wistar* Diabetes Melitus tipe II.

Dari 3 sampel yang digunakan sebagai kontrol positif, didapatkan hasil kadar *malondialdehyde* (MDA) sebesar 70 ng/ml untuk kelompok kontrol positif 1, untuk kontrol positif 2 sebesar 74 ng/ml, dan untuk kontrol positif 3 sebesar 78 ng/ml dengan rerata sebesar 74 ng/ml.

Pakan yang diberikan pada tikus percobaan terdiri dari diet standart yang terdiri dari PARS 100 gram, air 25 cc, tepung terigu 50 gram (Muwarni, 2006). Antioksidan adalah senyawa yang dapat melindungi sistem biologis di dalam tubuh. Aktivitas antioksidan di dalam tubuh merupakan suatu kesatuan sistem yang saling terkait dan saling mempengaruhi, contohnya *Superoxide dismutase*, katalase dan gluta -tion *peroxydase*. Kekurangan salah satu komponen ini dapat menyebabkan terjadinya penurunan status antioksidan secara menyeluruh dan mengakibatkan perlindungan terhadap serangan ROS menjadi lemah (Halliwell, 1991, Didalam Lilik M, 2008).

Adanya proses autooksidasi pada pada hiperglikemi dan reaksi glikasi dapat memicu pembentukan radikal bebas khususnya radikal superoksida ( $O_2^-$ ), dan hidrogen peroksil ( $H^2O_2$ ) yang dapat membentuk radikal hidroksil ( $OH^-$ ), radikal bebas dapat merusak membrane sel, menjadi lipid peroksil atau MDA (Yasa et al, 2007).

Dari hasil penelitian menunjukkan kadar *superoksidasi dismutase* normal, Karena tikus tidak diberi pakan hiperkolesterol sehingga tikus dalam keadaan sehat, pada saat tikus tidak sehat atau terjadi diabetes melitus akan mengalami hiperglikemi, hiperkolesterol, asam urat disitulah penyebab terjadi penurunan kadar *superoksidasi dismutase* karena disebabkan radikal bebas yang tinggi dan antioksidan menurun.

#### **b. Mengidentifikasi Kadar *Superoksidasi Dismutase* pada Tikus Jantan *Strain Wistar* yang Dibuat DM Tipe 2 yang Tidak Diberikan Perlakuan dengan *Catechins Green Tea* GMB-4**

Dari hasil penelitian mengenai kadar *superoksidasi dismutase* (SOD) pada tikus jantan *strain wistar* dengan diabetes melitus tipe 2 tanpa perlakuan dengan *catechins green tea* GMB-4. didapat 3 sampel hasilnya Kelompok control positif, tikus (1) sebesar 3.83 ng/mL, tikus (2) sebesar 5.11 ng/mL, tikus (3) sebesar 6.11 ng/mL.

Diet hiperkolesterol yang diberikan terdiri dari pakan standart (PARS 600 gram dan tepung terigu 30 gram) yang ditambah telur kuning bebek 2 gr, asam kolat (1,2 gram), minyak babi 50 cc, minyak kambing 50 cc, dan air 25 cc (Mu'anisa, 2003). Pemberian pakan hiperkolesterol selama 40 hari dapat meningkatkan kadar kolesterol darah dan mengalami penurunan reseptor glukosa darah mengalami penurunan reseptor glukosa pada kelenjar pancreas, sehingga mengalami kerusakan pada sel  $\beta$  pankreas dan reseptor insulin di jaringan perifer (Soegondho 2000, dalam Hastuti, 2008).

Dari 3 sampel yang digunakan sebagai kontrol negatif, didapatkan hasil kadar *malondialdehyde* sebesar 56.5 ng/ml untuk kontrol negatif 1, untuk kontrol negatif 2 sebesar 62 ng/ml, dan untuk kontrol negatif 3 sebesar 61.5 ng/ml dengan rerata sebesar 60 ng/ml.

Diet standart yang terdiri dari PARS 100 gram, air 25 cc, tepung terigu 50 gram (Muwarni, 2006). Diet tinggi lemak maupun diet tinggi karbohidrat akan meningkatkan kadar trigliserida hanya saja diet tinggi lemak akan menunjukkan peningkatan yang lebih cepat di bandingkan diet tinggi karbohidrat (Srivastava *et al* 2000).

Berdasarkan fakta dan teori diatas asupan makanan yang diberikan tidak menunjukkan tingginya kadar *malondialdehideMDA* kemungkinan hal ini disebabkan pada diet standart jumlah kadar kolesterol tidak terlalu banyak dan juga tikus pada kelompok kontrol negative tidak di injeksi STZ yang dapat merangsang kerusakan pada sel beta sehingga tikus dalam keadaan hiperglikemi yang merasang pembentukan radikal bebas untuk memicu terjadinya pembentukan senyawa lipid peroksi atau MDA.

Radikal superoksida yang dihasilkan dalam ekskresi kolesterol akan meningkatkan jumlah radikal bebas di dalam tubuh sehingga tingkat oksidasi di dalam tubuh dapat meningkat. Meningkatnya oksidasi di dalam tubuh juga dipengaruhi oleh menurunnya aktivitas enzim antioksidan SOD dan meningkatkan MDA di dalam tubuh yang disebabkan oleh diet kaya kolesterol (Fki *et al.* 2005). Keterkaitan antara kondisi hiperkolesterolemia dengan tingkat oksidasi biomolekul dalam tubuh yang menandakan meningkatnya jumlah radikal bebas pun didukung oleh beberapa penelitian diantaranya Alviani (2007) yang menyatakan pemberian pakan kolesterol 1.25% dapat meningkatkan konsentrasi lipid peroksida tikus hingga lima kali dari konsentrasi lipid peroksida tikus normal.

Minyak babi dan minyak kambing mempunyai kandungan kolesterol yang lebih tinggi dibanding dengan minyak hewani lainnya dan minyak nabati, asam kolat diberikan untuk meningkatkan kadar kolesterol dan terbentuknya sel busa (Srivastava *et al.* 2003). Tinggi nya kadar lemak pada diet hiperkolesterol disebabkan penambahan lemak babi, lemak kambing, dan asam kolat.

Salah satu faktor utama penyebab diabetes melitus adalah gemarnya seseorang dalam mengonsumsi makan makanan yang tinggi lemak, makan makan tinggi lemak dapat memicu kenaikan berat badan dan beresiko meningkatkan kadar kolesterol ketika seseorang mengalami hiperkolesterol tubuh akan terjadi stress oksidatif dan pankreas rusak yang pada akhirnya akan mengakibatkan resistensi insulin sehingga resiko terkena diabetes melitus (Laakso, 2001).

Hasil penelitian menunjukkan pemberian diet hiperkolesterol berhasil dan kadar SOD menurun. karena pemberian hiperkolesterol dapat menyebabkan produksi ROS (*reactive Oxygen Species*) atau radikal bebas yang berlebih disini memicu terjadinya stress oksidatif dalam keadaan ini antioksidan melemah sehingga *superoksidasi dismutase* akan menurun.

**c. Mengidentifikasi Peningkatan Kadar *Superoksidasi Dismutase* pada Tikus Jantan *Strain Wistar* yang Dibuat DM Tipe II yang Diberikan Perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4 20 mg/kg BB***

Dari hasil penelitian mengenai pengaruh pemberian *catechins green tea* GMB-4 sebagai antioksidan dalam meningkatkan kadar *superoksidasi dismutase* (SOD) pada tikus jantan *strain wistar* dengan diabetes melitus tipe 2, dengan perlakuan Ekstrak *Catechins Green Tea* GMB-4 dengan dosis 20 mg/tikus/hari. didapatkan 3 sampel, dan dari 3 sampel didapatkan hasilnya kadar SOD, kelompok perlakuan 1. tikus (1) sebesar 6,22 ng/mL, tikus (2) sebesar 7,77 ng/mL, tikus (3) sebesar 8,11 ng/mL.

Dari hasil penelitian, yang digunakan sebagai perlakuan 1 sebanyak 3 sampel, didapatkan hasil kadar *malondialdehyde* (MDA) sebesar 59 ng/ml sebagai kelompok perlakuan 1.1, untuk kelompok perlakuan 1.2 sebesar 56.5 ng/ml, dan untuk perlakuan 1.3 sebesar 56.5 ng/ml dengan rerata sebesar 57,33 ng/ml.

Daun teh hijau mengandung gugus flavanoid dari polifenol. Salah satu senyawa aktif teh hijau adalah catechin. Senyawa ini bersifat sebagai antioksidan. Fungsi antioksidan adalah sebagai peredam yang dapat menetralisir radikal bebas yang masuk tubuh serta menghentikan reaksi berantai peroksidasi dari lipid. Selain itu teh hijau juga dapat berfungsi sebagai antiinflamasi (Wolfson, 2007). EGCG menghambat aktifitas asetil KoA karboksilase dalam siklus biosintesa asam lemak, sehingga dapat menurunkan akumulasi triasilgliserol (trigliserida) pada jaringan lemak (Murase, 2000).

Dari penelitian menunjukkan nilai peningkatan kadar SOD tetapi masih belum signifikan, hal ini disebabkan terjadinya stress oksidasi, tidak seimbangan nya radikal bebas dengan antioksidan dengan pemberian dosis 20 mg/kg BB belum efektif meningkatkan kadar *superoksidasi dismutase*.

Berdasarkan hasil dan teori diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 20 mg/KgBB/ tikus / hari, tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai sig 0.961,. Dosis tersebut tidak berpotensi menurunkan kadar *malondialdehide (MDA)*. Pada perlakuan ini belum menunjukkan keberhasilan menurunkan kadar *malondialdehide (MDA)*. Kemungkinan disebabkan jumlah dosis yang diberikan belum sesuai ataupun tidak sebanding dengan keadaan stress oksidasi yang terjadi akibat konsumsi makanan tinggi lemak maupun kerusakan sel yang terjadi akibat radikal bebas oleh paparan Streptozocin (STZ).

**d. Mengidentifikasi Peningkatan Kadar *Superoksidasi Dismutase* pada Tikus Jantan *Strain Wistar* yang Dibuat DM tipe II yang Diberikan Perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* 40 mg/kg BB**

Dari hasil penelitian mengenai pengaruh pemberian *catechins green tea GMB-4* sebagai antioksidan dalam meningkatkan kadar *superoksidasi dismutase* (SOD) pada tikus jantan *strain wistar* dengan diabetes melitus tipe 2, dengan perlakuan Ekstrak *Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 40 mg/tikus/hari. didapatkan tiga sampel kelompok 2. dan dari 3 sampel didapatkan hasilnya kadar SOD. hasilnya perlakuan 2, tikus (1) sebesar 5,55 ng/mL, tikus (2) sebesar 6,55 ng/mL, tikus (3) sebesar 6,94 ng/mL.

Dari hasil penelitian yang digunakan sebagai perlakuan 2 sebanyak 3 sampel dan didapatkan hasil kadar *malondialdehide (MDA)* sebesar 76 ng/ml sebagai kelompok perlakuan 2.1, untuk kelompok perlakuan 2.2 sebesar 56.5 ng/ml, dan untuk perlakuan 2.3 sebesar 64 ng/ml dengan nilai rerata sebesar 65,33 ng/ml.

Mekanisme kerja flavanoid termasuk *catechin* adalah menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai scavengers (peredam) terhadap radikal bebas oksigen reaktif ( $O_2^-$ ) maupun radikal hidroksil ( $OH^-$ ). Cara kerjanya dengan memberikan donor atom H kepada radikal peroksil membentuk radikal flavanoid dan akan bereaksi dengan oksigen reaktif (superokida) sehingga menjadi netral. Dengan reaksi tersebut, reaksi berantai peroksidasi lipid dapat dihentikan (Nagao T, 2005).

Epigallocatechin gallate adalah flavonoid teh hijau (*Camellia sinensis*) yang banyak diketahui sebagai antioksidan. Epigallocatechin gallate mempengaruhi enzim-enzim tertentu, di antaranya menghambat sintesis reversible fatty acid, meningkatkan tyrosine phosphorylation dari reseptor insulin dan mengaktivasi ornithine decarboxylase. Mekanisme enzim tersebut penting dalam reaksi kimia yang berlangsung dalam tubuh yang berhubungan dengan timbulnya penyakit dan kesehatan, selain itu EGCG diduga berpengaruh pada proses oksidasi lemak sehingga efektif untuk menurunkan berat badan (Hoffman, 2007).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 40 mg/KgBB/ tikus / hari, menunjukkan nilai yang belum signifikan. hal ini disebabkan karena pemberian dosis *Catechins Green Tea GMB-4* yang kurang efektif, *catechins* memiliki kandungan polifenol yang tinggi yang memiliki peran antioksidan, antioksidan akan menekan radikal bebas sehingga kadar *superoksidasi dismutase* akan meningkat.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 40 mg/KgBB/ tikus / hari, dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0.71 menunjukkan keberhasilan dalam menurunkan kadar gula darah, dibandingkan dosis 20 mg/KgBB yang belum menunjukkan perubahan dari terapi yang diberikan dosis 40 mg/KgBB ini sudah menunjukkan keberhasilan akan tetapi Tingkat keberhasilan pemberian terapi apabila dibandingkan dengan dosis 60 mg/KgBB masih lebih cepat dengan dosis 60 mg/KgBB jumlah dosis yang diberikan diduga berpengaruh terhadap tingkat keberhasilan terapi. *Catechins Green Tea GMB\_4* bersifat antioksidan yang dapat menjaga pankreas dari radikal bebas, ketika radikal bebas masuk ke dalam tubuh antioksidan yang akan mengikat radikal bebas sehingga tidak sampai terjadi stres oksidasi.

#### d. Mengidentifikasi Peningkatan Kadar *Superoksidasi Dismutase* pada Tikus Jantan *Strain Wistar* yang Dibuat DM tipe II yang Diberikan Perlakuan dengan *Catechins Green Tea GMB-4* 60 mg/kg BB

Dari hasil penelitian mengenai pengaruh pemberian *catechins green tea GMB-4* sebagai antioksidan dalam meningkatkan kadar *superoksidasi dismutase* (SOD) pada tikus jantan *strain wistar* dengan diabetes melitus tipe 2, dengan perlakuan *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 60 mg/tikus/hari. didapatkan tiga sampel kelompok 3, dan dari 3 sampel didapatkan hasilnya kadar SOD. dan hasilnya kelompok perlakuan 3, tikus (1) sebesar 8,77 ng/ml, tikus (2) sebesar 9,72 ng/ml, tikus (3) sebesar 7,11 ng/ml.

Dari hasil penelitian mengenai Efektivitas Pemberian *Cathechins Green Tea GMB-4* Terhadap Penurunan *Malondialdehid (MDA)* Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Tipe II, yang digunakan sebagai perlakuan 3 sebanyak 3 sampel dan didapatkan hasil kadar *malondialdehyde (MDA)* sebesar 89 ng/ml sebagai kelompok perlakuan 3.1, untuk kelompok perlakuan 3.2 sebesar 81.5 ng/ml, dan untuk perlakuan 3.3 sebesar 86.5 ng/ml dengan nilai rerata sebesar 85,33 ng/ml.

Teh hijau merupakan tumbuhan obat yang mempunyai efek farmakologis antara lain dapat menurunkan berat badan, menurunkan kolesterol, trigliserida,

serta glukosa, dapat mencegah karies pada gigi, antimutagenik, antioksidan, antibakteri. (Murase, 2000).

*Catechins* merupakan salah satu jenis flavonoid yang banyak ditemukan pada daun teh dan merupakan antioksidan kuat, *catechins* sulit ditemukan pada teh hitam, karena proses pembuatan teh hitam yang dikeringkan, menghasilkan enzim yang bereaksi dengan *catechins*, hal ini tidak terjadi pada teh hijau, karena teh hijau diseduh saat daun masih segar, jumlah *catechins* paling banyak terdapat pada teh hijau (Joe, 2004).

*Polyphenol* mempunyai efek sebagai antioksidan melalui mekanisme menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai *scavengers* (peredam) terhadap ROS (*reactive oxygen species*) seperti O<sub>2</sub><sup>-</sup>, radikal hidroksil (OH<sup>0</sup>). Cara kerjanya dengan memberikan donor atom H kepada radikal peroksil membentuk radikal flavanoid dan akan bereaksi dengan oksigen reaktif (superoksid) sehingga menjadi netral. Dengan adanya reaksi tersebut, reaksi berantai peroksidasi lipid dapat dihentikan (Wahyu, 2010).

Polifenol yang terkandung dalam teh hijau sebagai antioksidan membantu kerja enzim *superoksid dismutase* (SOD), yang dapat menyingkirkan radikal bebas, sehingga akan dapat menyebabkan penurunan LDL, mencegah tekanan darah tinggi, dan mengurangi resiko kanker, teh hijau mengandung antioksidan 6X lebih potensial dibanding teh hitam, (Syah, 2006).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 60 mg/KgBB/ tikus / hari, menunjukkan nilai yang signifikan. menunjukkan keberhasilan dan yang paling efektif hal ini dikarenakan *catechins green tea* GMB-4 memiliki kandungan polifenol yang tinggi yang memiliki peran antioksidan, semakin tinggi konsentrasi *catechins* yang diberikan, maka akan memiliki kandungan polifenol yang tinggi juga sehingga pada kelompok P3 yang di berikan *catechins green tea* GMB-4 dengan dosis 60 mg/kg BB menilai kadar SOD yang tinggi dan nilai signifikan dari *post hoc test* di dapatkan hasil signifikan 0,02 dengan perbandingan  $\alpha < 0,05$ .

Berdasarkan dari hasil dan teori diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 60 mg/KgBB/ tikus / hari, lebih berpotensi menurunkan *malondialdehyde* (MDA) dengan sig 0.001. Pada perlakuan ini jumlah dosis yang diberikan paling tinggi daripada kelompok perlakuan lain ternyata menunjukkan pengaruh yang sangat bagus, kandungan *catechins* sebagai antioksidan akan bekerja lebih cepat dengan dosis yang tepat dan mampu menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA), menurunkan simpanan lemak dan mencegah terjadinya stress oksidasi.



**e. Menganalisis Efek Pemberian *Catechins Green Tea GMB-4* sebagai Antioksidan dalam Meningkatkan Kadar *Superoksidasi Dismutase (SOD)* pada Tikus Jantan *Strain Wistas* dengan Diabetes Melitus Tipe II**

Dari hasil penelitian yang dilakukan penelitian yang menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pemberian ekstrak *catechins green tea GMB-4* terhadap peningkatan kadar *superoksidasi dismutase* pada tikus jantan *strain wistar* dengan diabetes melitus tipe 2 terdapat perbedaan yang signifikan. Dimana dapat dilihat dari uji *One Way Anova* dengan nilai signifikan 0.016, dan diketahui nilai signifikansi ( $\alpha < 0,05$ ) maka  $H_0$  ditolak. Sehingga ada efek pemberian Ekstrak *Catechins Green Tea GMB-4* sebagai antioksidan dalam meningkatkan kadar *superoksidasi dismutase* pada tikus jantan strai wistar dengan diabetes melitus tipe 2.

Berdasarkan uji *Post Hock Test* dapat diketahui bahwa dari nilai output yang memiliki tanda (\*) mengindikasi ada perbedaan. Perbandingan K\_Neg dengan K\_Pos sama dengan nilai rata-rata 0.33 dengan nilai signifikan 0.99. perbandingan antara K\_Neg dengan K\_P1 sama dengan nilai rata-rata -2.00 dengan nilai signifikan 0.22. perbandingan antara K\_Neg dengan K\_P2 sama dengan nilai rata-rata -0.66 dengan nilai signifikan 0.93. perbandingan antara K\_Neg dengan K\_P3 berbeda dengan nilai rata-rata -3.00 dengan nilai signifikan 0.39. perbandingan antara K\_Pos dengan K\_P1 sama dengan nilai rata-rata -2.33 dengan nilai signifikan 0.12. perbandingan antara K\_Pos dengan K\_P2 sama dengan nilai rata-rata -1.00 dengan nilai signifikan 0.77. perbandingan antara K\_Pos dengan K\_P3 berbeda dengan nilai rata-rata -3.33 dengan nilai signifikan 0.02. perbandingan antara K\_P1 dengan K\_P2 sama dengan nilai rata-rata 1.33 dengan nilai signifikan 0.56. perbandingan antara K\_P1 dengan K\_P3 sama dengan nilai rata-rata -1.00 dengan nilai signifikan 0.77. perbandingan antara K\_P2 dengan K\_P3 sama dengan nilai rata-rata -2.33 dengan nilai signifikan 0.12.

Pada diabetes tipe 2 terdapat dua masalah utama yang berhubungan dengan insulin, yaitu resistensi insulin dan gangguan sekresi insulin. Sebagai akibat terkaitnya insulin dengan reseptor tersebut, terjadi suatu rangkaian reaksi dalam metabolism glukosa didalam sel. Resistensi insulin pada diabetes melitus tipe 2 disertai dengan penurunan reaksi intrasel ini. Dengan demikian insulin menjadi tidak efektif untuk menstimulasi pengambilan glukosa oleh jaringan. Untuk mengatasi resistensi insulin dan mencegah terbentuknya glukosa dalam darah, harus terdapat peningkatan jumlah insulin yang diseikresikan (Setyawan, 2007).

*Catechins green tea* mempunyai peran sebagai antioksidan melalui *scavenging reactive oxygen (ROS)* dan nitrogen species serta sebagai chelating (peningkat) ion metal pada reaksi redok. Peran *Catechins Green Tea* sebagai

antioksidan dapat digunakan dalam menangani sebagai kerusakan tubuh yang disebabkan oleh adanya radikal bebas beberapa mekanisme *Catechins Green Tea* sebagai antioksidan akan dijelaskan sebagai berikut. *Catechins* selain dapat mengaktifasi eNOS, juga berperan dalam penghambatan oksidasi NADPH. Oksidasi NADPH dapat terjadi pada proses proinflamasi, proliferasi dan proses apoptosis sel, dimana akan menghasilkan produksi radikal bebas *superoxide* ( $O_2^-$ ). Pada proses ini *catechins* dapat berperan membantu regulasi aktivitas oksidasi NADPH, mereduksi produksi  $O_2^-$  dan memproteksi NO dari perubahan *peroxynitride* (Scewe, 2008).

*Polifenol* adalah antioksidan yang sangat kuat, salah satu fungsinya dapat mengatasi radikal bebas yang merupakan molekul sangat tinggi stabil berada di dalam tubuh. Menurut Maeta dkk. (2007). polifenol terutama *epigallocatechin gallat* (EGCG) dapat melindungi kerusakan sel beta pancreas dari pengaruh oksidan. EGCG secara luas telah diketahui sebagai antioksidan, sebagai contoh EGCG mampu menangkal *superoxideanion radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, peroxy radicals, single oxygen, dan peroxy nitrile*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan total katekin pada produk teh herbal adalah berkisar antara 2,33-3,91% dengan kandungan total katekin tertinggi diberikan oleh teh hijau klon gambung 9 dan teh hijau dari daun murbei varietas kanva (Brannon, 2007).

Perlu diwaspadai *Ekstrak Catechins Green Tea GMB 4* terdapat kandungan *kafein* yang berlebih dalam dosis tinggi dan akan menjadi *pro-oksidan* yang akan merusak DNA (Chacko *et al*, 2010). Penelitian sebelumnya menyebutkan Ekstrak EGCG dari teh bersifat sitotoksik. EGCG (*Epigallocatechin-gallate*) dalam teh justru bersifat sebagai *pro-oksidan* dan bukan sebagai antioksidan pada sel  $\beta$  *pancreas* *in vivo*, mengingat hal tersebut mengkonsumsi teh hijau secara berlebihan dapat berbahaya bagi kesehatan (Chacko *et al*, 2010). Dosis yang tepat pada penelitian ini pada perlakuan 3 dengan dosis 60 mg/kg BB, berpotensi meningkatkan kadar *superoksidasi dismutase* pada tikus yang dibuat Diabetes Melitus Tipe 2.

## 6.6 Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan pada penelitian di atas dapat dirumuskan kesimpulan sebagai berikut:

Pada kelompok kontrol negative, yaitu pada tikus non diabetes melitus didapatkan hasil kadar superoksidasi dismutase, tikus 1 sebesar 4.83 ng/mL, pada tikus 2 sebesar 5.33 ng/mL, pada tikus 3 sebesar 6.44 ng/mL. Pada kelompok control positif, yaitu diinjeksi Streptozocin dan tidak diberi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4*.

4 di dapatkan hasil kadar *superoksidasi dismutase* sebesar 2.83 ng/mL untuk tikus (1). Untuk tikus (2) sebesar 3.83 ng/mL, untuk tikus (3) sebesar 5.11 ng/mL. Pada kelompok perlakuan 1, yaitu diberi Ekstrak *Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 20 mg/kg BB/tikus/hari di dapatkan hasil kadar *superoksidasi dismutase* sebesar 6,22 ng/mL untuk perlakuan 1 (1). Untuk perlakuan 1 (2) sebesar 7.77 ng/mL, untuk perlakuan 1 (3) sebesar 4.27 ng/mL. Pada kelompok perlakuan 2, yaitu diberi Ekstrak *Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 40 mg/kg BB/tikus/hari di dapatkan hasil kadar *superoksidasi dismutase* sebesar 5.55 ng/mL untuk perlakuan 2 (1). Untuk perlakuan 2 (2) sebesar 6.55 ng/mL, untuk perlakuan 2 (3) sebesar 6.94 ng/mL. Pada kelompok perlakuan 3, yaitu diberi Ekstrak *Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 60 mg/kg BB/tikus/hari di dapatkan hasil kadar *superoksidasi dismutase* sebesar 8.77 ng/mL untuk perlakuan 3 (1). Untuk perlakuan 3 (2) sebesar 9.72 ng/mL, untuk perlakuan 3 (3) sebesar 6.72 ng/mL.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa efek pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* sebagai antioksidan dalam meningkatkan kadar *superoksidasi dismutase* pada tikus jantan strain wistar dengan diabetes melitus tipe 2, Hasil uji statistik *One – Way ANOVA* didapatkan hasil nilai signifikansi 0,016, dimana ( $\alpha < 0,05$ ) sehingga hasil H<sub>0</sub> di tolak (ada pengaruh). pada perlakuan 3 dengan dosis 60 mg/Kg/BB,dari *Uji Post Hoc Tes* didapatkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0,02 dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Pada kelompok perlakuan I, yaitu diberi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 20 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan hasil kadar *malondialdehide (MDA)* dengan rerata sebesar 57,33 ng/ml. Pada kelompok perlakuan II, yaitu diberi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 40 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan hasil kadar *malondialdehide (MDA)* dengan nilai rerata sebesar 65,33 ng/ml. Pada kelompok perlakuan III, yaitu diberi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 60 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan hasil kadar *malondialdehide (MDA)* dengan nilai rerata sebesar 85,33 ng/ml. Pada kelompok kontrol positif, didapatkan hasil kadar *malondialdehide (MDA)* dengan rerata sebesar 74 ng/ml. Pada kelompok kontrol negatif, hasil kadar rata-rata *malondialdehide* 60 ng/ml.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* mempunyai efek menurunkan kadar *malondialdehide* pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Type-II, Hasil uji statistik *One – Way ANOVA* didapatkan hasil nilai signifikansi sehingga hasil  $< \alpha$  Ho di tolak. Dosis yang paling berpotensi menurunkan kadar *malondialdehide*, pada perlakuan 3 dengan dosis 60 mg/Kg/BB,dari *Uji Post Hoc Test* didapatkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

## 6.7 Daftar Pustaka

- American Diabetes Association. 2010. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Available. Clinical Practice Recommendation Standard of Medical Care in Diabetes*.
- American Diabetes Association. ADA Position Statement: Standard of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2004.
- Arisman, 2010. *Buku Ajar Ilmu Gizi: Gizi Dalam Daur Kehidupan*. Jakarta. Penertirbit kedokteran.
- Arikunto, S. 2006. *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktik*, Jakarta: Rineka Cipta
- Badan penelitian dan pengembangan kesehatan departemen kesehatan RI (2007). *Laporan hasil riset kesehatan Dasar (RISKESDAS)* Nasional Departemen Kesehatan RI.
- Bambang, K. 2009. Prospek Teh Indonesia sebagai Minuman Fungsional, (Online), (<http://www.scribd.com/doc/6601729/Prospek-Teh-Indonesia-Sebagai-Minuman-Fungsional>), diakses 29 oktober 2009).
- Brunner & Suddarth. 2002. *Buku Ajar Keperawatan Medical Bedah*, Jakarta. EGC
- Cabrera C, Atacho R, Gimenez R. 2006. *Beneficial Effect of Green Tea*. Journal of American College of Nutrition,
- Caramori, G. and A. Papi. 2004. *Oxidant and Asthma*. Jakarta
- Chaiyasut, C., W. Kusirisin, N. Lailerd, P. Lerttrakarnnon, M. Suttajit, and S. Srichairatanakool. 2011. Effects of phenolic compounds of fermented Thai indigenous plants on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3057567/>
- Chaves, B. E. and R, R. Henry, 2005, type 2 Diabetes Insulin Resistance, Beta Cell Dysfunction, and Other Metabolic and Hormonal Abnormalities. Elsevier, Inc. <http://www.elsevier.com>. [Diakses tanggal: 13 Februari 2008].
- Choi, BC.K., Tennessee, LM, dan Eijkemans, GJ.M, 2001. Developing Regional Workplace Health and Hazard Surveillance in The Americas. Pan Am J Pub Health.
- Chacko, S., Thambi, P., Kuttan, R., Nishigaki, I. 2010. *Beneficial effects of green tea: A literature review*. Chinese Medicine.
- Departemen kesehatan RI, 2005. Pedoman Pemeriksaan Laboratorium Untuk Penyakit Diabetes Melitus. Jakarta.
- Departemen kesehatan RI, 2008. Jumlah Penderita Diabetes Indonesia Ranking ke-4 di Dunia, Jakarta.
- Di Carlo, F. J and F.W. Oehme. 1992. *Animal Models In Toxicology*. Edited by Shayne Cox Gad & Christoper P. Chengelis. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Dihin Asfarinda Budiarti. 2010. Pengaruh *Epigallocatechin Epigalatechin (EGCG)* Teh Hijau (*Camellia assamica*) klon GMB-4 Terhadap Kadar Resistensi Serum Tikus (*Rattus norvegicus strain wistar*) Jantan Yang Diberi Diet Tinggi Lemak. Universitas Brawijaya. Malang.

- Dinas Kesehatan Kota Kediri. 2011. *Data Kasus Penyakit Diabetes Melitus*. Kediri: Bidang Yankes.
- Diyah, Fajar Arta Auladin, Yuly Peristiowati., Sutrisno, Diah Kristianti., 2013 *Catechins Green Tea Gmb-4 Sebagai Antioksidan Melalui Mekanisme Npenurunan Kadar Mda Dan Peningkatan Kadar Soda Dan Mda Pada Tikus Strain Wistar Dengan Diabetes Melitus Type 2*
- Duke, J.A. 1998. *Handbook of Energy Crops: Camellia Sinensis, (Online)*, (<http://www.hort.purdue.edu>, diakses 5 Oktober 2009).
- Fajar Wahyu Pribadi, 2008. Efek catechins terhadap kadar asam urat, C-Reactive protein (CRP) dan melondialdehid darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) hiperurisemia. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Guyton, A.C, dan Hall, J.E. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC
- Hadi, Hamam. 2005. Beban Ganda Masalah Gizi dan Implikasinya Terhadap Kebijakan Pembangunan Kesehatan Nasional.
- Halliwell B. 2006. *Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. *Plant Physiol*.
- Hidayat, Aziz Alimul. 2007. *Riset Keperawatan dan Tehnik Penulisan Ilmiah*. Salemba Medika.
- Hau, J., & Hoosier Jr., G. L. 2003. *Handbook of Laboratory Animal Science Second Edition*. Boca Raton: CRC Press.
- Hoffman. 2007. EGCG-potent extract of green tea. <http://www.drhoffman.com/> page.cfm/118. Diakses tanggal 10 Desember 2009.
- International Diabetes Federation, 2004. IDF Clinical Guidelines task Force. *Global Guideline for type 2 diabetes*.
- Leung, A.Y. 1980. *Encyclopedia of common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics*. New York: John Wiley & Sons.
- Mawarti H, Ratnawati R, dan Lyrawati D. 2012 *Epigallatocatechin Gallate Menghambat Resistensi Insulin pada Tikus dengan Diet Tinggi Lemak*. Jurnal Kedokteran Brawijaya.
- Michel, B. 2011. *Nursing Diabetes Mellitus*. Dalam S. Lewis, S. Dirksen, M. Heitkemper, L. bucher & I. camera (Editor), *Medical Surgical Nursing Eight vol 2*, USA: Elsevier Mosby.
- Mu'nisa, A. 2003. *Pengaruh Diet Asam Lemak Essensial Terhadap Kadar Kolesterol dan Permasalahanya*.IPB.
- Murwani S, Ali M, Muliartha K. 2006. *Diet Aterogenik pada Tikus Putih (*Rattus novergicus* strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis*. Journal Kesehatan Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.
- Nagao T, Komine Y, Soga S, Meguro S, Hase T, Tanaka Y, Tokimitsu I 2005. *Ingestion of a Tea Beverage Rich in Catechins Leads to a Reduction in Body Fat and Maalondialdehyde-LDL in men*. *American Journal Clinical Nutrition*, jakarta
- Nakamura Tomonori, Terajima Tomoko, Ogata Taeko, Ueno K, Hashimoto N, Ono K, Yano S. 2006. *Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide*. Diabetic and metabolic disease.

- Nelson. 2009. *Green Tea Extract*. Nutrimart: USA. <http://www.nutrimart.com/Bulk/Description/greentea.htm> Diakses Tanggal 7 November 2009.
- Nursalam. 2003. *Konsep dan Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu keperawatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Nursalam, 2008. *Konsep dan Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu keperawatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Notoatmodjo, S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta. PT Rineka Cipta.
- Notoatmojo, S. 2005. *Metode Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT. Asdi Mahasatya.
- Pande, Sienni Gayatri, 2010. *Pengaruh Pemberian Teh Hitam Terhadap Kadar SOD dan MDA Pada Rattus Norvegicus Galur Wistar Yang Diberi Diet Aterogenik*. Malang; FKUB 2010.
- Perkeni. 2006. *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*.
- Pillai SP, Mitscher LA, Menon SR, Pillai CA, Shankel DM. 1999. *Antimutagenic/antioxidant activity of green tea components and related compounds*. J Environ Toxicol Oncol.
- Prabowo S, Satriyo ED, 2007. *Aulanni'am. Pengaruh Green Tea terhadap Kadar Malondialdehida dan Aktivitas Superoksida pada Artritis Ajuvan (Model Hewan untuk Rheumatoid Arthritis)* Prosiding Seminar Nasional Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Surakarta.
- Price, SA, Lorraine M,W, 2002. Patofisiologi, Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit Edisi 6. Jakarta: EGC
- PPTK Gambung dan ATI, 2007. *Teh, terbukti secara ilmiah sebagai cara terbaik dan alami untuk meraih kesehatan*. Bandung
- Ratnawati R, Indra MR, and Satuman. *Green Tea Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis in the Primary Human Visceral Preadipocyte Culture*. Majalah Ilmu Faal Indonesia. 2007
- Rosalind, J.M. KimG.J and Anne M.M. 2009. *Green tea (Camellia sinensis) catechins and vascular function*. Britist Journal of Nutrition.
- Sayama K, Lin S, Zheng G, Oguni I. 2000. *Effects of green tea on growth, foodutilization and lipid metabolism in mice. In vivo*; Jul-Aug; 14(4):481-484
- Schteingart, D, 2003. *Pancreas: Metabolism Glukosa dan Diabetes Mellitus*. Dalam S. Price & Wilson (Editor) *Patofisiologi Edisi 6*. Jakarta: penerbit buku kedokteran EGC.
- Setyawan dan hadisaputro, S. 2007. *Epidemiologi dan Faktor-Faktor Resiko Terjadinya Diabetes Mellitus Tipe 2*. In: Drmono, T. suhartono, T.G.D. pemayun, F.S. padmomartono, editors. *Naskah Lengkap Diabetes Mellitus Ditinjau dari Berbagai Aspek Penyakit Dalam*. Semarang: badan penerbit.
- Soegondo S soewondo, P, subekti, I, 2009. *Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu*. Balai penerbitan FKUI Jakarta.
- Suyono, S. 2009. *Patofisiologi Diabetes Mellitus*. Dalam S. Soegondo, P. Soewondo, & I.Subekti Editor, *Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu: Panduan Penatalaksanaan Diabetes Mellitus bagi Dokter dan Edukator*. Jakarta:FKUI.
- Suyono, S. 2011. *Diabetes Mellitus di Indonesia*. Dalam: *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Pusat penertiban ilmu penyakit dalam FKUI Jakarta.





