

# Pemodelan reaksi glikosilasi dan peran infus daun tapak dara (*Catharanthus roseus* [L] G. Don) sebagai penghambat kerusakan protein

Rizky Taufan Firdaus<sup>1</sup>, Eko Suhartono<sup>2</sup>, Nur Qamariah<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Forum Studi Ilmiah Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan

<sup>2</sup>Bagian Kimia Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan

<sup>3</sup>Bagian Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan

## ABSTRACT

Rizky Taufan Firdaus, Eko Suhartono, Nur Qamariah - *Glycosilation reaction models and the role of Madagascar periwinkle (Catharanthus roseus [L] G. Don)' S leaves infusion as protein damage inhibitor*

**Background :** Glycosilation is a reaction between protein and glucose in high concentration. The basic of this reaction is the continuous increase of glucose concentration, followed by a hooking between glucose with the amin primary structure of the protein. Beside form the AGEs, glycosilation reaction forms free radicals as the side product. The free radical reaction with the protein forms a crosslinking of the protein and then change the structure of the protein.

**Objectives :** This research was carried out to know glycosilation reaction model and the role of madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* [L] G. Don)' s leaves infusion as protein damage inhibitor.

**Method :** This research is an experimental and explorative research. This research was carried out in two steps, the making of infusion and the test for protein damage inhibition by using the infusion of madagascar periwinkle' s leaves and glyclazide.

**Result :** The activity of madagascar periwinkle's leaves infusion to inhibit the protein damage is 21,29% while the activity of glyclazide is 96,77%.

**Conclusion :** The infusion of madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don)'s leaves can inhibit the protein damage because of the glycosilation reaction but lower than the glyclazide's.

**Key words :** Madagascar periwinkle – glycosilation – free radical – protein damage

## ABSTRAK

Rizky Taufan Firdaus, Eko Suhartono, Nur Qamariah - *Pemodelan reaksi glikosilasi dan peran infus daun tapak dara (Catharanthus roseus [L] G. Don) sebagai penghambat kerusakan protein*

**Latar belakang penelitian:** Reaksi glikosilasi adalah reaksi yang terjadi antara protein dan glukosa pada konsentrasi tinggi. Reaksi tersebut didasarkan atas peningkatan kadar glukosa yang terus menerus, yang selanjutnya terjadi *hooking* antara glukosa dengan gugus amin primer pada protein. Selain membentuk AGEs, reaksi glikosilasi juga dapat membentuk radikal bebas sebagai hasil samping. Reaksi radikal bebas dengan protein akan menyebabkan ikatan silang pada protein yang selanjutnya mengubah struktur dan fungsi protein.

**Tujuan penelitian:** Tujuan dilaksanakannya penelitian ini adalah untuk mengetahui model reaksi glikosilasi serta peran infus daun tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) dalam menghambat kerusakan protein.

**Bahan dan cara:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bersifat eksploratif. Penelitian ini dibagi dalam 2 tahap, yaitu tahap pembuatan infus dan tahap uji penghambatan kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi dengan menggunakan infus daun tapak dara dan gliclazide.

**Hasil penelitian:** Aktivitas infus tapak dara dalam menghambat kerusakan protein adalah sebesar 21,29 % sedangkan aktivitas antidiabetes oral gliclazide dalam menghambat kerusakan protein sebesar 96,77%.

**Simpulan:** Infus daun tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) dapat menghambat kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi namun aktivitasnya lebih rendah daripada aktivitas antidiabetes oral gliclazide.

(B.I.Ked. Vol. 36, No.1: 1-6, 2004)

## PENGANTAR

Reaksi glikosilasi adalah reaksi yang terjadi antara protein dan glukosa pada konsentrasi tinggi<sup>1,2,3</sup>. Reaksi ini dapat terjadi secara non enzimatis dan merupakan reaksi yang kompleks antara gula pereduksi dan gugus amin pada protein<sup>4,5,6,7</sup>. Reaksi tersebut didasarkan atas peningkatan kadar glukosa yang terus menerus, yang selanjutnya terjadi *hooking* antara glukosa dengan gugus amin primer pada protein<sup>1,2</sup>. Reaksi tersebut menyebabkan *browning*, fluoresensi, dan pembentukan ikatan silang<sup>1,2,3,8</sup>. Reaksi tersebut juga disebut sebagai reaksi Maillard<sup>1,2,3,4,7</sup>.

