

## Analisis Kadar O<sup>6</sup>-[H<sup>3</sup>]Metilguanin-DNA pada Kultur Hepatosit Tikus Menggunakan Liquid Scintillation Counter Setelah Pemberian (-)-Epigalokatekin Galat dari Teh Hijau

*Analysis of O<sup>6</sup>-[H<sup>3</sup>]Methylguanine-DNA in Rat Liver Cell Culture by Liquid Scintillation Counter After (-)-Epigallocatechin Gallate Exposure from Green Tea*

Djoko Agus Purwanto

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi,  
Universitas Airlangga, Surabaya

### ABSTRACT

**Background.** Alkylation of DNA can occur at various site, however alkylation of the O<sup>6</sup>-position of guanine has the strongest mutagenic potential. O<sup>6</sup>-Methylguanine is a toxic and mutagenic lesion which is formed in cellular DNA by alkylating agents. Alkyl group from carbanium ion can attack DNA forms alkylated DNA especially at O<sup>6</sup> position of guanine. O<sup>6</sup>-methylguanine mispairs with thymine during replication, and if the adduct is not removed, this results in conversion from a guanine-cytosine pair to an adenine-thymine pair. Deficient repair of O<sup>6</sup>-methylguanine has been suggested to be a contributory factor in the etiology of some diseases such as diabetes and cancer. This study aimed to determine O<sup>6</sup>-methylguanine DNA concentration induced by N-[H<sup>3</sup>]methyl-N-nitrosourea ([H<sup>3</sup>]MNU) in rat liver cell culture with and without (-)-epigallocatechin gallate exposure.

**Methods.** Primary rat liver cell culture was divided into 10 groups. Five groups for [H<sup>3</sup>]MNU 32 µM exposure, and 5 groups remain for 48 µM [H<sup>3</sup>]MNU exposure. Each group of [H<sup>3</sup>]MNU exposure got EGCG 0 (as control), 8, 17, 33 and 67 ppm. The DNA was isolated, and O<sup>6</sup>-[H<sup>3</sup>]methylguanine DNA separated by high performance liquid chromatography (HPLC). Concentration of O<sup>6</sup>-[H<sup>3</sup>]methylguanine DNA was measured by Liquid Scintillation Counter.

**Results.** O<sup>6</sup>-Methylguanine DNA concentration decreased significantly in liver cell culture groups with EGCG. O<sup>6</sup>-[H<sup>3</sup>]Methylguanine DNA concentration in control groups for [H<sup>3</sup>]MNU 32 µM and 48 µM were 29.89 ± 2.01 and 32.00 ± 1.67 fmol/µg DNA, respectively, while with EGCG 67 ppm were 1.87 ± 0.94 and 2.38 ± 0.36 fmol/µg DNA.

**Conclusion.** O<sup>6</sup>-methylguanine DNA concentration in liver rat culture induced by MNU decreases significantly after EGCG exposure. These findings support the conclusion that EGCG plays a key role in suppressing and inhibiting cancer development.

**Keywords:** (-)-epigallocatechin gallate, N-[H<sup>3</sup>]methyl-N-nitrosourea, O<sup>6</sup>-methylguanine DNA, Liquid Scintillation Counter

---

### PENDAHULUAN

---

Teh adalah salah satu minuman yang amat populer digunakan di Jepang, Cina dan negara Asia Timur Jauh. Teh memiliki kandungan polifenol flavonol yang disebut katekin (Rodriguez et al., 2005). Di antara senyawa katekin yang terdapat dalam teh, (-)-epigalokatekin galat (EGCG) merupakan komponen yang kadarnya paling besar (*major component*) (Jung and Ellis, 2002). Selain EGCG, komponen katekin lainnya yang terdapat dalam teh adalah: (-)-epigallocatechin (EGC) 5.5%; (-)-epicatechin

(EC) 12.24%; (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 51.88%; (-)-epicatechin-3-gallate (ECG) 6.12%; total green tea katekin 75.7%; dan caffeine, <1% (Bettuzzi et al., 2006). Dilaporkan bahwa efek hambatan karsinogenesis teh sangat berkaitan dengan kandungan katekinnya. Hambatan karsinogenesis teh hijau 6 kali lebih poten dibandingkan dengan teh hitam (Serafini et al., 1996) karena kadar katekin teh hijau (26,7 %) lebih besar dari teh hitam, (4,3%) (Yen dan Chen, 1996).