- Sulistiyowati T. dkk. 2004. *Efek Teh Hitam (Camelia sinensis O.K, var. Assamica (Mast)) Terhadap Plak Atrosklerosis pada Kelinci (Oryctolagus cuniculus) strain new Zaeland white*. Majalah Cermin Dunia Kedokteran. Pusat Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Depkes RI. Jakarta. No. 47.
- Shixian; VanCrey; J. Shi; Y. Kakuda; and Y. Jiang. 2006. *Green Tea Extract Thermogenesis-Induced Weight Loss by Epigallocatechin Gallate Inhibition of Catechol-O-Methyltransferase*.
- Syah, A., 2006, Taklukan Penyakit dengan Teh Hijau, Cet.1, Agromedia Pustaka Jakarta
- Tjoroprawiro, A.2007. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Surabaya: Airlangga university Press.
- Tuminah. 2004. *Efek Teh Hitam [Camellia Sinensis O.K. Var. Assamica (Mast)] sebagai salah satu Sumber Antioksidan*. Majalah Cermin Dunia Kedokteran. Pusat Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Depkes RI. Jakarta.
- Wulandari, Selvy Putri. 2009. *Hasil Ekstrak Teh Hijau Bagi Kesehatan Untuk Mengurangi Berbagai macam Penyakit Serta Aplikasi Dalam Kehidupan Sehari-hari*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang.
- WHO (World Health Organization) Report 2003. An Aging World. <http://www.census.gov/prod/2001pubs/p95-01-1.pdf>. diakses tanggal 01 Juni 2012.
- Wolfram, Swen. 2007. *Effects of Green Tea and EGCG on Cardiovascular and Metabolic Health*. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 26, No. 4, 373S-388S (2007).
- Yamanishi, T. 1995. *Flavour of Tea. Food Review International Special Issue on Tea*, (Online), Vol. 2, No. 3. ([http://www.ipard.com/art\\_perkebun/Aug02-06\\_kb.asp](http://www.ipard.com/art_perkebun/Aug02-06_kb.asp), diakses 29 Oktober 2009).
- Zhang HM, Chen SW, Zhang LS, Feng XF. 2006. Effects of soy isoflavone on law-grade inflammation in obese rats. *Zhang Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*.31:336-339.
- Zhion. 2009. *EGCG Health Benefits and Side Effects*. <http://www.zhion.com/phytonutrients/EGCG.htm>. Diakses Tanggal 7 November 2009.



# BAB 7

## Efek Catechins Green Tea GMB-4 Terhadap Kadar Kolesterol Total, Kadar HDL dan LDL pada Tikus *Strain Wistar* dengan Diabetes Melitus Tipe II

### 7.1 Abstrak

Ekstrak teh hijau terdapat 2 bahan aktif *catechins* dan *flavanol* yang berperan menjaga kadar normal lemak dengan membuang kolesterol total LDL dari dalam darah. Diabetes Melitus Type-II merupakan kelainan pokok yang di tandai dengan resistensi insulin. Yang berdampak pada peningkatan sintesis trigleserida dan VLDL. Tujuan penelitian untuk mengetahui dampak CGT pada kolesterol total, HDL dan LDL dengan Diabetes Melitus Tipe II.

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *true experimental design* dengan sampel 20 ekor tikus *strain wistar* jantan yang di bagi menjadi 5 kelompok, dengan pembagian K.neg, K.pos, K.P.1(20mg/kgBB), K.P.2(40mg/kgBB), K.P.3(60mg/kgBB). Pengumpulan data dengan menggunakan metode *cobas mira*, selanjutnya dianalisa menggunakan uji non parametrik *One-Way ANOVA* dengan nilai kemaknaan  $\alpha$  0,05.

Hasil penelitian K.neg (5,93), K.pos (28,3), K.P.1(20mg/kgBB 16,03), K.P.2(40mg/kgBB 28,23), K.P.3(60mg/kgBB 11,1). Hasil uji statistik *One Way Anova* di dapatkan hasil nilai signifikan 0,000, dimana ( $\alpha < 0,05$ ) sehingga hasil  $< \alpha$  Ho di tolak. Dosis yang berpotensi menurunkan kadar kolesterol pada perlakuan 2 dengan dosis 40 mg/Kg/BB dari *Uji Post Hoc Tes* di dapatkan Perbedaan yang signifikan

dengan sig 0,000 di bandingkan dengan kelompok kontrol negatif, hasil uji Tukey mean kolesterol total -21 Mg/dl.

Dosis yang sangat berdampak pada penelitian ini adalah kelompok perlakuan dengan dosis 40mg/kgBB. Karena dosis CGT bila di berikan terlalu banyak bisa menyebabkan toksitas pada hewan coba. Kandungan ECG GMB-4 mampu meningkatkan kinerja liver sehingga dapat menurunkan kolesterol total dan menghambat LDL pada liver.

**Kata Kunci:** *Catschins Green Tea GMB-4, Kolesterol Total, HDL, LDL Diabetes Melitus Tipe II*

## 7.2 Latar Belakang

Penyebab kematian di Indonesia saat ini telah bergeser dari penyakit infeksi ke penyakit degeneratif antara lain penyakit sistem sirkulasi diantaranya, diabetes melitus. Diabetes melitus (DM) merupakan gejala yang timbul pada seseorang yang disebabkan karena adanya peningkatan kadar gula darah (glukosa) akibat kekurangan insulin.(Winasis, 2009). Pada diabetes kadar kolesterol plasma biasanya meningkat, dan inimemegang peranan dalam mempercepat terjadinya penyakit atherosklerosis vaskuler yang merupakan komplikasi utama jangka panjang diabetes pada manusia. Pada diabetes berat sintesis kolesterol menurun, meningkatkan defisiensi protein yang melemahkan badan sehingga dapat mengakibatkan kematian (Ganong, 1983). Penderita diabetes melitus sering kali di sertai peningkatan low density lipoprotein (LDL) dan homosistein (Hcy).(Wijekoon EP,2006). Ciri disbledemia pada DM tipe II adalah penurunan kadar kolesterol High density lipoprotein (HDL, peningkatan jumlah paritikel "small dense" LDL dan peningkatan trigleserid plasma. (Nieman km,2006).

Pada diabetes tipe 2 kelainan pokok terjadi pada resistensi insulin perifer. Manifestasi dislipidemianya adalah meningkatnya kilomikron,VLDL, trigleresida, LDL dan menurunnya HDL Kolesterol. Makin resistensi insulin makin meningkat sintesis trigleresida dan VLDL di hati. Enzim yang berperan yaitu lypoprotein lipase,hepatik trigleresida lipase, lipoprotein tranfer protein dan *lechithin cholesterol acyl transferase* (LCAT). (Djokomoeljsnto, 2000). Gangguan metabolisme lipoprotein yang kaya trigleresida dan hipercolesterolemia. Lipoprotein kaya trigleresida berasal dari dua sumber yaitu usus dan hepar. Usus mensekresi kilomikron sesudah mencerna makanan kaya lemak. Dalam sirkulasi, trigleresida dari kilomikron di hidrolisa oleh lipoprotein lipase, yang memecah lipoprotein ini menjadi kilomikro rendah. Kilomikron akan menuju ke hepar. Hepar akan mensekresi VLDL yang kemudian mengalami lipolisis oleh lipoprotein lipase menjadi VLDL yang kemudian

mengalami lipolisis oleh lipoprotein lipase menjadi VLDL. VLDL sebagian menuju hepar dan sebagian lagi di konversi menjadi LDL dan VLDL dibersihkan dari sirkulasi oleh reseptor LDL. Pada diabetes melitus terjadi dua abnormalitas metabolisme triglycerida yaitu over produksi VLDL dan lipolisis yang tidak efektif oleh lipoprotein lipase. Menyebabkan hipertriglycerida.

Terjadinya hiperkolesterolemia karena over produksi VLDL yang dapat meningkatkan produksi IDL dan LDL dan berkurangnya aktivitas reseptor LDL, over produksi VLDL dapat karena obesitas dan NIDDM. Berkurangnya reseptor LDL adalah konsentrasi dari penurunan aktivitas insulin menjadi defisiensi insulin atau resistensi insulin. (foster DW & wilson JD, 1992)

Diabetes melitus sebagai suatu penyakit kronis yang mulai menonjol sebagai penyebab morbiditas dan mortalitas di negara-negara sedang berkembang termasuk di negara Indonesia (Winasis, 2009). Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit Global endemik (Shaw, Sicre, Zimmet, 2010). Saat ini diperkirakan 171 juta pasien menderita DM seluruh dunia dan diperkirakan tahun 2030 akan menjadi dua kali lipatnya (Wild *et al*, 2004). Penderita Diabetes Melitus (DM) di Indonesia secara epidemiologi diperkirakan pada tahun 2030 prevalensi mencapai 21,3 juta orang atau merupakan negara urutan keempat dengan jumlah perkiraan penderita DM didunia (Wild *et.al*, 2004). Sedangkan hasil Riset kesehatan Dasar (Rskesdas) tahun 2007, diperoleh bahwa proporsi penyebab kematian akibat DM pada kelompok usia 45-54 tahun di daerah perkotaan menduduki ranking ke-2 yaitu 14,7%. Daerah pedesaan, DM menduduki ranking ke-6 yaitu 5,8%. Banyak permasalahan kesehatan yang muncul karena jumlah penderita DM dari tahun ke tahun terus meningkat kejadian DM juga mengakibatkan terjadinya hiperkolestolemia. Prevalensi hiperkolestolemia meningkat dari 13,6% menjadi 16,5% pada laki-laki dan dari 16% menjadi 17% pada perempuan (Jamal,2004).

Hiperkolesterolemia merupakan peningkatan kadar kolesterol dalam darah (Schlesinger 2011). Keadaan hiperkolesterolemia terjadi jika kadar kolesterol total dalam darah melebihi normal. (Jung 2006) mengatakan bahwa peningkatan kadar LDL dan penurunan kadar HDL dikarenakan adanya kolesterol berlebih, yang menyebabkan penumpukan kolesterol dalam tubuh. Selanjutnya penumpukan kolesterol diikuti dengan aktivitas radikal bebas menyebabkan adanya kerusakan oksidatif pada beberapa jaringan. Kadar kolesterol yang tinggi dalam darah menyebabkan VLDL membentuk LDL, akibatnya LDL dalam darah meningkat. Kadar LDL yang terus meningkat membuat HDL tertekan dan tidak bisa membuang kelebihan kolesterol yang ada dalam darah, sehingga keadaan HDL menurun. Keadaan tersebut seuai dengan pernyataan Sargowo (2001) bahwa, hiperkolesterol mengakibatkan adanya gangguan metabolisme lipoprotein, yang meliputi peningkatan kadar LDL serta penurunan kadar HDL.



Menambahkan bahwa banyak orang memilih pengobatan medis yang mengandung bahan-bahan kimia (bahansintesis), harganya pun mahal, dan mempunyai efek samping yang merugikan kesehatan. Mengetahui hal tersebut, banyak ilmuwan yang menggunakan bahan alami sebagai bahan pengobatan alternatif. (Povey 1994) menyatakan bahwa antioksidan dapat berperan dalam penurunan kadar kolesterol. Antioksidan membantu memecah terjadinya proses oksidasi lemak yang apabila terjadi oksidasi lemak, maka kolesterol menjadi mudah melewati dinding arteri dan menyumbatnya. (Pambudi (2003).

Di Kota Kediri angka kejadian Diabetes Melitus pada tahun 2011 mencapai 10.312 jiwa dan mengalami peningkatan di tahun 2012 menjadi 14.337 jiwa. Diabetes Melitus menduduki tingkat ke 5 dari 10 penyakit terbanyak Puskesmas di Kota Kediri. (Dinkes Kota Kediri 2014).

Berdasarkan penelitian pada hewan coba memerlukan bahwa antioksidan dapat menghambat terjadinya hiperkolesterol.(Musthafa,2000). Oleh karena itu penelitian mengenai bahan yang mengandung antioksidan serta mencegah hiperkolesterol perlu dilakukan. Salah satu bahan alam yang mengandung antioksidan yaitu catechin Green Tea. *Catechins Green tea* mempunyai kandungan *polyphenol* dan *flavonol* dimana berperan dalam mengabsorbsi ion metal, menjaga keseimbangan metabolisme karbohidrat pada diabetes melitus (Kati hanhinneva.*et al*,2010)

Di dalam *catechins green tea* mempunyai kandungan *polyphenol*. Salah satu tanaman yang mengandung *polyphenol* yaitu teh hijau. Dalam teh hijau terkandung 30-40 persen *polyphenol*, lebih besar dari jenis teh biasa yang hanya 3-10 persen. Ekstrak teh hijau terdapat dua bahan aktif *catechins* dan *theaflavin* yang berperan membantu menjaga kadar normal lemak dalam darah, yang dikenal dengan sebutan kolesterol. Kerja dari ekstrak teh hijau Kandungan *catechins* pada teh hijau adalah 30-42% dari ekstrak padat teh hijau, konsentrasiannya tergantung pada cara pengolahan daun teh, letak geografis, cara pengambilan ekstrak, dan jenis daun teh (Cabrera *et.al*, 2006). *Catechins* green tea juga mempunyai kualitas dari teh-teh lainnya. *Catechins* merupakan antioksidan kuat diharapkan mengurangi aterosklerosis. Di dukung penelitian Nagao 2005 yang menyatakan bahwa sifat antioksidan *Catechins* dapat menghambat LDL. *Catechins* juga dapat menurunkan kadar serum darah, faktor proinflamasi, kolesterol dan juga LDL dengan menghambat oksidasi (Lucas *et al*, 2007).

Mengurangi penyerapan kolesterol dari makanan yang terjadi di saluran pencernaan dan meningkatkan kinerja liver untuk membuang kolesterol LDL dari dalam darah.Dari kedua mekanisme tadi, maka akan membantu menurunkan kolesterol LDL (kolesterol jahat) dan sebagai antioksidan yang akan memberikan perlindungan terhadap radikal bebas. Dengan adanya radikal bebas, LDL (kolesterol

jahat) akan terkondisi, di mana akan terdeposit di dinding pembuluh darah, yang merupakan awal terjadinya *atherosclerosis* (Wulandari, 2009).

Melihat tingginya angka terjadinya penyakit diabetes melitus peneliti tertarik untuk membuat penelitian dengan judul "Dampak pemberian ekstrak *Catechins Green Tea* (CGT) GMB-4 terhadap Kolesterol total HDL dan LDL" Dengan melakukan studi invivo pada tikus strain wistar dengan Diabetes Melitus type II, di Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang.

### **7.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian**

#### **1. Tujuan Umum**

Mengetahui Dampak Pemberian Catechin Green Tea GMB-4 Terhadap Kadar kolesterol total, HDL & LDL pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan diabetes melitus tipe 2

#### **2. Tujuan Khusus**

- a. Mengidentifikasi Kadar kolesterol total, HDL & LDL pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang diberi perlakuan dengan *catechins green tea* dosis I yaitu 20 ml/kg BB diberikan 1 x sehari
- b. Mengidentifikasi Kadar kolesterol total, HDL & LDL pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang diberi perlakuan dengan *catechins green tea* dosis II yaitu 40 ml/kg BB diberikan 1 x sehari
- c. Mengidentifikasi Kadar kolesterol total, HDL & LDL pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang diberi perlakuan dengan *catechins green tea* dosis III yaitu 60 ml/kg BB diberikan 1 x sehari
- d. Mengidentifikasi Kadar kolesterol total, HDL & LDL pada tikus putih jantan *Strain Wistar* dengan diabetes melitus tipe 2 tanpa perlakuan dengan *catechins greentea*.
- e. Menganalisa apakah ada pengaruh *catechins green tea* terhadap Kadar kolesterol total, HDL & LDL pada tikus putih jantan *Strain Wistar* non diabet tipe II.

### **7.4 Metode Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan metode *true eksperimen design*, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan kepada suatu gejala pada suatu kelompok kontrol dengan beberapa kelompok perlakuan(Nursalam, 2008).

Dalam rancangan ini memungkinkan peneliti mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok

eksperimen dengan kelompok kontrol (kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif) (Nursalam, 2008).

Pada penelitian ini sampel penelitian yang diperlukan untuk masing-masing kelompok adalah 4 sampel penelitian sehingga total besar subyek penelitian sebanyak 20 sampel penelitian.

- 1) Kelompok eksperimen (perlakuan) 1 sebanyak 4 Tikus
- 2) Kelompok eksperimen (perlakuan) 2 sebanyak 4 Tikus
- 3) Kelompok eksperimen (perlakuan) 3 sebanyak 4 Tikus
- 4) Kelompok kontrol positif sebanyak 4 Tikus
- 5) Kelompok kontrol negatif sebanyak 4 Tikus

Sampel pada penelitian ini diambil sebanyak 20 ekor Tikus jantan *Strain Wistar* yang diperoleh dari Universitas Brawijaya Malang, yang dibuat Diabetes melitus Type II di Laboratorium fisiologi (FAAL) Universitas Brawijaya Malang.

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *random sampling*/ pengambilan secara acak yaitu merupakan teknik pengambilan sampel yang memberikan kesempatan yang sama kepada populasi untuk dijadikan sampel.

#### a. Cara Perlakuan Tikus

Sebelum melakukan proses perlakuan hewan coba peneliti harus mengajukan surat ijin penelitian, Peneliti memilih Tikus wistar yang digunakan berdasarkan kriteria populasi sebanyak 15 ekor. Kemudian diadaptasikan pada kandang tempat pemeliharaannya selama 7 hari. Satu kandang untuk satu tikus dan diberi sekam, Setiap satu minggu sekali kandang dibersihkan. Selama 40 hari selanjutnya diberikan diet *chow standart* pada kelompok kontrol negatif, sedangkan pada kelompok kontrol positif diberikan diet hiperkolesterol (60% fat, Harlan Teklad) untuk membuat tikus Diabetes Melitus Type II. Kemudian diinjeksi secara intraperitoneal dengan Streptozotocin (STZ) *low dose* 30 mg/kg BB dibagi 3 hari (10 mg/kgBB/hari), (Uemura *et al*, 2001, Nakamura *et al*, 2006). Setelah 3 hari dilakukan pemeriksaan gula darah. Bila gula darah mencapai >200 mg/dl sudah dikategorikan hiperglikemia. Selain itu juga dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol untuk mengetahui kadar kolesterol apabila > 200 mg/dl dikategorikan hiperkolesterol yang sebelumnya diberikan STZ *low dose* dengan diit tinggi lemak.

Kelompok dibagi menjadi 5 yang terdiri dari:

- Kelompok 1 : Kontrol negatif tikus non diabet tanpa perlakuan,
- Kelompok 2 : Tikus diabet yang tidak diberikan perlakuan dengan *Catechin Green Tea GMB-4*,
- Kelompok 3 : Tikus diabet dengan perlakuan *Catechin Green Tea GMB-4* 20 mg/KgBB/hari,
- Kelompok 4 : Tikus diabet dengan perlakuan *Catechin Green Tea GMB-4* 40 mg/KgBB/hari,

Kelompok 5 : Tikus diabet dengan perlakuan *Catechin Green Tea GMB-460 mg/KgBB/hari*, Perlakuan diberikan selama 6 minggu, setiap 2 minggu sekali dilakukan pemeriksaan gula darah 8-12 jam setelah makan (Chaiyasut *et al*, 2011)<sup>7</sup>.

#### **b. Pemberian diet hiperkolesterol (aterogenik)**

Pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/ PARS 30 gram, air 20 cc, tepung terigu 30 gram (Muwarni,2006)<sup>8</sup>.

Diet aterogenik yang terdiri dari pakan standart ( PARS 30 gram dan tepung terigu 30 gram ) yang ditambahkan kuning telur bebek (2 gram ), asam kolat (0,06 gram ), minyak babi 3,22 gram (3,75 cc ), minyak kambing 4gram (4 cc), minyak kelapa 0,4 gram (0,4 cc ), air ( 25cc ) (Mu`nisa.A,2003

#### **b. Metode Pembuatan larutan STZ**

1. Melarutkan STZ 30 mg/Kg BB dengan normal salin 20ml
2. Mengecek pH larutan (ph harapannya antara 3,5-4)
3. Apabila pH belum sampai angka tersebut ditambahkan asam sitrat 0,01 ml
4. Larutan STZ siap disuntikkan ke tikus

Prosedur Pemberian

1. Tikus dipuaskan 6 jam sebelum pemberian STZ
2. Persiapkan alat dan bahan: sput 1 ml, alkohol, kapas, STZ, handscon
3. Suntikkan 0,1 ml STZ secara intra peritoneal (dilakukan pada hari ke 0 dan hari ke 2)
4. Setelah pemberian injeksi STZ 3 hari kemudian dilakukan pengambilan darah vena dan kadar gula darah plasma. Pemeriksaan glukosa darah menggunakan Glukometer. Kadar gula darah tikus mencapai 200 mg/dl berarti sudah dikatakan diabetes (Zhang *et al*, 2008)<sup>10</sup>.

#### **c. Proses Pembedahan pada Hewan Percobaan**

1. Sebelum dilakukan pembedahan tikus dipuaskan 6-8 jam
2. Tikus di injeksi dengan Ketamin dengan menggunakan sput 5cc
3. Tunggu beberapa menit sampai tikus sudah mulai tidak sadar tetapi pastikan jantung masih berdenyut
4. Tikus diletakkan di papan untuk mempermudah proses pembedahan
5. Buka bagian dada tikus untuk mengetahui organ bagian dalam tikus. Ambil darah melalui jantung dengan menggunakan sput 5 cc
6. Darah ditampung menggunakan tabung valcon 15 ml
7. Darah disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit
8. Serum dimasukkan ke dalam tabung ependopt dengan menggunakan micropipet, siap untuk diperiksa kadar gula.

## 7.5 Hasil dan Pembahasan

### 7.5.1 Hasil Penelitian

#### a. Gambaran Umum Penelitian

Proses penelitian yang telah dilakukan di Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang, dalam penelitian ini menggunakan sampel perlakuan pada 15 ekor tikus putih *Strain Wistar* jenis kelamin jantan. Dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3, dan tiap sampel menempati kandang sendiri – sendiri.

Untuk mengetahui dampak pemberian *Ekstrak Catechins Green TeaGMB-4* terhadap kadar kolesterol total HDL,LDL dalam darah pada tikus *Strain Wistar* yang dibuat Diabetes Melitus Type-2. Penelitian ini dilakukan mulai tanggal 28 Agustus 2013 sampai 27 November 2013, di Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang.

#### b. Data Khusus Penelitian

Pemeriksaan kadar kolesterol total serum dari tikus putih jantan *Strain Wistar* dilakukan pada akhir penelitian.

Dan hasil kadar kolesterol total tikus percobaan pada masing – masing perlakuan dapat dilihat pada gambar grafik berikut ini:

Kelompok	Jumlah Sampel	Mean ± STD
K.Neg	3	1.73 ± 13.31
K.Pos	3	1.85 ± 11.01
K.P (20mg/kgBB)	3	1.87 ± 11.35
K.P (40mg/kgBB)	3	1.84 ± 8.50
K.P (60mg/kgBB)	3	1.85 ± 17.89

Dari tabel rata-rata berat badan tikus percobaan diatas dapat dijelaskan bahwa:

- Kelompok 1 (K.Neg) nilai rerata yaitu  $1.73 \pm 13.31$  dengan batas bawah 140.58 dan batas atas 206.74.
- Kelompok 2 (K.Post) nilai rerata yaitu  $1.85 \pm 11.01$  dengan batas bawah 157.97 dengan batas atas 212.69.
- Kelompok 2 (K.P20 mg) nilai rerata yaitu  $1.87 \pm 11.35$  dengan batas bawah 158.78 dengan batas atas 215.21.
- Kelompok 2 (K.P40) nilai rerata yaitu  $1.84 \pm 8.50$  dengan batas bawah 163.53 dengan batas atas 205.79.
- Kelompok 2 (K.P60) nilai rerata yaitu  $1.85 \pm 17.89$  dengan batas bawah 140.87 dengan batas atas 229.79.

Keterangan:

1. Kelompok 1 ( K.Neg ) = Diet Standart
2. Kelompok 2 ( K.Post ) = Diet Hiperkolesterol
3. Kelompok 3 ( K.P.20 mg ) = Diet Hiperkolesterol+STZ+CGT 20 mg
4. Kelompok 4 ( K.P.40 mg ) = Diet Hiperkolesterol+STZ+CGT 40 mg
5. Kelompok 5 ( K.P.60 mg ) = Diet Hiperkolesterol+STZ+CGT 60 mg

Dari hasil *lavene test* tersebut yaitu 0,067 dengan memakai  $\alpha = 0,05$ , berarti terima Ho. Jika terima Ho berarti data dikatakan homogen dan dilanjutkan ke uji *One Way Anovadengan* hasil 0,002 dengan  $\alpha = 0,05$  berarti tolak Ho dengan kesimpulan *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4*berdampakterhadap Penurunan kadar kolesterol total Darah Pada Tikus Putih Jantan *Strain Wistar Diabetes Melitus*, Ditandai minimal ada 1 kelompok yang berbeda.

### 7.5.2 Pembahasan

**a. Kadar Kolesterol Total Pada Kelompok Kontrol Negatif tanpa di beri perlakuan Hiperkolesterol dan *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4***

Dari 3 sampel yang digunakan sebagai kontrol negatif, didapatkan hasil kadar Kolesterol total dengan rerata 39,33 mg/dl. Hasil kadar HDL sebesar rerata 20 mg/dl. Hasil kadar LDL sebesar dengan rerata 5,93 mg/dl.

Berdasarkan fakta dan teori diatas asupan makanan yang diberikan tidak menunjukkan tingginya kadar *Kolesterol Total, HDL dan LDL* kemungkinan hal ini disebabkan pada diet standart jumlah kadar kolesterol tidak terlalu banyak.

Diet standart yang terdiri dari pakan ayam/ PARS 30 gram, air 20 cc, tepung terigu 30 gram (Muwarni,2006)<sup>8</sup>.Diet standar akan meningkatkan HDL maupun LDL, Diet tinggi lemak maupun tinggi karbohidrat sama-sama meningkatkan kadar trigliserida darah hewan coba, hanya saja pada diet tinggi lemak menunjukkan peningkatan yang lebih cepat dibanding pada diet tinggi karbohidrat (Srivastava *et al* 2000).

Diet standar akan meningkatkan HDL maupun LDL, Diet tinggi lemak maupun tinggi karbohidrat sama-sama meningkatkan kadar trigliserida darah hewan coba, hanya saja pada diet tinggi lemak menunjukkan peningkatan yang lebih cepat dibanding pada diet tinggi karbohidrat.

**b. Kadar Kolesterol Total Pada Kelompok Positifdengan di beri perlakuan Hiperkolesterol tanpa*Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4***

Dari 3 sampel yang digunakan sebagai kontrol positif, didapatkan hasil kadar Kolesterol Total dengan rerata sebesar 66,67 mg/dl. Hasilkadar HDL dengan rerata sebesar 21,17 mg/dl. Hasilkadar LDL dengan rerata sebesar 28,3 mg/dl.

Pemberian diet aterogenik untuk membuat tikus diabetes tipe II. Diet aterogenik yang terdiri dari pakan standart ( PARS 30 gram dan tepung terigu 30 gram ) yang ditambahkan kuning telur bebek (2 gram ), asam kolat (0,06 gram ), minyak babi 3,22 gram (3,75 cc ), minyak kambing 4gram (4 cc), minyak kelapa 0,4 gram (0,4 cc ), air ( 25cc ) (Mu'nisa.A,2003). Kemudian diinjeksi Streptozocin (STZ) *low dose* 30 mg/kgBB, pada daerah intraperitoneal (Nakamura *et al.*, 2006). Berdasarkan fakta dan teori diatas pemberian diet aterogenik menyebabkan peningkatan kadar kolesterol total LDL serta pembentukan triglirisida sehingga dapat menyebabkan kondisi hiperkolesterol. Injeksi *Streptozocin* (STZ) diduga juga sebagai faktor terjadinya kerusakan pada sel beta Langerhans pankreas yang dapat mengakibatkan hiperglikemi.Hipergikemi dapat memicu pembentukan lipid peroksida yang berlebih.Pemberian diet hiperkolesterol (60% fat, Harlan Teklad) untuk membuat tikus diabetes tipe II. Kemudian diinjeksi secara intraperitoneal dengan Streptozocin (STZ) *low dose* 30 mg/kgBB (Uemura *et al.*, 2001,Nakamura *et al.*, 2006).

Hasil penelitian menunjukkan perlakuan diet hiperkolesterol berhasil dengan hasil uji tukey rata-rata 153,00 mg/dl, karena pemberian diet hiperkolesterol menyebabkan meningkatnya radikal bebas dan mengakibatkan stres oksidasi yang akhirnya sel beta pankreas sebagai tempat produksi insulin mengalami kerusakan dan akhirnya terjadi peningkatan kadar Kolesterol Total.

**c. Kelompok perlakuan 1, setelah menjadi DM tipe 2 diberikan terapi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4 20 mg/Kg/BB / hari/ tikus.***

Dari 3 sampel yang digunakan sebagai perlakuan 1, didapatkan hasil kadar Kolesterol Total rerata sebesar 34,67 mg/dl. Hasil kadar HDL dengan rerata sebesar 21,3 mg/dl. Hasil kadar LDL dengan rerata sebesar 16,03 mg/dl.

Kandungan *polyphenol* pada teh hijau berperan penting terhadap menurunkan kadar kolesterol tampilan komponen *polyphenol* pada *green tea* beserta konsentrasi. Kandungan itu akan membantu menyerap kadar LDL dan mengembalikan ke liver dan di netralisir lagi oleh lemak HDL. (Hara,2001).

Teh hijau mengandung bahan alami yang berasal dari ekstrak teh. Sedangkan teh mengandung banyak zat berguna dalam pengobatan dan dapat di manfaatkan. Terdapat 2 zat bahan aktif yaitu *catechin* dan *theaflavin* yang berperan membantu menjaga kadar normal lemak di antaranya, megurangi penyerapan kolesterol yang terjadi dalam saluran pencernaan kemudian membuang kolesterol LDL dari dalam darah kembali ke liver.

**d. Kelompok perlakuan 2, setelah menjadi DM tipe 2 diberikan terapi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4 40 mg/Kg/BB / hari/ tikus.***

Dari 3 sampel yang digunakan sebagai perlakuan 2, didapatkan hasil Kolesterol Total dengan rerata sebesar 60,33 mg/dl. Hasil HDL dengan rerata sebesar 23,43 mg/dl. Hasil LDL dengan rerata sebesar 22,7 mg/dl.

Kandungan *polyphenol* pada teh hijau berperan penting terhadap menurunkan kadar kolesterol tampilan komponen *polyphenol* pada *green tea* beserta konsentrasinya. Kandungan itu akan membantu menyerap kadar LDL dan mengembalikan ke liver dan di netralisir lagi oleh lemak HDL.(Hara, 2001).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* dengan dosis 40 mg/KgBB/ tikus / hari, hasil uji Tukey rata-rata kolesterol 60,33 mg/dl dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0.015 menunjukkan keberhasilan dalam menurunkan kadar kolesterol, karena *Catechins Green TeaGMB\_4* bersifat anti oksidan. Maka akan membantu menurunkan kolesterol LDL (kolesterol jahat) dan sebagai antioksidan yang akan memberikan perlindungan terhadap radikal bebas. Dengan adanya radikal bebas, LDL (kolesterol jahat) akan terkondisi, di mana akan terdeposit di dinding pembuluh darah, yang merupakan awal terjadinya *atherosclerosis*. Dan berdampak membantu menurunkan kadar kolesterol yang ada pada dalam darah. Dan dampaknya efektif pada saat dilakukan penelitian pada dosis ini yaitu 40 mg/kgBB radikal bebas. Pada hasil penelitian ini dampak per 1 mg CGT menurunkan 1,51 mg/dl.

**e. Kelompok perlakuan 3, setelah menjadi DM tipe 2 diberikan terapi *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* 60 mg/Kg/BB / hari/ tikus.**

Dari 3 sampel yang digunakan sebagai perlakuan, didapatkan hasil kadar Kolesterol Total dengan rerata 38,67. Hasil HDL dengan rerata sebesar 22,7 mg/dl. Hasil LDL dengan rerata sebesar 11,7 mg/dl.

Mekanisme lain dari *catechins green tea* sebagai antioksidan adalah *catechins* mempunyai kemampuan dalam *scavenging* radikal dari respon stres oksidasi dan respon proinflamasi yang dihubungkan dengan aterogenik dan penurunan fungsi vaskuler. Dalam hal ini *catechin* berperan memproteksi oksidasi LDL (peningkatan oksidasi LDL dalam pembentukan plak aterosklerosis).

*Catechins* merupakan salah satu jenis flavonoid yang banyak di temukan pada daun teh dan merupakan antioxidant kuat. *Catechins* banyak di temukan pada teh hijau *Camellia Sinensis* klon *GMB-4* karena proses pembuatannya pada saat daun masih segar langsung di seduh tidak melewati tahap pengeringan sehingga kadar *Catechins* yang dihasilkan banyak (Joe, 2004).

*Catechins* merupakan antioksidan kuat diharapkan mengurangi aterosklerosis. Di dukung penelitian Nagao 2005 yang menyatakan bahwa sifat antioksidan *Catechins* dapat menghambat LDL. *Catechins* juga dapat menurunkan kadar serum darah, faktor proinflamasi, kolesterol dan juga LDL dengan menghambat oksidasi (Lucas *et al*, 2007).

Perlu diwaspadai *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terdapat kandungan *kafein* yang berlebihan dalam dosis tinggi dan akan menjadi



*pro-oksidan* yang akan merusak DNA (Chacko *et al*, 2010). Penelitian sebelumnya menyebutkan *ekstrakEGCG* dari teh hijau bersifat sitotoksik. *EGCG(Epigallocatechin-gallate)* dalam Teh Hijau justru bersifat sebagai *pro-oksidan* dan bukan sebagai *antioksidan* pada sel beta pankreasin vivo, Mengingat hal tersebut konsumsi teh hijau secara berlebihan dapat berbahaya bagi kesehatan (Chacko *et al*, 2010). Perlakuan 2 dengan dosis 40 mg/Kg/BB dan perlakuan berpotensi dalam menurunkan kadar *kolesterol* pada tikus yang dibuat Diabetes Melitus Type 2.