Reaksi glikosilasi diawali dengan pembentukan basa *Schiff* yang bersifat reversibel, yang akan mengalami penataan ulang (*rearrangement*) untuk membentuk produk Amadori<sup>1,2,7</sup>. Produk Amadori yang stabil ini mengalami suatu rangkaian reaksi dengan senyawa antara dikarbonil membentuk *advance glycation end products* (AGEs)<sup>1,2,3,4,7</sup>. AGEs adalah produk akhir reaksi glikasi yang kompleks dan ireversibel serta dapat menyebabkan kerusakan biomakromolekul misalnya protein, lipid, karbohidrat, dan ribosa<sup>1,2,5,6,8</sup>.

Selain membentuk AGEs, reaksi glikosilasi juga dapat membentuk radikal bebas sebagai hasil samping. Misalnya radikal hidroksil, radikal hidroksi peroksil, radikal peroksil, radikal lipid peroksil, dan lain-lain<sup>1,3</sup>. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang kehilangan elektronnya pada orbital terluarnya, sehingga bersifat sangat reaktif. Karena sangat reaktif radikal bebas tersebut dapat bereaksi dengan semua komponen biomakromolekul. Dengan protein reaksi radikal bebas akan menyebabkan ikatan silang pada protein yang selanjutnya mengubah struktur dan fungsi protein. Akibatnya, sel menjadi rusak<sup>1,2,9</sup>.

Untuk menghambat kerusakan sel tersebut diperlukan senyawa yang mampu meredamnya.

Senyawa tersebut bersifat sebagai antioksidan<sup>1,2,9,10,11,12</sup>. Berbagai antioksidan dari bahan alam telah ditemukan, antara lain vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten, senyawa polifenol, flavonoid, turunan sulfur, turunan quinon dan lain-lain<sup>1,2,10,11</sup>.

Banyak tanaman telah diketahui mengandung senyawa antioksidan, misalnya temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), mengkudu atau pace (*Morinda citrifolia* L.), daun dewa (*Gynura divaricata*), pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.), lidah buaya (*Aloe vera*), pare (*Momordica charantia*), dan lain-lain<sup>13,14,15,16</sup>. Selain tanaman tersebut, salah satu tanaman yang juga mengandung senyawa antioksidan adalah tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don)<sup>17,18,19,20,21,22,23</sup>.

Tapak dara mengandung berbagai zat kimia aktif. Tanaman ini mengandung 70 macam alkaloid atau lebih, termasuk 28 biindole alkaloid. Alkaloid yang bersifat sebagai antikanker, misalnya vincaluboblastine (vinblastin = VLB), leurocristine (vinkristin = VCR), leurosine (VLR), vinkadiolin, leurosidin, dan karantin<sup>17,18,19,23,24,25,26</sup>. Alkaloid yang berkhasiat hipoglikemik antara lain leurosine, leurosine sulfat, catharanthine, lochnerine, tetrahydroalstonine, vindoline, dan vindolinine<sup>17,18,19,20,26</sup>. Akar tapak dara mengandung alkaloid, flavonoid, fenilpropanoid, saponin, dan tanin<sup>17,18,19,24</sup>. Menurut Filipini *et al.*<sup>27</sup> tapak dara mengandung senyawa anthocyanin. Van tegelen *et al.*<sup>28</sup> menyebutkan bahwa tapak dara juga mengandung senyawa chorismate, phyllolquinon, anthraquinon, menaquinon, naphthoquinon, dan catalpalacton.

