

HAMBATAN MUTASI *p53* OLEH (-)-EPIGALOKATEKIN GALAT PADA KULTUR HEPATOSIT TIKUS

Djoko A. Purwanto*, Sofia Mubarika**, Indwiani Astuti**, A. Toto Purnomo*, dan Retno P. Rahayu**

* *Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. E-mail: djokoagus@yahoo.com.*

** *Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga*

*** *Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada*

Abstrak

Paparan bahan karsinogenik hampir tidak dapat dihindari dalam kehidupan sehari-hari. Oleh karena itu perlu senyawa yang dapat mencegah terjadinya karsinogenesis. Pada penelitian ini (-)-epigallocatekin galat yang diisolasi dari teh hijau diuji kemampuannya dalam mencegah mutasi pada gen *p53* yang diinduksi oleh *N*-metil-*N*-nitrosourea. Dengan menggunakan metode PCR-SSCP maka dapat disimpulkan bahwa komponen utama teh hijau yaitu (-)-epigallocatekin galat (EGCG) dari kadar 20 ppm hingga 160 ppm yang diberikan pada media kultur hepatosit tikus selama 36 jam dapat menghambat terjadinya mutasi yang diinduksi *N*-metil-*N*-nitrosourea sebanyak 40 μ M pada gen *p53* ekson 6 dan 8, sedangkan ekson 5 dan ekson 7 tidak terjadi mutasi hingga pemberian mutagen *N*-metil-*N*-nitrosourea sebanyak 40 μ M. Hasil ini

Abstract

Inhibition of *p53* Gene Mutation by (-)-Epigallocatechin Gallate in Primary Rat Liver Cell Cultures

The carcinogen exposure to human live almost occur everyday. Therefore, we need a substance which can protect carcinogenesis. In this study, we examine the effect of (-)-epigallocatechin gallate isolated from green tea to prevent *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mutation on *p53* gene exon 5, 6, 7, and 8 by PCR-SSCP method. It was found that (-)-epigallocatechin gallate 20 ppm to 160 ppm in primary rat liver cell cultures for 36 hours can inhibit *p53* gene mutation on exon 6 and exon 8 induced by 40 μ M *N*-methyl-*N*-nitrosourea. These result recommend that (-)-epigallocatechin gallate can used as cancer chemoprevention agent.

Keywords: (-)-epigallocatechin gallate, green tea, cancer chemoprevention, PCR-SSCP.

PENDAHULUAN

Paparan bahan karsinogenik dewasa ini hampir tidak dapat dihindari dalam kehidupan sehari-hari. Mulai dari limbah industri, polusi udara, asap rokok, makanan, minuman, hingga kosmetik masih banyak dijumpai bahan yang dapat menyebabkan kanker. Oleh karena itu perlu dicari suatu senyawa yang dapat digunakan sebagai pencegah terjadinya inisiasi karsinogenesis. Pilihan yang paling memberi peluang adalah teh hijau sebab secara epidemiologis terbukti dapat menurunkan angka kejadian kanker. Di samping itu teh hijau juga diunggulkan sebagai *chemopreventive agent* pada seminar kanker ke-13 di Sapporo, Jepang.