Penggunaan 1.25 % ekstrak air teh hijau (serupa dengan kadar teh dalam minuman sehari-hari) dapat

menekan hingga 82 % pembentukan tumor yang diinduksi oleh 7,12-dimetil-benz(*a*)antrasena (DMBA) pada tikus (Wang et al., 1992). Disamping itu, EGCG dari teh hijau menunjukkan kemampuan neuroprotektif baik *in vitro* maupun *in vivo* (Mandel et al., 2005). EGCG sebagai kandungan terbesar teh hijau juga dilaporkan mencegah terjadinya kanker dan penyakit kardiovaskuler (Yang and Landau, 2000). Dari semua penelitian diatas menunjukkan bahwa EGCG memiliki kemampuan untuk mencegah terjadinya kanker, namun sejauh ini mekanisme hambatan karsinogenesis oleh EGCG dari teh hijau belum diketahui secara pasti.

Sebagai senyawa yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat, maka mekanisme hambatan karsinogenesis EGCG perlu diteliti lebih lanjut. Beberapa peneliti memperkirakan efek hambatan karsinogenesis EGCG disebabkan sifatnya sebagai anti-oksidan (Chen and Ho, 2007), namun beberapa peneliti lain memperoleh bukti yang meyakinkan bahwa mekanisme hambatan karsinogenesis EGCG memiliki titik tangkap pada sistem perbaikan DNA (Meeran et al., 2006; Katiyara et al., 2007). Selain hal tersebut, EGCG juga mampu mencegah mutagenesis hampir sebesar 40% pada sel HCT116 and HCT116/ch3 yaitu sel-sel yang telah kehilangan kemampuan repairnya (Mure and Rossman, 2001). Salah satu enzim perbaikan DNA yang sangat berperan terhadap terjadinya inisiasi karsinogenesis adalah O<sup>6</sup>-alkilguanin-DNA alkiltransferase (AGT) (Qingming et al., 2005). AGT berfungsi memindahkan gugus alkil dari karsinogen yang melekat pada O<sup>6</sup>-guanin-DNA ke sistein internal dirinya sendiri sehingga DNA menjadi normal kembali (Rasimas et al., 2003). Jika EGCG yang terdapat pada teh hijau dapat meningkatkan aktifitas AGT di dalam sel, maka kadar O<sup>6</sup>-alkilguanin-DNA akan turun karena kecepatan perbaikan DNA meningkat sehingga mutasi pada DNA dapat dicegah dan terjadinya inisiasi karsinogenesis dapat dihindari.

Pencegahan karsinogenesis pada tahap inisiasi ini sangat penting karena inisiasi merupakan proses yang bersifat menetap (*irreversibel*) dan siap berkembang menjadi kanker apabila dipicu adanya promotor dan kondisi lingkungan sel yang mendukung (Corpet and Pierre, 2003). Namun apakah EGCG mampu menurunkan kadar DNA termetilasi akibat paparan

karsinogen? Apakah kadar O<sup>6</sup>-alkilguanin-DNA yang diinduksi oleh N-metil-N-nitrosourea akan turun pada pemberian EGCG. Untuk mendapatkan jawaban dari masalah tersebut, maka perlu dilakukan pembuktian secara eksperimental.