## 7.6 Kesimpulan dan Saran

### 7.6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas dapat dirumuskan kesimpulan sebagai berikut:

1. Pada kelompok kontrol negatif, didapatkan hasil rata-rata kadar Kolesterol Total sebesar 39,33 mg/dl. Kadar HDL didapatkan rata-rata sebesar 20 mg/dl. Dan pada Kadar LDL didapatkan rata-rata sebesar 5,93 mg/dl.
2. Pada kelompok kontrol positif, didapatkan hasil rata-rata kadar Kolesterol Total sebesar 66,7 mg/dl. Kadar HDL didapatkan rata-rata 21,17 mg/dl. Dan pada Kadar LDL didapatkan rata-rata sebesar 28,3 mg/dl.
3. Pada kelompok perlakuan I, yaitu diberi *Ektrak Catechins Green Ttea GMB-4* dengan dosis 20 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan hasilrata-rata kadar Kolesterol sebesar 34,7 mg/dl. Hasil Kadar HDL didapatkan rata-rata sebesar 21,3 mg/dl. Dan pada hasil Kadar LDL didapatkan rata-rata sebesar 16,03 mg/dl..
4. Pada kelompok perlakuan II, yaitu diberi *Ekstrak Catechins Green TeaGMB-4* dengan dosis 40 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan hasil rata-rata kadar Kolesterol Total sebesar 60,33 mg/dl. Hasil Kadar HDL didapatkan rata-rata sebesar 23,43 mg/dl. Dan pada hasil kadar LDL didapatkan rata-rata sebesar 28,23 mg/dl.
5. Pada kelompok perlakuan III, yaitu diberi *Ekstrak Catechins Green TeaGMB-4* dengan dosis 60 mg/KgBB/Tikus/Hari, didapatkan hasil rata-rata kadar Kolesterol Total sebesar 38,67 mg/dl. Hasil Kadar HDL didapatkan rata-rata sebesar 22,7 mg/dl. Dan hasil rata-rata Kadar LDL didapatkan sebesar 11,1 mg/dl.
6. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* Berdampak dapat menurunkan Kadar Kolesterol Total pada tikus strain wistar yang dibuat Diabetes Melitus Tipe-II, Hasil uji statistikOne – Way ANOVA didapatkan hasil nilai signifikansi 0,000, dimana ( $\alpha < 0,05$ ) sehingga hasil  $< \alpha$

Ho di tolak. Dosis yang paling berpotensi menurunkan kadar Kolesterol Total pada perlakuan 2 dengan dosis 40 mg/Kg/BB,dari *Uji Post Hoc Tes* didapatkan perbedaan yang signifikan dengan sig 0,000 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, hasil uji *Tukey* rata-rata kolesterol Total -21 mg/dl.

### 7.6.2 Saran

#### 1. Bagi Peneliti Selanjutnya

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi bagi peneliti yang berminat ingin meneliti tentang dampak pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap kadarkolesterol total, HDL, dan LDL maupun variabel lainnya dan bisa dikembangkan tidak pada tikus tetapi bisa pada manusia untuk menemukan dosis yang tepat untuk manusia.

#### 2. Bagi Institusi Pendidikan

Institusi pendidikan diharapkan dapat menggunakan hasil penelitian ini sebagai masukan pembelajaran dalam penatalaksanaan penurunan kadarKolesterol Total, HDL dan LDL pada pasien Diabetes Melitus.

## 7.7 Daftar Pustaka

- American Diabetes Association Position Statement.(2005). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*.
- American Diabetes Association. 2007. Preventing Type 2 Diabetes and Heart Disease: Surveying Attitudes, Knowledge and Risk. *CheckUp America,Research Overview & Executive Summary, p. 1-4*.
- Aprian Rendra Eko.S. Yuly Peristiowati, Rahmania Ambarika,2013 Efek *Catechins Green Tea Gmb-4* Terhadap Kadar Kolesterol Total, Kadar HDL dan LDL Pada Tikus Strain Wistar Dengan Diabetes Melitus Tipe II
- Arikunto, S. 2006. *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktik*, Jakarta: Rineka Cipta
- Budiana, 2008. *Memahami Dampak Kolesterol*. Available from: URL: <http://www.dewansfamilymultiply.com>.
- Brannon. 2007. "Green Tea: New Benefit from an Old Favorite?" *Nutrition Dimension Inc*, p.1-6.
- Cabrera, C, Artacho, R, Giménez, R, 2006, Beneficial Effects of Green Tea-A Review, *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 25, no. 2, pp 79-99, accessed on 6th December 2009.
- Casper G. Schalkwijk and Coen D.A. Stehouwer. 2005. Vascular Complication in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science* 109. "143-159".
- Chaiyasut C, Kusirisin W, Lailerd N, Lerttrakarnnon P, Suttajit M, Srichairatanakool S. 2011. *Effects of Phenolic Compounds of Fermented Thai Indigenous Plants on Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

- Departemen Kesehatan RI. Laporan Hasil RISKESDAS in Adipose Tissue of Humans and Their Relation to Nasional. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2010
- Dinas Kesehatan Kota Kediri. 2011. *Data Kasus Penyakit Diabetes Melitus. Kediri*: Bidang Yankes.
- Di Carlo, F. J and F.W. Oehme. 1992. *Animal Models In Toxicology. Edited by Shayne Cox Gad & Christoper P. Chengelis*. Marcel Dekker, Inc. New York
- Djokomoeljanto. R dan Darmono, 2000. *Hidup Sehat Bersama Diabetes, naskah Lengkap Persatuan Diabetes Indonesia (Persadi)*,Semarang.
- Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser Lango, Jameson, Lascalzo. Harrison's Principles of Internal Medicine.17 th edition. By The Mc Graw-Hill Companies, Inc,2008
- Foster, D.W., 1992, Diabetes Mellitus, In Wilson, J.D. and Foster, D.W., *Endocrinology*, 1255-1317, W.B Saunders Company, A Division of Harcourt Brace and Company, London.
- Hara Y. 2001. *Green Tea: Health Benefits and Applications*. Marcel Dekker, New York.1: 2.
- Hidayat,(2007).Riset Keperawatan Dan Teknik Penulisan Ilmiah. Jakarta; Salemba Medika
- Lucas A. edralin, arpita basu. 2005. *Mechanisms and effect of green tea on cardiovascular health*. Department of nutritional sciences. Oklahoma state university.
- Mayes, P. A., 2003. Bioenergetika dan Metabolisme Karbohidrat serta Lipid. In: Bani A. P. dan Sikumbang T. M. N., eds. *Biokimia Harper*. jakarta: EGC, pp. 114-282.
- Miller,B. (2003). Cholesterol Control. Oak Enterprise. Petali jaya.
- Murwani S, Ali M, Muliartha K. 2006. *Diet Aterogenik pada Tikus Putih (Rattus norvegicus strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis*.Journal Kesehatan Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.
- Mu'nisa.A. 2003. Pengaruh Diet Asam Lemak Essensial Terhadap Kadar Kolesterol dan Permasalahanya. IPB
- Nakamura Tomonori, Terajima Tomoko, Ogata Taeko, Ueno K, Hashimoto N, Ono K,Yano S.2006. *Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse modelproduced by streptozotocin and nicotinamide*.*Diabetic and metabolic disease*
- Nagao, Yumiko Komine, and Satoko Soga. 2005. "Ingestion of a Tea Rich in Catechins Leads to a Reduction in Body Fat and Malondialdehyde-modified LDL in Men." *The Am Journal of Clinic Nutrition*, Vol.81, p.122-129
- Nieman KM, Hart CS, Szegedi SS, Garrow TA, Sparks JD, schalinske KL.(2006). Folate status modulates the Induction of Hepaticglysine N-Methyltransferase and Homocyteine Metabolisme In Diabetic Rat,Am J Physiol Endocrinology Metab,2006;291:E12345-E42.22
- Nursalam.2006. *Konsep dan Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan:Pedoman Skripsi, Tesis dan Intruman Penelitian Keperawatan*. Jakarta. Salemba Medika
- Nursalam. 2008. *Konsep dan Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan*. Edisi 2. Jakarta: Salemba Medika.
- Nursalam. (2003). Pendekatan Praktis Riset Keperawatan Jakarta: Salemba medika;2003.
- Notoatmodjo,S. 2005. Metodologi Penelitian Kesehatan. Jakarta: PT Rineka Cipta. Page 165.

- Pambudi, J. 2003. Potensi Teh sebagai Sumber Zat Gizi dan Peranannya dalam Kesehatan. Jakarta: Lembaga Riset Perkebunan Indonesia, Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial RI
- Perkeni. 2006. Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia2006.
- Sylvia Anderson, Price.2002. konsep klinis proses-proses penyakit. Edisi 6. Vol 2. Jakarta EGC.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. 2010. Diabetes Atlas: Global estimate of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res and Clinical Practice* 87: 4-14
- Sujayanto, G. 2008. *Khasiat Teh Untuk Kesehatan dan Kecantikan*. Flona Serial Oktober.
- Sugiono.2006.*Statistik untuk Penelitian*. Bandung: CV. Alfabetas.
- Suyono, S. 2002. *Patofisiologi Diabetes Mellitus*. Dalam *Penatalaksanaan Diabetes Mellitus terpadu*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Suyono.S. 2007. *Kecendrungan peningkatan jumlah penyandang Diabetes*. Dalam *Penatalaksanaan Diabetes Mellitus terpadu*. Jakarta:Balai Penerbit FKUI.
- Tedjapranata, Mulyadi. Diabetes di usia lanjutMedicine Primery care, 2009.
- Tisnadjaja, D., 2003, Pengaruh penambahan glukosa dan sodium asetat pada proses produksi bahan penurun kolesterol Monascus powder, Nusa Kimia, Vol. 3, No. 1.
- Wibisono, S., 2006.*Konsensus pengelolaan dan pencegahan dan pencegahand diabetes melitus tipe 2 di Indonesia tahun 2006*. Diambil tanggal 4 Juli 2012 dari <http://www.kedokteran.info>
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.(2004). Global prevalence of diabetes; estimates for the year 2000 and projection for 2030. *Diab Care*. 2004;27:1047-53.
- Winasis Budi E.(2009).*Hubungan antara Konsep diri dengan Depresi pada Pasien Diabetes Mellitus Di Rumah sakit Parancimantoro Wonogiri*.Skripsi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta
- WHO. Diabetes Fact Sheet No 312: World Health Organization; 2008.





# BAB 8

## Efek Isolat Catechins dari Green Tea GMB-4 Terhadap Kadar NADPH dan Nitric Oxide pada Sel Endotel yang Dipapar Glukosa Tinggi

### 8.1 Abstrak

Disfungsi endotel merupakan kerusakan lapisan sel endotel yang disebabkan oleh berbagai kondisi diantaranya adalah resistensi insulin, dan hiperglikemia. Disfungsi endotel dapat terjadi karena adanya pembentukan senyawa oksigen reaktif (ROS) sehingga dapat meningkatkan produksi radikal bebas, yang merupakan awal terjadinya stres oksidatif yang berdampak pada komplikasi diabetes melitus. Penanganan kondisi disfungsi endotel sebelum terjadi kerusakan lebih lanjut sangatlah penting. Penanganan disfungsi endotel dengan menggunakan antioksidan *Catechins Green tea GMB-4* GMB-4 yang diekstraksi dari Pusat Penelitian teh dan Kina (PPTK) Gambung Jawa Barat mempunyai kandungan *polyphenol* dan *flavonol* tinggi hingga 25-35% dan mempunyai efek sebagai antioksidan dengan kandungan *cathechins* berkisar antara 7,02-11,60% dimana berperan menghambat stres oksidasi pada endotel. Diharapkan dengan pemberian *Catechins Green tea GMB-4* GMB-4 dapat memperbaiki kerusakan endotel melalui penghambatan oksidasi NADPH dan peningkatan produksi NO sehingga dapat mencegah terjadinya komplikasi lanjut pada pasien dengan diabetes melitus.

Pada Penelitian ini menggunakan desain *true eksperimen* dengan pendekatan *post test only control group design*. Subjek penelitian ini adalah kultur sel endotel yang berasal dari *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* (HUVEC) yang dipapar glukosa 30 mM dan diberi perlakuan dengan *Catechins Green tea GMB-4* dengan 3 dosis yaitu 0,03 mg/ml; 0,3 mg/ml dan 3 ng/ml. Setelah pemberian selama 12 jam selanjutnya dilakukan analisa kadar NADPH dan Nitric Oxide (NO) dengan metode Colorimeter menggunakan NADPH Assay kit ab65349 dan Nitric Oxide Assay kit KGE001.

Dari hasil penelitian didapatkan ada penurunan kadar NADPH pada kultur HUVEC setelah perlakuan *Catechins Green tea GMB-4* pada dosis 0,3 mg/ml, dan terjadi peningkatan kadar Nitric oxide pada perlakuan dosis 0,03 mg/ml dan dosis 0,3 mg/ml. Dari hasil uji statistic one way Anova didapatkan nilai signifikan 0,000 untuk kadar NO dan NADPH. Sehingga dapat disimpulkan pemberian *Catechins Green tea GMB-4* pada dosis 0,3 mg/ml dapat menurunkan oksidasi NADPH dan meningkatkan produksi NO secara signifikan.

Pemberian *Catechins Green tea GMB-4* dapat mengaktifkan eNOS dan berperan dalam penghambatan oksidasi NADPH melalui *pospotidylinositol-3 kinase*, *cAMP dependent protein kinase* dan jalur Akt. *Catechins* juga mengkatalisis produksi NO dari L-arginin dan menghambat ROS dengan jalan mengikat ion metal pada reaksi redok, menghambat transkripsi faktor, menghambat enzim prooksidan dan meningkatkan enzim antioksidan.

**Kata kunci:** *Catechins Green tea GMB-4*, antioksidan, NO, NADPH

## 8.2 Latar Belakang

Diabetes merupakan masalah kesehatan global. *International Diabetes Federation* memprediksi individu dengan diabetes melitus akan meningkat. Pada tahun 2007 tercatat 240 miliar penderita diabetes melitus tipe II, jumlah ini diperkirakan akan meningkat menjadi 380 miliar pada tahun 2025 pada negara-negara dengan pendapatan rendah dan menengah (Juliana *et al.*, 2009). Dari seluruh penderita diabetes melitus di dunia, lebih dari 60 % berasal dari Asia. Prevalensi diabetes melitus pada penduduk Asia mengalami peningkatan dengan cepat pada dekade terakhir mencapai lebih dari 110 miliar individu pada tahun 2007 (Ark *et al.*, 2012).

Hiperglikemia terjadi karena terganggunya metabolisme glukosa pada tingkat seluler. Hiperglikemia mempunyai kontribusi besar dan merupakan kunci pathway metabolik yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan secara luas. Hal ini terjadi karena adanya reaksi nonenzimatik akibat kelebihan glukosa dan beberapa protein

seperti hemoglobin dan albumin yang menghasilkan *advanced glycosylated end product (AGE)*.

Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan (Ueno *et al.*, 2002). Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan prooksidan sehingga dapat meningkatkan produksi radikal bebas. Hal itu merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidasi (Casper *et al.*, 2005).

Stres oksidasi dapat menghambat fungsi endotel karena menyebabkan ketidakseimbangan produksi NO (Assunta *et al.*, 2009).

Disfungsi endotel merupakan kondisi dimana adanya ketidakseimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilatasi pada endotel pembuluh darah. Disfungsi endotel dapat disebabkan oleh berbagai kondisi diantaranya adalah kondisi resistensi insulin, hipertensi, obesitas, inflamasi, dislipidemia dan hiperglikemia (Inge *et al.*, 2010).

Disfungsi endotel pada hiperglikemia, dapat mengaktivasi transkripsi faktor NF $\kappa$ B sehingga menginduksi ekspresi adesi molekul, peningkatan kemokin, dan pengeluaran sitokin lainnya. Peningkatan ROS pada disfungsi endotel dapat menyebabkan ketidakseimbangan produksi NO sehingga memicu perkembangan aterosklerosis (Jean *et al.*, 2004).

Penggunaan antioksidan saat ini merupakan alternatif dalam pencegahan dan penanganan pada disfungsi endotel. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Keancy, 1994.

*Catechins Green tea GMB-4* mempunyai kandungan *polyphenol* dan *flavonol* dimana berperan dalam mengabsorbsi ion metal, menjaga keseimbangan metabolisme karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya adalah menghambat aktivasi enzim  $\alpha$  *glucosidase*, menghambat absorpsi glukosa pada intestinal, melindungi sel  $\beta$  pankreas, meningkatkan sekresi insulin, mengaktivasi AMPK, sebagai antioksidan yang bekerja menghambat stres oksidasi, sebagai antiinflamasi pada endotel dan proliferasi pada pertumbuhan sel endotel (Kati Hanhinhineva, et al., 2010). Diharapkan dengan pemberian *Catechins Green tea GMB-4* dapat memperbaiki kerusakan endotel sehingga dapat mencegah terjadinya komplikasi lanjut pada penyakit diabetes militus seperti terjadinya penyakit cardiovaskuler.

Pada studi yang dilakukan oleh Tsuneki, 2004 perlakuan pada hewan coba menunjukkan bahwa *polyphenols* dalam *catechin green tea* mempunyai efek sebagai antioksidan menurunkan tekanan darah, memproteksi perkembangan penyakit koroner dengan mengontrol kadar gula darah dan berat badan.

Pada penelitian ini, peneliti akan menganalisa secara jelaskan dan detail bagaimana mekanisme *Catechin green tea* sebagai antioksidan dapat menghambat oksidasi NADPH dan meningkatkan produksi Nitric Oxide pada disfungsi endotel dengan hiperglikemia.



## 8.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 8.3.1 Tujuan Penelitian

- Mengetahui mekanisme *Catechins Green tea GMB-4* sebagai antioksidan pada disfungsi endotel melalui mekanisme penghambatan oksidasi NADPH pada kultur HUVEC
- Mengetahui mekanisme *Catechins Green tea GMB-4* sebagai antioksidan pada disfungsi endotel melalui mekanisme peningkatan produksi *Nitric Oxide* pada kultur HUVEC
- Membuktikan pemberian perlakuan *Catechins Green tea GMB-4* dapat menghambat NADPH dan meningkatkan produksi NO pada kultur HUVEC yang dipapar glukosa

### 8.3.2 Manfaat

- Dengan mengetahui mekanisme *Catechins Green tea GMB-4* sebagai antioksidan sehingga dapat digunakan sebagai salah satu alternatif penanganan disfungsi endotel tidak hanya pada kasus hiperglikemia tetapi disfungsi endotel oleh berbagai penyebab.
- Dengan mengetahui mekanisme *Catechins Green tea GMB-4* sebagai antioksidan, pada disfungsi endotel maka dapat ditemukan metode yang tepat untuk penanganan disfungsi endotel sehingga dapat mencegah berbagai komplikasi pada diabetes melitus.

## 8.4 Metode Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni (*true eksperiment*) secara invitro dengan kultur HUVEC dengan *post test only control group design*. Tempat penelitian dilakukan di laboratorium biomedik dan laboratorium farmakologi Universitas Brawijaya Malang pada bulan April 2012 s/d Juni 2013.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian *catechin green tea* GMB-4 pada kultur HUVEC yang dipapar glukosa tinggi. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pemberian *catechin green tea* GMB-4 sebagai antioksidan dilihat dari mekanisme penghambatan NADPH dan peningkatan produksi NO. Pada penelitian ini menggunakan subyek penelitian: Sel huvec dari kultur *umbilical cord*

Cara pengambilan subyek penelitian dengan non probability sampling dengan teknik consecutive sampling, yaitu subyek penelitian yang memenuhi kriteria penelitian dimasukkan dalam penelitian sehingga jumlah subyek penelitian yang diperlukan terpenuhi. Pada penelitian ini subyek penelitian yang diperlukan untuk

masing-masing kelompok adalah 5 subyek penelitian sehingga total besar subyek penelitian sebanyak 20 subyek penelitian.

a. Alat dan Bahan

Kultur endotel diambil dari *umbilical cord* manusia dari RSUD Gambiran Kediri, kemudian dikultur dalam 4-8 passages pada flasks yang telah diberi gelatin coated. Menggunakan suplemen M199 dengan 15 % foetal bovine serum (FBS invitro), 0,1 mg/dl heprin. Setelah sel konvulen diberikan induksi 30 mM glukosa untuk membuat kondisi disfungsi endotel. Sebagai perlakuan dipapar dengan *catechin green tea* tiga dosis yaitu dosis I:0,03 mg/ml, dosis II: 0,3 mg/ml dan dosis III: 3 mg/ml. Pada kelompok kontrol negatif huvec tidak dipapar glukosa dan pada kontrol positif huvec dipapas glukosa tinggi tapi tidak di papar *catechin green tea*.

b. Analisa Nitric Oxide

Kultur Huvec dalam 5 well dishes (90 % konvulen) diberikan serum free medium selama 4 jam. Setelah diberikan treatment dengan *catechin green tea* 0,03 mg/ml; 0,3 mg/ml dan 3 mg/ml, NO dideteksi dengan *Colorimeter* menggunakan *Nitric Oxide Assay Kit* KGE001.

c. Deteksi NADPH

Sel dalam medium M199 berisi 1% FBS selama 12 jam, setelah diberikan treatment dengan *Catechins Green tea* GMB-4, dideteksi adanya penurunan oksidasi NADPH dengan menggunakan *Colorimeter* dengan NADPH Assay Kit ab65349.

d. Analisa data

Untuk menganalisa perbedaan masing-masing perlakuan dilakukan dengan menggunakan uji statistik One Way Anova. Masing-masing sampel perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Dengan menggunakan tingkat signifikansi 0,000

## 8.5 Hasil dan Pembahasan

Komplikasi kronis diabetes melitus dapat mengakibatkan kerusakan pembuluh darah terutama pada sel endotel pembuluh darah. Kerusakan sel endotel tersebut diakibatkan karena kondisi hiperglikemia yang berdampak pada peningkatan produksi ROS. Kerusakan endotel ini disebut juga disfungsi endotel. Pada Jalur Poliol dijelaskan bahwa peningkatan kadar glukosa dalam darah akan dirubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase (AR). Pemecahan glukosa menjadi sorbitol berakibat terjadinya penurunan rasio NADPH menjadi NADP<sup>+</sup>. Berkurangnya NADH didalam sel dapat menghambat aktivitas enzim lain yang membutuhkan NADPH (Nishimura, 2008). Pada kondisi glukosa normal konsentrasi sorbitol didalam sel rendah, tetapi pada kondisi hiperglikemia maka pemecahan glukosa melalui jalur poliol ini akan meningkat. Sehingga akan semakin

banyak glukosa yang direduksi menjadi sorbitol, dan konsentrasi sorbitol akan meningkat (Thornalley, 2007).

Pada kondisi hiperglikemia terjadi oksidasi NADPH yang akan berakibat terjadinya apoptosis sel, dimana proses ini akan menghasilkan produksi radikal bebas *superoxide* ( $O_2^-$ ). Peningkatan produksi *Reactive Oxigen Species* (ROS) yang merupakan senyawa turunan O<sub>2</sub> dan bersifat tidak stabil. Produksi ROS ini dapat terjadi pada waktu pembentukan *advance glycosylation ends products* (AGEs). Akumulasi AGEs pada jaringan merupakan sumber utama radikal bebas sehingga berperan dalam peningkatan stres oksidasi, serta terkait pada komplikasi diabetes melitus (Beckett, 2003).

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa sel endotel yang terpapar glukosa tinggi akan mengalami kerusakan atau apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa hiperglikemia akan meningkatkan radikal bebas yang berdampak pada kerusakan endotel. Kondisi rusaknya endotel inilah yang disebut dengan disfungsi endotel.

Pemberian *Catechins green tea* sebagai antioksidan bekerja sebagai scavenging free radical yang dapat mengaktifasi eNOS, dan berperan dalam penghambatan oksidasi NADPH. Oksidasi NADPH dapat terjadi pada proses proinflamasi, proliferasi dan proses apoptosis sel, dimana akan menghasilkan produksi radikal bebas *superoxide* ( $O_2^-$ ). Pada proses ini *catechins* dapat berperan membantu regulasi aktivitas oksidasi NADPH, mereduksi produksi  $O_2^-$  dan memproteksi NO dari perubahan *peroxynitride* (Scewe *et al.*, 2008).

Teori diatas dibuktikan dalam penelitian ini bahwa setelah pemberian *Catechin green tea* GMB-4 terjadi penurunan konsentrasi NADPH yang berarti terjadi penghambatan oksidasi NADPH melalui mekanisme mengikat ion logam yang terlibat dalam pembentukan spesies yang reaktif serta menghancurkan molekul yang rusak akibat stres oksidasi. Pada proses ini *catechins* dapat berperan membantu regulasi aktivitas oksidasi NADPH, mereduksi produksi  $O_2^-$  dan memproteksi NO dari perubahan *peroxynitride* (Scewe *et al.*, 2008).

Pada hiperglikemia selain terjadi peningkatan oksidasi NADPH juga terjadi penurunan produksi NO. Penurunan produksi NO karena menurunnya ketersediaan NO akibat kondisi stres oksidasi yang berkepanjangan akan berdampak pada terganggunya insulin reseptor. Penurunan aktivasi reseptor insulin ini akan menurunkan aktivasi PI3K, Akt dan penurunan produksi eNOS yang merupakan enzim yang berperan dalam produksi NO. Dengan penurunan produksi NO sebagai varodilatasi dan peningkatan MAPK serta endotelin yang merupakan vasokonstriksi maka akan terjadi ketidakseimbangan vasodilatasi dan vasokonstriksi sehingga terjadi kondisi disfungsi endotel (Naruse *et al.*, 2006).

NO pada sel endotel berperan dalam mengontrol tonus vasomotor dan homeostasis pembuluh darah. NO merupakan mediator seluler pada proses

fsiologi dan pada kondisi patologi. NO sintesis dari asam amino L-arginine menjadi L-citrulline oleh enzim NO-synthase (NOS) termasuk isoform *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS), *neuronal nitric oxide synthase* (nNOS), *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Brian, et all., 2005). Pada kondisi inflamasi karena hiperglikemia, produksi NO khususnya iNOS yang diekspresikan. Sedangkan eNOS dan nNOS disintesis pada kondisi fungsi tubuh normal atau sebagai homeostasis. NO seperti iNOS meningkat secara signifikan seiring dengan peningkatan mediator inflamasi yang distimulasi oleh respon makrofag seperti lipopolisakarida bakteri, interferon - $\gamma$  dan kemampuan sel pembunuh ( Michel,2011).

Pernyataan diatas ditunjang data pada kelompok kontrol positif yang diberikan glukosa tinggi 30 mM terjadi penurunan produksi NO dibanding dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan kondisi hiperglikemia mempengaruhi ketersediaan NO pada sel yang berakibat tergangguanya vasodilatasi dan terjadi disfungsi endotel.

Pemberian antioksidan *catechins green tea* GMB-4 dibuktikan dapat menghambat pelepasan NO dengan menekan ekspresi dan aktivitas enzim NOS. Hal ini dibuktikan pada penelitian ini terjadi peningkatan konsentrasi Nitric Oxide setelah pemberian perlakuan pada kultur Huvec dengan *Catechins Green tea* GMB-4.

Penelitian serupa dilakukan oleh Paquay et al., 2000 dengan menggunakan EGCG dan *catechins* lainnya diketahui dapat menghambat induksi mRNA dan aktivitas iNOS pada sel line setelah dipapar dengan LPS atau IFN- $\gamma$ . Penghambatan transkripsi iNOS dapat dilihat pada ikatan NF $\kappa$ B sebagai promoter terhadap dengan demikian akan menginaktivasi gene iNOS (Carmela et al., 2007).

*Catechins* di duga juga bekerja pada jalur PI3K dengan cara menginduksi eNOS untuk memproduksi NO dimana akan mengaktifasi *guanylate cyclase* untuk memproduksi *cyclic guanosine monophosphate* dan menyebabkan vasorelaksasi endotel dengan mengaktifasi jalur sinyal PI3K, protein kinase A dan *Akt-dependent* (Lorenz et al.,2004

## 8.6 Kesimpulan dan Saran

Dari hasil penlitian didapatkan bahwa pemberian *Catchins green tea* GMB-4 dapat menghambat oksidasi NADPH secara signifikan ( $p<0,005$ ) pada dosis 0,3 Mg/ml pada kultur HUVEC yang dipapar glukosa 30 Mm dan dapat meningkatkan produksi Nitric Oxide secara signifikan ( $p<0,005$ ) pada dosis 0,3 Mg/ml pada kultur HUVEC yang dipapar glukosa 30 Mm. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian *Catchins green tea* GMB-4 dapat menghambat oksidasi NADPH dan meningkatkan kadar Nitric Oxide pada disfungsi endotel.

## 8.7 Daftar Pustaka

- Assunta Maria Potenza, Sara Gagliardi, Carmela Nacci, Maria Rosaria Carratu and Monica Montagnani. Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Target. *Current Medical Chemistry*, 2009; 16: 94-112
- Ark J.van, Moser J, Lexis C.P.H, Bekkema F, Pop I, Horst C.V, Zeebregts C.J, Goor H.V, Wolffenbutted B.H.R, Hillebrands. Type 2 diabetes mellitus is associated with an imbalance in circulating endothelial and smooth muscle progenitor cell numbers. *Diabetologia* 2012;55:2501-2512
- Carmela S, Rosaria V, Beatrice S, Roberta D. B, Carmela F, Roberta M. 2007. Polypenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita Vol.43 No.4.* "394-405".
- Carmen C, Reys A, Rafael G. 2006. Benefical effect of green tea. *J American College of nutrition* 25(2). "79-99".
- Casper G. Schalkwijk and Coen D.A. Stehouwer. 2005. Vascular Complication in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science* 109. "143-159".
- Inge A. M. van den Oever, Hennie G. Raterman, Mike T. Nurmohamed, and Suat Simsek. 2010. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus, Mediators of Inflammation. Article ID 792393, 15
- Irukamaya-T. Miyauchi, T. Sakai, S. Kasuya Y. Goto, K. Yamaguchi, I. 2004. Activation of Peroxisome Proinflamator-activated Receptor-alpha Decreases Endothelin -1- induced p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 44. " S358 - S361".
- Jian Xu, Ming-Hui Z. 2009. Molecular Insights and Therapeutic Target for Diabetic Endothelial Dysfunction. *Circulation*, 120(13), " 1266-1286".
- Juliana C.N.C, Vasanti M, Weiping J, Takashi K, Chittaranjan S Y, Kun-Ho Y, Frank B. 2009. *Diabetes in Asia, Epidemiology, Risk factor, and Pathophysiology*. American Medical Association, JAMA Vol 301, No.20: 2129-2140
- Kowluru RA, Tang J, Kern TS. 2001. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experiment galactosemia. *Diabetes*, 50. "1938-1942".
- Lorenz M, Wassler S, Follmann E, Michaelis W, Dusterhoft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V. 2004. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatiylinositol-3-OH-kinase-cAMP- dependent protein kinase, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial- dependent vasorelaxation. *J Biol Chem*, 279. "
- Michael E.W, Naomi M.H, Eland A, Monika H, David F.K, James G.E, Elliott, John F.K, Joseph A.V. 2007. Acute EGCG suplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J.The American College of Nutrition*, 26(2). "95-102".
- Nishimura Yabe Chihiro, Masato Katsuyama, Kuniharu Matsuno. Physiological role of NOX/ NADPH oxidase the superoxide-generating enzyme. *J.Clin. Biochem. Nutr.*, 2012;50(1);9-22.
- Schewe T, Steffen Y & Sies H. 2007. How do dietary flavonols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys* 476,"102-106".



Ueno, Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T, 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr*; 132. "897-900".

Yuly Peristiowati, Retty Ratnawati, Indasah., 2013. Efek Isolat Catechins Dari Green Tea Gmb-4 Terhadap Kadar Nadph Dan Nitric Oxide Pada Sel Endotel Yang Dipapar Glukosa Tinggi





# BAB 9

## Efek Isolat Catechins dari Green Tea GMB-4 Terhadap Mobilisasi Endothelial Progenitor Cells (EPC) Melalui Aktivasi Stromal Cells Derived Factor-1 (SDF1- $\alpha$ ) dan CXCR4 pada Tikus Diabetes Melitus Tipe II

---

### 9.1 Abstrak

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolism yang ditandai dengan hiperglikemia yang dapat mempercepat terbentuknya senyawa oksigen reaktif. Pembentukan senyawa oksigen reaktif dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxigen Species* (ROS) yang merupakan awal terjadinya stres oksidasi. Stres oksidasi akan memicu perbaikan endotel melalui peningkatan mobilisasi EPC yang di pengaruhi oleh *Stromal cell-derived factor-1* (SDF-1 $\alpha$ ) dan reseptornya CXCR4, eNOS dan NO. Keadaan diabetes melitus menyebabkan ekspresi SDF-1 $\alpha$  menurun sehingga mempengaruhi penurunan mobilisasi EPC penurunan perbaikan vaskuler sehingga terjadi komplikasi seperti aterosklerosis, retinopati diabetes, dan penyakit kardiovaskuler lainnya. Penanganan disfungsi endotel dengan antioksidan *Catechins Green tea* berperan menghambat stres oksidasi pada endotel. *Catechins Green tea* merupakan *free radical scavenger* yang mempunyai kemampuan dalam mengaktivasi *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS), mengaktivasi kemokin *Stromal cell-derived factor-1* (SDF-1 $\alpha$  /CXCR4) yang berperan dalam meningkatkan kemotaksis EPC. Pada penelitian ini bertujuan membuktikan pemberian *catechins green tea* dapat meningkatkan mobilisasi EPC melalui aktivasi SDF-1 $\alpha$  dan Nitric Oxide.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Biomdik Universitas Brawijaya Malang, menggunakan 25 tikus strain wistar yang diberikan diet tinggi lemak selama 45 hari, dan diamati kadar SDF-1 $\alpha$ , NO dan mobilisasi EPC. Diet tinggi lemak yang diberikan terdiri dari campuran PARS 66.6%, tepung terigu 33.4%, kolesterol 1.9%, asam kolat 0,1% dan minyak babi 9,4 %. Total energi per gram pakan yang diberikan sebesar 4,03 kalori sedangkan jumlah kalori tikus dengan diet normal sebesar 3,43 kalori tiap gram pakan maka terjadi positif energy balance, selanjutnya di berikan ijeksi STZ low dose 30 mg/kgBB. Kondisi ini yang akan menyebabkan terjadinya resistensi insulin yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar glukosa darah lebih dari 250 mg/dl dan terjadi peningkatan kadar insulin. Setelah dipastikan terjadi resistensi insulin di lakukan pemberian CGT-GBM-4 secara oral dengan menggunakan sonde dengan dosis 20 mg/kg BB, 40 mg/kg BB dan 60 mg/kg BB selama 6 minggu. Tahap selanjutnya pemeriksaan kadar NO dengan menggunakan metode colory meter, pemeriksaan kadar SDF-1 $\alpha$  dengan Elisa Kit dan mobilisasi EPC dengan metode Flowcytometry. Selanjutnya data akan dilakukan analisa dengan uji statistik *one way anova*.

Dari hasil penelitian didapatkan pemberian *Catechins green tea* GMB-4 dapat meningkatkan kadar SDF-1 $\alpha$  dengan nilai p-value 0,014, Sehingga dapat di simpulkan bahwa CGT-GBM-4 dapat digunakan untuk perbaikan vaskuler pada kondisi hiperglikemia diabetes melitus melalui aktivasi SDF-1 $\alpha$  dan meningkatkan mobilisasi EPC.

**Kata Kunci:** Diabetes Melitus, Disfungsi Endotel, SDF-1 $\alpha$ , CXCR4, *Catechins green tea*

## 9.2 Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan kelompok sindrom metabolismik yang di tandai dengan adanya hiperglikemia sebagai efek dari metabolisme karbohidrat lemak dan protein. Dalam jangka waktu yang lama kondisi hiperglikemia dapat menyebabkan kerusakan jaringan, disebabkan akumulasi glukosa dalam sel sehingga dapat menimbulkan komplikasi pada diabetes melitus seperti penyakit jantung kroner, retinopati, nepropati dan neuropati (Cariello *et al.*, 2006; Hamfiner *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2003).