Menilik kandungan bioaktif yang dimiliki oleh tapak dara, tidaklah mengherankan apabila tapak dara memiliki bermacam-macam kegunaan. Misalnya: tapak dara telah teruji sebagai antikanker<sup>15,17,18,19,22,23</sup>. Herba tapak dara berkhasiat mengatasi hipertensi, diabetes mellitus, oligouria, hepatitis, perdarahan akibat turunnya jumlah trombosit (*primary thrombocytopenic purpura*), ma-

laria, sembelit, dan kanker. Akarnya mampu mengatasi haid yang tidak teratur (peluruh haid)<sup>17,19,20</sup>.

Di India jus daun tapak dara digunakan untuk mengobati sengatan lebah. Di Hawaii rebusan tapak dara digunakan untuk menutup luka, sedangkan di Cina tapak dara digunakan untuk obat pemicu diuresis dan pereda batuk. Di Amerika Tengah dan Selatan tapak dara dipakai sebagai obat demam, paru tersumbat, dan radang tenggorokan. Di Karibia ekstrak dari bunga tapak dara digunakan sebagai larutan untuk mengobati iritasi dan infeksi pada mata<sup>20</sup>.

Berkaitan dengan berbagai khasiatnya yang dimiliki oleh tapak dara maka pada penelitian ini ingin diketahui kemampuan tapak dara dalam menghambat kerusakan protein secara *in vitro* akibat reaksi glikosilasi. Hal ini didasarkan atas kandungan kimia yang dimiliki oleh tapak dara. Penelitian ini juga diharapkan dapat memberi sumbangan bagi bangsa Indonesia tentang keanekaragaman hayati yang dimiliki, yang selanjutnya dapat dikembangkan sebagai *fitofarmaka*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui model reaksi glikosilasi serta peran infus tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) dalam menghambat kerusakan protein.

## BAHAN DAN CARA

Penelitian ini dilakukan di Bagian Kimia Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat pada bulan Juni 2003 sampai dengan Agustus 2003.

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) yang diambil dari Balai Benih dan Penjualan Tanaman Obat Unit Pelaksana Teknis Dinas Pertanian Banjarbaru. Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain: buffer fosfat pH 7,4, bovine serum albumin, FeCl<sub>3</sub>, EDTA, asam askorbat, DNPH, urea, TCA 20%, HCl 2,5 M, larutan glukosa 200 mg/dL, dan tablet gliclazide.

### Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas (Pyrex®) yaitu beker glass, gelas ukur, labu ukur, serta neraca analitik (Gibertini E42S-B). Selain itu, digunakan juga spektrofotometer (Biosystems BTS-305).

## Cara Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bersifat eksploratif. Penelitian ini dibagi dalam 2 tahap, yaitu tahap pembuatan infus dan tahap uji penghambatan kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi dengan menggunakan infus daun tapak dara dan gliclazide.

### Cara kerja penelitian ini adalah:

#### 1. Tahap pembuatan infus

Pada tahap ini daun dibersihkan dan kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung. Selanjutnya daun tersebut ditumbuk sampai halus. Ke dalam 100 ml air yang dipanaskan hingga mendidih dimasukkan 100 mg serbuk daun tersebut, sambil diaduk selama 15 menit. Larutan tersebut memiliki konsentrasi 100%.

#### 2. Tahap uji penghambatan kerusakan protein dengan metoda DNP yang dimodifikasi<sup>29,30</sup>

Prinsip dari reaksi ini adalah protein direaksikan dengan glukosa konsentrasi tinggi, sebagai kontrol kinetika. Sebagai kontrol termodinamika, reaksi dikendalikan pada suhu 37°C dengan pemanasan 2,5 jam.

#### Reaksi:

Glukosa + protein → fragmen → senyawa karbonil 2,4 DNPH + senyawa karbonil → kromogen

Pada tahap ini digunakan empat larutan, yakni larutan protein, larutan protein dengan Glukosa 200 mg/dL, larutan protein dengan glukosa 200 mg/dL + infus daun tapak dara 100%, dan larutan protein dengan glukosa 200 mg/dL + gliclazide 100%. Warna yang dihasilkan diukur serapannya pada panjang gelombang 390 nm. Kerusakan protein dihitung dengan menggunakan rumus  $C = A / \epsilon b$  dengan  $\epsilon = 22000 \text{ nm/M}$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran kerusakan protein dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan. Besarnya kerusakan protein yang terjadi akibat reaksi glikosilasi disajikan pada TABEL 1.