Pendekatan teoretis dari struktur kimia EGCG yang merupakan ester dari asam galat dan epigallocatekin. Struktur resonansi ester terprotonkan akan memberikan muatan positif terhadap atom karbon karbonil dan atom oksigen karbonil (Fesenden & Fesenden, 1998). Muatan positif ini membuat EGCG dapat berinteraksi dengan gugus S-sistein asam amino 145 pada AGT seperti yang terjadi antara suatu ion karbanium (CH<sub>3</sub><sup>+</sup>) dan AGT (Singer & Berg, 1991). Interaksi AGT dengan EGCG ini menyebabkan terjadinya perubahan konformasi AGT sehingga dapat menjadi aktivator yang akan melekat pada daerah promotor gen AGT. Aktivasi pada promotor gen AGT menyebabkan ekspresi AGT di dalam sel meningkat (Margison et al., 2003). Meningkatnya ekspresi AGT di dalam sel mempercepat proses perbaikan kerusakan O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA yang diinduksi oleh karsinogen sehingga kadar O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA akan menurun dan terbentuk O<sup>6</sup>-guanin normal (Rasimas et al., 2003). Menurunnya kadar O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA ini, akan mencegah terjadinya inisiasi karsinogenesis (Samson, 2006).

Alkilasi DNA pada posisi O<sup>6</sup>-guanin merupakan kerusakan yang paling poten dalam memicu inisiasi karsinogenesis (Daniels and Tainer, 2000). Kerusakan ini dapat diperbaiki secara spesifik oleh AGT. Oleh karena itu AGT sangat berperan dalam menurunkan kadar O<sup>6</sup>-alkilguanin dan mencegah mutasi (Qingming et al., 2005). Jika secara teoritis pemberian EGCG pada kultur hepatosit tikus dapat meningkatkan aktivitas AGT di dalam sel, maka pemberian EGCG seharusnya akan menyebabkan penurunan kadar O<sup>6</sup>-alkilguanin-DNA.

Menurunnya kadar O<sup>6</sup>-alkilguanin-DNA di dalam sel akan memperkecil kemungkinan terjadinya mutasi. Dengan demikian, pemberian EGCG diharapkan akan dapat mencegah inisiasi karsinogenesis. Hasil yang dicapai pada penelitian ini diharapkan dapat dijadikan langkah yang amat bermanfaat untuk dapat mengungkap mekanisme hambatan karsinogenesis dari EGCG sehingga dapat

dijadikan dasar pengembangan sebagai senyawa penawar karsinogen di samping menggali potensi alam Indonesia dalam rangka ikut berpartisipasi menurunkan angka kejadian kanker.

---

## SUBJEK DAN METODE

---

Semua bahan yang digunakan untuk preparasi dan pembuatan kultur telah diuji untuk keperluan kultur (*cell culture tested*). Tikus galur Wistar berat  $\pm$  200 gram (Lab. Perhewan ITB), media Perfusi hepar, media disintegrasi hepar, Gas O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> = 95/5, media WME (Sigma), hepes (Sigma), FBS (Sigma), gentamisin (Sigma), penisilin-streptomisin (Sigma), N-metil-N-nitrosourea (Sigma), N-[H<sup>3</sup>]metil-N-nitrosourea (Amersham, *sp. act.* 18.6 Ci/mmol), standar O<sup>6</sup>-metilguanin (Sigma), standar N<sup>7</sup>-metilguanin (Sigma), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (E.Merck, p.a), NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (E.Merck, p.a), metanol (E.Merck, pro HPLC), HCl (E.Merck, p.a).

