

**NANOPOLIMERIK KITOSAN-ALGINAT PEMBAWA
EKSTRAK *WHITE TEA* (*Camellia sinensis*) SEBAGAI
PENGHAMBAT STRES OKSIDATIF PADA TIKUS
DIABETES TIPE 2**

DISERTASI

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Doktor (Dr.)



Diajukan Oleh:

Shaum Shiyan

16/405220/SFA/00138

**Kepada
PROGRAM PASCA SARJANA
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2020**

DISERTASI

NANOPOLIMERIK KITOSAN-ALGINAT PEMBAWA EKSTRAK *WHITE TEA* (*Camellia sinensis*) SEBAGAI PENGHAMBAT STRES OKSIDATIF PADA TIKUS DIABETES TIPE 2

dipersiapkan dan disusun oleh:

SHAUM SHIYAN
16/405220/SFA/00138

telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 24 Agustus 2020

Promotor

Prof. Dr. Apt. Akhmad Kharis Nugroho, M.Si.

Ko Promotor I

Prof. Dr.rer.nat. Apt. Triana Hertiani, M.Si.

Ko Promotor II

Dr.rer.nat. Ronny Martien, M.Si.

Mengetahui:

Fakultas Farmasi

Universitas Gadjah Mada

Prof. Dr. Endro Nugroho, M.Si.

Tim Penguji:

Ketua: Prof. Dr. Apt. Abdul Rohman, M.Si.

Anggota:

1. Prof. Dr. Apt. Akhmad Kharis Nugroho, M.Si.
2. Prof. Dr.rer.nat. Apt. Triana Hertiani, S.Si., M.Si.
3. Dr. rer.nat. Ronny Martien, M.Si.
4. Prof. Dr. Apt. Achmad Fudholi, DEA.
5. Prof. Dr. Apt. Subagus Wahyuono, M.Sc.
6. Dr. Apt. Arief Nurrochmad, M.Si., M.Sc.
7. Dr. Apt. Adhyatmika, M.Biotech.
8. Dr. Apt. Esti Hendradi, M.Si.

1.

3.

5.

7.

2.

4.

6.

8.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam disertasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan, master maupun doktoral di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 24 Agustus 2020



Shaum Shiyan

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum w.w.

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang senantiasa memberikan petunjuk, melimpahkan berkah dan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi dengan judul **Nanopolimerik kitosan-alginat pembawa ekstrak *white tea* (*Camellia sinensis*) sebagai penghambat stres oksidatif pada tikus diabetes tipe 2**, untuk melengkapi salah satu syarat mencapai derajat Doktor (Dr.) dari Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh ekstrak dari bahan baku *white tea* dan memformulasikan nanopartikel polimerik berbasis kitosan-alginat. Polimerik pembawa ekstrak *white tea* yang dihasilkan diuji aktivitas secara *in vivo* dilihat dari parameter stres oksidatif pada model tikus diabetes yang diinduksi streptozototin-nikotinamid (STZ-NA). Harapan kedepan dapat diperoleh produk nutrasetika berbasis nanopartikel pembawa ekstrak *white tea* dalam membantu pasien diabetes.

Tersusunnya naskah dan penelitian ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan banyak pihak, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih pada:

1. Prof. Dr. Apt. Akhmad Kharis Nugroho, M.Si. selaku Promotor yang telah banyak menginspirasi, memotivasi, meluangkan waktu, mencurahkan pikiran dan tenaga untuk memberikan bimbingan selama riset dan penulisan.
2. Prof. Dr.rer.nat. Apt. Triana Hertiani, M.Si. selaku Ko-Promotor yang telah memberikan inspirasi, semangat dan bimbingan yang sangat berguna dalam penyelesaian riset dan penulisan.
3. Dr. rer.nat. Ronny Martien, M.Si. selaku Ko-Promotor yang memberikan bimbingan dan memfasilitasi berbagai kerja sama dengan banyak pihak selama riset.
4. Prof. Dr. Apt. Abdul Rohman, M.Si., Prof. Dr. Apt. Achmad Fudholi, DEA., Prof. Dr. Apt. Subagus Wahyuono, M.Sc., Dr. Apt. Arief Nurrochmad, M.Si.,

M.Sc. sebagai tim penguji atas masukannya untuk kesempurnaan penelitian dan penulisan disertasi.