Teh hijau adalah teh yang diperoleh dari daun *tumbuhan Camellia sinensis* familia *Theaceae* yang diolah tanpa mengalami fermentasi dan memiliki kandungan (-)-epigallocatekin galat terbesar dibandingkan teh lain misalnya teh hitam, teh o'olong, dan teh pouchong. Teh memiliki kandungan beberapa polifenol yaitu flavonol, flavandioliol, flavonoid, dan asam fenolat. Kandungan terbesar polifenol teh hijau adalah flavonol yang biasa disebut katekin (Miyagawa *et al.*, 1997). Teh hijau memiliki kadar katekin 26,7%, sedangkan teh hitam memiliki kadar 4,3% (Yen & Chen, 1996). Komposisi kandungan katekin dari teh hijau adalah (-)-epigallocatekin galat (EGCG) 15,1%, (-)-epigallocatekin (EGC) 6,9%, (-)-epikatekin galat (ECG) 3,0%, (-)-epikatekin (EC) 1,8%, (+)-katekin 0,5%, kofein 8,1% dan teobromin 0,4% atau jika dibuat 1,25% ekstrak teh dalam air panas mengandung EGCG 708 ppm, EGC 324 ppm, ECG 141 ppm EC, 84 ppm katekin 23 ppm, kofein 380 ppm dan teobromin 19 ppm (Wang *et al.*, 1992). Beberapa peneliti menekankan bahwa hambatan tumor teh hijau disebabkan karena fraksi polifenol terutama EGCG yang merupakan komponen terbesar (Katiyar *et al.*, 1993). Struktur kimia dari EGCG dengan banyaknya gugus fenol menggambarkan kemampuannya dalam menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*).

Studi epidemiologi di Shanghai, Cina menunjukkan bahwa kebiasaan mengkonsumsi teh hijau dapat menurunkan resiko kanker usus masyarakat setempat (Yu *et al.*, 1995). Demikian juga di Jepang, konsumsi teh hijau oleh penduduk di beberapa daerah menunjukkan terjadinya penurunan resiko relatif angka kejadian kanker secara bermakna (Imai *et al.*, 1997). Hal ini menunjukkan bahwa teh hijau memiliki efek hambatan terjadinya karsinogenesis dan perlu mendapatkan perhatian untuk dikembangkan sebagai senyawa unggulan dalam mencegah kanker.

EGCG juga memiliki kemampuan mencegah karsinogenesis yang diinduksi oleh beberapa karsinogen kimiawi seperti benzo(a)piren (BP) (Muto *et al.*, 1999), 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NKK) (Shi *et al.*, 1994), N-nitrosobis(2-oxopropil)amin (BOP) (Majima *et al.*, 1998), 1,2-dimethylhydrazine (SDMH) (Yin *et al.*, 1994), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)(Yamane *et al.*, 1995), N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)(Fujita *et al.*, 1989) dan masih banyak lagi. Penelitian kami terdahulu menunjukkan bahwa EGCG kadar 66,7 ppm yang diberikan pada kultur hepatosit tikus selama 48 jam dapat meningkatkan aktifitas O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT) yaitu salah satu enzim yang berperan dalam perbaikan DNA, secara bermakna (Purwanto, 2000). Namun sejauh ini mekanisme efek hambatan EGCG pada gen p53 yang mengatur siklus sel untuk memberi kesempatan terjadinya perbaikan DNA dan proses apoptosis masih belum pernah dipelajari. Oleh karena itu pada penelitian ini akan ditentukan efek hambatan (-)-epigallocatekin galat teh hijau terhadap sistem perbaikan DNA khususnya dalam mencegah mutasi pada tumor-supresor gen *p-53* ekson 5, 6, 7 dan 8 pada kultur hepatosit tikus menggunakan metode PCR-SSCP.

Penelitian ini merupakan bagian dari alur penelitian besar untuk mencari senyawa yang dapat berfungsi meningkatkan kemampuan apoptosis sel apabila terjadi kerusakan pada DNA sebagai usaha kemanusiaan untuk mencegah terjadinya karsinogenesis.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian dan Bahan Uji

(-)-Epigallocatekin galat diperoleh sebagai hasil isolasi dari daun teh (*Camellia sinensis*) oleh Sigma Chemical Company dengan derajat kemurnian HPLC > 98 %. Tikus jenis Wistar diperoleh dari Laboratorium Hewan Fakultas Farmasi dengan berat badan ± 200 gram, diisolasi heparinya, dan dibuat kultur hepatosit yang akan diberi perlakuan dan diamati responnya terhadap pencegahan mutasi pada *p53*.