TABEL 1 memperlihatkan bahwa kadar senyawa karbonil yang terbentuk pada perlakuan

II paling banyak. Hal ini menunjukkan kerusakan protein terbesar terjadi pada perlakuan II yaitu protein + glukosa 200 mg/dL.

Reaksi glikosilasi adalah jenis reaksi non enzimatis. Reaksi ini merupakan reaksi antara protein dan glukosa pada konsentrasi tinggi<sup>1,2,3</sup>. Komplikasi pada diabetes mellitus diduga terkait dengan reaksi ini. Proses glikosilasi non enzimatis akan mengalami serangkaian reaksi kimia untuk menghasilkan produk yang reaktif dengan berbagai ikatan

silang, pigmentasi dan fluoresensi<sup>1,2,3,5,27</sup>. Reaksi glikosilasi non enzimatis ini pertama kali ditemukan oleh Louis Camille Maillard. Dia mengamati terbentuknya warna coklat saat memanaskan campuran karbohidrat protein, sehingga reaksi ini sering disebut sebagai reaksi Maillard<sup>1,2,3,7,8,27</sup>.

Mekanisme reaksi glikosilasi sangat rumit, namun dapat dianalisis melalui tiga tahap. Tahap pertama reaksi terjadi lewat transformasi *D-glucopirosone* menjadi AGEs yang dimulai ketika

TABEL 1. Kadar senyawa karbonil ( $\mu\text{M}$ ) masing-masing perlakuan

Perlakuan	Perlakuan I	Perlakuan II	Perlakuan III	Perlakuan IV
1	0,0008	0,0137	0,0121	0,0004
2	0,0032	0,0172	0,0122	0,0006
3	0,0018	0,0154	0,0121	0,0005
4	0,0022	0,0156	0,0121	0,0007
5	0,0021	0,0155	0,0122	0,0003
6	0,0019	0,0153	0,0123	0,0005
Rerata $\pm$ SD	0,0020 $\pm$ 0,0008	0,0155 $\pm$ 0,0011	0,0122 $\pm$ 0,0001	0,0005 $\pm$ 0,0001