### Penentuan Kadar O<sup>6</sup>-Metilguanin-DNA

Sampel hepatosit digunakan untuk menunjukkan pengaruh EGCG konsentrasi akhir 8 ppm, 17 ppm, 33 ppm dan 67 ppm terhadap alkilasi DNA oleh N-metil-N-nitrosourea (MNU) 400 ppm dan 600 ppm yang diberikan sebanyak 25  $\mu$ l pada 3.0 ml kultur (sekitar 1 juta sel/ml), sehingga konsentrasi akhir MNU berturut-turut menjadi 32  $\mu$ M dan 48  $\mu$ M. Kadar MNU tersebut disesuaikan dengan kadar CNU level terapeutik pada glioma sel line manusia yaitu antara 25-50  $\mu$ M (Burns *et al.*, 1988). Secara ringkas prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut: disiapkan suspensi hepatosit dalam media WME sebanyak 350 ml dengan konsentrasi 10<sup>6</sup> sel/ml. Suspensi tersebut dibagikan ke dalam 30 piring petri (*petri dish*) masing-masing berisi 2.5 ml. Pada setiap perlakuan dan kontrol, masing-masing disiapkan replikasi sebanyak 5 kali.

Sebagai kontrol negatif dan kontrol positif sebanyak 10 piring petri diberi tambahan 0.5 ml media kultur, perlakuan I sebanyak 5 piring petri diberi tambahan 0.50 ml EGCG 50 ppm yang dilarutkan dalam media kultur, perlakuan II sebanyak 5 piring petri diberi 0.50 ml EGCG 100 ppm, perlakuan III sebanyak 5 piring petri diberi 0.50 ml

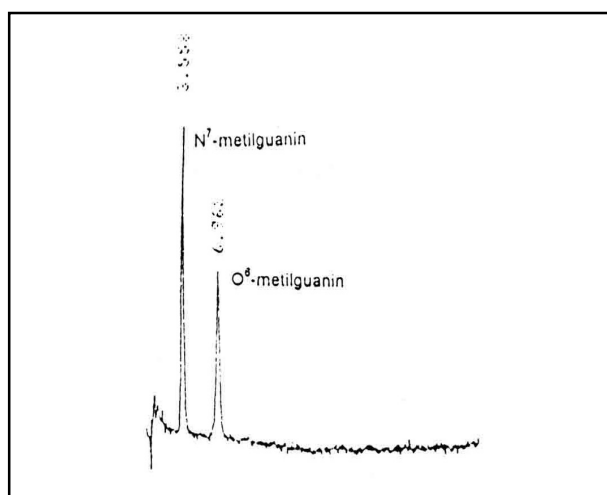
EGCG 200 ppm, dan perlakuan IV sebanyak 5 piring petri diberi 0.50 ml EGCG 400 ppm. Setelah 24 jam, semua media kultur dibuang dan diganti dengan media baru sebanyak 3.0 ml. Kemudian diberi perlakuan MNU 400 ppm dan 600 ppm sebanyak 25  $\mu$ l seperti pada rancangan percobaan. Kemudian kultur diinkubasikan pada suhu 37 °C dan dialiri gas hingga konsentrasi CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam. Setelah itu sel dipanen dan diisolasi DNAny. DNA dihidrolisis dengan HCl 0,1 N yang mengandung 0.5 ppm O<sup>6</sup>-metilguanin yang tidak bersifat radioaktif pada suhu 80 °C selama 1 jam. Hasil hidrolisis disentrifuse, filtrat diambil dan diinjeksikan pada HPLC sebanyak 20  $\mu$ l. Filtrat hasil pemisahan HPLC mulai menit ke-5 hingga menit ke-8 ditampung ke dalam tabung *scintillation counter*, diberi *scintillation fluid* dan dibaca aktifitas radioaktifnya pada LSC.