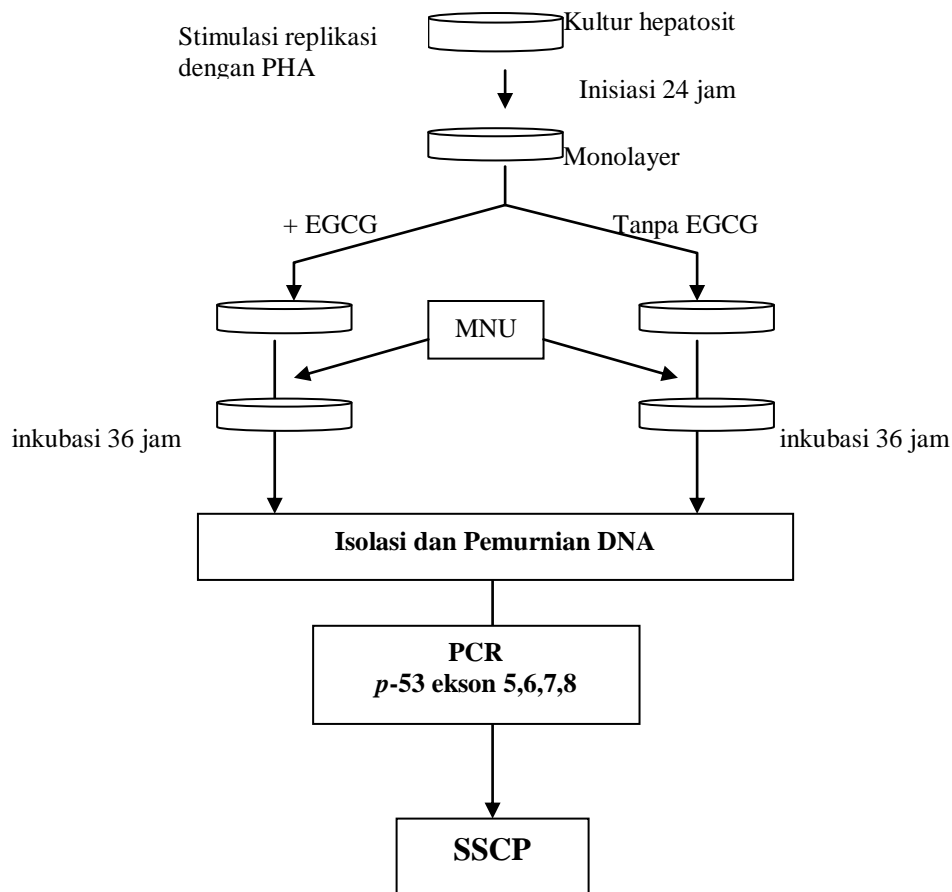
Alat Penelitian

Untuk melakukan PCR digunakan thermocycler Thermolyne CS-1.

Metodologi

Kultur hepatosit dibagi dalam 3 kelompok yaitu blanko, kontrol positif dan pemberian perlakuan EGCG. Masing-masing kelompok kecuali blanko digunakan 5 macam kadar yaitu untuk kontrol positif (*N*-metil-*N*-nitrosourea=MNU) 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M dan 100 μ M, sedangkan untuk perlakuan diberikankan EGCG masing-masing 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm dan 100 ppm sebelum ditambahkan mutagen MNU sebesar 20 dan 40 μ M dengan replikasi sebanyak 3 kali.

Alur Penelitian



Persiapan Kultur Hepatosit Tikus

Tikus ditimbang dan dianestesi dengan eter. Rongga peritoneal dibuka dan disiapkan 3 ligatur pada vena porta dan vena cava inferior. Kemudian media perfusi hepar dimasukkan hepar setelah vena cava inferior dipotong. Disiapkan ligatur 4 pada vena cava sekitar 1 cm dari diafragma. Dilakukan resirkulasi dengan media disintegrasasi