Pada tahun 2007 International Diabetes Federation melaporkan adanya peningkatan secara drastis prevalensi diabetes melitus di seluruh dunia. Diperkirakan pada tahun 2025 prevalensi diabetes melitus di dunia akan mengalami peningkatan dari 246 miliar menjadi 380 miliar orang (Chaiyasut *et al.*, 2011).

Penyebab diabetes melitus secara patofisiologi dihubungkan dengan produksi radikal bebas yang dapat mengganggu metabolism protein, DNA dan lemak pada

kehidupan organism sehingga meningkatkan reaksi oksidasi yang berdampak secara molekuler pada kerusakan jaringan dalam tubuh. Toksik seluler berasal dari over produksi radikal bebas yang disebut juga kondisi stress oksidasi. Selanjutnya over produksi radikal bebas akan menyebabkan kerusakan sel, degenerasi selluler dan komplikasi lainnya. Dilaporkan dalam studi invivo dan invitro kondisi hiperglikemia dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas dalam sel sehingga berdampak pada kerusakan selluler (Chaiyasut *et al.*, 2011).

Hiperglikemia terjadi karena terganggunya metabolisme glukosa pada tingkat selluler. Hiperglikemia mempunyai kontribusi besar dan merupakan kunci pathway metabolik yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan secara luas. Hal ini terjadi karena adanya reaksi nonenzimatis akibat kelebihan glukosa dan beberapa protein seperti hemoglobin dan albumin yang menghasilkan *advanced glycosylated end product* (AGE). Produksi AGE dapat menyebabkan terganggunya integritas sel dengan adanya modifikasi fungsi protein atau karena adanya pengaruh produk *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan senyawa oksigen reaktif (Thornally, 2002).

Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan (Ueno *et al.*, 2002). Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan prooksidan sehingga dapat meningkatkan produksi radikal bebas. Hal itu merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidasi (Casper *et al.*, 2005).

Stres oksidasi dapat menghambat fungsi endotel karena menyebabkan ketidakseimbangan produksi NO (Kadirvelu, 2002). Disfungsi endotel merupakan kondisi dimana adanya ketidakseimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilatasi pada endotel pembuluh darah. Disfungsi endotel dapat disebabkan oleh berbagai kondisi diantaranya adalah kondisi resistensi insulin, hipertensi, obesitas, inflamasi, dislipidemia dan hiperglikemia (Inge *et al.*, 2010).

Disfungsi endotel pada hiperglikemia, dapat mengaktivasi transkripsi faktor NF $\kappa$ B sehingga menginduksi ekspresi adesi molekul, peningkatan kemokin, dan pengeluaran sitokin lainnya. Peningkatan ROS pada disfungsi endotel dapat menyebabkan ketidakseimbangan produksi NO sehingga memicu perkembangan aterosklerosis (Jean *et al.*, 2004).

Untuk itulah perlu adanya suatu penanganan pada disfungsi endotel sebelum terjadi kerusakan lebih lanjut. Beberapa tindakan penanganan terjadinya disfungsi endotel yang sudah pernah dilakukan adalah pemberian suplemen L- arginin, terapi fibrate, pemberian folate, pengobatan dengan statins, penghambatan AGE, penghambatan PKC, penghambatan ACE dan antioksidan. (J. Callaes *et al.*, 2001).

EPC merupakan sel-sel yang memiliki kemampuan untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi sel-sel endotel. EPC merupakan bagian dari sel induk yang



bersifat lebih matang dan unipoten. Secara klinis, EPC dapat memperbaiki kondisi-kondisi penyakit yang diawali dengan kerusakan sel-sel endotel, baik secara anatomis/struktural maupun fungsional, melalui mekanisme neovaskularisasi (Carmen, *et al.*, 2012). Pada pasien dengan diabetes melitus tipe I dan II dapat mengalami penurunan jumlah EPC (Tepper *et al.*, 2002). Diketahui EPC yang dilihat dari pasien dengan diabetes melitus mengalami kerusakan secara fungsinya dalam melakukan adesi, proliferasi dan tubulisasi. Tidak terkontrolnya peningkatan kadar glukosa dalam plasma menyebabkan peningkatan kadar glikasi hemoglobin dan peningkatan kadar glukosa plasma secara bebas yang berkorelasi terhadap penurunan jumlah EPC (Tepper *et al.*, 2002).

Penggunaan antioksidan saat ini merupakan alternatif dalam pencegahan dan penanganan pada disfungsi endotel. Dari berbagai literatur disebutkan bahwa penggunaan antioxidant dapat menurunkan dan menghambat stress oksidasi pada kondisi hiperglikemia. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Keaney, 1994 bahwa antioksidan dalam vitamin C dan E dapat menurunkan P-selectin pada pasien hiperkolesterol. Ini diyakini bahwa antioksidan bisa sebagai penanganan kondisi disfungsi endotel (Anderson, *et al.*, 2000). Sehingga penggunaan antioksidan sepertinya mulai dikembangkan pada disfungsi endotel. Pada penelitian yang dilakukan oleh Chaiyasut *et al.*, 2011 menggunakan komponen phenolic fermentasi dalam menghambat terjadinya stress oksidasi pada tikus diabetik.

Teh merupakan jenis minuman yang paling banyak dikonsumsi manusia setelah air dan diperkirakan manusia mengkonsumsi teh tak kurang dari 120 ml setiap harinya (Yang & Landau., 2000; McKay & Blumber, 2002). Konsumsi the di Indonesia masih sangat rendah yakni 0,2 kg/kapita/tahun. Diduga hal ini karena masyarakat Indonesia belum banyak mengetahui tentang khasiat the bagi kesehatan. Walaupun minum the sudah menjadi semacam budaya setidaknya dikalangan masyarakat Jawa/Sunda, namun teh belum menjadi primadona untuk masyarakat Indonesia (Sibuea., 2003). Di Negara Cina minum the telah dikenal lebih dari 4000 tahun. Tradisi pengobatan Cina telah merekomendasikan minum the hijau sebagai minuman untuk mencegah dan mengobati berbagai penyakit (Brannon, 2007). Komponen biotifit utama dalam teh adalah polifenol khususnya *catechins* yang berperan sebagai antioksidan. Senyawa polifenol berperan sebagai penangkap radikal bebas hidroksil (OH) sehingga tidak mengoksidasi lemak, protein, dan DNA dalam sel. Kemampuan polifenol khususnya *catechins* menangkap radikal bebas 100 kali lebih efektif dibanding vitamin C dan 25 kali lebih efektif dibanding vitamin E (Sibuea, 2003). *Catechins* banyak terdapat pada teh hijau yaitu the yang diproses tanpa oksidasi enzimatis. *Catechins* akan berubah menjadi theaflavin dan thearubigin pada saat proses reaksi oksidasi enzimatis. Oleh karena itu diyakini *catechins green tea* lebih berkhasiat dibanding dengan teh Oolong (teh semi reaksi oksidasi enzimatis) dan the

hitam (the yang diproses dengan reaksi oksidasi enzimatis secara penuh) ( Yudana & Luize, 2006; Sibuea, 2003).

*Catechins Green tea* mempunyai kandungan *polyphenol* dan *flavonol* dimana berperan dalam mengabsorbsi ion metal, menjaga keseimbangan metabolisme karbohidrat pada diabetes melitus diantaranya adalah menghambat aktivasi enzim  $\alpha$  *glucosidase*, menghambat absorpsi glukosa pada intestinal, melindungi sel  $\beta$  pankreas, meningkatkan sekresi insulin, mengaktifasi AMPK, sebagai antioksidan yang bekerja menghambat stres oksidasi, sebagai antiinflamasi pada endotel dan proliferasi pada pertumbuhan sel endotel (Kati Hanhinhineva, *et al.*, 2010).

Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Teh dan Kina (PPTK) Gambung Jawa Barat teh selain mengandung polifenol hingga 25-35% juga mengandung metilxantin, asam amino, peptides, karbohidrat, vitamin (C,E, dan K), karotenoid, mineral seperti kalium, magnesium, mangan, fluor, zinc, selenium, copper, iron, calcium dan alkaloid lain. Kandungan polifenol teh yang berasal dari Indonesia mempunyai komponen aktif untuk kesehatan  $\pm$  1,34 kali lebih tinggi dibanding negara lain. Catechins merupakan senyawa polifenol utama pada teh sebesar 90% dari total kandungan polifenol. Rata-rata kandungan catechins pada teh Indonesia khususnya klon Gambung 4 dan 9 berkisar antara 7,02-11,60% b.k, sedangkan pada negara-negara lain hanya berkisar 5,06-7,4% b.k. (PTPN VIII, PPTK Gambung dan ATI, 2007). Pada penelitian ini *catechins green tea* yang digunakan berasal dari klon Gambung-4 PPTK Gambung Jawa Barat yang di ekstraksi oleh IPB yang telah dilakukan penelitian oleh Mariam, 2011 dengan hasil kandungan katekinnya (komponen utama campuran EGCG dan ECG = 54,4: 17,6) dari teh hijau adalah sekitar 2,68% dari 25 gram berat kering teh hijau atau 10,76%.

Diharapkan dengan pemberian *catechins green tea* GMB-4 dapat memperbaiki kerusakan endotel sehingga dapat mencegah terjadinya komplikasi lanjut pada penyakit disabetes militus seperti terjadinya penyakit cardiovaskuler. Pada penelitian yang dilakukan dengan hewan coba diketahui bahwa *Catechin green tea* menghambat proses penyakit degeneratif, mempunyai aktivitas sebagai antiproliferasi pada sel hepatoma dan juga mempunyai aktivitas hipolipidemik pada hepar tikus yang dibuat hepatoma (Vanessa *et al.*, 2004).

Pada studi yang dilakukan oleh Tsuneki, 2004 perlakuan pada hewan coba menunjukkan bahwa *polyphenols* dalam *catechin green tea* mempunyai efek sebagai antioksidan menurunkan tekanan darah, memproteksi perkembangan penyakit koroner dengan mengontrol kadar gula darah dan berat badan.

Pada penelitian ini, peneliti akan menganalisa secara jelaskan dan detail bagaimana mekanisme *Catechin green tea* GMB-4 sebagai antioksidan dan modulasi mobilisasi EPC pada disfungsi endotel dengan hiperglikemia.



## 9.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 9.3.1 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa Pemberian *catechins green tea* GMB-4 sebagai antioxidan dapat meningkatkan kadar SDF-1 pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus Tipe 2.
2. Membuktikan bahwa Pemberian *catechins green tea* GMB-4 sebagai antioxidan dapat meningkatkan kadar CXCR-4 pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus Tipe 2.

### 9.3.2 Manfaat Penelitian

1. Manfaat akademis

Menambah wawasan ilmu pengetahuan mengenai pengaruh *catechine green tea* GMB-4 dalam meningkatkan mobilisasi EPC melalui peningkatan SDF-1 $\alpha$ , CXCR-4 dan *Nitric Oxide*.

2. Manfaat Klinis

Diharapkan pemberian *catechine green tea* dapat digunakan sebagai alternatif pencegahan dan penanganan pada pasien dengan disfungsi endotel khususnya pada kasus diabetes melitus dalam upaya pencegahan terjadinya komplikasi diabetes melitus.

## 9.4 Metode Penelitian

Rancangan penelitian merupakan penelitian *true eksperimental* dengan pendekatan *post test only control group design*.

Secara invivo dengan menggunakan hewan coba pada tikus Strain Wistar yang dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok pertama adalah kontrol negatif tikus non diabet tanpa perlakuan, Kelompok 2 merupakan kontrol positif dimana Tikus dibuat diabet dengan diinjeksi Streptozotocin (STZ). Kelompok 3 merupakan Tikus diabet dengan perlakuan *catechin green tea* GMB-4 20 mg/kg, Kelompok 4 merupakan Tikus diabet dengan perlakuan *catechin green tea* GMB-4 40 mg/kgBB dan Kelompok 5 merupakan Tikus diabet dengan perlakuan *catechin green tea* GMB-4 60 mg/kgBB.

### 9.4.1 Bahan dan Alat Penelitian

- a. Bahan Pembuatan Tikus DM tipe 2

Bahan untuk pembuatan Tikus DM tipe II meliputi Streptozotocin (STZ) *low dose* 30 mg/kg BB, sputis disposable 3 cc, normal salin dan alkohol 70%.

b. Bahan Pemberian Diit Hiperkolesterol

Bahan untuk pembuatan diet hiperkolesterol meliputi pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/ PARS 30 gram, air 20 cc, tepung terigu 30 gram (Muwarni,2006). Diet aterogenik yang terdiri dari pakan standart ( PARS 30 gram dan tepung terigu 30 gram ) yang ditambahkan kuning telur bebek (2 gram ), asam kolat (0,06 gram ), minyak babi 3,22 gram (3,75 cc ), minyak kambing 4 gram (4 cc), minyak kelapa 0,4 gram (0,4 cc ), air ( 25cc ) (Mu'nisa.A, 2003).

c. Bahan Pemeriksaan SDF1- $\alpha$

Bahan pemeriksaan SDF-1 $\alpha$  meliputi Rat SDF-1 $\alpha$  ELISA Kit (Bioassay Technology Lab, USA), Elisa Reader, mikropipet, vortec, tube dan Rb SDF-1 $\alpha$  antibody (BIOSS, USA), preparat aorta, parafin blok.

d. Bahan Pemeriksaan CXCR4

Bahan pemeriksaan CXCR4 meliputi preparat aorta dengan parafin blok, Rb CXCR4 antibody (BIOSS,USA).

e. Bahan Pemeriksaan CD 34

Bahan pemeriksaan CD 34 meliputi antibody CD 34 (Biolegend, USA), FITC anti-human CD4 (Biolegend, USA), PBS.

f. Bahan Pemeriksaan CD133

Bahan pemeriksaan CD133 meliputi antibody CD133 ( biolegend,USA), anti CD 133 PERCP (Biosence), PBS.

#### 9.4.2 Prosedur Penelitian

a. Prosedur Pembuatan Tikus Diabetes Melitus Tipe II

Tikus wistar dipilih berdasarkan kriteria inklusi sebanyak 25 ekor umur 2 bulan dengan berat badan 150-200 gr. Kemudian dikondisikan pada kandang tempat pemeliharaannya selama 2 minggu dengan diberikan diet *chow standart* pada kelompok kontrol negatif, sedangkan pada kelompok kontrol positif diberikan pakan kaya lemak dengan komposisi pakan (80%), lemak babi (15%) dan kuning telur bebek (5%) (Syamsul *et al.*, 2011). Jumlah konsumsi makanan setiap harinya maksimum sebanyak 25 gr/tikus/hari. Hewan uji DM tipe 2 dapat dilihat dengan parameter uji kadar glukosa darah preprandial dan postprandial. Pemberian diit tinggi lemak selama 45 hari. Kemudian diinjeksi secara intraperitoneal dengan Streptozotocin (STZ) *low dose* 30 mg/kg BB intraperitoneal (Zhang *et al* 2008; LAB Fisiologi FKUB). Setelah 3 hari pasca induksi STZ dilakukan pemeriksaan gula darah setelah dipuasakan selama 6 jam. Bila kadar gula darah mencapai >250 mg/dl menggunakan *Blood glucose Test Meter*, sudah dikategorikan hiperglikemia. Selain dilakukan pemeriksaan gula darah juga dilakukan pemeriksaan kadar insulin untuk menentukan telah

terjadi resistensi insulin dengan pemberian STZ *low dose* dengan diit tinggi lemak.

**b. Pemberian diet hiperkolesterol (aterogenik)**

1. Pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/ PARS 30 gram, air 20 cc, tepung terigu 30 gram (Muwarni,2006).
2. Diet aterogenik yang terdiri dari pakan standart ( PARS 30 gram dan tepung terigu 30 gram ) yang ditambahkan kuning telur bebek (2 gram ), asam kolat (0,06 gram), minyak babi 3,22 gram (3,75 cc ), minyak kambing 4 gram (4 cc), minyak kelapa 0,4 gram (0,4 cc ), air ( 25cc ) (Mu'nisa.A, 2003).

**c. Prosedur Ekstrak *Catechine green tea***

Ekstrak *catechins green tea* dengan kemurnian 80% dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, program studi Kimia, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Bandung dan laboratorium pengolahan teh hijau di Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung, Ciwidey, Bandung

**d. Perlakuan pemberian *Catechine green tea***

Sebelum diberikan perlakuan tikus diadaptasikan dulu selama 2 minggu dikankang dengan diit normal. Setelah pemberian diit hiperkolesterol selama 5 minggu baru dilakukan pemberian *Catechins green tea* GMB-4.

*Catechins green tea* GMB-4 diberikan secara sonde pada tikus sesuai dosis dengan maksimal pemberian 10 cc/ hari. Sebelum memegang tikus, sonde harus sudah diisi dengan dosis serta gelembung udara tidak boleh muncul karena akan membuat tikus kesakitan dan berontak. Sonde dilengkapi dengan jarum yang ujungnya bulat untuk mengurangi kemungkinan dari injeksi trakea (Di Carlo and Oehme, 1992).

Pada waktu memberikan dosis, kulit punggung dan leher tikus harus dipegang. Posisi antara kepala, leher dan punggung tikus berada pada garis yang lurus. Alternatif lainnya adalah bahu tikus dapat dipegang dengan menggunakan telunjuk dan jempol di kedua sisi kepala. Tujuannya untuk memegang dengan erat saat pemberian dosis sehingga dapat mengontrol gerakan tikus. Tikus dapat ditempatkan di meja atau diletakkan di dada untuk dapat mengendalikan hewan coba.

Apabila tikus sudah siap maka sonde dapat dimasukkan ke mulut dan turun sampai ke esofagus. Jika tikus tidak berontak maka sonde tidak dipegang terlalu erat sehingga akan mengurangi esofagus robek. Apabila tikus tetap tetap berontak, maka sonde harus dicabut untuk membiarkan tikus tenang, kemudian dapat diulangi. Pemberian dosis dapat dilakukan secara perlahan. Terlalu cepat

dapat menyebabkan cairan dimuntahkan (*vomit*) ke esofagus sehingga hasil tidak akurat. Sonde dapat ditarik dari mulut setelah selesai memberikan dosis dan hewan diamati tanda-tanda stres atau kesulitan pernafasan (Di Carlo and Oehme, 1992).

Volume dosis yang diberikan pada hewan coba jangan terlalu banyak karena dapat mengakibatkan efek yang kurang baik bagi hewan. Larutan tes untuk hewan coba adalah 0,005 – 0,01 ml/g BB sedangkan volume maksimum adalah 0,02 ml/g BB. Kerugian dari metode pemberian dosis secara oral adalah interaksi langsung antara tikus dengan tangan manusia (*handling*) yang dapat meningkatkan *plasma corticosterone* sehingga akan mempengaruhi hasil akhir dan menyebabkan kematian karena kebocoran esofagus atau radang paru-paru (Di Carlo and Oehme, 1992).

Setelah 6 minggu pemberian *Catechins green tea* GMB-4 tikus dikalukan pembedahan dengan cara tikus diberikan anastesi lokal dengan eter selanjutnya dilakukan pembedahan daerah perut sampai diafragma. Selanjutnya diambil darah dari jantung dengan menggunakan sputit sebanyak 5 ml untuk diakukan pemeriksaan lanjut. Setelah diambil darah, tikus yang telah mati dikubur (dipendam) di tempat yang telah disediakan di laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya.

#### e. Prosedur Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

Untuk pengukuran kadar gula darah menggunakan *Blood glucose Test Meter* dengan menggunakan darah tepi untuk pemeriksaan maintenance (Chen *et al.*, 2008). Sedangkan untuk pemeriksaan pada akhir perlakuan dengan metode cobas Miras.

#### f. Prosedur Pemeriksaan Kadar Insulin

Untuk pemeriksaan kadar insulin serum tikus wistar digunakan standart rat insulin solution 5mg/ml atau 500 $\mu$ l. Darah yang diambil dari jantung sebanyak 5 ml selanjutnya diputar menggunakan sentrifugase dengan kecepatan 3000 rpm selama 7 menit untuk mengambil serumnya. Serum yang diambil disimpan pada suhu -20°C selama siap untuk diukur. Pengukuran menggunakan Rat Insulin ELISA Kit (Wang *et al.*, 2007). Pada penelitian ini menggunakan Rat Insulin ELISA Kit (INS). Dengan protocol terlampir.

#### g. Prosedur Pengukuran SDF1- $\alpha$ dengan ELISA pada hewan coba

Deteksi adanya aktivasi SDF1- $\alpha$  dan CXCR4 dilihat pada aorta tikus dengan pemeriksaan Imunohistokimia dengan menggunakan Antibody SDF1- $\alpha$  dan CXCR4 (Hamed *et al.*, 2010). Pemeriksaan Immunohistokimia sebagai berikut:

a) Pembuatan blok parafin

Jaringan yang diambil pada saat operasi difiksasi dengan bufer formalin 4%. Untuk pemeriksaan analisa histopatologik jaringan tumor ovarium dilakukan pengamatan makroskopik untuk menentukan ukuran tumor, dilanjutkan dengan proses jaringan untuk pembuatan preparat. Pembuatan sediaan parafin blok dilakukan sebagai berikut: Jaringan dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit. Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6um dengan rotary microtome. Kemudian dilekatkan pada objek glas ber polylisin (PDL). Dari tiap blok paraffin yang dipotong, satu sediaan diwarnai dengan hematoksilin eosin untuk pemeriksaan histopatologi, sementara satu sediaan lainnya digunakan untuk pewarnaan immunohistokimia. Preparat kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan lapangan besar (400x) untuk menentukan jenis dan tipe kanker serta penentuan grading/derajat diffrensiasi histopatologi.

b) Pembuatan Imunohistokimia.

Metode Immunohistokimia dilakukan dengan menggunakan metode *streptavidin-biotin-peroksidase* yang dilabel dengan *streptavidin biotin* (Pierce, Carpinteria, USA). Sebelum proses pewarnaan, setiap sediaan preparat dideparaffinisasi dengan xylene selama 15 menit dan direhidrasi dengan alkohol 100% dan alkohol yang konsentrasiya diencerkan menjadi 90%, 80%, 70% dan 60% selama masing masing 10 menit. Sediaan kemudian dicuci dengan dH<sub>2</sub>O sebanyak 2 kali selama 5 menit dan diinkubasi dengan larutan PBS selama 5 menit.

Selanjutnya, sediaan preparat diletakkan ke dalam glass box yang berisi citrate buffer kemudian dimasukkan kedalam autoclave selama 15 menit untuk dioptimalkan antigenicity-nya. Sediaan didinginkan pada suhu ruangan selama 1 jam, dan setelah dikeringkan sebentar, jaringan diberi batas dengan menggunakan pap pen. Sediaan dicuci dengan dH<sub>2</sub>O selama 5 menit dan PBS selama 5 menit sebelum diinkubasi dengan hydrogen peroksidase 0.3% selama 15 menit.

Setelah endogenous peroksidasenya diblok, sediaan diinkubasi dengan blocking solution selama 30 menit untuk memblok avidin yang terdapat pada jaringan. Kemudian, sediaan diinkubasi overnight pada suhu -4°C dengan primer antibodi (anti SDF-1α Bioss bs-0783R dan CXCR4 Bioss bs-

1011R) yang diencerkan 1:100. Sediaan dicuci lagi sebanyak 3 kali dengan dH<sub>2</sub>O sebelum diinkubasi dengan secondary antibody dan streptavidin-HRP masing masing selama 30 menit. Untuk pewarnaan digunakan 3,3 diamino benzidine tetrahydrochloride kurang lebih 10 menit sampai didapatkan reaksi pewarnaan yang dapat dideteksi dengan pemeriksaan mikroskopis. Setelah itu diwarnai lagi dengan hematoksilin untuk memperjelas inti sel selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.

Terakhir, sediaan diberi malinol sebelum ditutup dengan deg glass. Hasil dari pemeriksaan immunohistokimia akan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang terwarna dari pewarnaan, yaitu dikatakan positif bila terdapat imunostaining inti dan lebih dari 5% sel tumor positif perwarnaan. Evaluasi immunohistokimia ini akan dilakukan secara individual oleh konsulen Patologi dan peneliti untuk mendapatkan hasil yang akurat.

c) Interpretasi hasil Imunohistokimia.

Metode Perhitungan terhadap hasil perwarnaan imunohistokimia:

1. Penelitian ini menggunakan jaringan Aorta tikus wistar dengan DM Tipe II
2. Dengan nilai konfiden interfal 90% dan kekuatan uji 80% maka didapatkan, bahwa masing-masing kelompok harus terdiri dari 5 sampel
3. Terdapat 25 slide (jumlah slide), yang terdiri dari 5 slide x 5 kelompok Pemeriksaan
4. Setiap sample jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4um, kemudian dideteksi:
  - a. Pemeriksaan Hematoxilen-Eosin
  - b. Pemeriksaan Imunohistokimia SDF-1 $\alpha$  dan CXCR4
5. Untuk keperluan perhitungan, slide yang sudah berkode ditutup nomer kodennya dan diberi nomer baru secara acak. Sehingga pemeriksa tidak mengetahui slide yang diperiksa merupakan sample kelompok apa (Blind)
6. Pemeriksa terdiri dari 2 orang, masing-masing adalah:
7. Pemeriksaan dan perhitungan sample dilakukan secara terpisah antara kedua pemeriksa.
8. Pemeriksaan dan perhitungan jumlah sel endotelyang mengekspresikan SDF-1 $\alpha$  dan CXCR4 diamati dengan warna coklat pada sitoplasma - dilakukan menurut Soini et al, (1998) dan Pizem and Cor (2003) yang dimodifikasi, masing-masing slide pada bidang pandang dengan perbesaran 1000x dan sebanyak 20 lapang pandang.

9. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang
10. Dilakuakan pemulasan Hematoxilen-Eosin yang digunakan sebagai pembanding structural.
11. Analisis statistik bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya.
12. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi lebok kurang 1500 sel (Soini et al, 1998; Pizem and Cor, 2003).

## 9.5 Hasil dan Pembahasan

### 9.5.1 Hasil Penelitian

a. Pengaruh pemberian *catechins green tea GMB-4* terhadap peningkatan Kadar SDF-1  $\alpha$  pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2 dengan Pemeriksaan ELISA

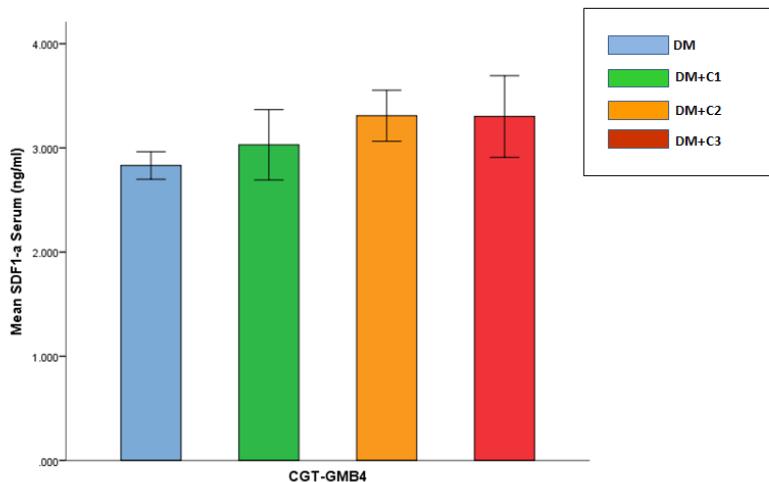
Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov diketahui bahwa data kadar SDF-1 $\alpha$  dengan pemeriksaan Assay ELISA Kit secara signifikan terbukti berdistribusi normal ( $P=0,745$ ). Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea GMB-4* secara signifikan dapat berpengaruh terhadap kadar SDF-1 $\alpha$  pada plasma dengan pemeriksaan Assay Elisa Kit ( $p=0,05$ ). Adapun hasil uji lanjut analisis ini dengan *Post Hoc Tests* ditampilkan pada tabel dan gambar berikut:

**Tabel 9.1**

Kadar SDF-1 $\alpha$  plasma pada tikus strain *winstar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang di berikan perlakuan *catechins green tea GMB-4*

No	Perlakuan	Mean (ng/ml) ± Standart Deviasi
1.	Kontrol Negatif (N)	3,37150±0,056883
2.	Kontrol Positif (DM)	2,83150±0,132324
3.	DM+C1	3,03000±0,338102
4.	DM+C2	3,30900±0,244999
5.	DM+C3	3,30175±0,392044

Catatan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan pengaruh yang signifikan



**Gambar 9.1**

Diagram batang rata-rata kadar SDF1 $\alpha$  serum. Analisis kadar serum SDF 1- $\alpha$  tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan ( $p>0.05$ ). Keterangan: C (control), DM, DM+C1 (CGT 20 mg/kg BB), DM+C2 (CGT 40 mg/kg BB), DM+C3 (CGT 60 mg/kg BB).

Berdasarkan hasil uji statistik perlakuan CGT GMB-4 pada semua dosis tidak menunjukkan perbedaan bermakna dalam meningkatkan kadar SDF1 $\alpha$  serum dibandingkan kelompok tikus diabetes melitus tipe 2. Namun kadar SDF-1 di serum DM menurun dibandingkan kelompok non DM, meskipun peneurunannya tidak bermakna.

**b. Pengaruh perlakuan *catechins green tea* GMB-4 terhadap Ekspresi SDF-1 $\alpha$  pada aorta tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2**

Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov diketahui bahwa data Ekspresi SDF-1 $\alpha$  dengan pemeriksaan Imunohistokimia pada aorta secara signifikan terbukti berdistribusi normal ( $P= 0,409$ ). Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap ekspresi SDF-1 $\alpha$  pada aorta dengan pemeriksaan Imunohistokimia ( $p=0,000$ ). Adapun hasil uji lanjut analisis ini dengan Post Hoc Tests ditampilkan pada tabel dan gambar berikut:

**Tabel 9.2**

Ekspresi SDF-1 $\alpha$  pada aorta tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang di berikan perlakuan *catechins green tea GMB-4*

No	Perlakuan	Mean (ng/ml) ± Standart Deviasi
1.	Kontrol Negatif (N)	9,2500±1,5000 <sup>a</sup>
2.	Kontrol Positif (DM)	4,5000±1,129099 <sup>b</sup>
3.	DM+C1	13,2500±0,50000 <sup>c</sup>
4.	DM+C2	15,7500±2,06155 <sup>c</sup>
5.	DM+C3	21,2500±1,2583 <sup>d</sup>

Catatan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan pengaruh yang signifikan

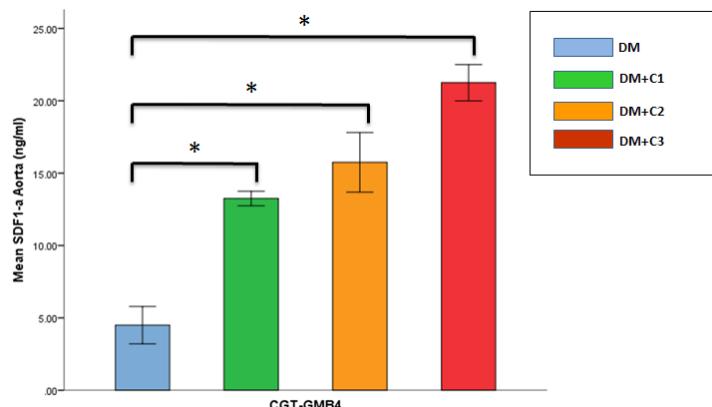
**Gambar 9.2**

Diagram batang rerata ekspresi SDF-1 $\alpha$ . Perlakuan CGT GMB-4 pada semua dosis 20, 40 dan 60 mg/kgBB secara bermakna meningkatkan ekspresi SDF-1 $\alpha$  diaorta dibanding kelompok kontrol DM Keterangan: C (control), DM, DM+C1 (CGT 20 mg/kg BB), DM+C2 (CGT 40 mg/kg BB), DM+C3 (CGT 60 mg/kg BB).

Berdasarkan hasil uji statistik perlakuan CGT GMB-4 pada semua dosis 20, 40 dan 60 mg/kgBB efektif meningkatkan ekspresi SDF-1 $\alpha$  di aorta dibandingkan kelompok tikus diabetes melitus dengan nilai signifikan 0.000  $p<0,05$ .

#### c. Pengaruh perlakuan *catechins green tea GMB-4* terhadap Ekspresi CXCR-4 pada aotra tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2

Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov diketahui bahwa data Ekspresi CXCR4 dengan pemeriksaan Imunohistokimia pada aorta secara signifikan

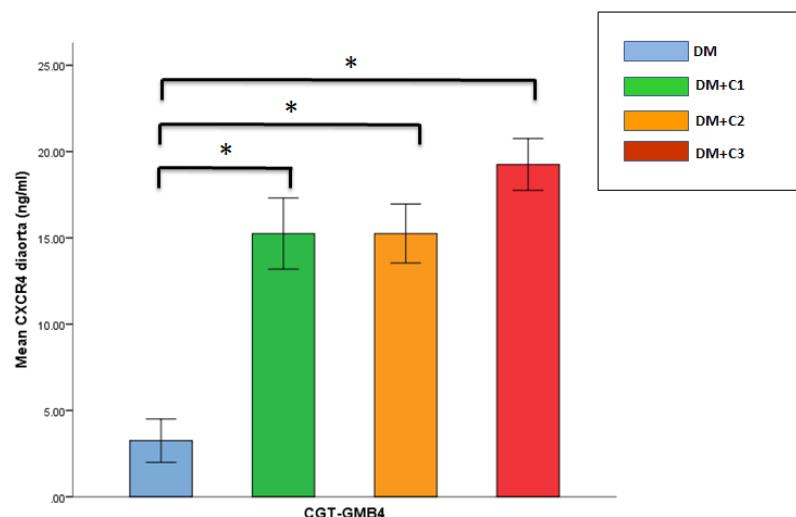
terbukti berdidistribusi normal ( $P = 0,242$ ). Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap ekspresi CXCR4 pada aorta dengan pemeriksaan Imunohistokimia ( $p=0,00$ ). Adapun hasil uji lanjut analisis ini dengan *Post Hoc Tests* ditampilkan pada tabel dan gambar berikut:

**Tabel 9.3**

Ekspresi CXCR4 pada Aorta tikus *strain wistar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang di berikan perlakuan *catechins green tea* GMB-4

No	Perlakuan	Mean ± Standart Deviasi
1.	Kontrol Negatif (N)	$4.2500 \pm 0.95743^a$
2.	Kontrol Positif (DM)	$3.2500 \pm 1.25831^b$
3.	DM+C1	$15.2500 \pm 2.06155^c$
4.	DM+C2	$15.2500 \pm 1.70783^c$
5.	DM+C3	$19.2500 \pm 1.5000^d$

Catatan: (\*) menunjukkan perbedaan pengaruh yang signifikan

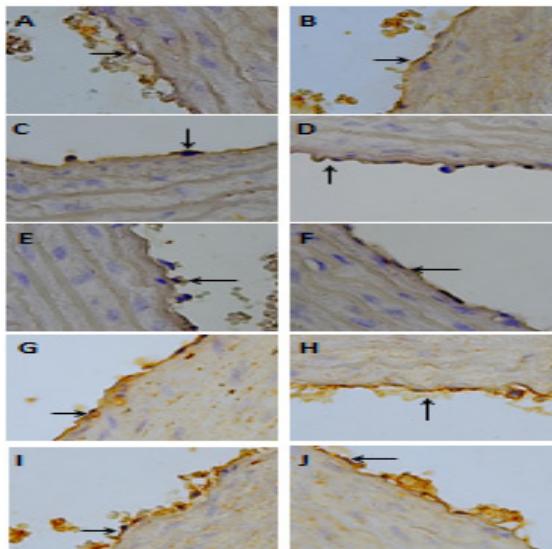


**Gambar 9.3**

Ekspresi CXCR-4 pada aorta tikus *strain wistar* pada masing-masing kelompok perlakuan. Perlakuan CGT GMB-4 pada semua dosis 20,40 dan 60 mg/kgBB secara bermakna meningkatkan ekspresi CXCR4 di aorta dibanding kelompok kontrol DM Keterangan: C (control), DM, DM+C1 (CGT 20 mg/kg BB), DM+C2 (CGT 40 mg/kg BB), DM+C3 (CGT 60 mg/kg BB).