5. Dr. Apt. Esti Hendradi, M.Si., sebagai penguji eksternal atas masukannya untuk kesempurnaan penulisan disertasi.
6. Dr. Apt. Adhyatmika, M.Biotech., sebagai penguji internal atas masukannya untuk kesempurnaan penulisan disertasi.
7. Program beasiswa BUDI DN dari LPDP sebagai lembaga pemberi beasiswa yang sudah membiayai studi doktoral ini.
8. PT DKSH Indonesia yang sudah berkenan bekerja sama dalam analisis partikel menggunakan instrumen Malvern Panalytical. Wiji Lestari dan Fahri Hidayat atas arahan serta ilmu yang sangat bermanfaat selama proses evaluasi partikel.
9. Kepala dan segenap karyawan di Bagian Teknologi Farmasi, Biologi Farmasi dan Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang banyak membantu selama penelitian berlangsung.
10. Keluarga dan rekan-rekan yang selalu memanjatkan doa, merawat, memberikan inspirasi, semangat dan berbagai fasilitas.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, semoga amal kebaikan mendapat balasan dari Allah SWT.

Kiranya tiada gading yang tidak retak, begitu juga penulis yang tidak lepas dari kesalahan dan kekurangan. Penulis membuka diri untuk menerima kritik dan saran bersifat membangun guna kebaikan penelitian ini selanjutnya. Harapan penulis, semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua. Disertasi ini, sebagai bentuk nyata sumbangsih pengembangan teknologi bahan alam terutama fitofarmasetika dan formulasi khususnya, serta ilmu farmasi pada umumnya. Akhir kata, semoga disertasi ini dapat menambah wawasan dan pengetahuan. Aamiin.

Wassalamualaikum w.w.

Yogyakarta, Agustus 2020

Penulis



Shaum Shiyani

DAFTAR ISI

NANOPOLIMERIK KITOSAN-ALGINAT PEMBAWA	i
PERSETUJUAN DISERTASI.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xviii
INTISARI.....	xx
ABSTRACT.....	xxi
PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
1. Perumusan Masalah	5
2. Keaslian Penelitian.....	7
3. Urgensi atau Kepentingan Penelitian	10
B. Tujuan Penelitian.....	11
TINJAUAN PUSTAKA.....	12
A. Kajian Pustaka.....	12
1. <i>White Tea</i> dari Jenis <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	12
2. Senyawa <i>Epigallocatechin gallate</i> (EGCG) dan Fenolik Daun Teh.....	14
3. Metode Ekstraksi Fenolik Teh	15
4. Teknologi Formulasi EGCG dan Ekstrak Teh.....	16
5. Optimasi dengan <i>Central Composite Design</i> (CCD).....	21

7. Stres Oksidatif pada Kondisi Diabetes.....	22
B. Landasan Teori.....	25
C. Hipotesis.....	28
METODE PENELITIAN.....	30
A. Waktu dan Tempat Penelitian	30
B. Alat dan Bahan	30
1. Alat.....	30
2. Bahan.....	31
C. Hewan Percobaan.....	31
D. Jalannya Penelitian.....	32
1. Bagian I: Modifikasi Ekstraksi <i>White Tea</i>	32
2. Bagian II: Formulasi dan Optimasi Nanopolimer Kitosan – Alginat Pembawa Ekstrak <i>White Tea</i>	42
3. Bagian III: Studi <i>In Vivo</i> Penghambatan Stres Oksidatif Pada Tikus Kondisi Diabetes Tipe 2.....	47
E. Variabel Penelitian	57
1. Ekstraksi Simplisia Kering <i>White Tea</i>	57
2. Formulasi Nanopolimer Kitosan – Alginat Pembawa Ekstrak <i>White Tea</i>	58
3. Parameter stres oksidatif pada Pemodelan Tikus Diabetes Tipe 2	58
F. Analisis Data	58
1. Analisis Hasil Ekstraksi	58
2. Analisis Optimasi Nanopolimer.....	59
3. Analisis Uji Penghambatan Stres Oksidatif.....	59
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	60
A. Modifikasi Ekstraksi <i>White Tea</i>	60