hepar suhu 37 ° C dengan kecepatan 30 ml /menit selama 30 menit. Hepar diisolasi selaput dirobek dan hepatosit disuspensikan dalam media kultur suhu 0 – 4° C. Suspensi disaring kasa nilon 100 µm dan dicuci. Kemudian dilakukan perhitungan kepekatan sel, tiap 100 kultur dibutuhkan suspensi hepatosit yang terdiri atas : FBS 20 ml + Pen – Strep 2.0 ml + Gentamysin (40 mg/ml) 250 µl + Hepes 1,2 g + 200 juta hepatosit hidup + media WME sampai volume 200 ml. Kemudian pHnya diatur hingga 7,4. Suspensi hepatosit dituang 2,0 ml dalam masing-masing piring petri steril 25 cm² kemudian diinkubasikan dalam inkubator O₂/CO₂ (95/5 vol.%) suhu 37° C selama 2 jam untuk inisiasi kultur monolayer.

Larutan Senyawa Uji dan Kontrol

Senyawa uji (EGCG) dilarutkan dalam media kultur WME sebagai larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm, kemudian dibagikan ke dalam masing-masing sampel hingga konsentrasi yang diharapkan. Kontrol (MNU) dibuat kadar induk 1 mM dengan bantuan WME, kemudian pH diatur 7,4 dan dibagikan hingga konsentrasi yang diharapkan.

Penyiapan DNA Target untuk PCR

Dibuat suspensi hepatosit sebanyak 80 ml dengan konsentrasi 10⁶ sel/ml kemudian tambahkan PHA. Tiap piring petri diisi 2,5 ml suspensi. Sebagai kontrol digunakan MNU sedang perlakuan diberikan EGCG dengan kadar 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm dan 100 ppm. Kultur diinkubasikan selama 36 jam 37° C. Sel dipanen dilisis menggunakan proteinase K dan 20% SDS selama 24 jam 37° C, kemudian diisolasi DNA dan dilakukan pemurnian sebelum dilakukan PCR.

Amplifikasi Dengan PCR

DNA dari kontrol dan perlakuan masing-masing diambil 1 µg dalam 50 mM KCl, 10 mM tris (pH 8,4), 2,5 mM MgCl₂, masing-masing 1 µM primer, deoksinukleotida fosfat (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) masing-masing 200 µM, gelatin 200 µg/ml, 2 unit Taq polimerase dalam volume reaksi 100 µl (enzim diberikan terakhir setelah ditambah mineral oil beberapa tetes). Primer yang digunakan untuk amplifikasi *p-53* ekson 5,6,7,8 adalah :

Ekson 5 (sense) 5'-TTC CTC TTC CTG CAG TAC TC -3' dan
(antisense) 5'-ACC CTG GGC AAC CAG CCC TGT-3'

Ekson 6 (sense) 5'-ACA GGG CTG GTT GCC CAG GGT-3' dan
(antisense) 5'-AGT TGC AAA CCA GAA CCT CAG-3'

Ekson 7 (sense) 5'-GTG TTG TCT CCT AGG TTG GC-3' dan
(antisense) 5'-GTT CAC CGA GGA CTG GAC CT-3'

Ekson 8 (sense) 5'-TAT CCT GAG TAG TGG TAA TC-3' dan
(antisense) 5'-AAG TGA ATC TGA GGC ATA AC-3'

Kemudian dilakukan amplifikasi 30 cycle sebagai berikut:

Denaturasi 95°C selama 1 menit

Annealing 50°C selama 2 menit

Ekstensi 72°C selama 3 menit

Setelah selesai dilakukan *cool down* hingga 4°C. Mineral oil diambil dengan menggunakan parafilm dengan jalan memutar-mutar pada kertas hingga terjadi loncatan. Produk yang diperoleh dianalisis menggunakan elektroforesis.