Berdasarkan hasil uji statistik perlakuan CGT GMB-4 pada semua dosis 20, 40 dan 60 mg/kgBB efektif meningkatkan ekspresi CXCR4 di aorta dibandingkan kelompok tikus diabetes melitus dengan nilai signifikan 0.000 p<0,05.

Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi SDF1- $\alpha$  dan CXCR-4 pada aotra tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus Tipe 2



**GAMBAR 9.4**

Ekspresi SDF-1 (deret kiri) dan CXCR4 (deret kanan) pada Aorta *strain winstar* dengan diabetes melitus Tipe 2 yang di beri perlakuan *catechins green tea* GMB-4 dengan pemeriksaan Imunohistokimia.

Keterangan: A,B Kontrol Negatif (N); C dan D Kontrol Positif (DM); E dan F Perlakuan I (DM + CGT-GMB-4 20mg/kgBB); G dan H perlakuan II (DM + CGT-GMB-4 40mg/kgBB); I dan J Perlakuan III (DM + CGT-GMB-4 60mg/kgBB)

## 9.5.2 Pembahasan

- a. Pemberian *catechins green tea* GMB-4 sebagai antioxidant dapat meningkatkan kadar SDF-1 pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2

Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap kadar SDF-1 $\alpha$  pada plasma dengan pemeriksaan *Assay Elisa Kit* ( $p=0,05$ ). Berdasarkan hasil analisis *Post hoc test* diketahui bahwa CGT-GMB-4 secara signifikan dapat meningkatkan Kadar SDF-1 $\alpha$  plasma. Pemberian CGT-GMB-4 pada dosis 20 mg/kg BB tidak signifikan meningkatkan kadar SDF-1 $\alpha$  plasma dibanding kontrol. Sedangkan



pemberian CGT-GMB-4 pada dosis 40 dan 60 mg/kg BB secara signifikan meningkatkan kadar SDF-1 $\alpha$  plasma dibanding kontrol.

SDF-1 $\alpha$  merupakan kemokin yang berperan dalam mobilisasi EPC dari *bone marrow*. Salah satu reseptor yang berperan dalam mobilisasi EPC adalah CXCR-4 atau reseptor SDF-1  $\alpha$  (Fang *et al.*, 2010). Mobilisasi EPC dari *bone marrow* terjadi karena meningkatnya kadar SDF-1, reseptor CXCR-4, PIGF, VEGF serta peningkatan kadar MMP-9 dalam serum (Heissig *et al.*, 2002). Kondisi iskemia diyakini mempengaruhi peningkatan kadar SDF1, yang akan memicu mobilisasi dan sirkulasi progenitor sel dari *bone marrow* melalui mekanisme peningkatan aktivasi MMP-9 (Shintani *et al.*, 2002). Kemokin SDF-1 $\alpha$  dapat meningkatkan migrasi sel progenitor dari *bone marrow* (Wright *et al.*, 2002). Kadar SDF-1 $\alpha$  yang meningkat dapat menyebabkan gradien konsentrasi sehingga mempertahankan progenitor sel (Sweeney *et al.*, 2002).

Penggunaan antioksidan *catechine green tea* dapat menghambat respon pembentukan ROS dilihat dengan penurunan kadar *superoxide dismutase* (SOD), mengurangi stres oksidasi pada kondisi diabetes melitus serta dapat meningkatkan ekspresi SDF-1 $\alpha$  pada sirkulasi. SDF-1 $\alpha$  yang berikatan dengan reseptor CXCR4 pada permukaan sel menyebabkan sinyal yang dapat meningkatkan mobilisasi EPC dari *bone marrow* dan mempengaruhi homing EPC pada sel yang injuri (Lapidot *et al.*, 2001 dan Wright *et al.*, 2002). Penggunaan antioksidan *catechine green tea* dapat menghambat respon pembentukan ROS dilihat dengan penurunan kadar *superoxide dismutase* (SOD), mengurangi stres oksidasi pada kondisi diabetes melitus serta dapat meningkatkan ekspresi SDF-1 $\alpha$  pada sirkulasi. Ikatan antara SDF-1 $\alpha$  dan CXCR4 menghasilkan peningkatan interaksi kadar Ca<sup>2+</sup> pada sitoplasmik dan fosforilasi PI3 kinase serta protein kinase lainnya seperti Akt, MEK/ERK dan Janus Kinase (JAK)-2 (Walter *et al.*, 2005). Aktivasi protein kinase Akt menyebabkan upregulasi aktivitas eNOS sehingga meningkatkan ekspresi eNOS dan fosforilasi dimana eNOS merupakan enzim yang mengkatalisa proses *Nitric Oxide* (NO). NO merupakan molekul sinyal untuk proteksi vaskuler dan perbaikan vaskuler (Kuhlmann *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini dengan menggunakan hewan coba tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus Tipe 2 yang di berikan *catechins* GMB-4 dapat meningkatkan kadar SDF-1 $\alpha$  pada pemeriksaan serum, selain itu peningkatan aktivasi SDF-1 $\alpha$  juga dapat dilihat dari pemeriksaan aorta tikus. *Catechins green Tea* GMB-4 pada dosis 40 dan 60 mg/kg BB dapat meningkatkan kadar SDF-1 $\alpha$  pada plasma dan ekspresi SDF-1 $\alpha$  pada aorta tikus DM, dimana pada dosis ini *flavanoid* yang terdapat dalam *catechins green tea* GMB-4 dapat menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai scavenger (peredam) terhadap radikal bebas oksigen reaktif (O<sub>2</sub><sup>0-</sup>) maupun radikal hidroksil (OH<sup>0</sup>). Cara kerjanya dengan memberikan donor atom H kepada radikal peroksil membentuk radikal *flavanoid* dan akan bereaksi dengan

okksigen reaktif (superoksida) sehingga menjadi netral. Dengan reaksi tersebut, reaksi berantai (Nagao.,*et al.*, 2005).

Kemampuan *Catechins Green Tea* sebagai scavenging radikal bebas dihubungkan dengan adanya reduksi satu electron potensial ( $E^\circ$ ) dimana reaktif sebagai antioksidan yang mendonorkan satu atom hidrogen supaya terjadi kondisi yang normal. Berkurangnaya  $E^\circ$  mengindikasikan adanya kekurangan energi yang diperlukan hydrogen atau donor elektron dan merupakan salah satu faktor yang menentukan aktivitas antioksidan. *Catechins Green Tea* mempunyai elektron potensial ( $E^\circ$ ) seperti halnya  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E), tetapi lebih tinggi dibanding dengan ascorbate (vitamin C) (Javanovic *et al.*, 1997).

Pemberian CGT-GMB4 melalui mekanisme peningkatan ekspresi SDF-1 $\alpha$  dapat menstimulasi mobilisasi EPC dan EPC homing untuk proses perbaikan vaskuler. Stimulasi jalur sinyal PI3 Kinase/Akt akan mengaktivasi reseptor CXCR4. Selanjutnya kemokin SDF-1 $\alpha$  berikatan dengan G-protein reseptor membran CXCR4 menyebabkan upregulasi dan mengaktifasi MMP-9 dan eNOS. eNOS merupakan katalisis yang mensintesis NO, dimana NO potensial menyebabkan migrasi EPC. MMP-9 mendegradasi matrik ekstraselluler sehingga menyebabkan migrasi sel EPC dari *bone marrow*. Aktivasi Akt juga menghambat terjadinya apoptosis.

**b. Pemberian *catechins green tea* GMB-4 sebagai antioksidan dapat meningkatkan ekspresi CXCR-4 pada tikus strain *winstar* dengan diabetes melitus tipe 2**

Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap ekspresi CXCR4 pada aorta dengan pemeriksaan Imunohistokimia dengan signifikan ( $p=0,00$ ). Setelah dilakukan uji lanjut *post hoc test* diketahui bahwa CGT-GMB-4 secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi CXCR4 pada aorta pada dosis 20,40,60 mg/kg BB aorta dibanding kontrol.

Kemokin dan reseptor SDF-1 $\alpha$  berperan juga dalam migrasi EPC dan diferensiasi. CXCR4 adalah reseptor kemokin SDF-1 $\alpha$  berperan penting dalam remodeling vaskuler (Schober A, 2008). SDF-1 $\alpha$  adalah kemokin yang bertanggung jawab untuk mobilisasi EPC dan juga berperan dalam perekruitmen EPC dari bone marrow pada kondisi hipoksia melalui reseptor CXCR4 (Spinetti, *et al.*, 2008). SDF-1 $\alpha$  menginduksi migrasi EPC secara invitro (Jujo *et al.*, 2010) dan ikatan antara reseptor CXC-kemokin (CXCR4) dengan SDF-1 $\alpha$  diyakini meningkatkan mobilisasi EPC. SDF-1 $\alpha$  juga meregulasi proliferasi EPC dan ketahanan hidup dari EPC. SDF-1 $\alpha$  dan CXCR4 merupakan kunci regulasi mobilisasi dan rekruitmen EPC ( Jujo *et al.*, 2010). Overekspresi dari SDF-1 dapat meningkatkan *stem sel homing* pasca iskemia jaringan (Urbich *et al.*, 2004). EPC diyakini dapat memperbaiki integritas endotel yang monolayer

dengan menempati bagian-bagian endotel yang cedera atau disfungsi (Urbich *et al.*, 2004).

Peningkatan rekrutmen EPC ini dipengaruhi oleh kemokin CXCR4 dapat meningkatkan migrasi EPC dari *bone marrow* dengan peningkatan ekspresi VEGF dan TGF- $\beta$ . Dengan teridentifikasinya kemokin CCL5/CCR5 diyakini merupakan molekul target yang mempengaruhi neovaskularisasi pada perbaikan jaringan. Keadaan yang mempengaruhi ekspresi SDF-1 $\alpha$  dapat menyebabkan penurunan kadar SDF-1 $\alpha$ , sehingga dapat menyebabkan penurunan mobilisasi EPC dari *bone marrow* (Schober *et al.*, 2003 dan Zerneck *et al.*, 2005).

Mekanisme peningkatan ekspresi SDF-1 $\alpha$  yang dapat menstimulasi mobilisasi EPC dan EPC homing untuk proses perbaikan vaskuler. Stimulasi jalur sinyal PI3 Kinase/Akt akan mengaktifasi reseptor CXCR4. Selanjutnya kemokin SDF-1 $\alpha$  berikatan dengan G-protein reseptor membran CXCR4 menyebabkan upregulasi dan mengaktifasi MMP-9 dan eNOS. eNOS merupakan katalisis yang mensintesis NO, dimana NO potensial menyebabkan migrasi EPC. MMP-9 mendegradasi matrik ekstraselluler sehingga menyebabkan migrasi sel EPC dari *bone marrow*. Aktivasi Akt juga menghambat terjadinya apoptosis. Reaksi ini akan mempromosikan migrasi sel EPC dari *bone marrow* selanjutnya akan bermigrasi ke sirkulasi. EPC yang bersirkulasi akan homing pada daerah yang mengalami iskemia oleh adanya stimulasi dari SDF-1 $\alpha$ . EPCs berkontribusi terhadap proses neovaskularisasi dimana secara langsung akan mempengaruhi deferensiasi sel endotel dan secara tidak langsung mensupport sinyal protein dan struktur enzym yang berperan dalam proses angiogenesis (Hong Yu *et al.*, 2008).

Aorta dipilih sebagai organ yang diduga dapat mengekspresikan aktivasi CXCR4, karena aorta merupakan pembuluh darah besar dalam tubuh dimana pada kondisi injuri oleh karena peningkatan kadar glukosa dapat terjadi disfungsi sehingga memicu mobilisasi EPC dari *bone marrow* untuk mengadakan perbaikan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Schober *et al.*, 2003 pada hewan coba tikus yang dibuat injuri pada bagian karotisnya, diketahui adanya peningkatan ekspresi SDF-1 $\alpha$  yang diamati setelah 24 jam, peningkatan SDF-1 $\alpha$  terjadi selama adanya perubahan formasi dari neointima pada dinding pembuluh darah. Aktivasi platelet juga dikelurkan bersamaan dengan adanya SDF-1 $\alpha$  setelah injuri vaskuler (Zermecke *et al.*, 2005 dan Massberg *et al.*, 2006).

Peningkatan sirkulasi SDF-1 $\alpha$  merupakan efek dari perbedaan gradien konsentrasi SDF-1 $\alpha$  dalam darah dan SDF-1 $\alpha$  di *bone marrow* (Schober *et al.*, 2003). Pada injuri arteri akan terjadi overekspresi SDF-1 $\alpha$  yang merupakan proses penting dalam perbaikan vaskuler. Pada penelitian yang dilakukan oleh Zermecke *et al.*, 2005 pada mencit ApoE -/- terjadi peningkatan kadar SDF-1 $\alpha$  setelah diberi perlakuan perlukaan pada arteri. Sehingga diyakini SDF-1 $\alpha$  secara tidak langsung mempengaruhi pengambilan EPC melalui reseptor CXCR4.



## 9.6 Kesimpulan dan Saran

### 9.6.1 Kesimpulan

1. Pemberian CGT-GMB-4 pada dosis 40 dan 60 mg/kg BB secara signifikan meningkatkan kadar SDF-1 $\alpha$  plasma dibanding kontro dengan pemeriksaan ELISA.
2. Pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap ekspresi SDF-1 $\alpha$  pada aorta dengan pemeriksaan Imunohistokimia ( $p=0,000$ ) pada dosis 20, 40, dan 60 mg/kg BB
3. Pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap ekspresi CXCR4 pada aorta dengan pemeriksaan Imunohistokimia dengan signifikan ( $p=0,00$ ) pada dosis 20, 40, dan 60 mg/kg BB

### 9.6.1 Saran

CGT-GBM-4 dapat digunakan untuk perbaikan vaskuler pada kondisi hiperglikemia diabetes melitus melalui aktivasi SDF-1 $\alpha$  dan CXCR4, dan perlu dilakukan penelitian lanjut pada tatanan klinik

## 9.7 Daftar Pustaka

- Ahn Hee Yul, Kim Chan Hyung. Epigallocatechin-3-gallate Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Lab Anim Res*, 2011; 27(2): 85-90.
- Anderson, R.A. Evans, L.M. Ellis, G.R. Khan, N. Morris, K. Jacson, S.K. Rees A. Lewis, M.J. Fenneaux, M.P. 2006. Prolonged deterioration of endothelial dysfunction in response to postprandial lipaemia is attenuated by vitamin C in type 2 diabetes. *Diabet. Med*, 23. " 258-264".
- Anderson TJ. 2000. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol*, 34. " 631-638".
- Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW.. The myeloperoxidase of human phagocytes generates N-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J. Clin.Inves*, 2000; 104(1):103-113.
- Alain Tedgui and Ziad Mallat. Cytokines in Atherosclerosis Pathogenic and Regulatory Pathway. *Physiol Rev*, 2006; (86):515-581.
- Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005; 45:321-325.
- Ark J.van, Moser J, Lexis C.P.H, Bekkema F, Pop I, Horst C.V, Zeebregts C.J, Goor H.V, Wolffenbutted B.H.R, Hillebrands. Type 2 diabetes mellitus is associated with an imbalance in circulating endothelial and smooth muscle progenitor cell numbers. *Diabetologia* 2012;55:2501-2512

- Assunta Maria Potenza, Sara Gagliardi, Carmela Nacci, Maria Rosaria Carratu and Monica Montagnani. Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Target. *Current Medical Chemistry*, 2009; 16: 94-112.
- Bauersachs J and Thum T. Endothelial progenitor cells dysfunction: Mechanisms and therapeutic approaches. *Eur J Clin Invest*, 2005;37:603-606.
- Bahlmann FH, De Grott K, Spandau JM, Landry AL, Hartel B, Duckert T. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 2004;103:921-926
- Balestrieri M.L, Schino C, Felice F, Casamassimi A, Balestrieri A, Milone L, Servillo L, and Napoli C. Effect of low doses of red wine and pure resveratrol on circulating endothelial progenitor cells. *J Biochem*,2008;143:179-186.
- Burchardt IC, Gozal D, Dayyat E, Cheng Y, Li R, Goldbart A, Row B. Green tea catechins polypenols attenuate behavioral and oxidative responses to intermittent hypoxia. *American J of Respiratory and Critical care Medicine*. 2007;177:1135-1141.
- Casper G. Schalkwijk and Coen D.A. Stehouwer. Vascular complication in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science* 2005; 109:143-159
- Calixto J.B, Compos M.M, Otuki M.F, Santos A.R. Anti inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation pf pro-inflammatory cytokines,chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*. 2004; 70: 93-103.
- Ceradini DJ, Kulkami AR, Callaghan MJ. Progenitor cells trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10:858-864.
- Ceradini Daniel Roymon H, Matthew J, Dachum Y, Diane E, Michael B and Geoffre C.G. Decreasing incelluler superoxide correct defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *The journal of biological chemistry* 2008; 283(16):10930-10938.
- Charo IF, Ransohoff RM, The many roles of chemocines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354:610-621.
- Chaiyasut Chaiyavat, Kusirisin Winthana, Lailerd Narissara, Lerttrakarnnon Peerasak, Suttajit Maitree, Srichairatnakool Somdet. Effect of Pholinolic Compounds Fermented Thai Indigenous Plant on Oxidative Strees in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 1-10.
- Chen L, Wu F, Xia W, Zhang Y, Xu S, Cheng F, Liu X, Zhang X, Wang S, Tao. CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2010;88:462-470.
- Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Madina F.S, Zaruelo A. Inhibition pf pro inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure activity relationshiop. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72:1010-1021
- Crespy Vanessa and Williamson Gary. A Riview of the Health Effects of Green Tea Catches in Invivo Animal Models. *American Society for Nutritional Sciences*, 2004; 0022- 3166.
- Cubbon Richard M, Adil R, Stephen B.W. The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair. *Diabetes Vasc Dis Res*;2007;4:103-111.



- Cubbon Richard, Matthew B Kahn and Stephen B. Wheatcroft. Effect of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair. *Clinical Science*. 2009;117:137- 190.
- Damayanthi Evy, Kusharto Clara M, Suprihatini Rohayati, Rohdiana Dadan. The Study of Catechins and Its Derivatives Content as Natural Antioxidant and Organoleptic Characteristic in Mulberry Tea and Camellia-mulberry Tea Products. *Media Gizi & Keluarga* 2008;32(1):95-103.
- De Falco E, D Porcelli, A.R. Torella. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induce recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood* 2004;104(12):3472-3482.
- Departemen Kesehatan RI. Hasil-hasil Riset Kesehatan Dasar tahun 2007. Badan Litbangkes Jakarta, 2008.
- Desmunarti Susi, Rimbawan, Anwar Faisal, dan Winarto. The effect of instant tempe powder on Malondiadehyde (MDA) in Serum of Hyperglycemic Rats. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 2012;6(2): 72-74.
- Devaraj Sridevi, and Iswarlal Jialal. Dysfunction endothelial progenitor cells in metabolic syndrome. *Experimental Diabetes Research*, 2012;1-5.
- Diabetes Care. Evidence-base nutrition principle and recommendation in Diabetes Mellitus. American Diabetes Association, 2003.
- Dimmeler Stefanie, Alexandra Aicher, Mariuca V, Christiane M.R, Klaudia A, Michaela T, Hartmut R, Stephan F, Hans M, and Andreas M.Z. HMG-Coa reductase inhibitors. (statins) increase endothelial progenitor cells via PI3-Kinase/Akt pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 2001;108(3):365-366.
- Duynhoven J.V, Vaughan E, Jacobs M, Kemperman R, Vezen E.J, Gross G, Roger L, Possemiers S, Smilde A.K, Dore J, Westerhuis J.A. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *PNAS* 2011;108:1: 4531-4538
- Egan R, Lavery F, Caporali. Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4 positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2008;51 (7):1296-1305
- Facchini FS, Humphreys MH, DoNascimento C, Abbasi F, Reaven GM. Relation between insulin resistance and plasma concentrations of lipid hydroperoxides, carotenoids, and tocopherols. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:776-9.
- Fadini Gian P, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, Grego F, Kreutzenberg S.V, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology*. 2006;26:2140-2146.
- Falco E, Avitable D, Totta P, Straino S, Spallotta F, Cencioni C, Torella AR, Rizzi R, Porcelli D, Zaxheo A, Di Vito G, Napolitano M, Maelillo G, Capogrosi MC, Resce M. Altered SDF-1-mediated differentiation of bone marrow derived endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. Altered SDF-1-mediated differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *J Cell Mol Med*. 2009 Sep;13(9B):3405-14.
- Fang Dong and HA Xiao-qin. Effect of endothelial progenitor cells in neovascularization and their application in tumor therapy. *Chin Med J*, 2010;123(17):2454-2460.

- Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser Lango, Jameson, Lascalzo. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17 th edition. By The Mc Graw-Hill Companies, Inc,2008.
- Fleissner Felix and Thomas Thum. Critical role of the Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species balance in Endothelial Progenitor Dysfunction. *Antioxidants and Redox Signaling* 2011;15(4): 933-948.
- Frederick JR, Fitzpatrick JR, McCormick RC, Harris DA, Kim AK, Maenzer J, Marotta N, Smith MJ, Cohen J, Hiesinger W, Atluri P, Woo YJ. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  activation of tissue-engineered endothelial progenitor cell matrix enhance ventricular function after myocardial infarction by inducing neovasculogenesis. *Circulation*. 2010;122:S107-S117.
- Fujiyama Soichiro, Katsuya Amano, Kazutaka U, Madayuki Y, Yasunobu N, Yoshihisa N, Denan Jin, Shinji Takai, Mizuo M, Kensuke E, Takayuki I, Toshiji I, and Hiroaki M. Bone marrow monocyte cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization endothelial progenitor cells. *Circulation research*, 2003;93:980-989.
- Ferdinando Giacco, Brownlee Michael. Oxidative stress and diabetic complication. *Circ Res.*, 2010; 107: 1058-1070
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K. Regulation of endothelium -derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597- 601
- Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induce angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001;98: 2604-2609.
- Gallagher K.A, Z.J. Liu, M. Xiao. Diabetic impairment in NO-mediated endothelial progenitor cells mobilization and homing are resersed by hyperoxia and SDF-1 $\alpha$ . *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(5):1249-1259.
- Galasso G, Schiekofer S, Sato K, Shibata R, Handy D.E, Ouchi N, Leopold J.A, Loscalzo J, and Walsh K. *Circ Res*, 2006;98:254-261.
- Georgescu Adriana, Nicoleta Alexandru, Andrei Constantinescu, Irina Titorencu, Doina Popov. The promise of EPC-based therapies on vascular dysfunction in diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 2011; 669 (1-3):1-6.
- Georgescu Adriana. Vascular dysfunction in diabetes: The endothelial progenitor cell as new therapeutic strategy. *World Journal of Diabetes* 2011;15;2(6): 92-97.
- Gill M, S. Dias, K. Hattori. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGF2(+) AC133(+) endothelial precursr cells. *Circulation Reseach*. 2001;88(2):167-174.
- Guo Y, Hamgoc G, Bian H, Pelus L.M, Broxmeyer H.E., SDF-1/cxcr12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, 2005;23:1324-1332.
- Grunewald M, Avaraham I, Dor Y, Bachar-Lustg E, Itin A, Yung S. VEGF-induce adult neovascularization: Recruitment, retention and role of accessory cells. *Cells*, 2006;124:175-189.
- Haffner. Pre-diabetes, insulin resistance, inflammation and CVD risk. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2003;61 (1): 9-18.





Hamed Saher, Brenner B, Aharon A, Daoud D, Roguin A. Nitric oxide and superoxide dismutase modulated endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology* 2009;8(56): 1475-2840.

Hamed Saher, Jonia Alshiek, Anat Aharon, Benjamin Brenner and Ariel Roguin. Red wine consumption improves in vitro migration of endothelial progenitor cells in young, healthy individuals. *Am J Clin Nutr* 2010;92:161-169.

Hamed Saher, Brenner B, and Roguin A. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2. *Cardiovascular Research*, 2011; 91: 9-15

Han, J.K, Lee, H.S, Yang, H.M, Hur, J., Jun, S.I, Kim, J.Y, Cho, C.H, Koh, G.Y, Peters, J.M, Park, K.W, Cho, H.J, Lee, H.Y. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelium progenitor cells through genomic and nongenomic activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* 2008;118:1021-1033.

Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Tateno M, Shieh JH. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97:3354-3360.

Hayden M.S, Ghosh S. Signaling to NFkB. *genes Dev*. 2004;18: 2195-2224.

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625-635.

Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant function. *Crit Rev Food Nutr* 2003;43:89-143

Hinonori Nakagami, Yusufumi Kaneda, Toshio Ogihara and Ryuichi Morishita. Endothelial Dysfunction in Hyperglycemia as a trigger of Atherosclerosis. *Current Diabetes Reviews*, 2005: 59-63.

Hirschi KK, Majesky MW. Smooth muscle stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004;276:22-33.

Hong Li Xiaoyun Zhang, Xiumei Guan, Xiaodong Cui, Yuliang Wang, Hairong Chu and Min Cheng. Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potential of late endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Diabetology*, 2012;11(46): 1-10.

Hong Yu and Yingmei Feng. The potential of statin and stromal cell-derived factor-1 to promote angiogenesis. *Cell Adhesion and Migration*, 2008;2(4):254-257.

Hristov Mihail, Zernecke A, Liehn E.A, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after artery injury. *Thromb Haemost* 2007;98:274-277.

Huang Po-Hsun, Chen Yung-Hsiang, Tsai Hsiao-Ya, Chen Jia-Shiong, Wu Tao-Cheng, Lin Feng-Yen Lin, Sata Masataka, Chen Jaw-Wen, Lin Shing-Jong. Intake of Red Wine Increases the Number and Functional Capacity of Circulating Endothelial Progenitor Cells by Enhancing Nitric Oxide Bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006;109: 869-877.

Inge A. M. van den Oever, Hennie G. Raterman, Mike T. Nurmohamed, and Suat Simsek.. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Mediators of Inflammation* 2010;(10).1155 - 1167

Ishida Yuko, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Rivotal role of CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *The journal of Clinical Investigation*. 2012;122(2):711-721.

Jian Xu, Ming-Hui Z. Molecular Insights and Therapeutic Target for Diabetic Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2009; 120(13):1266-1286.

Jia WP, Pang C, Chen L.. Epidemiological characteristic of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in a Chinese adult population: the Shanghai Diabetes Studies, a cross-sectional 3 year follow-up study in Shanghai urban communities. *Diabetologia*, 2007; 50(2): 286-292.

Jorge Calles-escandon and Marilyn Cipolla. Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical perspective, *Endocrine reviews*, 2001; 22(1):36-52.

Juliana C.N.C, Vasanti M, Weiping J, Takashi K, Chittaranjan S Y, Kun-Ho Y, Frank B. 2009. Diabetes in Asia, Epidemiology, Risk factor, and Pathophysiology. *American Medical Association, JAMA* Vol 301, No.20: 2129-2140

Jujo K, Hamada H, Iwakura A, Thorne T, Sekiguchi H, Clarke T, Ito A, Misener S, Tanaka T, Klyachko E, Kobayashi K, Tongers J, Roncalli J, Tsurumi Y, Hagiwara N, Losordo DW. CXCR blockade augment bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction. *PNAS* 2010;15(107):11008-11013.

Jun-ichi, Toyoki. M, Makoto. S, Kazuya. K, Ryuji. O, Ichiro. T, Sachiy. T, Yoshihiro. H, and Naoki. M. 2010. Green tea Catechins Improve Human Forearm Vascular Function and Have Potent Anti Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects in Smokers. *Intern Med*, 49. "2553-2559".

Kahler Christian M, Wechselberger J, Hilbe W, Gschwendtner A, Colleselli D, Niederegger H, Boneberg E.M, Sizzo G, Wendel A, Gunsilius E, Yosep R.P, Hamacher J. Peripheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells leads to homing in acute lung injury. *Respiratory Research* 2007, 8; 50: 465-9921.

Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 2004; 3:17-26.

Katherine A.G, Liu Z.J, Xiao M, Chen H, Goldstein L.J, Buerk D.G, Nedeau A, Thom S.R, Velazquez O.C. Diabetic impairment in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 $\alpha$ . *The Journal of Clinical Investigation* 2007;117(5):1249-1259.

Kielczewski Jennifer L, Yagna P.R. Jarajapu, Serrgio L.C, Kyung H.C, Todd Lydic, Lynn C.S, Julia Busik, Jeffrey H, Arturo J, C, Kenneth W, Timoty J.L, Michael E.B, Robert N.M, Tailoi Channing and Maria B.G. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates vascular repair by enhancing nitric Oxide generation. *Circulation Research*, 2009;105:897-905.

Kim, J.A. Montagnani, M. Koh, K.K. Quon, M.J. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, 2006; 113:1888-1994.



- Korbling M, Estrov Z, Adult stem cells for tissue repair- a new therapeutic concept?.*N Engl J. Med.*2003;349:570-582.
- Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experiment galactosemia. *Diabetes* 2001; 50:1938-42.
- Kuhlmann CRW, Schaefer CA, Tillmanns H, Erdogan A. Signalling mechanisms of SDF- induced endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Bioph Res Co* 2005;335: 1107-1114
- Lapidot, Leone Antonio M, Valgimigli M, Benedetta G, Zaccone V, Perfetti M, D'Amario D, Rebusci A.G, Crea F. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *European Heart Journal* 2009;30: 890-899.
- Laksmi, Hernowati Tinny Endang, Dugikawa Martha Tiara. Korelasi antara kadar high sensitive C-Reactive Protein (hs-CRP) dengan kadar *Circulating Endothelial Progenitor Cell* (ECP) pada pasien sindroma metabolik 2012
- Li C, Kong Y, Wang H. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by Sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 2009;01.028
- Li Calzi S, Matthew B.Neu, Lynn S. Shaw, Maria B.Grant. Endothelial progenitor dysfunkcjon in the pathogenesis of diabetic retinopathy: treatment concept to correct diabetes-associated deficits. *EPMA Journal* 2010;1:88-100.
- Li Hong, Zhang Xiaoyun, Guan Xiumei, Xiaodong Cui, Wang Yuliang, Chu Hairong, Cheng Min. Advenced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Diabetology* 2012;11(46): 1-10.
- Lin Y.L, Lim J.K. (-) Epigallocatechin 3-gallate Block the induction of nitric oxide synthase by down-regulation lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol.* 2000; 52:465-472.
- Liu Zhao J, Velazquez O.C. Hypoxia, Endothelial progenitor cell mobilization and diabetic wound healing. *Antioxidant & Redox signaling* 2008;(10): 1870-1882.
- Lutz M, Rosenberg M, Kiessling F. Local injection of Stem Cell Factor (SCF) Improve Myocardial Homing of Systemically Delivered c-kit 1 Bone Marrow-derived Stem Cells. *Cardiovascular Research* 2008;77:143-150.
- Maeng Yong-Sun Choi H.J, Park Y.W, Choi K.S, Min J.K, Kim Y.H, Suh P.G. Kang K.S, Wong M.H, Kim Y.M, Kwon Y.G. Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGFR2- PLC  $\beta$ 2 axis. *Blood Journal* 2009;113:233-243.
- Mark A Creager, MD Josua A. Beckman. Vascular function and diabetes mellitus. in Endothelial Dysfunction and Vascular Disease, *Circulation*.2007;16: 45-56.
- Mariam Nida. Isolasi dan Fraksinasi Katekin The Hijau Klon GMB-4 serta Penentuan kekuatan Antioksidannya, *Skripsi*., Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam Institut Tehnologi Bandung, 2011.
- Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohln-hoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M, Platelet secrete stromal cell-derived factor 1 alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med* 2006; 203:1221-1233.

Meltem Avci-Adali, Gerhard Ziemer, Hans P. Webdel. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization — A review of current strategies Volume 28, Issue 1, January–February 2010, Pages 119–129

Mitchell Jane A, Ferhana Ali, Lucy Bailey, Laura Moreno and Louise S. Harrington. Role Nitric Oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*, 2007;93: 141-147.

Montagnani, M. Chen, H. Barr. VA. Quon, MJ. Insulin stimulating activation of eNOS is Independent of Ca++ but Requires phosphorylation by Akt at Ser 1179. *J. Biol. Chem.*, 2002; 276:30392-30398.

Montagnani,M. Golovchenko, I. Kim,I. Koh. G.Y. Goalstone, M.L. Mundhekar, A.N. Johansen, M. Kucik, D.F. Quon, M.J. Draznin, B. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol. Chem.*,2005; 277:1794-1799.

Morris LM, Klanke CA, Lang SA, Pakall S, Maldonado AR, Vuletin J, Alaee D, Keswani S, Lim FY, Crombleholme T. Characterization od EPC mobilization following cutaneous Wounding. *Wound Repair Regen*. 2010;18 (4): 383-390.

Mu`nisa.A. Pengaruh Diet Asam Lemak Essensial Terhadap Kadar Kolesterol dan Permasalahanya. IPB, 2003.

Nakamura Tomonori, Terajima Tomoko, Ogata Taeko, Ueno K, Hashimoto N, Ono K, Yano S. Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. *Diabetic and metabolic disease*,2006;29(6).

Nishimura Yabe Chihiro, Masato Katsuyama, Kuniharu Matsuno. Physiological role of NOX/ NADPH oxidase the superoxide-generating enzyme. *J.Clin. Biochem. Nutr.*, 2012;50(1);9-22.

Nugrahenny Dian, Widodo M. Aris, Permatasari Nur. Vitamin E mempertahankan kemampuan EPC yang dipapar Glukosa tinggi dalam melepaskan NO dan menginduksi migrasi sel endotel. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, 2012.

Ohshima Mako MS, Tao-sheng Li, Masayuki kubo, Shu-Lan Qin, Kimikazu Hamano. Antioxidant therapy attenuate Diabetes-related impairment of bone marrow stem cells, *Circ J* 2009;73:162-166

Oikawa A, M. Siragusa, F. Quaini. Diabetes mellitus induce bone marrow microangiopathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2010;30(3): 498-508

Park Y, LeeH, Koh CS. Prevalence of diabetes and IGT in Yonchon County, South Korea. *Diabetes care*, 2005;18(4): 545-548.

Paul E Szimitko, Paul W.M. Fedak, Rocard D.W, Dukan J.S, Michael J.B, Subodh V. Endothelial Progenitor cells: New Hope for a broken heart. *Circulation*, 2003;107:3093-3100.

Paul R Robertson. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. 2004;279(41):42351-42354.

Paichev Mario, Afzal J.N, Daniel P, Zhenping Zhu, William J.L, Mathew W, Mahmet C, Daniel J.H, Hicklin, Larry W, Malcolm A.S, and Shahin Rafili. *Blood Journal. Hematology*, 2000;95:952-958.