1.	Verifikasi Metode Penetapan TPC dan TFC.....	60
2.	Optimasi Sistem KCKT Menggunakan CCD	64
3.	Validasi Metode KCKT	77
4.	Orientasi Modifikasi Ekstraksi Infundasi.....	83
5.	Aplikasi <i>Central Composite Design</i> (CCD) dalam Optimasi Ekstraksi Menggunakan Teknik <i>Kinetic-Assisted Infundation</i> (KAI).....	91
6.	Prediksi dan Verifikasi Kondisi Ekstraksi KAI Optimum.....	105
7.	Profil spektra FTIR-ATR ekstrak optimal hasil KAI.....	106
9.	Analisis Menggunakan SEM.....	109
B.	Formulasi dan Optimasi Polimerik Nanopartikel.....	111
1.	Orientasi dan Preparasi Polimerik Nanopartikel.....	111
2.	Optimasi Formula Nanopolimerik Menggunakan CCD	111
3.	Prediksi dan Verifikasi Formula Optimum	130
4.	Karakterisasi Formula Optimum.....	132
5.	Analisis FTIR-ATR untuk Identifikasi Interaksi Antar Komponen	139
6.	Stabilitas Partikel Nanopolimer Formula Optimum	141
7.	Uji <i>In Vitro</i> Pelepasan	143
C.	Aktivitas Penghambatan Stres Oksidatif Pada Tikus Diabetes Tipe 2	145
1.	Orientasi dan Induksi Streptozotosin-Nikotinamid (STZ-NA). 145	
2.	Perkembangan Berat Badan Tikus.....	146
3.	Analisis ALP	147
4.	Analisis SGOT dan SGPT.....	149
5.	Analisis Kadar Glukosa Darah pada Tikus	151
6.	Analisis Kadar <i>Malondialdehyde</i> (MDA).....	152

7. Analisis Aktivitas <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD)	154
8. Analisis Aktivitas <i>Glutathion Peroxidase</i> (GPx).....	156
9. Analisis <i>Glutathione</i> (GSH).....	157
10. Histopatologi pada Pankreas	158
11. Histopatologi pada Hepar.....	161
D. Pembahasan Umum Nanopolimerik Ekstrak <i>White Tea</i> Sebagai Penghambat Stres Oksidatif Pada Diabetes	164
1. Modifikasi KAI dengan Teknik KAI.....	164
2. Formulasi dan Optimasi Nanopolimerik Kitosan-Alginat Pembawa Ekstrak <i>White Tea</i> (NP-EWT).....	166
3. Parameter stres oksidatif Pemberian NP-EWT pada Model Tikus Diabetes yang Diinduksi STZ-NA.....	170
BAB V.....	173
KESIMPULAN DAN SARAN.....	173
A. Kesimpulan.....	173
B. Saran.....	174
DAFTAR PUSTAKA	175

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Kandungan komponen bioaktif pada berbagai jenis teh.....	13
Tabel 2.	Komposisi <i>run</i> dalam orientasi ekstraksi menggunakan pendekatan CFD.....	40
Tabel 3.	Komposisi <i>run</i> pada rancangan optimasi ekstraksi menggunakan CCD	41
Tabel 4.	Rancangan CCD pada optimasi formula nanopolimerik ekstrak <i>white tea</i>	43
Tabel 5.	Prosedur uji aktivitas penghambatan <i>superoxide dismutase</i> (SOD)	52
Tabel 6.	Ringkasan hasil <i>scanning</i> panjang gelombang maksimal dari beberapa variasi waktu pengukuran setelah pembentukan kompleks warna ..	60
Tabel 7.	Rentang konsentrasi, persamaan regresi linier, nilai LoD dan LoQ	63
Tabel 8.	Presisi dan akurasi metode penetapan TPC	64
Tabel 9.	Presisi dan akurasi metode penetapan TFC	64
Tabel 10.	Rancangan lengkap CCD dan hasil percobaan pada kondisi sistem KCKT.....	65
Tabel 11.	Hasil analisis statistik dari desain CCD untuk keseluruhan respon pada kondisi sistem KCKT.....	66
Tabel 12.	Transformasi dan persamaan model masing-masing respon pada sistem KCKT	67
Tabel 13.	Hasil uji kesesuaian sistem KCKT	78
Tabel 14.	Parameter validasi pada metode KCKT.....	80
Tabel 15.	Presisi dan akurasi metode pemisahan dan deteksi menggunakan KCKT.....	81
Tabel 16.	Rancangan dan hasil percobaan CFD dari proses ekstraksi <i>white tea</i>	84
Tabel 17.	Hasil analisis statistik pada pendekatan <i>centroid factorial design</i> (CFD)	85
Tabel 18.	Status transformasi, tipe model dan persamaan regresi yang dihasilkan dalam analisis statistik dengan pendekatan CFD.....	86