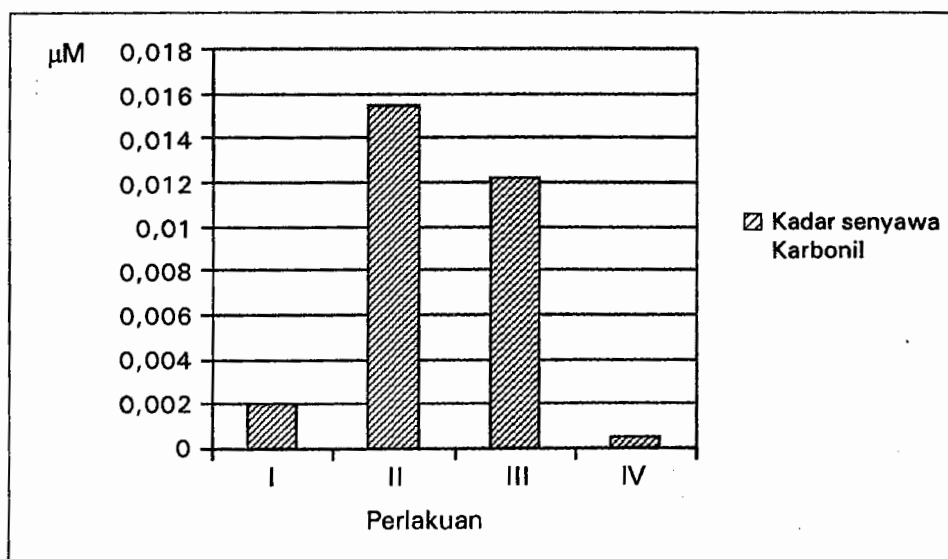
Keterangan

Perlakuan I : Protein

Perlakuan II : Protein + Glukosa 200 mg/dL

Perlakuan III : Protein + Glukosa 200 mg/dL + infus daun tapak dara 100%

Perlakuan IV : Protein + Glukosa 200 mg/dL + Gliclazide 100%



GAMBAR 1. Kadar senyawa karbonil ( $\mu\text{M}$ ) pada reaksi glikosilasi

molekul glukosa karbon rantai 6 berbentuk cincin membuka secara spontan, dan berubah menjadi molekul yang linear dengan aldehyd (CHO) pada salah satu sisinya<sup>2,7</sup>. Reaksi ini disebut *Browning*<sup>2</sup>. Aldehyd dapat bereaksi dengan gugus amino (-NH<sub>2</sub>) dari suatu makromolekul biologik dan menggandeng glukosa ke protein<sup>1,2</sup>. Hasil reaksi awal dikenal sebagai *basa schiff*, yang secara spontan mengatur sendiri (*selfarrangement*) menjadi produk Amadori, reaksi ini dapat berjalan reversibel sehingga secara fisiologis tidak mempunyai pengaruh<sup>2</sup>. Pada konsentrasi glukosa darah yang rendah, ikatan glukosa dengan gugus amino akan terlepas lagi. Sebaliknya, konsentrasi glukosa darah yang tinggi akan meningkatkan *hooking* glukosa pada gugus amino<sup>2,7</sup>.

Tahap kedua terjadi dengan ditunjang oleh konsentrasi glukosa yang terus-menerus tinggi, hal ini menyebabkan *hooked sugars* tetap berada di tempatnya dan berbagai reaksi lanjutan akan terjadi<sup>2,3,7</sup>. Sesudah berlangsung beberapa waktu, akan terjadi serangkaian perubahan melalui proses jalur oksidatif, non-oksidatif, maupun penataan ulang sehingga terbentuk senyawa CML (*N-carboxymethyllysine*) dan *pentosidine* (jalur oksidatif), *pyralline* (jalur non-oksidatif), dan 3-DG (*3-deoxyglucosone*) (proses penataan ulang)<sup>1,2,7</sup>. Adapun senyawa intermediet  $\alpha$ -oxoaldehyd yang terbentuk dari jalur poliol maupun peroksidasi lipid berupa GLO (*glyoxal*), MGO (*methylglyoxal*), dan 3-DG (*3-deoxyglucosone*)<sup>3,7</sup>.

Produk Amadori yang terbentuk pada tahap pertama reaksi Maillard mengalami *rearrangement* menjadi senyawa dikarbonil<sup>3,28</sup>. Senyawa dikarbonil berikatan dengan protein membentuk 3-DG (*3-deoxyglucosone*)<sup>3,28</sup>. Senyawa 3-DG dengan protein kemudian bertanggungjawab pada pembentukan *basa schiff* intramolekular dan intermolekular, reaksi ini terjadi pada tahap ketiga reaksi Maillard<sup>3,28</sup>.

Tahap ketiga reaksi Maillard akan menghasilkan senyawa yang sangat tidak stabil dan reaktif<sup>1,2,3</sup>. Senyawa intermediet yang terbentuk pada tahap kedua akan bereaksi secara polimerisasi dengan struktur protein membentuk senyawa AGEs<sup>2,3,7</sup>.

Efek antidiabetes/hipoglikemik tanaman tapak dara disebabkan oleh kandungan alkaloidnya, antara lain leurosine, leurosine sulfat, catharanthine, lochnerine, tetrahydroalstonine, vindoline, dan

vindoline<sup>17,18,19,20,26</sup>. Karena kemampuannya ini maka *hooking* antara glukosa dengan protein dapat balik lagi sehingga berbagai reaksi lanjutan yang menyebabkan kerusakan protein dapat dihambat.