- Patschan Daniel, Krupincza K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C, Goligorsky M. Dynamic of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F176-185
- Paquay J.B, Haenen G.R, Stender G, Wiseman S.A, Tijburg L.B, Bast. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J. Agric Food Chem*, 2000; 48:5768-5772.
- Penn MS et al. Role of Stem Cell Homing in Myocardial Regeneration. *International Journal of cardiology* 2004;23-25.
- Pribadi Fajar Wahyu, Ernawati Dwi Arini. Efek Catechins trhadap kadar asam Urat, C-Reactive Protein (CRP) dan Malondialdehid darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) Hiperurisemia. *Mandala of Health.*, 2010;4(1):39-45.
- Qi Yuanyuan, Qian L, Sun B, Liu L, Wu P, Sun L. Inhaled NO contributes to lung repair in piglets with acut respiratory distres syndrome via increasing cieculating endothelial progenitor cells. *Plosone* 2012;7(3): e33859.
- Rafii S, Meeus S, Dias S. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 2002;13:61-67.
- Rahman I, Biswas S.K, Kirkham P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by diatary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 2004;72: 1439-1452.
- Ramachandran A. Epidemiology of diabetes in India-three decades of research. *J Assoc Physicians India*, 2005; 53:34-38.
- Reynolds K, Duan X. InterASIA Collaborative Group. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in the Chinese adult population: International Colaborative Study of Cardiovascular Disease in Asia. *Diabetologia*, 2005; 46(9):1190 - 1198.
- Rivard A, Luo Z, Perlman H, Fabre JN, Nguyen T, Maillard L, Waslsh K. Early cell loss after angioplasty results in a disproportionate decrease in percutaneous. gene transfer to the vessel wall. *Hum Gene Ther*. 1999;10:711-721.
- Rohdiana Dadan, Widiantara Tantan. Aktivitas antioksidan beberapa klon the unggulan. *Teknologi pangan Universitas Pasundan* 2011: 579-582.
- Rosalind, J.M. KimG.J and Anne M.M. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *Britist Journal of Nutrition*, 2009;102:1790-1802.
- Sabu M.C, Priya T.T, Ramadasan K, Ikuo N. Benefical effect of green tea: a Literatur review. *Chinese Medicine*, 2010;( 5 ):13.1-9.
- Syamsul Eka Siswanto, Nugroho Agung Endro, Pramono Suwijiyo. The antidiabetics of combination metformin and purified extract of Andrographis paniculata (Burn).F.Ness in High Fructose-Fat Rats. *Majalah obat tradisional*, 2011;16 (3): 124-131.
- Sakihama H, Masunaga T, Yamashita K, Hashimoto T, Inobe M, Todo S, Uede T, Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis. *Circulation*. 2004;110: 2924-2930.
- Sameena S Khan, Michael A. Solomon, and J. Philip McCoy,Jr. Detection of Circulation endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry Part B (Clinica Cytometry)*. 2005;64B:1-8.

- Sesti C, Hale SL, Lutzko C, Kloner R.A. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and stem Cell Factor Improve Contractile Reserve of the Infarcted Left Ventricle Independent of Restoring Muscle Mass. *Journal of the American College of Cardiology* 2005;46:1662-1669.
- Setiawan Bambang, Darsuni Asnawati, Muttaqien Fauzan, Adiputro Dwi Laksono, Kania Nia, Nugrahenny Dian, Widodo M. Aris. *J Exp Integr Med* 2013;3(3): 1-15.
- Scalbert, A. Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130. "2073S - 2085S"
- Schewe T, Steffen Y & Sies H. How do dietary flavonols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys.* 2008;476:102-106.
- Schober A, Zernecke A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2007;97:730-737.
- Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C, Crucial role of injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2003;108:2491-2497.
- Schomig K, G. Busch, B. Steppich. Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *European Heart Journal*; 27(9):1032-1037.
- Schalkwijk and C. D. A. Stehouwer. 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*, vol. 109, no. 2, pp. "143 – 159".
- Sekaran Muniandy, Rajes Gvist, Gracie Ong Siok Yan, Chook Jack Bee, yiaw Koon Chu and Arokiasamy Vinsent Rayappan. 2009. The oxidative stress of hyperglycemia and the inflammatory process in endothelial cells. *The Journal of Medical Investigation* Vol 56: "6-9".
- Sherene M, Shenouda, Joseph A.V. 2007. Effect of flavonoid-containing beverages and EGCG on Endothelial Function. *J the American College of nutrition*, 26(4). " 366S- 372S".
- Shoda Shoda H, Miyata S, Liu BF. 2007. Inhibitory effect of tenilsetam on the Maillard reaction. *Endocrinology*; 138(5)."1886-1892".
- Soobrattee M.A, Neergheen V.S, Luximo- Ramma A, Aruoma O.I, Bahorun T. 2005. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agent: mechanism and actions. *Mutat Res*, 579. " 200-213".
- Soeatumadi DW. 2007. Peran stress oksidatif dalam patogenesis angiopati mikro dan angiopati makro diabetes melitus. *Medika*; (5), "318-325".
- Shargel L, Yu A. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 1999 4th ed New York: Lange.
- Shintani S, Muroha T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*.2001;103:2776-2779.
- Shirozu M, Nakano T, Inzawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Hanjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*.1995;28:495-500.
- Sierra De La Luz, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, Zhang H, Fales H, Tosato G. Differential processing of stromal-derived factor-alpha and stromal- derived factor-a beta explains function diversity. *Blood*, 2004;103:2452-2459.



Srivastava S.K, Bhatnagar A, B. Frieddrich, Ramana, KV. NADPH oxidase and aldose reductse inhibition attenuates high glucose-induced NFkB activation and apoptosis of human lens epithelial cells. Human Biological Chemistry and Genetic, University of Texas Medical Branch, Galveston, 2004.

Stirban, A. Negrean, M. Stratmann, B. Gowlowski, T. Hortmann, T. Gotting, C. Kleesiek, K. Mueller-Roesel, M. Koschinsky, T. Uribarri, J. Vlassara, H. Tschoepe, D. 2006. Benfotiamine prevent macro and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29. "2064-2071".

Strom, C. Sander, B. Klemp, K. Aiello, L.P. Lund-Andersen, H. Larsen, M. 2005. Effect of ruboxistaurin on blood-retinal barrier permeability in relation to severity of leakage in diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46. " 3855-3858".

Swen Wolfram. 2007. Effect of Green tea and EGCG on Cardiovascular and Matabolic Health. *J. The American College of Nutrition*, 25(4). "373S-388S".

Szmitkol Paul E.S, Paul W.M. Fedak, Richard D.W, Dukan J.S, Michael J.B, Kutryk and Subodh V. Endothelial Progenitor Cells: New Hope for a Broken Heart. *Circulation* 2003;107:3093-3100.

Soesilowati S. Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment. *Acta Medica Indonesiana*, 2003; 35(1):27-34.

Sorrentino Sajoscha A, Bahlmann Ferdinand H, Besler Christian, Muller Maja, Schulz Svenja, Kirchhoff Nina, Doerries Carola, Horvath T, Limbourg A, Limbourg F, Fliser D, Haller H, Drexler H, Landmesser Ulf. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity on endothelial progenitor Cells from patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*.2007;116:163-173.

Spinetti Gaia, Nicolle Kraenkel, Costanza Emanueli and Paolo Maddaldu. Diabetes and vessel wall remodeling: from mechanistic insights to regeneration therapies. *Cardiovascular Research*.2008;78: 265-273.

Steinmetz M, Nickenig G, and Werner N. Endothelial regenerating cells: an expanding universe, *Hypertension*, 2010;55(3):593-599.

Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayanno-poulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem / progenitor cells. *Blood*, 2002;99:44-51.

Takahashi T, C. Kalka, H. Masuda. Ischemia and cytokine -induce mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine* 1999;5(4):434-438.

Tan, W.-S. Chow, V. H. G. Ai, and K. S. L. Lam. Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasomotor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2002;18(1): 71-76.

Tedjapranata, Mulyadi. Diabetes di usia lanjut. Medicine Primery care, 2009.

- Thum Thomas, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder J.D, Tsikas D, Ertl G, Bauersachs J. Endothelial nitric oxide synthase Uncoupling impairs endothelial progenitor cells mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 2007;56: 666-674.
- Tepper O.M, Galiano R.D, Capla J.M, Kalka C, Gagne P.J, Jacobowitz G.R, Levine J.P, Gurther G.C. Human Endothelial progenitor cells from type II diabetes exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2005;106:2781-2786.
- Ueno, Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr* 2002; 132. "897-900".
- Urbich Carmen, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circulation Reseach*. 2004;95:343-353.
- Van Zanden JJ, Van der Woude H, Vaessen J, Usta M, Wortel-boer HM, Cnubben N and Rietjens I. The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP 1 and MRP2 inhibiting potential. *Biochem Pharmacol* 2007;74:345-351.
- Verma and T. J. Anderson. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002.;105(5):546-549.
- Venera S, Henrynk D, Karl S, Mario L. 2007. Molecular target of tea polyphenol in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 73. "348-358".
- Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res*. 2000;87:184-188.
- Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz*, 2005;27:579-588.
- Wahyu F, Ernawati. Efek catechin terhadap kadar asam urat, c-reactive protein (CPR) dan malondialdehid darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) hiperurisemia. *Mandala of health* 2010;4(1):30-46.
- Wang, Hui Jie. Low Dose Streptozotocin (STZ) Combined with High Energy intake and Effectively induce Diabetes through altering the related gen expression. *Asia pacific J Clinical Nutr*,2007;16:412-417.
- Way, N. Katai, and G. L. King. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*, 2001;18,(12):945-959.
- Wegiel Barbara, Gallo D.J, Raman K.G, Karisson J.M, Ozanich B, Chin B.Y, Tzeng E, Ahmad S, Ahmed A, Baty C.J, Otterbein L.E. Nitric Oxide-dependent bone marrow progenitor mobilization by carbox monoxide enhances endothelial repair following vascular injury. *Circulation* 2010;121(4): 537-548.
- Weon Kim, Myung Ho Jeong, Suk Hee Cho, Ji Hye Yun, Hong Jae Chae, Young K.A, Min CL, Xianwu C, Takahisa K, Toyoaki M, Jung CK. Effect green tea consumption on endothelial function and circulation endothelial progenitor cells in chronic Smokers. *Circ J* 2006;70:1052-1057
- Werner Nikos, Stefan Junk, Ulrich Laufs, Andreas Link, Katrin Walenta, Michael Bohn and Georg Nickenig. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointim formation after vascular injury. *Circulation research*,2003;93:17-24



- Westerwell F.L, Visseren and G.R. Hajer. Endothelial progenitor cells levels in obese men with the metabolic syndrom and the effect of simvastatin monotherapy vs simvastatin / ezetimibe combination therapy. *European Heart Journal*, 2008;29(22):2808-2817.
- Wheeler D.S, Catravas J.D, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong H.R. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibit IL-1 beta dependent proinflammatory signal transduction in culture respiratory epithelial cells. *J Nutr*. 2004;134:1039-1044.
- Widiastuti. Difference on nitric oxide concentration and stenosis degree in congestive heart failure patient with and without diabetes mellitus. Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, 2010.
- Wong KC, Wang Z. Prevalence of type 2 diabetes mellitus of Chinese population in Mainland China, Hongkong and Taiwan. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006; 73(2):26-134.
- Wright D.E, Brownman E.P, Wagers A.J, Butcher EC, Weissman I.L. Hemopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med*, 2002;195:145-154
- Yamaguchi J, Fukushima K, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Marasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal Cell-derived factor-1 effect on ex vivo expanded endothelial progenitor cells recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107:1322-1328.
- Yang F, Oz H.S, Berve S, de-Viliers W.J, McClain C.J, Varilek G.W. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate block nuclear factor-kappa B activation by inhibiting IκB-ppa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol*. 2002; 60:528-533.
- Yu Hong and Feng Yingmei. The potential of statin and stromal cell-derived factor-1 to promote angiogenesis. *Cell adhesion and migration*. 2008; 2:4,254-257.
- Yuly Peristiowati, Retty Ratnawati, Djangan Sargowo, Achmad Rudijanto., 2014. Efek Isolat Catechins Dari Green Tea Gmb-4 Terhadap Mobilisasi Endothelial Progenitor Cells (Epc) Melalui Aktivasi Stromal Cells Derived Factor-1 (Sdf1-A) Dan Cxcr4 Pada Tikus Diabetes melitus Tipe II.
- Yuly Peristiowati, Retty Ratnawati, Djangan Sargowo, Achmad Rudijanto., 2013. Efek Isolat Catechins Dari Green Tea Gmb-4 Terhadap Mobilisasi Endothelial Progenitor Cells (Epc) Melalui Peningkatan Cd 34 Dan Cd 133 Pada Tikus Diabetes Melitus Tipe II.
- Zhang, Ming, Xiao-Yan Lv, Zhi-Gang Xu, and Li Chen. The Characterization of High-Fat and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induce Type 2 Diabetes Rat Model. *Experimental Diabetes Research*. 2008:1-9.
- Zeng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNos signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;50(3):274-280.
- Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Meriskay M, Gierchik P, Biessen EA, Weber C, SDF-1 alpha.CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. 2005;96:784-791.
- Zheng, H., Dai, T, Zhou,B, Zhu, J, Huang, H, Wang, M and Fu, G.. SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Atherosclerosis* 2008;201:36-42



# BAB 10

## Efek Isolat Catechins dari Green Tea GMB-4 Terhadap Mobilisasi Endothelial Progenitor Cells (EPC) Melalui Peningkatan CD 34 dan CD 133 pada Tikus Diabetes Melitus Tipe II

---

### 10.1 Abstrak

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolism yang ditandai dengan hiperglikemia. Hiperglikemia menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, aktivasi jalur metabolisme poliol yang dapat mempercepat terbentuknya senyawa oksigen reaktif. Pembentukan senyawa oksigen reaktif dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA dan protein sehingga dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxigen Species* (ROS) yang merupakan awal terjadinya stres oksidasi. Stres Oksidasi akan mengaktifasi faktor transkripsi NF $\kappa$ B yang dapat menginduksi peningkatan ekspresi molekul adesin, peningkatan kemokin dan pengeluaran sitokin.

Pada fase akut diabetes melitus dapat menyebabkan kondisi stres oksidasi dan inflamasi yang diakibatkan adanya hierglikemia sehingga memicu terjadinya disfungsi endotel. Pada tahap ini tubuh akan melakukan kompensasi dengan melakukan perbaikan endotel dengan mengekspresikan beberapa faktor yang berperan dalam perbaikan endotel melalui peningkatan mobilisasi EPC dari bone marrow. Faktor yang berperan dalam migrasi, mobilisasi dan EPC homing ke daerah yang mengalami kerusakan vaskuler adalah *Stromal cell-derived factor-1* (SDF-1 $\alpha$  / CXCR4), eNOS dan NO.

SDF-1 $\alpha$  merupakan kemokin yang berperan dalam meningkatkan kemotaksis EPC pada daerah injuri vaskuler. Aktivasi SDF-1 $\alpha$  dapat memediasi EPC homing melalui peningkatan PI3 Kinase/Akt/eNOS pathway, sehingga EPC dapat berproliferasi dan membentuk neovaskularisasi. Peningkatan jumlah EPC, migrasi, dan mobilisasi EPC sehingga dapat memperbaiki jaringan dan vaskuler yang mengalami kerusakan sehingga dapat mencegah komplikasi vaskuler lebih lanjut. Pada kondisi diabetes melitus yang kronis ekspresi SDF-1 $\alpha$  menurun sehingga mempengaruhi penurunan mobilisasi EPC dari bone marrow. Kondisi ini akan menurunkan perbaikan vaskuler. Penurunan perbaikan vaskuler dapat menyebabkan komplikasi diabetes melitus dengan meningkatnya faktor-faktor pertumbuhan vaskuler diantaranya VEGF, MMP-9 yang akan mempengaruhi proses angiogenesis dan terjadi komplikasi diabetes melitus seperti atherosclerosis, retinopati diabetes, dan penyakit kardiovaskuler lainnya.

Hasil penelitian menunjukkan CGT-GMB4 signifikan berpengaruh terhadap peningkatan mobilisasi EPC dilihat dari peningkatan aktivasi CD34 dan CD 133 pada tikus strains wistar dengan DM tipe II. Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap aktivasi CD133 dan CD 34 dengan pemeriksaan Flowcytometry ( $p=0,000$ ). Dilanjutkan uji *post hoc test* diketahui bahwa CGT-GMB-4 secara signifikan dapat meningkatkan Aktivasi CD133 dan CD 34 pada dosis 40 dan 60 mg/kg BB dibanding kontrol.

Penanganan disfungsi endotel dengan menggunakan antioksidan saat ini merupakan pilihan karena antioksidan diyakini dapat memperbaiki disfungsi endotel. *Catechins Green tea* mempunyai kandungan *polyphenol* dan *flavonol* mempunyai efek sebagai antioksidan dimana berperan menghambat stres oksidasi pada endotel.

**Kata Kunci:** Diabetes Melitus, Disfungsi Endotel, Mobilisasi EPC, CD133, CD34

## 10.2 Latar Belakang

Disfungsi endotel merupakan kondisi dimana adanya ketidakseimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilatasi pada endotel pembuluh darah. Disfungsi endotel dapat disebabkan oleh berbagai kondisi diantaranya adalah resistensi insulin, dan hiperglikemia. Disfungsi endotel dapat terjadi karena adanya pembentukan senyawa oksigen reaktif (ROS) sehingga dapat meningkatkan produksi radikal bebas, yang merupakan awal terjadinya stres oksidatif yang berdampak pada komplikasi diabetes melitus. Untuk itulah perlu adanya suatu penanganan kondisi disfungsi endotel sebelum terjadi kerusakan lebih lanjut. Penanganan disfungsi endotel dengan

menggunakan antioksidan saat ini merupakan pilihan karena antioksidan diyakini dapat memperbaiki disfungsi endotel.

Pada fase akut diabetes melitus dapat menyebabkan kondisi stres oksidasi dan inflamasi yang diakibatkan adanya hierglikemia sehingga memicu terjadinya disfungsi endotel. Pada tahap ini tubuh akan melakukan kompensasi dengan melakukan perbaikan endotel dengan mengekspresikan beberapa faktor yang berperan dalam perbaikan endotel melalui peningkatan mobilisasi EPC dari bone marrow. Faktor yang berperan dalam migrasi, mobilisasi dan EPC homing ke daerah yang mengalami kerusakan vaskuler adalah *Stromal cell-derived factor-1* (SDF-1 $\alpha$  / CXCR4), eNOS dan NO. SDF-1 $\alpha$  merupakan kemokin yang berperan dalam meningkatkan kemotaksis EPC pada daerah injuri vaskuler. Aktivasi SDF-1 $\alpha$  dapat memediasi EPC homing melalui peningkatan PI3 Kinase/Akt/eNOS pathway, sehingga EPC dapat berproliferasi dan membentuk neovaskularisasi. Peningkatan jumlah EPC, migrasi, mobilisasi dan EPC homing dapat memperbaiki jaringan dan vaskuler yang mengalami kerusakan sehingga dapat mencegah komplikasi vaskuler lebih lanjut. Pada kondisi diabetes melitus yang kronis ekspresi SDF-1 $\alpha$  menurun sehingga mempengaruhi penurunan mobilisasi EPC dari bone marrow dan EPC homing. Kondisi ini akan menurunkan perbaikan vaskuler. Penurunan perbaikan vaskuler dapat menyebabkan komplikasi diabetes melitus dengan meningkatnya faktor-faktor pertumbuhan vaskuler diantaranya VEGF, MMP-9 yang akan mempengaruhi proses angiogenesis dan terjadi komplikasi diabetes melitus seperti aterosklerosis, retinopati diabetes, dan penyakit kardiovaskuler lainnya.

EPC merupakan sel-sel yang memiliki kemampuan untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi sel-sel endotel. EPC merupakan bagian dari sel induk yang bersifat lebih matang dan unipoten. Secara klinis, EPC dapat memperbaiki kondisi-kondisi penyakit yang diawali dengan kerusakan sel-sel endotel, baik secara anatomis/struktural maupun fungsional, melalui mekanisme neovaskularisasi (Carmen, *et al.*, 2012). Pada pasien dengan diabetes melitus tipe I dan II dapat mengalami penurunan jumlah EPC (Tepper *et al.*, 2002). Diketahui EPC yang dilihat dari pasien dengan diabetes melitus mengalami kerusakan secara fungsinya dalam melakukan adesi, proliferasi dan tubulisasi. Tidak terkontrolnya peningkatan kadar glukosa dalam plasma menyebabkan peningkatan kadar glikasi hemoglobin dan peningkatan kadar glukosa plasma secara bebas yang berkorelasi terhadap penurunan jumlah EPC (Tepper *et al.*, 2002).

Pada pasien dengan diabetes melitus tipe I dan II dapat mengalami penurunan jumlah EPC (Tepper *et al.*, 2002). Diketahui EPC yang dilihat dari pasien dengan diabetes melitus mengalami kerusakan secara fungsinya dalam melakukan adesi, proliferasi dan tubulisasi. Tidak terkontrolnya peningkatan kadar glukosa dalam plasma menyebabkan peningkatan kadar glikasi hemoglobin dan peningkatan kadar



glukosa plasma secara bebas yang berkorelasi terhadap penurunan jumlah EPC (Tepper *et al.*, 2002)

Pada kondisi diabetes melitus kronik, pasien akan mengalami disfungsi endotel akibat adanya ketidakseimbangan perbaikan dan kerusakan endotel. Akibatnya akan terjadi peningkatan produksi ROS yang dapat meningkatkan pelepasan eNOS dan berakibat terjadi penurunan produksi NO. Kondisi ini akan menyebabkan penurunan mobilitas EPC dari *bone marrow* dan penurunan kapasitas adesi, integrasi endotel serta proliferasi dari sel endotel (Cubbon *et al.*, 2007). Pada kondisi hiperglikemia yang terus menerus dapat terjadi penurunan ekspresi SDF-1 $\alpha$  sebagai kemokin yang mempengaruhi mobilisasi EPC dari *bone marrow*. Penurunan ekspresi SDF-1 $\alpha$  pada diabetes melitus disebabkan menurunnya produksi NO sehingga akan berakibat menurunkan rekrutiment dan homing EPC dari sirkulasi ke daerah injuri vaskuler. EPC pada pasien diabetes melitus fase kronis mengalami penurunan jika dibandingkan pasien non diabetes sehingga dapat mengganggu proses neovaskularisasi dan reendotelialisasi (Ark *et al.*, 2012). Pada kondisi diabetes melitus fase kronis jumlah dan mobilisasi EPC akan mengalami penurunan (Hamed *et al.*, 2011).

## 10.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 10.3.1 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa Pemberian *catechins green tea* GMB-4 sebagai antioksidan dapat meningkatkan kadar NO pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus Tipe II.
2. Membuktikan bahwa Pemberian *catechins green tea* GMB-4 sebagai antioksidan dapat meningkatkan Jumlah EPC dilihat dari peningkatan antibodi CD 34 dan CD 133 pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus Tipe II.

### 10.3.2 Manfaat Penelitian

- a. Dengan mengidentifikasi faktor yang mempengaruhi EPC Homing dapat digunakan dalam menentukan target terapi pada penanganan disfungsi endotel dan disfungsi EPC pada kasus Diabetes melitus dan kasus-kasus lain pada kondisi yang sama.
- b. Dengan mengetahui mekanisme *Nitric Oxide* sebagai faktor yang mempengaruhi EPC homing dan peningkatan jumlah EPC dapat digunakan untuk menentukan target penanganan disfungsi endotel dan disfungsi EPC secara tepat pada tatanan klinik.

## 10.4 Metode Penelitian

Rancangan penelitian merupakan penelitian *true eksperimental* dengan pendekatan *post test only control group design*. Secara invivo dengan menggunakan hewan coba pada tikus Strain Wistar yang di bagi menjadi 5 kelompok. Kelompok pertama adalah kontrol negatif tikus non diabet tanpa perlakuan, Kelompok 2 merupakan kontrol positif dimana Tikus dibuat diabet dengan diinjeksi Streptozotocin (STZ). Kelompok 3 merupakan Tikus diabet dengan perlakuan *catechin green tea GMB-4 20 mg/kg*, Kelompok 4 merupakan Tikus diabet dengan perlakuan *catechin green tea GMB-4 40 mg/kgBB* dan Kelompok 5 merupakan Tikus diabet dengan perlakuan *catechin green tea GMB-4 60 mg/kgBB*.

### 10.4.1 Prosedur Pengukuran NO

Pengukuran kadar *Nitric Oxide* dengan menggunakan *colorimetric assay* (R&D). Pengukuran kadar NO menggunakan bahan dari serum. (Widiastuti, 2010):

1. Siapkan spesimen serum yang akan diperiksa
2. Tambahkan 200 $\mu$ L buffer reaksi (1x) ke well blangko
3. Tambahkan 50 $\mu$ L buffer reaksi ke lubang-lubang wells untuk standart nol
4. Tambahkan 50 $\mu$ L Nitrit standart atau sampel ke wells lainnya
5. Tambahkan 50 $\mu$ L buffer reaksi (1x) ke semua wells sampel dan standart
6. Tambahkan 50 $\mu$ L reagen Griess I ke tiap wells blangko
7. Tambahkan 50 $\mu$ L reagen Griess II ke tiap wellskecuali wells blangko  
Campurkan dengan menggoyang plate dengan perlahan
8. Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang
9. Tentukan optical density (OD) dari tiap well menggunakan microplate reader set pada 540 nm

### 10.4.2 Prosedur Identifikasi EPC pada Hewan Coba

#### Isolasi EPC

Sebanyak 2,5 CC fosfat Buffer Salin (PBS) dicampur dengan 2,5 CC darah (1:1) pada tabung sentrifuge 15 mL dengan tujuan untuk mempertahankan pH. Setelah itu dihomogenkan. Campuran sampel darah dan dengan PBS kemudian dilapiskan secara hati-hati (lewat diding tabung) ke dalam tabung sentrifuge 15 mL yang telah berisi *Lymphocyte Separation Medium* (LSM) sebanyak 2,5 cc. Campurkan disentrofugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 30 menit dengan posisi *brake off*. Setelah disentrifusi akan terbentuk 4 lapisan yaitu berturut-turut eritrosit,

*granulosit* (PMN), *ficoll hypaque*, cincin *buffy coat* (limfosit dan monosit), plasma, dan PBS. Lalu mengambil cincin *buffy coat* dengan hati-hati dan memindahkannya ke dalam tabung baru. Sel dicuci dengan PBS dan disentrifugasi dengan kecepatan 1300 rpm selama 10 menit. Proses pencusian diulang 2-3 kali. Setelah itu membuang supernatannya dan mengambil pallletnya yang merupakan PBMC terisolasi (*Laksmi et al.*, 2012).

#### 10.4.3 Prosedur Deteksi EPC dengan *Flow Cytometry*

Preparasi Sampel:

1. Ambil 1 ml darah tampung dalam flacon
2. Inkubasi selama 5 menit pada suhu ruangan
3. Sentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 2000 RPM
4. Ambil supernatannya. Selanjutnya tambahkan 50 ml PBS pada pelet, ambil sedikit sampel untuk dihitung jumlah selnya.
5. Lakukan sentrifuse lagi selama 5 menit dengan kecepatan 2000 RPM
6. Aspirasi supernatannya

Dalam usaha mengidentifikasi EPC homing, peneliti mencoba mencari *marker antigen* yang spesifik untuk EPC dengan menggunakan *Flowcytometry*. EPC mengekspresikan *marker antigen* CD34 (*Biolegend, USA*) dan CD133 (*Biolegend, USA*). Cara pemeriksaan EPC sebagai berikut: Membuat *Cell Staining Buffer*, yang isinya adalah *Fetal Bufine Serum* (FBS) 2% dalam PBS dan mencampurkan dengan antibody CD 34 (1:10) dan CD 133 (1:10). Enceran antibody dimasukkan dalam pipet sebanyak 50  $\mu$ L, dicampurkan kedalam palate PBMC. Setelah itu diinkubasi selama 20-30 menit tanpa cahaya dan suhu 4°C. Selanjutnya diinkubasi, dan ditambahkan 300-400  $\mu$ L dan dipindahkan ke dalam tube 5 mL dan dibaca pada *flowcytometry* (*Setiawan, et al.*, 2013).

Untuk menganalisa perbedaan masing-masing perlakuan dilakukan dengan menggunakan uji statistik Anova dan Uji Same (*path analisis*). Masing-masing sampel perlakuan dibandingkan dengan kontrol dan di pengaruhnya antar variabel. Dengan menggunakan tingkat signifikansi 0,05. Sebelum dilakukan uji statistik Anova dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui homogenitas data. Bila hasil uji homogenitas  $P > 0,05$  berarti dapat dilanjutkan uji Anova.

## 10.5 Hasil dan Pembahasan

### 10.5.1 Hasil Penelitian

- a. Pengaruh perlakuan *catechins green tea GMB-4* terhadap Kadar Nitric Oxide (NO) pada plasma tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2 dengan analisa menggunakan Colorymetry

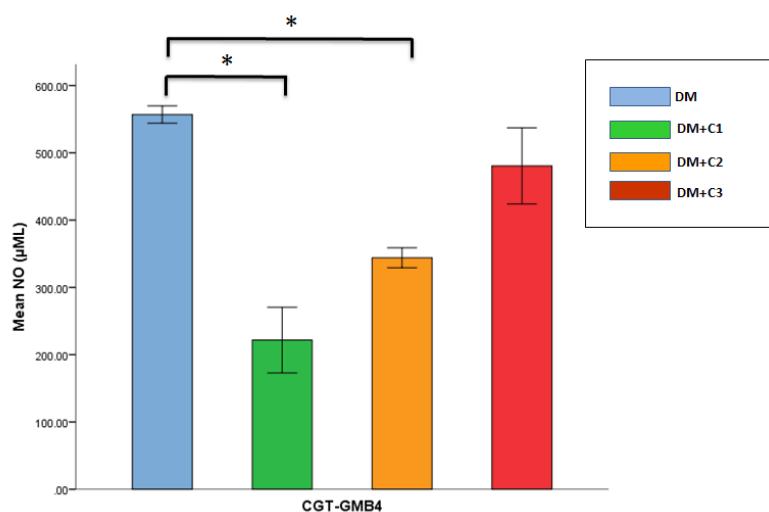
Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov diketahui bahwa data kadar NO dengan pemeriksaan Colorymetry secara signifikan terbukti berdistribusi normal ( $P=0,745$ ). Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea GMB-4* secara signifikan dapat berpengaruh terhadap kadar NO pada plasma dengan pemeriksaan Colorymetry ( $p=0,000$ ). Adapun hasil uji lanjut analisis ini dengan *Post Hoc Tests* ditampilkan pada tabel dan gambar berikut:

**Tabel 10.1**

Kadar *Nitric oxide* (NO) plasma pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang di berikan perlakuan *catechins green tea GMB-4*

No	Perlakuan	Mean kadar NO ( $\mu\text{M}$ ) ± Standart Deviasi (SD)
1.	Kontrol Negatif (N)	$311,9500 \pm 47,52420^{\text{a}}$
2.	Kontrol Positif (DM)	$556,8250 \pm 12,91701^{\text{b}}$
3.	DM+C1	$221,7250 \pm 48,86753^{\text{c}}$
4.	DM+C2	$344,0500 \pm 14,91342^{\text{a}}$
5.	DM+C3	$480,5250 \pm 56,63099^{\text{b}}$

Catatan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan pengaruh yang signifikan



**Gambar 10.1**

Diagram kadar NO ( $\mu\text{M}$ ). Perlakuan CGT GMB-4 pada dosis 20 dan 40 mg/kgBB secara bermakna meningkatkan kadar NO dibanding kelompok kontrol DM Keterangan: C (control), DM, DM+C1 (CGT 20 mg/kg BB), DM+C2 (CGT 40 mg/kg BB), DM+C3 (CGT 60 mg/kg BB).

Berdasarkan hasil analisis uji statistik *one way* Anova, perlakuan CGT GMB-4 pada dosis 20 dan 40 mg/kg BB efektif meningkatkan kadar NO pada tikus DM tipe 2 dengan nilai signifikan 0.00  $p<0.05$ . Sedangkan pada dosis 60 mg/kg BB tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol DM.

**b. Pengaruh Pemberian *catechins green tea* GMB-4 terhadap mobilisasi EPC dilihat dari peningkatan ekspresi CD 34 dan CD 133 pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2 dengan menggunakan *Flowcytometry***

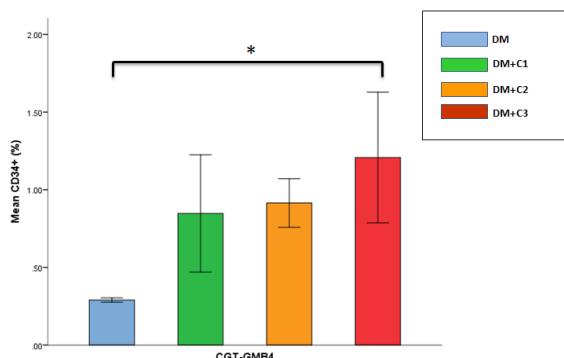
Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov diketahui bahwa data CD34 dengan pemeriksaan Flowcytometry secara signifikan terbukti berdistribusi normal ( $P=0,577$ ). Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap aktivasi CD 34 dengan pemeriksaan flowcytometry ( $p=0,005$ ). Adapun hasil uji lanjut analisis ini dengan *Post Hoc Tests* ditampilkan pada tabel dan gambar berikut:

**Tabel 10.2**

Ekspresi CD34<sup>+</sup> pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang di berikan perlakuan *catechins green tea* GMB-4

No	Perlakuan	Mean (%) ± Standart Deviasi
1.	Kontrol Negatif (N)	$1,4075 \pm 0,51874^a$
2.	Kontrol Positif (DM)	$0,2900 \pm 0,01414^b$
3.	DM+C1	$0,8475 \pm 0,377775^{ab}$
4.	DM+C2	$0,9150 \pm 0,15674^{ab}$
5.	DM+C3	$1,2075 \pm 0,421029^a$

Catatan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan pengaruh yang signifikan



**Gambar 10.2**

Diagram batang rerata CD34<sup>+</sup>. Perlakuan CGT GMB-4 pada dosis 60 mg/kgBB secara bermakna meningkatkan mobilisasi EPC dengan molekul penanda CD34<sup>+</sup> dibanding kelompok kontrol DM Keterangan: C (control), DM, DM+C1 (CGT 20 mg/kg BB), DM+C2 (CGT 40 mg/kg BB), DM+C3 (CGT 60 mg/kg BB).

Berdasarkan hasil uji statistik perlakuan CGT GMB-4 pada dosis 60 mg/kgBB efektif meningkatkan mobilisasi EPC dengan molekul penanda CD34<sup>+</sup> dibandingkan kelompok tikus diabetes melitus dengan nilai signifikan 0.015 p< 0,05. Sedangkan pada dosis 20 dan 40 mg/kgBB tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok DM.