Analisis SSCP

Sebanyak 5 ml produk PCR yang telah dimurnikan ditambah 10 ml formamide dye dalam tube ependorf dibuat *single strand* dengan cara dipanaskan 95 °C selama 7 menit , kemudian dengan cepat tube dicelupkan kedalam campuran *dry ice* dan metanol. Produk PCR yang telah menjadi single strand tersebut dilakukan pemisahan elektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamid 8 % pada suhu 4 °C selama ± 3-7 jam 150 volt hingga warna bromfenol blue hampir mencapai batas bawah. Setelah selesai dielektroforesis, gel dicuci dengan larutan asam asetat dan dilakukan pewarnaan dengan menggunakan perak nitrat. Adanya ekstra band menunjukkan terjadinya mutasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi PCR

Kondisi optimum PCR dicari dengan memperhatikan beberapa hal yang amat menentukan keberhasilan teknik PCR. Oleh karena itu telah dilakukan percobaan berkali-kali untuk mendapatkan komposisi serta program suhu PCR yang akan menghasilkan produk yang diharapkan. Kondisi akhir yang memberikan hasil PCR 1 band dengan intensitas yang kuat pada amplifikasi gen p53 ekson 5, 6, 7, dan 8 menggunakan komposisi :

| | |
|----------------------------|-------|
| dH ₂ O | 33 µl |
| Bufer PCR (Mg 15 mM) | 5 µl |
| dNTPs (2,5 mM) | 4 µl |
| Primer 1 (40 pmol/µl) | 2 µl |
| Primer 2 (40 pmol/µl) | 2 µl |
| Tag polymerase (1 unit/µl) | 2 µl |
| DNA | 2 µl |
| Volume akhir | 50 µl |

Program suhu yang digunakan untuk amplifikasi gen p53 ekson 5 adalah :

Hot start : 95 °C selama 5 menit
PCR : 94 °C selama 45 detik
53,5 °C selama 45 detik
72 °C selama 1 menit 15 detik
dilakukan sebanyak 30 kali siklus

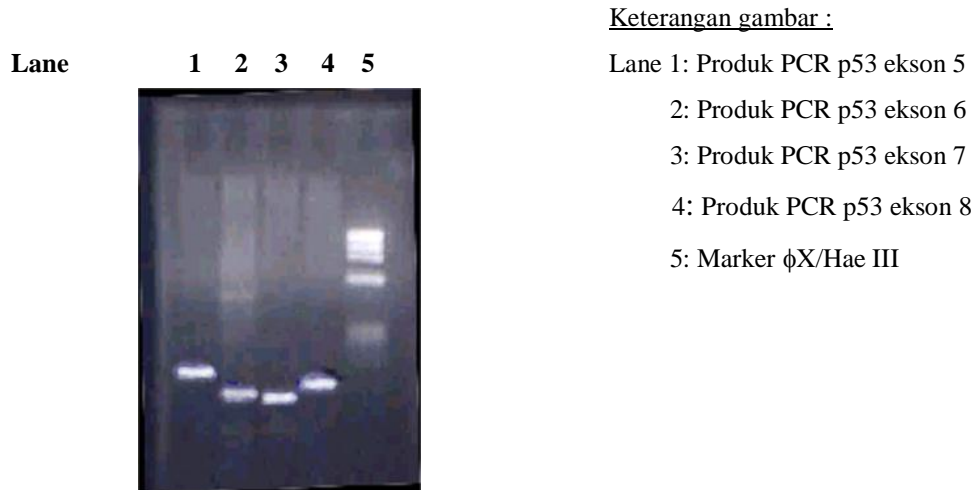
Ekstra ekstension : 72 °C selama 10 menit kemudian reaksi dihentikan dengan menurunkan suhu hingga 4 °C.

Program suhu yang digunakan untuk amplifikasi gen p53 ekson 6,7 dan 8 adalah

Hot start : 95 °C selama 5 menit
PCR : 94 °C selama 45 detik
55,5 °C selama 45 detik
72 °C selama 1 menit 15 detik
dilakukan sebanyak 30 kali siklus

Ekstra ekstension : 72 °C selama 10 menit kemudian reaksi dihentikan dengan menurunkan suhu hingga 4 °C.