Kemampuan daun tapak dara untuk menghambat kerusakan protein dapat terlihat pada perlakuan III yaitu larutan protein + glukosa 200 mg/dL + infus daun tapak dara. Daun tapak dara ini memiliki aktivitas penghambatan kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi sebesar 21,29 %.

Kerusakan protein yang terjadi ini disebabkan karena *hooking* antara protein dengan glukosa yang terus-menerus dan karena hasil samping dari reaksi ini yang berupa radikal bebas. Kemampuan tapak dara dalam meredam radikal bebas ini diduga karena kandungan berbagai alkaloidnya, serta beberapa senyawa turunan quinon seperti phylloquinon, anthraquinon, menaquinon, dan naphthoquinon. Struktur quinon pada senyawa turunan quinon tersebut bertindak sebagai akseptor elektron dan senyawa pengoksidasi-pereduksi.

Walaupun tapak dara mampu mengurangi pembentukan senyawa karbonil, akan tetapi kemampuannya masih lebih rendah daripada infus antidiabetes oral gliclazide. Kemampuan infus gliclazide 100% dalam menghambat kerusakan protein diduga karena kemampuan gliclazide yang dapat mencegah terjadinya reaksi glikosilasi, dengan efek hipoglikemiknya. Di samping itu kemampuan gliclazide dalam meredam radikal bebas. Ada beberapa cara gliclazide dalam meredam radikal bebas, misalnya: 1. Gliclazide dapat menurunkan kadar tembaga yang dapat menginduksi oksidasi LDL (*Low Density Lipoprotein*)<sup>31</sup>, 2. Gliclazide menurunkan adhesi monosit pada endotel yang memicu terjadinya aterosklerosis<sup>32</sup>, 3. Gliclazide dapat menurunkan kadar lipid peroksida plasma yang terbentuk akibat aktivitas radikal bebas<sup>33</sup>.

## SIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa infus tapak dara dapat menghambat kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi. Aktivitas tapak dara dalam menghambat kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi sebesar 21,29%. Aktivitas tersebut masih lebih rendah daripada aktivitas antidiabetes oral gliclazide, yaitu sebesar 96,77%.