---

## HASIL-HASIL

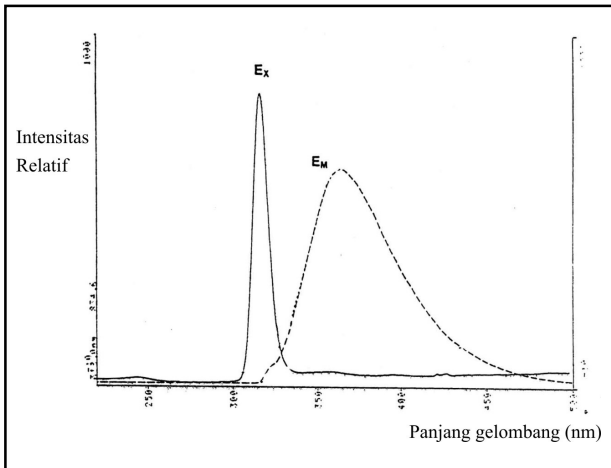
---

Hasil pemisahan kromatografi menggunakan HPLC kolom RP C-18 terlihat sangat baik dan mampu memisahkan antara N<sup>7</sup>-metilguanin dan O<sup>6</sup>-metilguanin seperti terlihat pada Gambar 1. Dengan demikian dapat dilakukan pemisahan O<sup>6</sup>-metilguanin dari komponen lain khususnya N<sup>7</sup>-metilguanin yang memiliki waktu retensi yang lebih dekat.



Gambar 1. Hasil pemisahan O<sup>6</sup>-metilguanin menggunakan HPLC dengan detektor fluoresensi yang dieluasi dengan 50 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dalam 20% metanol pH 2.0 kecepatan 1.8 ml/menit. Puncak O<sup>6</sup>-metilguanin muncul pada waktu retensi 2.963 menit.

Pengukuran luas kromatogram HPLC O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA dilakukan dengan menggunakan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi dan emisi yang memberikan serapan maksimum. Untuk menentukan panjang gelombang maksimum eksitasi dan emisi maka digunakan spektrofлуорometer dan diperoleh panjang gelombang maksimum eksitasi 318 nm dan emisi pada 368 nm (Gambar 2).

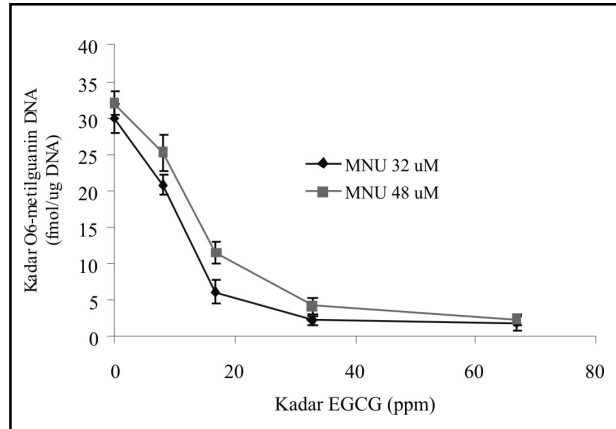


Gambar 2. Spektra eksitasi (---) dan emisi (—) O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA pada spektrofлуорometer dengan menggunakan pelarut 50 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dalam 20% metanol pH 2,0

Dari Gambar 3 terlihat bahwa pemberian EGCG mampu menurunkan alkilasi DNA akibat pemberian *direct carcinogens* MNU pada kultur sel hepatosit tikus. Konsentrasi O<sup>6</sup>-metilguanin DNA pada kelompok kontrol dengan pemberian [H<sup>3</sup>]MNU 32 μM dan 48 μM masing-masing adalah 29.89 ± 2.01 dan 32.00 ± 1.67 fmol/μg DNA, sedangkan pemberian EGCG 67 ppm dapat menurunkan kadar O<sup>6</sup>-metilguanin DNA hingga kadarnya mencapai 1.87 ± 0.94 dan 2.38 ± 0.36 fmol/μg DNA (tabel 1). Hal ini menunjukkan kemampuan EGCG dari teh hijau dalam mencegah terjadinya alkilasi pada DNA yang pada akhirnya dapat mencegah kanker akibat paparan dari senyawa karsinogen.