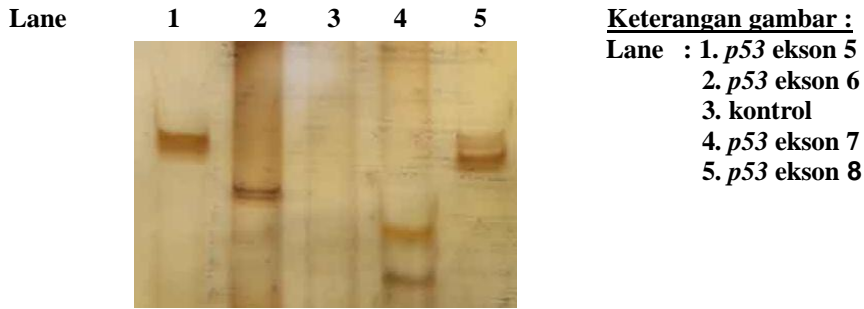
Dengan menggunakan *thermocycler* Thermolyne CS-1, maka hasil optimasi PCR yang diperoleh dengan kondisi diatas adalah sebagai berikut :



Gambar 2. Produk PCR hasil optimasi amplifikasi gen *p53* ekson 5,6,7 dan 8 dari DNA hepatosit tikus menggunakan *thermocycler* Thermolyne CS-1.

Optimasi SSCP

Hasil amplifikasi gen *p53* ekson 5,6,7 dan 8 selanjutnya akan dianalisis adanya mutasi dengan menggunakan teknik SSCP. Telah dilakukan beberapa percobaan untuk mendapatkan hasil SSCP yang terbaik. Kondisi akhir yang memberikan hasil SSCP terbaik adalah menggunakan gel poliakrilamid 12 % dengan penambahan gliserol 5 % dan dilakukan elektroforesis pada suhu kamar 150 Volt selama 4 jam. Hasil terbaik meliputi ketajaman pewarnaan dan terpisahnya untai ganda DNA menjadi untai tunggal, sehingga dari satu band hasil PCR akan diperoleh 2 band yang tajam pada lempeng poliakrilamid. Hasil SSCP dari produk PCR gen *p53* ekson 6 dapat digunakan untuk mewakili produk PCR ekson lain karena antar ekson memiliki perbedaan panjang fragmen DNA yang tidak terlalu besar seperti pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil optimasi PCR-SSCP gen *p53* ekson 6 dari DNA hepatosit tikus menggunakan gel poliakrilamid 12 % dengan penambahan gliserol 5 % dielektroforesis pada suhu kamar 150 Volt selama 4 jam.
 Terlihat adanya pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal sehingga bila terjadi mutasi akan dapat dideteksi dengan melihat adanya band tambahan atau terjadi pergeseran akibat terjadinya perbedaan konformasi lipat dari DNA untai tunggal.

Hasil PCR-SSCP Gen *p53* Ekson 5, 6, 7, dan 8

Hasil PCR-SSCP dari beberapa perlakuan terhadap *p53* ekson 5, 6, 7 dan 8 dibuat pada tabel 1, tabel 2, tabel 3 dan tabel 4.

Tabel 1

Tabel analisis mutasi gen *p-53* pada kultur hepatosit tikus yang diinduksi mutagen *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) dengan metode PCR-SSCP ekson 5.

| Blan -ko | MNU | | | | | EGCG + MNU 20 μ M | | | | | EGCG + MNU 40 μ M | | | | |
|-------------|-----|---|---|---|---|-----------------------|---|---|---|---|-----------------------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = tidak terjadi mutasi; + = terjadi mutasi

Tabel 2

Tabel analisis mutasi gen *p-53* pada kultur hepatosit tikus yang diinduksi mutagen *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) dengan metode PCR-SSCP ekson 6.

| Blan -ko | MNU | | | | | EGCG + MNU 20 μ M | | | | | EGCG + MNU 40 μ M | | | | |
|-------------|-----|---|---|---|---|-----------------------|---|---|---|---|-----------------------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - |

- = tidak terjadi mutasi; + = terjadi mutasi

Tabel 3

Tabel analisis mutasi gen *p*-53 pada kultur hepatosit tikus yang diinduksi mutagen *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) dengan metode PCR-SSCP ekson7.

| Blan -ko | MNU | | | | | EGCG + MNU 20 μ M | | | | | EGCG + MNU 40 μ M | | | | |
|-------------|-----|---|---|---|---|-----------------------|---|---|---|---|-----------------------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = tidak terjadi mutasi; + = terjadi mutasi

Tabel 4

Tabel analisis mutasi gen *p*-53 pada kultur hepatosit tikus yang diinduksi mutagen *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) dengan metode PCR-SSCP ekson 8.

| Blan -ko | MNU | | | | | EGCG + MNU 20 μ M | | | | | EGCG + MNU 40 μ M | | | | |
|-------------|-----|---|---|---|---|-----------------------|---|---|---|---|-----------------------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - |

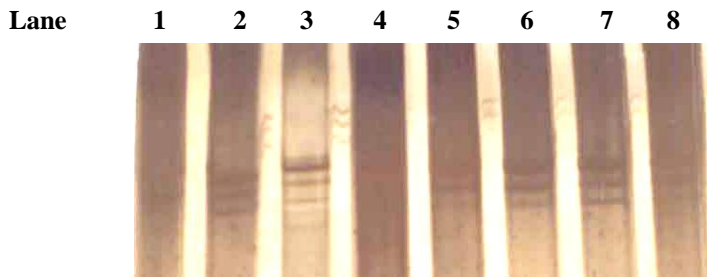
- = tidak terjadi mutasi; + = terjadi mutasi.

Dari keempat tabel di atas terlihat bahwa MNU 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M dan 100 μ M, semua menyebabkan terjadinya mutasi pada p53 ekson 6 dan ekson 8, sedangkan ekson 5 dan 7 tidak termutasi. Hal ini menunjukkan bahwa titik tangkap kerja MNU tidak pada gen p53 ekson 5 dan ekson 7, sedangkan pada ekson 6 dan ekson 8 jelas mutasi terlihat pada pemberian MNU 20 μ M dan 40 μ M (Gambar 4). Oleh karena itu hambatan mutasi EGCG pada pemberian MNU dilihat dari terjadi atau tidaknya mutasi pada p53 ekson 6 dan ekson 8.

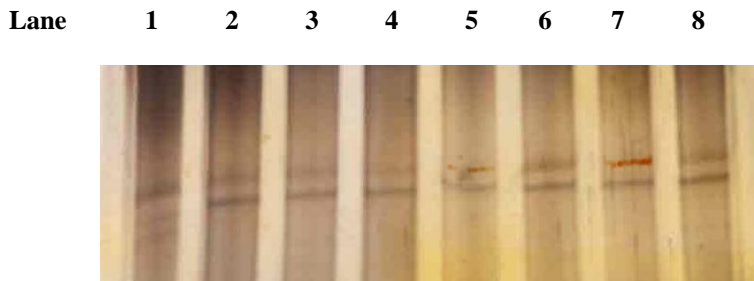
Lane 1 2 3 4 5 6 7 8



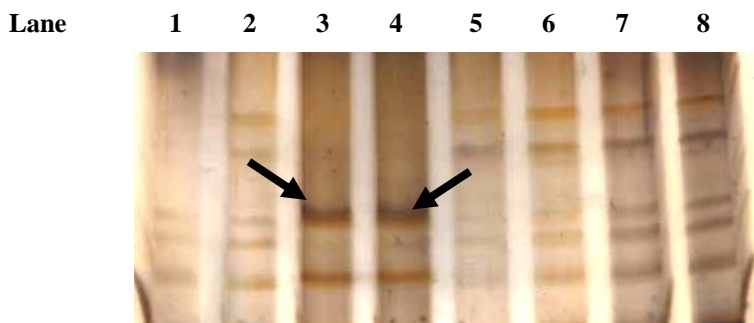
Gen p53 ekson 5



Gen p53 ekson 6



Gen p53 ekson 7



Gen p53 ekson 8

Keterangan gambar:

- | | |
|-------------------|----------------------------------|
| Lane 1. Kontrol, | 5. MNU 40 μ M + EGCG 20 ppm |
| 2. EGCG 40 ppm | 6. MNU 40 μ M + EGCG 40 ppm |
| 3. MNU 20 μ M | 7. MNU 40 μ M + EGCG 80 ppm |
| 4. MNU 40 μ M | 8. MNU 40 μ M + EGCG 160 ppm |

Gambar 4. Pengaruh EGCG dan MNU pada terjadinya mutasi gen p53 ekson 5, 6, 7, dan 8 dalam kultur primer hepatosit tikus.

KESIMPULAN

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa komponen utama teh hijau yaitu (-)-epigallocatekin galat (EGCG) dari kadar 20 ppm hingga 160 ppm yang diberikan pada media kultur hepatosit tikus selama 36 jam dapat menghambat terjadinya mutasi yang diinduksi N-metil-N-nitrosourea sebanyak 40 μ M pada gen p53 ekson 6 dan 8, sedangkan ekson 5 dan ekson 7 tidak terjadi mutasi hingga pemberian mutagen N-metil-N-nitrosourea sebanyak 40 μ M.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional dan Direktur Proyek URGE, atas bantuan dana melalui program penelitian Domestic Collaborative Research Grant (DCRG). Terima kasih pula disampaikan kepada Direktur PAU-Bioteknologi UGM yang telah memberikan fasilitas Laboratorium untuk menyelesaikan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Huang, M.T., Wang, Z.Y., Ho, C.T., Ferraro, T., Newmark, H., Mitchell, J.M., Laskin, J.D., and Conney, A.H., 1991. Inhibitory effect of topical application of green tea poliphenol fraction on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced ornithine decarboxilase activity, inflammation, and tumor promotion in the skin of CD-1 mice. **Proc. Am. Assoc. Cancer Research**, 32:129.
- Imai, K., Suga, K., and Nakachi, K., 1997. Cancer-preventive effects of drinking green tea among Japanese population. **Preventive Medicine**, 26:769-775.
- Marzuki, S., & Jenie, U.A., 1996. **Paradigma Baru Dalam Strategi Penemuan Obat**. Suatu kombinasi antara aktivitas analisis genom dengan keanekaragaman hayati. Diskusi Panel, Lustrum X dan Reuni V, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Macdonald, F., and Ford, C.H.J., 1997. **Molecular Biology of Cancer**. BIOS Scientific Publisher Limited , Oxford, p.35-60.
- Purwanto, D.A., 2000. Hambatan Inisiasi Karsinogenesis (-)Epigalokatekin Galat Melalui Peningkatan Aktivitas O⁶-Alkilguanin-DNA Alkiltransferase. **Disertasi**, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Purwanto, D.A., Zaini, N.C., and Santosa, M.H., 1997. Analisis DNA Teralkilasi Oleh 1,2-Dimetilhidrasin Pada Kultur Limfosit Manusia Setelah Pemberian Ekstrak Air Teh Hijau (*Camellia sinensis*). **Jurnal Penelitian Universitas Airlangga**, Vol.5, No.1, 48-57.
- Shi, S.T., Wang, Z.Y., Smith, T.J., Hong, J.Y., Chen, W.F., Ho, C.T., and Yang, C.S., 1994. Effect of green tea and black tea on 4-methyl(nitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice. **Cancer Research**, 54:4641-47.
- Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I., Hara, Y., and Kada, T., 1986. The pyrogallol related compounds reduce UV-induced mutation in Escherichia coli B/r WP2. **Mutation Research**, 173:239-244.
- Yu, G.P., Hsieh, C.C., Wang, L.Y., Yu, S.Z., Li, X.L., and Jin, T.H., 1995. Green tea consumption and risk of stomach cancer: a population-base case control study in Shanghai, China. **Cancer Causes Control**, 6:53