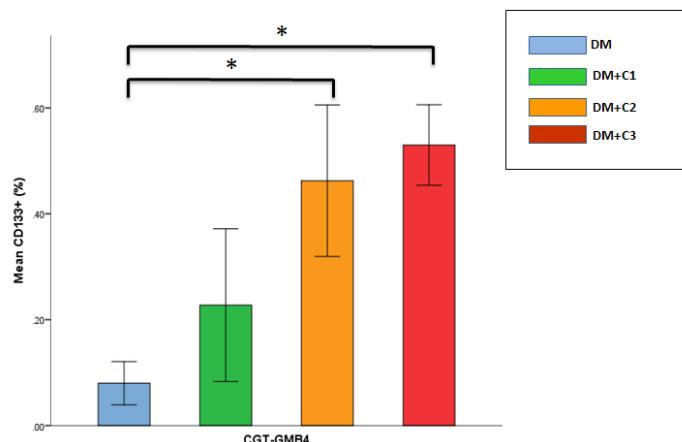
Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov diketahui bahwa data CD133 dengan pemeriksaan Flowcytometry secara signifikan terbukti berdistribusi normal (P= 0,970). Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap aktivasi CD133 dengan pemeriksaan Flowcytometry (p=0,000). Adapun hasil uji lanjut analisis ini dengan *Post Hoc Tests* ditampilkan pada tabel dan gambar berikut:

**Tabel 10.3**

Ekspresi CD133<sup>+</sup> pada tikus *strain winstar* dengan diabetes tipe 2 yang di berikan perlakuan *catechins green tea* GMB-4

No	Perlakuan	Mean (%) ± Standart Deviasi
1.	Kontrol Negatif (N)	0,3400±0,11195 <sup>a</sup>
2.	Kontrol Positif (DM)	0,0800±0,04082 <sup>b</sup>
3.	DM+C1	0,2275±0,14431 <sup>ab</sup>
4.	DM+C2	0,4625±0,14315 <sup>ac</sup>
5.	DM+C3	0,5300±0,19283 <sup>ac</sup>

Catatan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan pengaruh yang signifikan



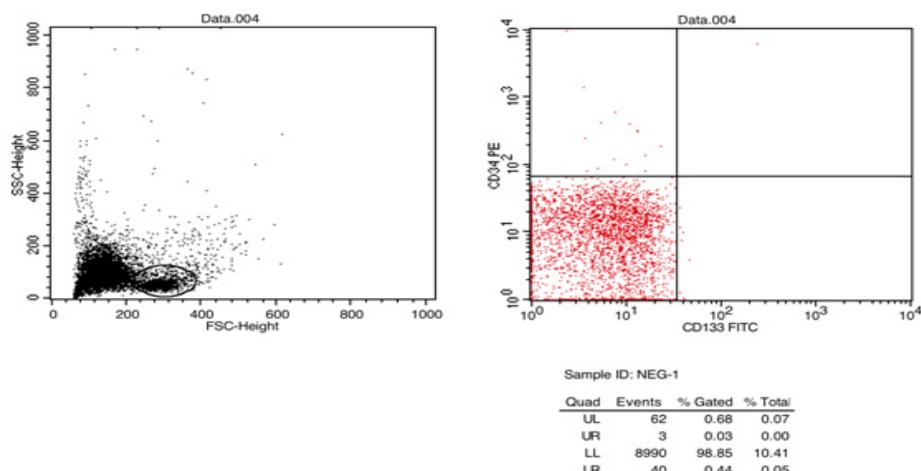
**Gambar 10.3**

Diagram batang rata-rata CD133<sup>+</sup>. Perlakuan CGT GMB-4 pada dosis 40 dan 60 mg/kgBB secara bermakna meningkatkan mobilisasi EPC dengan molekul penanda CD133<sup>+</sup> dibanding kelompok kontrol DM Keterangan: C (control), DM, DM+C1 (CGT 20 mg/kg BB), DM+C2 (CGT 40 mg/kg BB), DM+C3 (CGT 60 mg/kg BB).

Berdasarkan hasil uji statistik perlakuan CGT GMB-4 pada dosis 40 dan 60 mg/kgBB efektif meningkatkan mobilisasi EPC dengan molekul penanda CD133<sup>+</sup> dibandingkan kelompok tikus diabetes melitus dengan nilai signifikan 0.002 dan 0.000 p< 0,05. Sedangkan pada dosis 20 mg/kgBB tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok DM.

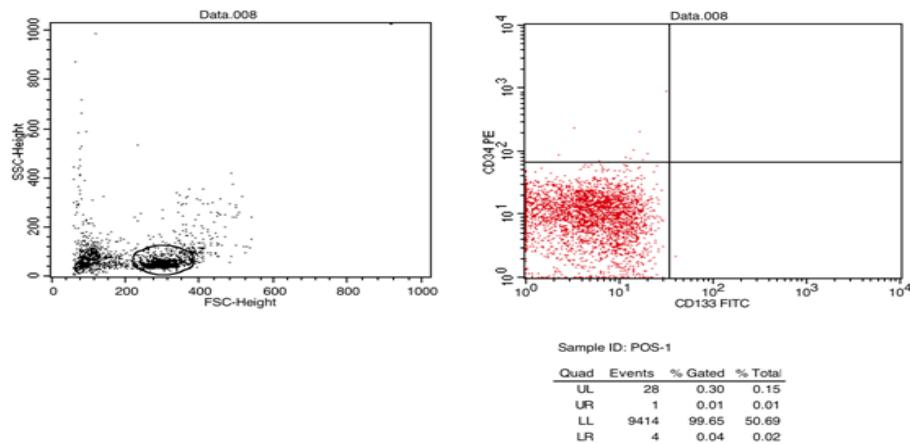
Berdasarkan hasil analisis di atas diketahui bahwa CGT-GMB-4 secara signifikan dapat meningkatkan Aktivasi CD133 dengan pemeriksaan flowcytometry. Pemberian CGT-GMB-4 pada dosis 40 dan 60 mg/kg BB secara signifikan meningkatkan aktivasi CD34 dibanding kontrol. Sedangkan pemberian CGT-GMB-4 pada dosis 20 mg/kg BB tidak signifikan meningkatkan aktivasi CD34 dibanding control.

**Hasil Pemeriksaan *Flowcytometry* kadar CD34 dan CD133 pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2 yang di beri perlakuan *catechins green tea* GMB-4.**



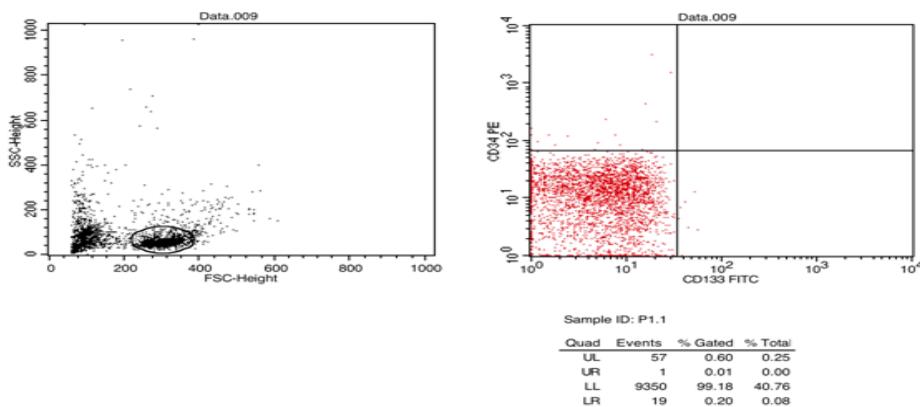
**GAMBAR 10.4**

Hasil Pemeriksaan *Flowcytometry* kadar CD34 dan CD133 pada kontrol negatif. Kontrol Negatif dengan nilai UL (*Upper Leaf*) % Total CD 34 (0,07), nilai LR (*Lower Right*) % total CD 133 (0,05) dan nilai UR (*Upper Right*) % Total Doubel Positif (0,00)



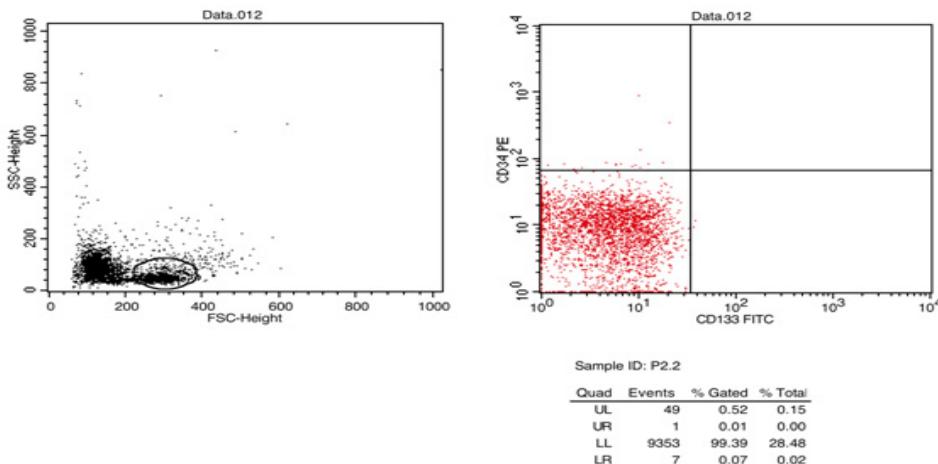
### GAMBAR 10.5

Hasil Pemeriksaan *Flowcytometry* kadar CD34 dan CD133 kontrol positif. Kontrol Positif dengan nilai UL (*Upper Leaf*) % Total CD 34 (0,15), nilai LR (*Lower Right*) % total CD 133 (0,02) dan nilai UR (*Upper Leaf*) % Total Doubel Positif (0,01)



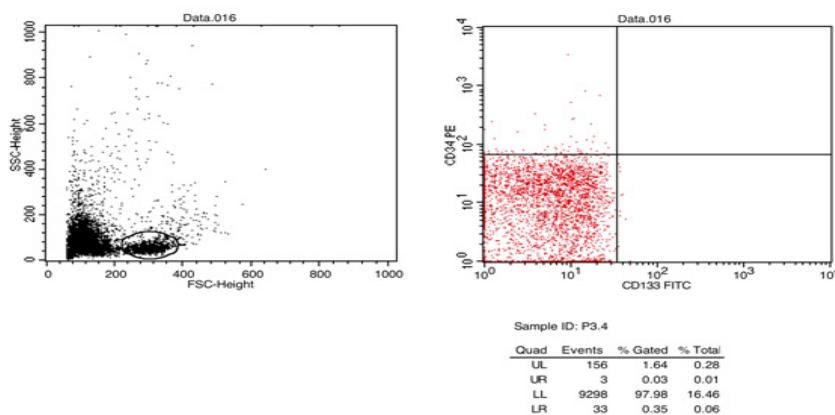
### GAMBAR 10.6

Hasil Pemeriksaan *Flowcytometry* kadar CD34 dan CD133. Perlakuan I dengan nilai UL (*Upper Leaf*) % Total CD 34 (0,25), nilai LR (*Lower Right*) % total CD 133 (0,06) dan nilai UR (*Upper Leaf*) % Total Doubel Positif (0,00).



**GAMBAR 10.7**

Hasil Pemeriksaan *Flowcytometry* kadar CD34 dan CD133 Perlakuan II. Perlakuan II dengan nilai UL (*Upper Leaf*) % Total CD 34 (0,15), nilai LR (*Lower Right*) % total CD 133 (0,02) dan nilai UR (*Upper Leaf*) % Total Doubel Positif (0,00)



**GAMBAR 10.8**

Hasil Pemeriksaan *Flowcytometry* kadar CD34 dan CD133 Perlakuan III. Perlakuan III dengan nilai UL (*Upper Leaf*) % Total CD 34 (0,28), nilai LR (*Lower Right*) % total CD 133 (0,06) dan nilai UR (*Upper Leaf*) % Total Doubel Positif (0,01)

Dari hasil pemeriksaan *flowcytometry* terdeteksi aktivasi CD 34 yang menandai adanya mobilisasi EPC pada tikus DM tipe II yang di berikan perlakuan dengan Catechins GMB-4. Dari hasil uji statistik perlakuan dengan Catechins GMB-4 terhadap aktivasi CD 34 ( $p = 0,005$ ) dan CD 133 secara signifikan dapat ( $p=0,000$ ). Dilanjutkan uji *post hoc test* diketahui bahwa CGT-GMB-4 secara signifikan dapat meningkatkan Aktivasi CD133 dan CD 34 pada dosis 40 dan 60 mg/kg BB dibanding kontrol.

### 10.5.2 Pembahasan

- a. Pemberian *catechins green tea* GMB-4 sebagai antioxidant dapat meningkatkan kadar NO pada tikus *strain winstar* dengan diabetes melitus tipe 2

Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap kadar NO pada plasma dengan pemeriksaan Colorymetry ( $p=0,000$ ). Setelah dilakukan uji lanjut dengan *post hoc test* diketahui bahwa CGT-GMB-4 secara signifikan dapat meningkatkan kadar NO pada dosis 20 dan 40 mg/kg BB secara signifikan dibandingkan control.

*Nitric oxide* (NO) merupakan radikal aktif yang mempunyai sifat tidak stabil, yang disintesis dalam endotel vaskuler oleh *Endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) dan bioavailabilitasnya tergantung adanya keseimbangan antara produksi dan inaktivasi (Hamed *et al.*, 2010). eNOS sebagai produksi *nitric oxide* (NO) berperan penting dalam reendotelialisasi terutama pada maturasi *endothelial cells* dan neovaskulogenesis pada EPCs (Wagiel *et al.*, 2010). Penelitian dengan menggunakan hewan coba tikus, menunjukkan bahwa pada kondisi defisiensi *nitric oxide synthase* (NOS3<sup>-/-</sup>), setelah pemberian *progenitor cells* secara infus intravena pada sel endotel, dapat menstimulasi VEGF dan memobilisasi EPC. Sehingga menghasilkan neovaskularisasi, ini menjelaskan bahwa *nitric oxide* (NO) berperan dalam mobilisasi sirkulasi *progenitor cells* (Thum *et al.*, 2007).

Migrasi EPC meningkat setelah pemberian donor NO pada pasien dengan diabetes melitus tipe 2 (Hong Li *et al.*, 2012). Pada penelitian yang dilakukan oleh Gallagher *et al.*, 2007 diketahui mekanisme ketergantungan NO dapat meningkatkan EPC homing pada proses penyembuhan luka tikus diabetes melitus yang dilakukan perlakuan dengan pemberian SDF-1 $\alpha$ . Penghambatan oksidasi NADPH juga dapat meningkatkan bioavailability NO sehingga terjadi proses reendotelialisasi dan peningkatan kapasitas EPC pada pasien diabetes (Sorrentino *et al.*, 2007). Fungsi EPC diregulasi oleh NO. Produksi NO meningkat dengan adanya peningkatan ekspresi eNOS. Diketahui bahwa ekspresi eNOS dapat meningkatkan produksi *growth hormone* (GH) dan insulin-like growth factor 1 (IGF) sehingga dapat meningkatkan aktivitas sel endotel dan dapat meningkatkan migrasi EPC secara invitro (Fleissner *et al.*, 2011, Thum *et al.*, 2003 dan Thum *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini menunjukkan peningkatan kadar NO pada serum tikus DM tipe II setelah pemberian CGT-GMB4, dimana pada kondisi diabetes melitus terjadi penurunan produksi NO. Dimana telah banyak dibuktikan bahwa NO yang disintesis oleh eNOS berperan penting sebagai regulator migrasi sel endotel dan angiogenesis. NO diketahui dapat meregulasi positif jalur *signaling* VEGF/VEGFR-2. VEGFR-2 yang teraktivasi kemudian dapat memicu

kaskade fosforilasi VE-cadherin pada residu tirosin yang dimediasi Src kinase. Sekuestrasi VE-cadherin pada endosom selanjutnya merusak faktor adesi fokal, memicu hilangnya kontak antar sel, meningkatkan permeabilitas vaskuler, dan memicu migrasi sel endotel. Aktivasi VEGFR-2 juga memicu polimerisasi aktin dan *turnover* faktor adesi fokal (*vinculin, paxillin, dantalin*) yang berperan pada pembentukan *stress fiber*. *Stress fiber* ini yang memungkinkan terjadinya kontraksi sel endotel dan membuat sel endotel mampu melakukan migrasi (Lamalice *et al*, 2007; Schmidt *et al*, 2007).

Pada proses migrasi sel endotel, VEGF juga mengaktifkan jalur *signaling* VEGFR-2/PI3K/Akt-PKB/eNOS, kemudian eNOS yang teraktivasi tersebut mensintesis NO (Williams *et al*, 2000; Lamalice *et al*, 2007). NO kemudian dapat memodulasi angiogenesis melalui induksi ekspansi permukaan sel endotel terkait vasodilatasi, yang memungkinkan terjadinya respon endotelium yang lebih baik terhadap agen angiogenik dan pro-migrasi (Parenti *et al*, 1998; Morales-Ruiz *et al*, 2000; Rousseau *et al*, 2000; Lamalice *et al*, 2007). Hambatan produksi NO diketahui dapat mengganggu peran VEGF/VEGFR2 dalam migrasi sel endotel (Morales-Ruiz *et al*, 2000; Lamalice *et al*, 2007).

Pada penelitian ini NO menurun pada perlakuan kontrol positif disebabkan tingginya superoksid pada kondisi glukosa tinggi. Hal ini sejalan dengan penelitian lain yang menunjukkan adanya penurunan NO dan peningkatan superoksid yang signifikan pada endotel yang dipapar glukosa tinggi selama 24 jam (Ding *et al*, 2004; Romero *et al*, 2008). Peningkatan superoksid tersebut terutama bersumber dari aktivasi NAD(P)H oksidase (Ding *et al*, 2004; Srinivasan *et al*, 2004). NAD(P)H oksidase merupakan kompleks enzim terikat membran yang dapat mengkatalisis reduksi satu elektron oksigen menjadi anion superoksid saat melakukan oksidasi sitosolik NAD(P)H.

Pada penelitian pendahuluan (Pristiwati., *et al*, 2014) telah dilakukan perlakuan pemberian CGT-GMB4 pada kultur HUVEC yang di papar glukosa, menunjukkan adanya penurunan kadar NADPH dan peningkatan kadar NO secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *Catechin green tea* GMB-4 terjadi penurunan konsentrasi NADPH yang berarti terjadi penghambatan oksidasi NADPH melalui mekanisme mengikat ion logam yang terlibat dalam pembentukan spesies yang reaktif serta menghancurkan molekul yang rusak akibat stres oksidasi. Pada proses ini *catechins* dapat berperan membantu regulasi aktivitas oksidasi NADPH, mereduksi produksi  $O_2^-$  dan memproteksi NO dari perubahan *peroxynitride* (Scewe *et al*, 2008).

Pemberian antioksidan *catechins green tea* GMB-4 dibuktikan dapat menghambat pelepasan NO dengan menekan ekspresi dan aktivitas enzim NOS. Hal ini dibuktikan pada penelitian ini terjadi peningkatan konsentrasi Nitric Oxide setelah pemberian perlakuan pada kultur Huvec dengan CGT GMB-4.

Penelitian serupa dilakukan oleh Paquay et al., 2000 dengan menggunakan EGCG dan *catechins* lainnya diketahui dapat menghambat induksi mRNA dan aktivitas iNOS pada sel line setelah dipapar dengan LPS atau IFN- $\gamma$ . Penghambatan transkripsi iNOS dapat dilihat pada ikatan NFK $\beta$  sebagai promoter terhadap dengan demikian akan menginaktivasi gene iNOS (Carmela et al., 2007).

*Catechins* di duga juga bekerja pada jalur PI3K dengan cara menginduksi eNOS untuk memproduksi NO dimana akan mengaktifasi *guanylate cyclase* untuk memproduksi *cyclic guanosine monophosphate* dan menyebabkan vasorelaksasi endotel dengan mengaktifasi jalur sinyal PI3K, protein kinase A dan *Akt-dependent* (Lorenz et al., 2004).

**b. Pemberian *catechins green tea GMB-4* sebagai antioksidan dapat meningkatkan Jumlah EPC dilihat dari peningkatan ekspresi CD 34 dan CD 133 pada tikus *strain wistar* dengan diabetes melitus tipe 2**

Berdasarkan uji anova satu arah diketahui bahwa pemberian *catechins green tea GMB-4* secara signifikan dapat berpengaruh terhadap aktivasi CD133 dan CD 34 dengan pemeriksaan Flowcytometry ( $p=0,000$ ). Dilanjutkan uji *post hoc test* diketahui bahwa CGT-GMB-4 secara signifikan dapat meningkatkan Aktivasi CD133 dan CD 34 pada dosis 40 dan 60 mg/kg BB dibanding kontrol.

Sirkulasi EPC dimulai setelah terbentuknya sel mononuclear darah tepi yang memiliki antigen permukaan CD34, berasal dari sumsum tulang. Setelah dari sumsum tulang sel akan masuk kedalam sirkulasi perifer. CD133 mulai akan menghilang tapi CD34 dan VEGFR-2 masih tetap ada. Perkembangan selanjutnya menjadi sel endotel, CD34 sudah menghilang, tinggal VEGFR-2 dan mulai terekspresi *VE-cadherin* tidak terdeteksi pada permukaan sel endotel vena umbilikalis manusia (Urbich et al., 2004)

EPC dipercaya dapat memberikan kontribusi secara klinis sebagai target terapi yang potensial untuk regenerasi vaskuler (Chen et al, 2007). EPC diketahui berperan dalam perbaikan vaskuler melalui dua cara. Pertama, dengan berdiferensiasi menjadi sel endotel matur dalam vaskulogenesis. Kedua, melalui aktivitas parakrin EPC, di mana EPC melepaskan berbagai faktor angiogenik yang diperlukan untuk aktivasi sel endotel matur dalam angiogenesis (You et al, 2006; Shantsila et al, 2007). Pada kondisi DM, komplikasi penyakit vaskuler akibat gangguan angiogenesis serta menurunnya pembentukan kolateral pada kondisi iskemia diketahui terkait dengan penurunan jumlah maupun fungsi EPC (Tepper et al, 2002; Loomans et al, 2004; Thum et al, 2005; Fadini et al, 2006). Model kultur EPC dengan kondisi glukosa tinggi digunakan untuk simulasi hiperglikemia klinis dalam evaluasi fungsi EPC *in vitro*. Konsentrasi glukosa pada media normal sebesar 4,5-5 mM sebanding dengan kadar glukosa darah 80-89

mg/dL, dan konsentrasi glukosa pada media sebesar 22 mM dalam penelitian ini sesuai dengan kadar glukosa darah 400 mg/dL yang dapat terjadi pada pasien DM tidak terkontrol(Chen *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2008). Meskipun pemaparan glukosa selama 24 jam tidak sesuai dengan patologi EPC pada pasien yang telah menderita DM secara kronis, tetapi model *in vitro* ini dapat diterima dengan tujuan untuk mempelajari mekanisme disfungsi EPC pada kondisi diabetes (Shenouda *et al*, 2011).

Untuk mengamati fungsi EPC pada kondisi glukosa tinggi dalam angiogenesis, dilakukan evaluasi kemampuan migrasi sel endotel matur setelah pemberian supernatan kultur EPC yang sebelumnya telah dipapar glukosa tinggi selama 24 jam. EPC pada fungsi sel endotel matur, karena EPC melepaskan berbagai mediator diantaranya NO yang kemudian larut dalam supernatan kultur EPC. Hal ini dibuktikan dengan terukurnya metabolit stabil NO, yaitu nitrit dan nitrat, pada supernatan EPC (Sun *et al*, 2003). Pada penelitian ini digunakan kultur EPC usia 7 hari (*late EPC*), karena diketahui bahwa *late EPC* mampu memproduksi NO lebih banyak dibandingkan *early EPC*. Hal ini dapat terjadi karena *late EPC* mengeks-presikan VEGFR-2 lebih banyak dibandingkan *early EPC* (Hur *et al*, 2004). Pada penelitian ini dibuktikan bahwa pemaparan glukosa tinggi selama 24 jam dapat secara bermakna menghambat kemampuan EPC dalam menginduksi migrasi sel endotel, dan hal ini berhubungan dengan penurunan NO EPC.

Telah banyak dibuktikan bahwa NO yang disintesis oleh eNOS berperan penting sebagai regulator migrasi sel endotel dan angiogenesis. NO diketahui dapat meregulasi positif jalur *signaling* VEGF/VEGFR-2. VEGFR-2 yang teraktivasi kemudian dapat memicu kaskade fosforilasi VE-cadherin pada residu tirozin yang dimediasi Src kinase. Sekuestrasi VE-cadherin pada endosom selanjutnya merusak faktor adesi fokal, memicu hilangnya kontak antar sel, meningkatkan permeabilitas vaskuler, dan memicu migrasi sel endotel. Aktivasi VEGFR-2 juga memicu polimerisasi aktin dan *turnover* faktor adesi fokal (*vinculin, paxillin, dantalin*) yang berperan pada pembentukan *stress fiber*. *Stress fiber* ini yang memungkinkan terjadinya kontraksi sel endotel dan membuat sel endotel mampu melakukan migrasi (Lamalice *et al*, 2007; Schmidt *et al*, 2007).

Hasil akhir dari peran EPC dalam proses neovaskularisasi, secara makroskopis adalah terbentuknya pembuluh darah kolateral pada jaringan iskemik. Selain itu, EPC juga berperan dalam proses reendotelialisasi, yaitu memperbaiki permukaan sel endotel yang rusak (Friedrich *et al*, 2006).

Secara fisiologi mobilisasi EPC signifikan dapat memperbaiki endotel. Pada studi yang dilakukan pada aorta anjing, diketahui bahwa terjadi proses reendotelialisasi setelah 3 bulan pada daerah yang dibuat cedera dengan implan dakron dengan diketahuinya terdapat koloni sel dengan marker CD34 (Paul *et al*, 2003)

Pada penelitian dengan manusia yang dipasang alat ada permukaan ventrikel, akan tertutupi oleh sel hemopoitik immatur CD133 bersamaan dengan terekspresinya reseptor VEGF-2 (Paichev et al., 2000). EPC dapat menyebabkan reendotelisasi pada endotel yang mengalami cedera (Werner et al., 2003).

Pada penelitian ini terbukti bahwa mobilisasi EPC meningkat dengan dibuktikan adanya peningkatan kadar CD34 dan CD 133 yang merupakan penanda dari keberadaan EPC pada saat mobilisasi untuk memulai proses homing. Peningkatan jumlah EPC dalam sirkulasi sangat penting karena berkorelasi positif dengan reendotelisasi dan neovaskularisasi yang berhubungan dengan perbaikan vaskuler. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa adanya faktor pertumbuhan, bahan farmakologis dan latihan fisik dapat meningkatkan jumlah EPC (Ruel et al., 2005).

Dengan adanya peningkatan kadar CD34 dan CD133 pada sirkulasi dapat menunjukkan adanya peningkatan mobilisasi EPC sehingga dapat meningkatkan proses reendotelisasi pada jaringan endotel dan pemperbaiki kerusakan endotel akibat peningkatan glukosa pada diabetes melitus.

## 10.6 Kesimpulan dan Saran

### 10.6.1 Kesimpulan

1. Pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap kadar NO pada plasma dengan pemeriksaan Colorymetry ( $p=0,000$ ). Pada dosis 20 dan 40 mg/kg BB secara signifikan berpengaruh terhadap kadar NO pada plasma dibanding control.
2. Pemberian *catechins green tea* GMB-4 secara signifikan dapat berpengaruh terhadap aktivasi CD133 dan CD 34 dengan pemeriksaan Flowcytometry ( $p=0,000$ ), pada dosis 40 dan 60 mg/kg BB berpengaruh secara signifikan terhadap aktivasi CD133 dan CD 34 dibanding kontrol.

### 10.6.2 Saran

#### 1. Bagi Peneliti Selanjutnya

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi bagi peneliti yang berminat ingin meneliti tentang dampak pemberian *Ekstrak Catechins Green Tea GMB-4* terhadap peningkatan kadar Nitric Oxide dan peningkatan mobilisasi EPC melalui aktivasi CD 133 dan CD 34 bisa dikembangkan pada tatanan klinis

#### 2. Bagi Institusi Pendidikan

Institusi pendidikan diharapkan dapat menggunakan hasil penelitian ini sebagai masukan pembelajaran dalam penatalaksanaan peningkatan kadar Nitric Oxide dan peningkatan mobilisasi EPC melalui aktivasi CD 133 dan CD 34 pada pasien diabetes melitus.



## 10.7 Daftar Pustaka

- Ahn Hee Yul, Kim Chan Hyung. Epigallocatechin-3-gallate Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Lab Anim Res*, 2011; 27(2): 85-90.
- Anderson, R.A. Evans, L.M. Ellis, G.R. Khan, N. Morris, K. Jackson, S.K. Rees A. Lewis, M.J.. Frenneaux, M.P. 2006. Prolonged deterioration of endothelial dysfunction in response to postprandial lipaemia is attenuated by vitamin C in type 2 diabetes. *Diabet. Med*, 23. " 258-264".
- Anderson TJ. 2000. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol*, 34. " 631-638".
- Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW.. The myeloperoxidase of human phagocytes generates N-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J. Clin.Inves*, 2000; 104(1):103-113.
- Alain Tedgui and Ziad Mallat. Cytokines in Atherosclerosis Pathogenic and Regulatory Pathway. *Physiol Rev*, 2006; (86):515-581.
- Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005; 45:321-325.
- Ark J.van, Moser J, Lexis C.P.H, Bekkema F, Pop I, Horst C.V, Zeebregts C.J, Goor H.V, Wolffenbutted B.H.R, Hillebrands. Type 2 diabetes mellitus is associated with an imbalance in circulating endothelial and smooth muscle progenitor cell numbers. *Diabetologia* 2012;55:2501-2512
- Assunta Maria Potenza, Sara Gagliardi, Carmela Nacci, Maria Rosaria Carratu and Monica Montagnani. Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Target. *Current Medical Chemistry*, 2009; 16: 94-112.
- Bauersachs J and Thum T. Endothelial progenitor cells dysfunction: Mechanisms and therapeutic approaches. *Eur J Clin Invest*, 2005;37:603-606.
- Bahlmann FH, De Grott K, Spandau JM, Landry AL, Hartel B, Duckert T. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 2004;103:921-926
- Balestrieri M.L, Schino C, Felice F, Casamassimi A, Balestrieri A, Milone L, Servillo L, and Napoli C. Effect of low doses of red wine and pure resveratrol on circulating endothelial progenitor cells. *J Biochem*,2008;143:179-186.
- Burchardt IC, Gozal D, Dayyat E, Cheng Y, Li R, Goldbart A, Row B. Green tea catechins polypenols attenuate behavioral and oxidative responses to intermittent hypoxia. *American J of Respiratory and Critical care Medicine*. 2007;177:1135-1141.
- Casper G. Schalkwijk and Coen D.A. Stehouwer. Vascular complication in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science* 2005; 109:143-159
- Calixto J.B, Compos M.M, Otuki M.F, Santos A.R. Anti inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation pf pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*. 2004; 70: 93-103.

- Ceradini DJ, Kulkami AR, Callaghan MJ. Progenitor cells trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10:858-864.
- Ceradini Daniel Roymon H, Matthew J, Dachum Y, Diane E, Michael B and Geoffre C.G. Decreasing incelluler superoxide correct defective ischemia-induced new vassel formation in diabetic mice. *The journal of biological chemistry* 2008; 283(16):10930-10938.
- Charo IF, Ransohoff RM, The many roles of chemocines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354:610-621.
- Chaiyasut Chaiyavat, Kusirisin Winthana, Lalerd Narissara, Lerttrakarnnon Peerasak, Suttajit Maitree, Srichairatnakool Somdet. Effect of Pholinolic Compounds Fermented Thai Indigenous Plant on Oxidative Strees in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 1-10.
- Chen L, Wu F, Xia W, Zhang Y, Xu S, Cheng F, Liu X, Zhang X, Wang S, Tao. CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2010;88:462-470.
- Comalada M, Balleter I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Madina F.S, Zaruelo A. Inhibition pf pro inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure activity relationshiop. *Biochem Pharmacoll*. 2006; 72:1010-1021
- Crespy Vanessa and Williamson Gary. A Riview of the Health Effects of Green Tea Catches in Invivo Animal Models. *American Society for Nutritional Sciences*, 2004; 0022- 3166.
- Cubbon Richard M, Adil R, Stephen B.W. The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair. *Diabetes Vasc Dis Res*;2007;4:103-111.
- Cubbon Richard, Matthew B Kahn and Stephen B. Wheatcroft. Effect of insulin risistance on endothelial progenitor cells and vascular repair. *Clinical Science*. 2009;117:137- 190.
- Damayanthi Evy, Kusharto Clara M, Suprihatini Rohayati, Rohdiana Dadan. The Study of Catechins and Its Derivatives Content as Natural Antioxidant and Organoleptic Characteristic in Mulberry Tea and Camellia-mulberry Tea Products. *Media Gizi & Keluarga* 2008;32(1):95-103.
- De Falco E, D Porcelli, A.R. Torella. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induce recruitment of bone marrow progenitoe cells. *Blood* 2004;104(12):3472-3482.
- Departemen Kesehatan RI. Hasil-hasil Riset Kesehatan Dasar tahun 2007. Badan Litbangkes Jakarta, 2008.
- Desmunarti Susi, Rimbawan, Anwar Faisal, dan Winarto. The effect of instant tempe powder on Malondiadehyde (MDA) in Serum of Hyperglycemic Rats. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 2012;6(2): 72-74.
- Devaraj Sridevi, and Iswarlal Jialal. Dysfunction endothelial progenitor cells in metabolic syndrome. *Experimental Diabetes Research*, 2012;1-5.
- Diabetes Care. Evidence-base nutrion principle and recommendation in Diadetes Melitus. American Diabetes Asscoiation, 2003.





Dimmeler Stefanie, Alexandra Aicher, Mariuca V, Christiane M.R, Klaudia A, Michaela T, Hartmut R, Stephan F, Hans M, and Andreas M.Z. HMG-Coa reductase inhibitors. (statins) increase endothelial progenitor cells via PI3-Kinase/Akt pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 2001;108(3):365-366.

Duynhoven J.V, Vaughan E, Jacobs M, Kemperman R, Vezen E.J, Gross G, Roger L, Possemiers S, Smilde A.K, Dore J, Westerhuis J.A. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *PNAS* 2011;108:1: 4531-4538

Egan R, Lavery F, Caporali. Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4 positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2008;51 (7):1296-1305

Facchini FS, Humphreys MH, DoNascimento C, Abbasi F, Reaven GM. Relation between insulin resistance and plasma concentrations of lipid hydroperoxides, carotenoids, and tocopherols. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:776-9.

Fadini Gian P, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, Grego F, Kreutzenberg S.V, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology*. 2006;26:2140-2146.

Falco E, Avitable D, Totta P, Straino S, Spallotta F, Cencioni C, Torella AR, Rizzi R, Porcelli D, Zaxheo A, Di Vito G, Napolitano M, Maelillo G, Capogrosi MC, Resce M. Altered SDF-1-mediated differentiation of bone marrow derived endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. Altered SDF-1-mediated differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *J Cell Mol Med*. 2009 Sep;13(9B):3405-14.

Fang Dong and HA Xiao-qin. Effect of endothelial progenitor cells in neovascularization and their application in tumor therapy. *Chin Med J*, 2010;123(17):2454-2460.

Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser Lango, Jameson, Lascalzo. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17 th edition. By The Mc Graw-Hill Companies, Inc,2008.

Fleissner Felix and Thomas Thum. Critical role of the Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species balance in Endothelial Progenitor Dysfunction. *Antioxidants and Redox Signaling* 2011;15(4): 933-948.

Frederick JR, Fitzpatrick JR, McCormick RC, Harris DA, Kim AK, Maenzer J, Marotta N, Smith MJ, Cohen J, Hiesinger W, Atluri P, Woo YJ. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  activation of tissue-engineered endothelial progenitor cell matrix enhance ventricular function after myocardial infarction by inducing neovascularogenesis. *Circulation*. 2010;122:S107-S117.

Fujiyama Soichiro, Katsuya Amano, Kazutaka U, Madayuki Y, Yasunobu N, Yoshihisa N, Denan Jin, Shinji Takai, Mizuo M, Kensuke E, Takayuki I, Toshiji I, and Hiroaki M. Bone marrow monocyte cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization endothelial progenitor cells. *Circulation Research*, 2003;93:980-989.