## PEMBAHASAN

Penurunan kadar O<sup>6</sup>-metilguanin dalam kultur hepatosit tikus yang dipapar oleh MNU dan EGCG ditengarai sangat terkait dengan peningkatan aktifitas



Gambar 3. Pengaruh pemberian EGCG terhadap kadar O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA pada kultur hepatosit yang diinduksi oleh MNU dengan menggunakan *Liquid Scintillation Counter* RACKBETA 12009-006 (n=4).

Tabel 1. Kadar O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA pada kultur hepatosit setelah diinduksi oleh MNU dan/tanpa EGCG dengan menggunakan *Liquid Scintillation Counter* RACKBETA 12009-006 (n=4)

Perlakuan pada kultur hepatosit	Kadar O <sup>6</sup> -metilguanin-DNA (fmol/μg DNA)* MNU 32 M	Kadar O <sup>6</sup> -metilguanin-DNA (fmol/μg DNA)* MNU 48 μM
Tanpa EGCG	29.89 ± 2.01	32.00 ± 1.67
EGCG 8 ppm	20.91 ± 1.35	25.21 ± 2.58
EGCG 17 ppm	6.16 ± 1.57	11.52 ± 1.51
EGCG 33 ppm	2.20 ± 0.53	4.24 ± 1.03
EGCG 67 ppm	1.87 ± 0.94	2.38 ± 0.68

\* Mean ± SD

O<sup>6</sup>-alkylguanin DNA alkyltransferase (AGT) akibat pemberian EGCG. Alasan pertama, AGT ini merupakan DNA repair enzim yang sangat penting untuk menghilangkan gugus alkil yang terikat pada posisi O<sup>6</sup>-guanin sehingga mencegah terjadinya inisiasi karsinogenesis. (Gerson, 2004). Peningkatan jumlah AGT dalam kultur akan mencegah/memperbaiki serangan gugus alkil dari MNU sehingga DNA kembali normal. Alasan kedua adalah pada saat MNU diberikan, EGCG telah dihilangkan dari media kultur. Jadi hambatan pembentukan O<sup>6</sup>-metilguanin oleh MNU bukan disebabkan karena molekul EGCG, tetapi karena aktifitas perbaikan DNA yang meningkat. Hal ini dapat dijelaskan karena MNU menghasilkan intermediat yang bersifat sangat elektrofilik sedangkan EGCG juga bersifat elektrofilik walaupun agak lemah sehingga tidak dimungkinkan terjadi reaksi antara EGCG dan MNU. Di samping itu jika didalam sitoplasma masih

dijumpai EGCG, jumlahnya sangat kecil dan tidak sebanding dengan jumlah MNU yang ditambahkan sehingga pengaruh MNU masih dominan.

Inisiasi karsinogenesis terjadi karena adanya mutasi pada gen yang bertanggung jawab terhadap timbulnya kanker (proto-onkogen). Mutasi yang terjadi pada proto-onkogen dapat menghasilkan onkogen sehingga sel dikatakan terinisiasi. Alkilasi pada basa DNA menyebabkan perubahan regulasi gen dan berperan terhadap proses karsinogenesis (Goodman dan Watson, 2002). Oleh karena itu untuk mencegah inisiasi karsinogenesis, mutasi pada proto-onkogen harus dicegah. Pada penelitian ini, pencegahan inisiasi karsinogenesis dibuktikan dengan hambatan terbentuknya alkilasi DNA. Hasil yang diperoleh pada gambar 3, menunjukkan bahwa EGCG 17 ppm mampu mencegah inisiasi karsinogenesis yang diakibatkan oleh MNU hingga kadar tertinggi 32 µM, sedangkan EGCG 33 ppm mampu mencegah inisiasi karsinogenesis oleh MNU hingga kadar tertinggi 48 µM.