**KEPUSTAKAAN**

1. Halliwell B and Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd edition. London: Oxford University Press, 1999.
2. Soeatmadji DJ. The role of free radicals in management of type 2 diabetic patients. Disampaikan pada Simposium Free Radicals in Diabetes and Their Interaction with Sulphonylurea, Jakarta, 24 Maret, 2001.
3. Bayness JW and Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complication: A new perspective an old paradigm. Diabetes, 1999; 48: 1-9.
4. Nagaraj RH, Shipanova IN and Faust FM. Protein cross-linking by the Maillard reaction: Isolation characterization, and *in vivo* detection of lysine-lysine crosslink derived from methylglyoxal. J Biol Chem, 1996; 271(32): 19338-45.
5. Murthy UM and Sun WQ. Protein modification by Amadori and Maillard reaction during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. J Exp Botany, 2000; 51(348): 1221-8.
6. Shoda H, Miyata S, Liu BF, *et al.* Inhibitory effects of tenilsetam on the Maillard reaction. Endocrinol, 1997; 138(5): 1886-92.
7. Turk Z. Glycation and AGE in diabetes and complications. eJIFCC, 2001; 13: 5.
8. Ulrich P and Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. J Clin Invest, 2001: 1-4.
9. Suryohudoyo P. Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler. Jakarta: Sagung Seto, 2000.
10. Asikin N. Antioksidan endogen dan penilaian status antioksidan. Kursus Penyegar Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan: Dasar, Aplikasi, dan Pemanfaatan Bahan Alam, Jakarta, 24 Maret, 2001.
11. Soewoto H. Antioksidan eksogen sebagai lini pertahanan kedua dalam menanggulangi peran radikal bebas. Kursus Penyegar Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan: Dasar, Aplikasi, dan Pemanfaatan Bahan Alam, Jakarta, 24 Maret, 2001.
12. Sofro ASM. Oksidan dan radikal bebas: Peran sistem enzim organisme aerob untuk mengatasinya. Workshop Nasional 2002 Pemeriksaan Parameter Radikal Bebas dan Antioksidan di Bidang Kesehatan. Banjarbaru 5 Juni 2002.
13. Yuliani S. Prospek pengembangan obat tradisional menjadi obat fitofarmaka. J Litbang Pertanian 2001; 20(3): 100-105.
14. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12(4): 564-82.
15. Anonymous. Terapi alam: Tanaman pelawan kanker dari kunyit putih hingga benalu. Harian Umum Sore Sinar Harapan 2003, 11 Agustus 2003, (www.sinarharapan.co.id/iptek/kesehatan.html).
16. Budiarto R, Setiawan B, Suhartono E. Potensi antiradikal *in vitro* infus tanaman pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) dengan menggunakan model reaksi Fenton. Seminar Nasional Teknik Kimia Unika Parahyangan, Bandung, 23 April 2003.
17. Dalimartha S. Atlas tumbuhan obat Indonesia. Jilid 1. Jakarta: Trubus Agriwidya, 2002.
18. Utami P dan Lentera T. Tanaman obat untuk mengatasi diabetes mellitus. Jakarta: AgroMedia Pustaka, 2003.
19. Anonymous. Tapak dara (*Catharanthus roseus* [L] G Don.). Pusat Data dan Informasi PERSI 2003, (www.pdpersi.co.id).
20. Anonymous. Description and natural history of the periwinkle. Cyberbotanica 1997, (biotech.icmb.utexas.edu/botany/perihist.html).
21. Anonymous. *Catharanthus roseus* [L] G Don. Ecology and Evolutionary Biology Conservatory, (florawww.eeb.uconn.edu).
22. Hartono A. Terapi nutrisi dan herbal untuk kanker. Intisari 1999, (www.indonesia.com/intisari).
23. Samiran. Tapak dara penumpas kanker payudara. Intisari 2001, (www.indonesia.com/intisari)
24. Cacace S, Schröder G, Wehinger E, Strack D, Schmidt J, Schröder J. A flavonol *o*-methyltransferase from *Catharanthus roseus* performing sequential methylations. Phytochemistry 2003; 62: 127-37
25. Menke FLH, Kijne JW, Memelink J. Digging for gene expression levels in *Catharanthus roseus*: Nonradioactive detection of olant mRNA levels. Biochemica 1996; 2: 16-8
26. Whitmer S, Canel C, Hallard D, Goncalves C, Verpoorte R. Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. Plant Physiol, 1998; 116: 853-7.
27. Stitt AW. Advance glycation: An important pathological event in diabetic and age related ocular disease. J Ophthalmol, 2001; 85: 746-53.
28. Lee C, Yim MB, Chock PB, Yim HS, Kang SO. Oxidation-Reduction Properties of Methylglyoxal-modified Protein in Relation to Free Radical Generation. J Biol Chem, 1998; 273 : 39.
29. Uchida K, Kanematsu M, Sakai K. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. Proc Natl Acad Sci, 1998; 95: 4882-7.
30. Sadikin M dan Adhiyanto C. Pengukuran konsentrasi senyawa dikarbonil. Pelatihan Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan: Dasar, Aplikasi, dan Pemanfaatan Bahan Alam, Jakarta, 17-21 April, 2001.
31. Desfaits AC, Serri O and Renier G. Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion, and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in NIDDM patients after gliclazide treatment. Diabetes Care, 1998; 21(4): 487-93.
32. Renier G, Mamputu JC, Desfaits AC and Serri O. Monocyte adhesion in diabetic angiopathy: effect of free-radical scavenging. Simposium Diabetes is a cardiovascular disease: New considerations for pharmacological management, Budapest, Hongaria, 2002.
33. Mattia GD, Laurenti O, Fava D. Diabetic endothelial dysfunction: Effect of free-radical scavenging in type 2 diabetic patients. Simposium Diabetes is a cardiovascular disease: new considerations for pharmacological management. Budapest, Hongaria, 2002.