Ferdinando Giacco, Brownlee Michael. Oxidative stress and diabetic complication. *Circ Res*, 2010; 107: 1058-1070

- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K. Regulation of endothelium -derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597- 601
- Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induce angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001;98: 2604-2609.
- Gallagher K.A, Z.J. Liu, M. Xiao. Diabetic impairment in NO-mediated endothelial progenitor cells mobilization and homing are resersed by hyperoxia and SDF-1 $\alpha$ . *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(5):1249-1259.
- Galasso G, Schiekofer S, Sato K, Shibata R, Handy D.E, Ouchi N, Leopold J.A, Loscalzo J, and Walsh K. *Circ Res*, 2006;98:254-261.
- Georgescu Adriana, Nicoleta Alexandru, Andrei Constantinescu, Irina Titorencu, Doina Popov. The promise of EPC-based therapies on vascular dysfunction in diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 2011; 669 (1-3):1-6.
- Georgescu Adriana. Vascular dysfunction in diabetes: The endothelial progenitor cell as new therapeutic strategy. *World Journal of Diabetes* 2011;15;2(6): 92-97.
- Gill M, S. Dias, K. Hattori. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGF2(+) AC133(+) endothelial precursr cells. *Circulation Reseach*. 2001;88(2):167-174.
- Guo Y, Hamgoc G, Bian H, Pelus L.M, Broxmeyer H.E., SDF-1/cxcr12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, 2005;23:1324-1332.
- Grunewald M, Avaraham I, Dor Y, Bachar-Lustg E, Itin A, Yung S. VEGF-induce adult neovascularization: Recruitment, retention and role of accessory cells. *Cells*, 2006;124:175-189.
- Haffner. Pre-diabetes, insulin resistance, inflammation and CVD risk. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2003;61 (1): 9-18.
- Hamed Saher, Brenner B, Aharon A, Daoud D, Roguin A. Nitric oxide and superoxide dismutase modulated endothelial progenitor cell function in type 2 diabtes mellitus. *Cardiovascular Diabetology* 2009;8(56): 1475-2840.
- Hamed Saher, Jonia Alshiek, Anat Aharon, Benjamin Brenner and Ariel Roguin. Red wine consumtion improve in vitro migration of endothelial progenitor cells in young, healthy individuals. *Am J Clin Nutr* 2010;92:161-169.
- Hamed Saher, Brenner B, and Roguin A. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus tipe-2. *Cardiovascular Research*, 2011; 91: 9-15
- Han, J.K, Lee,H.S, Yang,H.M, HurJ., Jun, S.I, Kim,J.Y, Cho, C.H, Koh,G.Y, Peters J.M, Park,K.W, Cho, H.J, Lee, H.Y. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\theta$  agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelium progenitor cells through genomic and nongenomic activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* 2008;118:1021-1033.
- Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Tateno M, Shieh JH. Plasma elevation of stromal cell- derived factor-1 induces mobolization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97:3354-3360.



- Hayden M.S, Ghosh S. Signaling to NFkB. *genes Dev.* 2004;18: 2195-2224.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche require MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625- 635.
- Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenol: Health effects, metabolism, and antioxidant function. *Crit Rev Food Nutr* 2003;43:89-143
- Hinonori Nakagami, Yusufumi Kaneda, Toshio Ogihara and Ryuichi Morishita. Endothelial Dysfunction in Hyperglycemia as a trigger of Atherosclerosis. *Current Diabetes Reviews*, 2005: 59-63.
- Hirschi KK, Majesky MW. Smooth muscle stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;276:22-33.
- Hong Li Xiaoyun Zhang, Xiumei Guan, Xiaodong Cui, Yuliang Wang, Hairong Chu and Min Cheng. Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potential of late endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Diabetology*, 2012;11(46): 1-10.
- Hong Yu and Yingmei Feng. The potential of statin and stromal cell-derived factor-1 to promote angiogenesis. *Cell Adhesion and Migration*, 2008;2(4):254-257.
- Hristov Mihail, Zernecke A, Liehn E.A, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after artery injury. *Thromb Haemost* 2007;98:274-277.
- Huang Po-Hsun, Chen Yung-Hsiang, Tsai Hsiao-Ya, Chen Jia-Shiong, Wu Tao-Cheng, Lin Feng-Yen Lin, Sata Masataka, Chen Jaw-Wen, Lin Shing-Jong. Intake of Red Wine Increases the Number and Functional Capacity of Circulating Endothelial Progenitor Cells by Enhancing Nitric Oxide Bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006;109: 869-877.
- Inge A. M. van den Oever, Hennie G. Raterman, Mike T. Nurmohamed, and Suat Simsek.. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Mediators of Inflammation* 2010;(10).1155 – 1167
- Ishida Yuko, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Rivotal role of CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *The journal of Clinical Investigation*. 2012;122(2):711-721.
- Jian Xu, Ming-Hui Z. Molecular Insights and Therapeutic Target for Diabetic Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2009; 120(13):1266-1286.
- Jia WP, Pang C, Chen L.. Epidemiological characteristic of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in a Chinese adult population: the Shanghai Diabetes Studies, cross-sectional 3 year follow-up study in Shanghai urban communities. *Diabetologia*, 2007; 50(2): 286-292.
- Jorge Calles-escandon and Marilyn Cipolla. Diabetes and Endothelial Dysfuntion: A Clinical perspective, *Endocrine reviews*, 2001; 22(1):36-52.
- Juliana C.N.C, Vasanti M, Weiping J, Takashi K, Chittaranjan S Y, Kun-Ho Y, Frank B. 2009. Diabetes in Asia, Epidemiology, Risk factor, and Pathophysiology. *American Medical Association, JAMA* Vol 301, No.20: 2129-2140

- Jujo K, Hamada H, Iwakura A, Thorne T, Sekiguchi H, Clarke T, Ito A, Misener S, Tanaka T, Klyachko E, Kobayashi K, Tongers J, Roncalli J, Tsurumi Y, Hagiwara N, Losordo DW. CXCR blokade augment bone marrow progenitor cell recruitmeny to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infraction. *PNAS* 2010;15(107):11008-11013.
- Jun-ichi., Toyoki. M, Makoto. S, Kazuya. K, Ryuji. O, Ichiro.T, Sachyo. T, Yoshihiro. H, and Naoki. M. 2010. Green tea Catechins Improve Human Forearm Vascular Function and Have Potent Anti Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects in Smokers. *Intern Med*, 49. "2553-2559".
- Kahler Christian M, Wechselberger J, Hilbe W, Gschwendtner A, Colleselli D, Niederegger H, Boneberg E.M, Sizzo G, Wendel A, Gunsilius E, Yosep R.P, Hamacher J. Peripheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells leads to homing in acute lung injury. *Respiratory Research* 2007, 8; 50: 465-9921.
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 2004; 3:17-26.
- Katherine A.G, Liu Z.J, Xiao M, Chen H, Goldstein L.J, Buerk D.G, Nedeau A, Thom S.R, Velazquez O.C. Diabetic impairment in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 $\alpha$ . *The Journal of Clinical Investigation* 2007;117(5):1249-1259.
- Kielczewski Jennifer L, Yagna P.R. Jarajapu,Serrgio L.C, Kyung H.C, Todd Lydic, Lynn C.S, Julia Busik, Jeffrey H, Arturo J, C, Kenneth W, Timoty J.L, Michael E.B, Robert N.M, Tailoi Channing and Maria B.G. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates vascular repair by enhancing nitric Oxide generation. *Circulation Research*, 2009;105:897-905.
- Kim, J.A. Montagnani, M. Koh, K.K. Quon, M.J. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*,2006; 113:1888-1994.
- Korbling M, Estrov Z, Adult stem cells for tissue repair- a new therapeutic concept?. *N Engl J. Med.*2003;349:570-582.
- Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experiment galactosemia. *Diabetes* 2001; 50:1938-42.
- Kuhlmann CRW, Schaefer CA, Tillmanns H, Erdogan A. Signalling mechanisms of SDF- induced endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Bioph Res Co* 2005;335: 1107-1114
- Lapidot, Leone Antonio M, Valgimigli M, Benedetta G, Zaccone V, Perfetti M, D'Amario D, Rebuzzi A.G, Crea F. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *European Heart Journal* 2009;30: 890-899.
- Laksmi, Hernowati Tinny Endang, Dugikawa Martha Tiara. Korelasi antara kadar high sensitive C-Reactive Protein (hs-CRP) dengan kadar *Circulating Endothelial Progenitor Cell (ECP)* pada pasien sindroma metabolik 2012
- Li C, Kong Y, Wang H. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by Sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 2009;01.028
- Li Calzi S,Matthew B.Neu, Lynn S. Shaw, Maria B.Grant. Endothelial progenitor dysfuncyion in the pathogenesis of diabetic retinopathy: treatment concept to correct diabetes-associated deficits. *EPMA Journal* 2010;1:88-100.



- Li Hong, Zhang Xiaoyun, Guan Xiumei, Xiaodong Cui, Wang Yuliang, Chu Hairong, Cheng Min. Advenced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Diabetology* 2012;11(46): 1-10.
- Lin Y.L, Lim J.K. (-) Epigallocatechin 3-gallate Block the induction of nitric oxide synthase by down-regulation lipopolysacharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol.* 2000; 52:465-472.
- Liu Zhao J, Velazquez O.C. Hypoxia, Endothelial progenitor cell mobilization and diabetic wound healing. *Antioxidant & Redox signaling* 2008;(10): 1870-1882.
- Lutz M, Rosenberg M, Kiessling F. Local injection of Stem Cell Factor (SCF) Improve Myocardial Homing of Systemically Delivered c-kit 1 Bone Marrow-derived Stem Cells. *Cardiovascular Research* 2008;77:143-150.
- Maeng Yong-Sun Choi H.J, Park Y.W, Choi K.S, Min J.K, Kim Y.H, Suh P.G. Kang K.S, Wong M.H, Kim Y.M, Kwon Y.G. Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGFR2-PLC  $\beta$ 2 axis. *Blood Journal* 2009;113:233-243.
- Mark A Creager, MD Josua A. Beckman. Vascular function and diabetes mellitus. in Endothelial Dysfunction and Vascular Disease, *Circulation*.2007;16: 45-56.
- Mariam Nida. Isolasi dan Fraksinasi Katekin The Hijau Klon GMB-4 serta Penentuan kekuatan Antioksidannya, *Skripsi.*, Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam Institut Tehnologi Bandung, 2011.
- Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohln-hoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M, Platelet secrete stromal cell-derived factor 1 alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med* 2006; 203:1221-1233.
- Meltem Avci-Adali, Gerhard Ziemer, Hans P. Webdel. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization — A review of current strategies Volume 28, Issue 1, January–February 2010, Pages 119–129
- Mitchell Jane A, Ferhana Ali, Lucy Bailey, Laura Moreno and Louise S. Harrington. Role Nitric Oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*, 2007;93: 141-147.
- Montagnani, M. Chen, H. Barr. VA. Quon, MJ. Insulin stimulating activation of eNOS is Independent of Ca++ but Requires phosphorylation by Akt at Ser 1179. *J. Biol. Chem.*, 2002; 276:30392-30398.
- Montagnani,M. Golovchenko, I. Kim,I. Koh. G.Y. Goalstone, M.L. Mundhekar, A.N. Johansen, M. Kucik, D.F. Quon, M.J. Draznin, B. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol. Chem.*,2005; 277:1794-1799.
- Morris LM, Klanke CA, Lang SA, Pakall S, Maldonado AR, Vuletin J, Alaee D, Keswani S, Lim FY, Crombleholme T. Characterization od EPC mobilization following cutaneous Wounding. *Wound Repair Regen.* 2010;18 (4): 383-390.
- Mu'nisa.A. Pengaruh Diet Asam Lemak Essensial Terhadap Kadar Kolesterol dan Permasalahanya. IPB, 2003.

- Nakamura Tomonori, Terajima Tomoko, Ogata Taeko, Ueno K, Hashimoto N, Ono K, Yano S. Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. *Diabetic and metabolic disease*, 2006;29(6).
- Nishimura Yabe Chihiro, Masato Katsuyama, Kuniharu Matsuno. Physiologycal role of NOX/NADPH oxidase the superoxide-generating enzyme. *J.Clin. Biochem. Nutr.*, 2012;50(1):9-22.
- Nugrahenny Dian, Widodo M. Aris, Permatasari Nur. Vitamin E mempertahankan kemampuan EPC yang dipapar Glukosa tinggi dalam melepaskan NO dan menginduksi migrasi sel endotel. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, 2012.
- Ohshima Mako MS, Tao-sheng Li, Masayuki kubo, Shu-Lan Qin, Kimikazu Hamano. Antioxidant therapy attenuate Diabetes-related impairment of bone marrow stem cells, *Circ J* 2009;73:162-166
- Oikawa A, M. Siragusa, F. Quaini. Diabetes mellitus induce bone marrow microangiopathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2010;30(3): 498-508
- Park Y, LeeH, Koh CS. Prevalence of diabetes and IGT in Yonchon County, South Korea. *Diabetes care*, 2005;18(4): 545-548.
- Paul E Szmitko, Paul W.M. Fedak, Rocard D.W, Dukan J.S, Michael J.B, Subodh V. Endothelial Progenitor cells: New Hope for a broken heart. *Circulation*, 2003;107:3093-3100.
- Paul R Robertson. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. 2004;279(41):42351-42354.
- Paichev Mario, Afzal J.N, Daniel P, Zhenping Zhu, William J.L, Mathew W, Mahmet C, Daniel J.H, Hicklin, Larry W, Malcolm A.S, and Shahin Rafili. *Blood Journal. Hematology*, 2000;95:952-958.
- Patschan Daniel, Krupincza K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C, Goligorsky M. Dynamic of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F176-185
- Paquay J.B, Haenen G.R, Stender G, Wiseman S.A, Tijburg L.B, Bast. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J. Agric Food Chem*, 2000; 48:5768-5772.
- Penn MS et al. Role of Stem Cell Homing in Myocardial Regeneration. *International Journal of cardiology* 2004;23-25.
- Pribadi Fajar Wahyu, Ernawati Dwi Arini. Efek Catechins terhadap kadar asam Urat, C- Reactive Protein (CRP) dan Malondialdehid darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) Hiperurisemia. *Mandala of Health.*, 2010;4(1):39-45.
- Qi Yuanyuan, Qian L, Sun B, Liu L, Wu P, Sun L. Inhaled NO contributes to lung repair in piglets with acut respiratory distres syndrome via increasing cieculating endothelial progenitor cells. *Plosone* 2012;7(3): e33859.
- Rafii S, Meeus S, Dias S. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 2002;13:61-67.
- Rahman I, Biswas S.K, Kirkham P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 2004;72: 1439-1452.





- Ramachandran A. Epidemiology of diabetes in India-three decades of research. *J Assoc Physicians India*, 2005; 53:34-38.
- Reynolds K, Duan X. InterASIA Collaborative Group. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in the Chinese adult population: International Colaborative Study of Cardiovascular Disease in Asia. *Diabetologia*, 2005; 46(9):1190 - 1198.
- Rivard A, Luo Z, Perlman H, Fabre JN, Nguyen T, Maillard L, Waslsh K. Early cell loss after angioplasty results in a disproportionate decrease in percutaneous gene transfer to the vessel wall. *Hum Gene Ther*. 1999;10:711-721.
- Rohdiana Dadan, Widianara Tantan. Aktivitas antioksidan beberapa klon the unggulan. *Teknologi pangan Universitas Pasundan* 2011: 579-582.
- Rosalind, J.M. KimG.J and Anne M.M. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *British Journal of Nutrition*, 2009;102:1790-1802.
- Sabu M.C, Priya TT, Ramadasan K, Ikuo N. Benefical effect of green tea: a Literatur review. *Chinese Medicine*, 2010;( 5 ):13.1-9.
- Syamsul Eka Siswanto, Nugroho Agung Endro, Pramono Suwijiyo. The antidiabetics of combination metformin and purified extract of Andrographis paniculata (Burn).F.Ness in High Fructose-Fat Rats. *Majalah obat tradisional*, 2011;16 (3): 124-131.
- Sakihama H, Masunaga T, Yamashita K, Hashimoto T, Inobe M, Todo S, Uede T, Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis. *Circulation*. 2004;110: 2924-2930.
- Sameena S Khan, Michael A. Solomon, and J. Philip McCoy,Jr. Detection of Circulation endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry Part B (Clinica Cytometry)*. 2005;64B:1-8.
- Sesti C, Hale SL, Lutzko C, Kloner R.A. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and stem Cell Factor Improve Contractile Reserve of the Infarcted Left Ventricle Independent of Restoring Muscle Mass. *Journal of the American College of Cardiology* 2005;46:1662-1669.
- Setiawan Bambang, Darsuni Asnawati, Muttaqien Fauzan, Adiputro Dwi Laksono, Kania Nia, Nugrahenny Dian, Widodo M.Aris. *J Exp Integr Med* 2013;3(3): 1-15.
- Scalbert, A. Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr*, 130. "2073S - 2085S"
- Schewe T, Steffen Y & Sies H. How do dietary flavonols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys*. 2008;476:102-106.
- Schober A, Zernecke A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2007;97:730-737.
- Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C, Crucial role of injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2003;108:2491-2497.
- Schomig K, G. Busch, B. Steppich. Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *European Heart Journal*; 27(9):1032-1037.
- Schalkwijk and C. D. A. Stehouwer. 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*, vol. 109, no. 2, pp. "143 - 159".

- Sekaran Muniandy, Rajes Gvist, Gracie Ong Siok Yan, Chook Jack Bee, yiaw Koon Chu and Arokiasamy Vinsent Rayappan. 2009. The oxidative stress of hyperglycemia and the inflammatory proces in endothelial cells. *The Journal of Medical Investigation* Vol 56: "6-9".
- Sherene M, Shenouda, Joseph A.V. 2007. Effect of flavonoid-contining beverages and EGCG on Endothelial Function. *J the American College of nutrition*, 26(4). " 366S- 372S".
- Shoda Shoda H, Miyata S, Liu BF.2007. Inhibitory effect of tenilsetam on the Maillard reaction. *Endocrinology*; 138(5)."1886-1892".
- Soobrattee M.A, Neergheen V.S, Luximo- Ramma A, Aruoma O.I, Bahorun T. 2005. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agent: mechanism and actions. *Mutat Res*, 579. " 200-213".
- Soeatmadji DW. 2007. Peran stress oksidatif dalam patogenesis angiopati mikro dan angiopati makro diabetes melitus. *Medika*; (5), "318-325".
- Shargel L, Yu A. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 1999 4th ed New York: Lange.
- Shintani S, Muroha T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infraction. *Circulation*.2001;103:2776-2779.
- Shirozu M, Nakano T, Inzawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Hanjo T. Sructure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*.1995;28:495-500.
- Sierra De La Luz, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, Zhang H, Fales H, Tosato G. Differential processing of stromal-derived factor-alpha and stromal- derived factor-a beta explains function diversity. *Blood*, 2004;103:2452-2459.
- Srivastava S.K, Bhatnagar A, B. Frieddrich, Ramana, KV. NADPH oxidase and aldose reductse inhibition attenuates high glucose-induced NFkB activation and apoptosis of human lens epithelial cells. Human Biological Chemistry and Genetic, University of Texas Medical Branch, Galveston,2004.
- Stirban, A. Negrean, M. Stratmann,B. Gowlowksi,T. Hortmann, T. Gotting,C. Kleesiek,K. Mueller-Roesel,M. Koschinsky,T. Uribarri,J. Vlassara,H. Tschoepe,D. 2006. Benfotiamine prevent macro and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29. "2064-2071".
- Strom, C. Sander, B. Klemp, K. Aiello, L.P. Lund-Andersen, H. Larsen, M. 2005. Effect of ruboxistaurin on blood-retinal barrier permeability in relation to severity of leakage in diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46. " 3855-3858".
- Swen Wolfram. 2007. Effect of Green tea and EGCG on Cardiovascular and Matabolic Health. *J. The American College of Nutrition*, 25(4). "373S-388S".
- Szmitkol Paul E.S, Paul W.M. Fedak, Richard D.W, Dukan J.S, Michael J.B, Kutryk and Subodh V. Endothelial Progenitor Cells: New Hope for a Broken Heart. *Circulation* 2003;107:3093-3100.



- Soesilowati S. Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment. *Acta Medica Indonesiana*, 2003; 35(1):27-34.
- Sorrentino Sajoscha A, Bahlmann Ferdinand H, Besler Christian, Muller Maja, Schulz Svenja, Kirchhoff Nina, Doerries Carola, Horvath T, Limbourg A, Limbourg F, Fliser D, Haller H, Drexler H, Landmesser Ulf. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity on endothelial progenitor Cells from patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*.2007;116:163-173.
- Spinetti Gaia, Nicolle Kraenkel, Costanza Emanueli and Paolo Maddaldu. Diabetes and vessel wall remodeling: from mechanistic insights to regeneration therapies. *Cardiovascular Research*.2008;78: 265-273.
- Steinmetz M, Nickenig G, and Werner N. Endothelial regenerating cells: an expanding universe, *Hypertension*, 2010;55(3):593-599.
- Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayanno-poulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem / progenitor cells. *Blood*, 2002;99:44-51.
- Takahashi T, C. Kalka, H. Masuda. Ischemia and cytokine -induce mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine* 1999;5(4):434-438.
- Tan, W.-S. Chow, V. H. G. Ai, and K. S. L. Lam. Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasoconstrictor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2002;18(1): 71-76.
- Tedapranata, Mulyadi. Diabetes di usia lanjut. Medicine Primery care, 2009.
- Thum Thomas, Fracarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder J.D, Tsikas D, Ertl G, Bauersachs J. Endothelial nitric oxide synthase Uncoupling impairs endothelial progenitor cells mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 2007;56: 666-674.
- Tepper O.M, Galiano R.D, Capla J.M, Kalka C, Gagne P.J, Jacobowitz G.R, Levine J.P, Gurther G.C. Human Endothelial progenitor cells from type II diabetes exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2005;106:2781-2786.
- Ueno, Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr* 2002; 132. "897-900".
- Urbich Carmen, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circulation Reseach*. 2004;95:343-353.
- Van Zanden JJ, Van der Woude H, Vaessen J, Usta M, Wortel-boer HM, Cnubben N and Rietjens I. The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP 1 and MRP2 inhibiting potential. *Biochem Pharmacol* 2007;74:345-351.
- Verma and T. J. Anderson. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002.;105(5):546-549.
- Venera S, Henryk D, Karl S, Mario L. 2007. Molecular target of tea polyphenol in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 73. "348-358".

- Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res*. 2000;87:184-188.
- Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz*, 2005;27:579-588.
- Wahyu F, Ernawati. Efek catechin terhadap kadar asam urat, c-reactive protein (CPR) dan malondialdehid darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) hiperurisemia. *Mandala of health* 2010;4(1):30-46.
- Way, N. Katai, and G. L. King. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*, 2001;18,(12):945-959.
- Wegiel Barbara, Gallo D.J, Raman K.G, Karisson J.M, Ozanich B, Chin B.Y, Tzeng E, Ahmad S, Ahmed A, Baty C.J, Otterbein L.E. Nitric Oxide-dependent bone marrow progenitor mobilization by carnon monoxide enhances endothelial repair following vascular injury. *Circulation* 2010;121(4): 537-548.
- Weon Kim, Myung Ho Jeong, Suk Hee Cho, Ji Hye Yun, Hong Jae Chae, Young K.A, Min CL, Xianwu C, Takahisa K, Toyoaki M, Jung CK. Effect green tea consumption on endothelial function and circulation endothelial progenitor cells in chronic Smokers. *Circ J* 2006;70:1052-1057
- Werner Nikos, Stefan Junk, Ulrich Laufs, Andreas Link, Katrin Walenta, Michael Bohn and Georg Nickenig. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointim formation after vascular injury. *Circulation research*,2003;93:17-24
- Westerwell F.L, Visseren and G.R. Hager. Endothelial progenitor cells levels in obese men with the metabolic syndrom and the effect of simvastatin monotherapy vs simvastatin / ezetimibe combination therapy. *European Heart Journal*, 2008;29(22):2808-2817.
- Wheeler D.S, Catravas J.D, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong H.R. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibit IL-1 beta dependent proinflammatory signal transduction in culture respiratory epithelial cells. *J Nutr*. 2004;134:1039-1044.
- Widiastuti. Difference on nitric oxide concentration and stenosis degree in congestive heart failure patient with and without diabetes mellitus. Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro Semarang,2010.
- Wong KC, Wang Z. Prevlence of type 2 diabetes mellitus of Chinese population in Mainland China, Hongkong and Taiwan. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006; 73(2):26- 134.
- Wright D.E, Brownman E.P, Wagers A.J, Butcher EC, Weissman I.L. Hemetopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J. Exp Med* , 2002;195:145-154
- Yamaguchi J, Fukushima K, Masuo O, Kawamoto A, Slver M, Marasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal Cell-derived factor-1 effect on ex vivo expanded endothelial progenitor cells recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107:1322-1328.
- Yang F, Oz H.S, Berve S, de-Viliers W.J, McClain C.J, Varilek G.W. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin3-gallate block nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I ka-ppa B kinase activity in the intestinal apithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol*. 2002; 60:528-533.





Yu Hong and Feng Yingmei. The potential of statin and stromal cell-derived factor-1 to promote angiogenesis. *Cell adhesion and migration*. 2008; 2:4,254-257.

Yuly Peristiowati, Retty Ratnawati, Djangan Sargowo, Achmad Rudijanto., 2014. Efek Isolat Catechins Dari Green Tea Gmb-4 Terhadap Mobilisasi Endothelial Progenitor Cells (Epc) Melalui Aktivasi Stromal Cells Derived Factor-1 (Sdf1-A) Dan Cxcr4 Pada Tikus Diabetes Melitus Tipe II.

Yuly Peristiowati, Retty Ratnawati, Djangan Sargowo, Achmad Rudijanto., 2013. Efek Isolat Catechins Dari Green Tea Gmb-4 Terhadap Mobilisasi Endothelial Progenitor Cells (Epc) Melalui Peningkatan Cd 34 Dan Cd 133 Pada Tikus Diabetes Melitus Tipe II.

Zeng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNos signal transduction pathway. *J Cardiovasc pharmacol*. 2008;50(3):274-280.

Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Meriskay M, Gierchik P, Biessen EA, Weber C, SDF-1 alpha.CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. 2005;96:784-791.

Zheng, H., Dai, T, Zhou,B, Zhu, J, Huang, H, Wang, M and Fu, G.. SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Atherosclerosis* 2008;201:36-42



## Daftar Riwayat Hidup Penulis

### Data Pribadi

Nama	Dr. Yuly Peristiowati, S.Kep, Ns,M.Kes
NIK/NIDN	130705024 / 0706077601
Tempat dan tanggal lahir	Kediri, 6 Juli 1976
Agama	Islam
Pekerjaan	Staf Pengajar Program Studi Ilmu Keperawatan STIKes Surya Mitra Husada Kediri
Jabatan Fungsional	Lektor
Alamat Rumah	Jl. KH. Wakid Hasyim Gg III/06 Bandar Lor Kediri
Nomor Telepon/Fax/HP	0354 684422/085707546908
Alamat kantor	Jl. Manila Sumperece no. 37 Kediri
NomorTelepon/Fax	0354 7009713 / 0354 695130
Alamat Email	yulystikes@gmail.com
Suami	Dr. Hariyono.,SKM.,MSc
	1. Muhammad Yuda Pratama Airlangga
	2. Muhammad Roihan Mahesa Putra
	3. Salsabilla Septiana Azahra



## Riwayat Pendidikan

Tahun Masuk	Jenjang	Nama Institusi Pendidikan
1983 – 1989	SD	SDN Semampir IV Kediri
1989 – 1992	SLTP	SMPN 1 Kediri
1992 – 1995	SLTA	SMAN 2 Kediri
1995 – 1998	DIII Keperawatan	Akademi Keperawatan Darul 'Ulum Jombang
1999 – 2002	S1	Program Studi Ilmu Keperawatan Fakultas Kedokteran Universitas Ailangga
2007 – 2009	S2	Program Megister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
2010 – 2016	S3	Program Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

## Pengalaman Penelitian dalam 5 Tahun Tarakhir

No	Tahun	Judul Penelitian	Sumber Dana
1	2012	Regulasi Catechins green tea GMB-4 dalam menghambat NADPH dan Peningkatan kadar Nitric Oxide (NO) pada kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) yang mewngalami stres oksidasi	Hibah Bersaing DIKTI
2	2013	Evaluasi pemberantasan Demam berdarah dengue dan identifikasi Type Virus Dengue dengan metode Spasial Geographic Information System (GIS) di Kota Kediri	Hibah Dosen Pemula DIKTI
3	2014	Identifikasi Faktor yang mempengaruhi EPC Homing secara invitro pada kultur HUVEC yang di papar supernatan EPC dengan perlakuan High Glikosa	Hibah Disertasi Doktor DIKTI
4	2014	Identifikasi Perkembangbiakan Bakteri pada pasien yang terpasang ETT sebagai penyebab terjadinya VAP di ruang ICU	Hibah Dosen Pemula DIKTI
5	2015	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun pepaya ( <i>Carica papaya linn</i> ) terhadap aktivitas proliferasi sel dan apoptosis pada kanker servik mencit C3H	Hibah Bersaing DIKTI tahun Pertama
6	2015	Pengaruh pemberian <i>cognitive support</i> dan ESQ terhadap perubahan perilaku seksual dan status Imunologis penderita HIV/AIDS	Hibah AINEC
7	2016	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun pepaya ( <i>Carica papaya linn</i> ) terhadap aktivitas proliferasi sel dan apoptosis pada kanker servik mencit C3H	Hibah Bersaing DIKTI tahun II



## Pengalaman Penulisan Artikel Dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No	Judul Artikel Ilmiah	Volume/Nomer/Tahun	Nama Jurnal
1	Kemampuan whole cell helicobacter pylori dalam menginduksidegradasi kolagen tip IV melalui peningkatan aktivitas makrofag	2010	Jurnal Kedokteran Brawijaya, 2010
2	Pengaruh pemberia sari Lidah Buaya (Aloe Vera) terhadap Penurunan kadar gula darah acak pada Penderita diabetes Mellitus	2013	Jurnal STRADA ISSN 2252-3847 Vol 2 No.1
3	The effects of catechin isolated from green tea GMB-4 on NADPH and nitric oxide levels in endothelial cells exposed to high glucose	2015	Journal of Intercultural Ethnopharmacology, 2015, 4(2): 114-117
4	Pengaruh Pemberian Cognitive Support Terhadap Peningkatan Kadar CD4 Pada Pasien HIV Di Kota Kediri	2015	Jurnal Ners Volume 10 Nomor 1 edisi April 2015
5	Antidiabetic Activity of GMB-4 Green Tea Catechins in Rats Developing Type 2 Diabetes Mellitus Mice with Insulin Resistance	2015	International Journal of Academic Research Vol. 7, No. 3, 2015
6	A HeLa Cell-Implanted Mouse Model of Cervical Cancer	2015	Journal of Applied Environmental and Biological Sciences 5 (12) 79-82, 2015
7	Identification of factors that may Affect Endothelial Progenitor Cells (EPC) Homing with Treatment of High Glucose	2016	Journal of Applied Environmental and Biological Sciences 6(4)63-70, 2016
8	Effect of Papaya Leaf Extract on Cell Proliferation and Apoptosis Activities in Cervical Cancer Mice Model	2016	Journal of Applied Environmental and Biological Sciences 6(9): 78-83, 2016

## Pengalaman Presentasi Oral dalam Seminar Ilmiah 5 Tahun Terakhir

Tahun	Judul	Penyelenggara	Waktu dan Tempat
2012	Effect of Extract ciplukan (Physalis angulata ) on proinflamatory sytokine TNF $\alpha$ and level leucocytes in wistar strain male rate with Rheumatoid Arthritis. Prosiding ISSN 2301-4784	Peserta oral Presentation International Nursing Conference STIKes Karya Hudasa Kediri	Lotus Hotel Kediri, 7-8 Juni 2012
2014	Identification of bacterial Proliferation in Patient with Endotracheal Tube (ETT) as the cause of Ventilator-Assosiated Oneumonia (VAP) at the ICU of Mardi Waluyo regiaon Hospital Blitar. Prosiding ISBN: 978-602-19251-3-3	Peserta oral Presentation Internrtional : Anual Meeting of the association of Indonesian Nurse Education Center (AINEC) and International Seminar AIPNI	Pontianak , 13-15 Nopember 2014



Tahun	Judul	Penyelenggara	Waktu dan Tempat
2014	The provision of Cognitive Support on the Increased Levels of CD4 in People Living with HIV in Kediri City	Oral Presentation Interntional : Anual Meeting of the association of Indonesian Nurse Education Center (AINEC) and International Seminar AIPNI	Pontianak , 13-15 Nopember 2014
2014	The effect of <i>Catechins</i> isolated from <i>green tea</i> GMB-4 on enhancing the mobilization Endothelial Progenitor Cells (EPC) Through activation of <i>Stromal Cell-Derived Factor-1(SDF-1α)</i> and <i>Nitric Oxide (NO)</i> on Endothelial Dysfunction Diabetes mellitus Type II"	International Conferenceon Advance Molecular Bioscience and Biomedical Engineering (ICAMBBE) Laboratorium Biosciece Universitas Brawijaya	Malang, Hotel Ariya Gajayana. 12-13 September 2014

### Pengalaman Penulisan Buku Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1	Panduan Praktik Laboratorium Pemeriksaan Fisik Keperawatan	2011	48	CV. Eskarno Kediri
2	Panduan Praktik Laboratorium Keperawatan Kebutuhan Dasar Manusia dan Keperawatan Medikal Bedah	2011	89	CV. Masoelom Kediri
3	Panduan Penulisan Skripsi Kualitatif dan Kuantitatif	2011	68	CV. Masoelom Kediri
4	Imunologi Diagnosis dan Teknik Biologi Molekuler	2014	224	Nuha Medika ISBN: 978-602-1547-32-8



**REPUBLIK INDONESIA**  
**KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA**

**SURAT PENCATATAN CIPTAAN**

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia Republik Indonesia, berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta yaitu Undang-Undang tentang perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra (tidak melindungi hak kekayaan intelektual lainnya), dengan ini menerangkan bahwa hal-hal tersebut di bawah ini telah tercatat dalam Daftar Umum Ciptaan:

- I. Nomor dan tanggal permohonan : EC00301704176, 7 Oktober 2017
- II. Pencipta  
Nama : Dr. Yully Peristiowati, S.Kep., Ns., M.Kes  
Alamat : Jl. Wahid Hasyim Gg III/6 RT.013 RW.002, Kelurahan Bandar Lor, Kecamatan Mojoroto, Kediri, JAWA TIMUR, 64114
- Kewarganegaraan : Indonesia
- III. Pemegang Hak Cipta  
Nama : SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN SURYA  
MITRA HUSADA  
Alamat : Jalan Manila No. 37 Sumberece, Kediri, JAWA TIMUR, 64133
- Kewarganegaraan : Indonesia
- IV. Jenis Ciptaan : Buku
- V. Judul Ciptaan : MONOGRAF Catechins Green Tea GMB-4 Sebagai Antidiabetik
- VI. Tanggal dan tempat diumumkan : 1 Januari 2016, di Kediri untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia
- VII. Jangka waktu perlindungan : Berlaku selama 50 (lima puluh) tahun sejak Ciptaan tersebut pertama kali dilakukan Pengumuman.
- VIII. Nomor pencatatan : 04265

Pencatatan Ciptaan atau produk Hak Terkait dalam Daftar Umum Ciptaan bukan merupakan pengesahan atas isi, arti, maksud, atau bentuk dari Ciptaan atau produk Hak Terkait yang dicatat. Menteri tidak bertanggung jawab atas isi, arti, maksud, atau bentuk dari Ciptaan atau produk Hak Terkait yang terdaftar. (Pasal 72 dan Penjelasan Pasal 72 Undang-undang Nomor 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta)

a.b. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
REPUBLIK INDONESIA  
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL  
u.b.  
DIREKTUR HAK CIPTA DAN DESAIN INDUSTRI

Dr. Dwi Widhyastari, Apt., M.Si.  
NIP. 196003181991032001