Karsinogen yang digunakan dalam penelitian ini hanya MNU mewakili senyawa karsinogen langsung. Efek hambatan O<sup>6</sup>-metilguanin ini dapat dikembangkan juga untuk senyawa lain baik karsinogen langsung maupun tidak langsung sehingga dapat digeneralisasikan bahwa EGCG dari teh hijau dapat mencegah inisiasi karsinogenesis dari berbagai paparan senyawa karsinogen. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa EGCG memiliki kemampuan untuk dapat dikembangkan sebagai bahan obat pencegahan kanker melalui mekanisme pencegahan terhadap alkilasi DNA pada posisi O<sup>6</sup>-guanin yang cenderung menyebabkan mutasi khususnya oleh MNU.

---

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah membantu sebagian dana untuk penelitian ini. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Noor Cholies Zaini pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Sofia Mubarika Harjana, dr, MMedSc pada Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada yang telah membantu dalam penelitian ini sebagai pembimbing disertasi.

---

#### DAFTAR PUSTAKA

---

- Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, Castagnetti G, Peracchia G, dan Corti A (2006). Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: A Preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Research* 66, 1234-1240
- Chen CW dan Ho CT (2007). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids*, 2(1):35-46.
- Corpet DE dan Pierre F (2003). Point: From animal models to prevention of colon Cancer. systematic review of chemoprevention in mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12:391-400
- Daniels DS dan Tainer JA (2000). Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mutation Research*, 460:151-163.
- Fessenden RJ dan Fessenden JS (1998). *Organic chemistry*. 6<sup>th</sup> ed., Wilard Grant Press, Massachusetts, USA.
- Gerson SL (2004). MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 4:296-307.
- Goodman JI dan Watson RE (2002). Altered DNA methylation: A Secondary mechanism involved in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42:501-525.
- Jung YD dan Ellis LM (2002). Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int. J Exp Pathol*, 82(6):309-316.
- Katiyara S, Elmetsab CA, dan Katiyara SK (2007). Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(5):287-295.
- Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, Youdim MBH (2005). Multifunctional activities of green tea

- catechins in neuroprotection. *Neurosignals*, 14:46-60.
- Margison GP, Povey AC, Kaina B dan Koref MFS (2003). Variability and regulation of *O*<sup>6</sup>-alkylguanine–DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 24(4):625-635.
- Meeran SM, Mantena SK, Elmets CA, dan Katiyar SK (2006). (–)-Epigallocatechin-3-Gallate Prevents Photocarcinogenesis in Mice through Interleukin-12–Dependent DNA Repair. *Cancer Research*, 66:5512-5520.
- Mure K dan Rossman TG (2001). Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants. , :85-95.
- Qingming F, Kanugula S, dan Pegg AE (2005). Function of domains of human *O*<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Biochemistry*, 44:15396-15405.
- Rasimas JJ, Pegg AE, dan Fried MG (2003). DNA-binding Mechanism of *O*<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase: Effects of protein and DNA alkylation on complex stability. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 7973-7980.
- Rodriguez SK, Guo W, Liu L, Band MA, Paulson EK, dan Meydani M (2005). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. *Int. J Cancer*, 118(7):1635-1644.
- Samson L (2006). The suicidal DNA repair methyltransferases of microbes. , 6(7):825 – 831.
- Serafini M, Ghiselli A, dan Ferro LA (1996). In vivo antioxidant effect of green tea and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50:28-32.
- Singer M dan Berg P (1991). *Genes and Genomes*, University Science Books, California.
- Wang ZY, Huang M-T, Ferraro T, Wong C-Q, Lou Y-R, Reuhl K, Iatropoulos M, Yang CS, dan Conney A.H (1992). Inhibitory effect of green tea in drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in skin of SKH-1 mice. *Cancer Research*, 52:1162-1170.
- Yang CS dan Landau JM (2000). Effects of tea consumption on nutrition and health. *Journal of Nutrition*, 130:2409-2412
- Yen GC dan Chen HY (1996). Relationship between antimutagenic activity and major component of various teas. *Mutagenesis*, 11:37-41.