Tabel 19. Desain CCD dan hasil percobaan lengkap untuk optimasi KAI.....	93
Tabel 20. Persamaan regresi pada optimasi KAI menggunakan CCD	94
Tabel 21. Hasil statistik pada optimasi KAI menggunakan CCD	95
Tabel 22. Nilai prediksi kondisi optimal dan rentang verifikasi.....	105
Tabel 23. Hasil percobaan pada optimasi formula nanopolimerik kitosan-alginat pembawa ekstrak <i>white tea</i> menggunakan CCD	112
Tabel 24. Status transformasi dan tipe model masing-masing respon.....	113
Tabel 25. Hasil analisis statistik dari CCD pada keseluruhan respon.....	114
Tabel 26. Hasil uji ANOVA terhadap model untuk respon diameter partikel	115
Tabel 27. Hasil uji ANOVA terhadap model untuk respon indeks polidispersitas	119
Tabel 28. Hasil uji ANOVA terhadap model untuk respon zeta potensial	120
Tabel 29. Hasil uji ANOVA terhadap model untuk respon mobilitas.....	124
Tabel 30. Hasil uji ANOVA terhadap model untuk respon efisiensi penjerapan EGCG (R ₅).....	125
Tabel 31. Hasil uji ANOVA terhadap model untuk respon efisiensi penjerapan kafein (R ₆).....	127
Tabel 32. Hasil uji ANOVA terhadap model untuk respon stabilitas partikel (R ₇)	129
Tabel 33. Tingkat kepentingan respon formula optimum nanopolimerik	130
Tabel 34. Nilai prediksi optimum dan rentang verifikasi formula optimum .	131
Tabel 35. Stabilitas partikel nanopolimer pada suhu ruang.....	141
Tabel 36. Hasil pengamatan visual formula terpilih pada uji stabilitas.....	143
Tabel 37. Hasil uji stabilitas dengan uji <i>heating-cooling cycle</i> dan <i>freeze-thaw cycle</i>	143
Tabel 38. Pelepasan EGCG dari waktu ke waktu	144
Tabel 39. Hasil orientasi induksi STZ-NA	145
Tabel 40. Hasil analisis ALP sebelum dan sesudah perlakuan.....	148
Tabel 41. Hasil analisis glukosa darah masing-masing perlakuan	152
Tabel 42. Hasil analisis MDA masing-masing perlakuan	153

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	<i>Roadmap</i> penelitian dengan objek <i>white tea</i> dari <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.....	6
Gambar 2.	Skema keaslian dan keterbaruan penelitian disertasi.....	9
Gambar 3.	Produk <i>Camellia sinensis</i> dari PPTK-Gamboeng.....	12
Gambar 4.	Proses pengolahan daun teh.....	14
Gambar 5.	Struktur kimia senyawa fenolik daun teh (<i>Camellia sinensis</i>)	15
Gambar 6.	Struktur kimia kitosan.....	19
Gambar 7.	Struktur kimia natrium alginat	20
Gambar 8.	Pembentukan senyawa ROS dan pembentukan MDA dari asam lemak ganda tak jenuh	23
Gambar 9.	Akumulasi AGE dan hubungannya dengan nepropati.....	24
Gambar 10.	Komplikasi lain yang ditimbulkan senyawa ROS	24
Gambar 11.	Jalannya penelitian bagian pertama, optimasi ekstraksi <i>white tea</i> ...	33
Gambar 12.	Jalannya penelitian bagian kedua, formulasi nanopolimerik ekstrak <i>white tea</i>	42
Gambar 13.	Jalannya penelitian bagian ketiga, studi <i>in vivo</i> aktivitas penghambatan stres oksidatif pada kondisi diabetes tipe 2	47
Gambar 14.	Panjang gelombang maksimal pada spektrofotometer UV-Vis.....	61
Gambar 15.	Waktu operasi (<i>operating time</i>)	62
Gambar 16.	Kurva kalibrasi pada penetapan TPC dan TFC menggunakan spektrofotometer	63
Gambar 17.	Analisis statistik dan model untuk respon waktu retensi (R_1) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD.....	68
Gambar 18.	Analisis statistik dan model untuk respon <i>theoretical plates</i> katekin (R_2) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	69
Gambar 19.	Analisis statistik dan model untuk respon <i>theoretical plates</i> EGCG (R_3) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	70
Gambar 20.	Analisis statistik dan model untuk respon resolusi 1 antara asam gallat-teobromin (R_4) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	71

Gambar 21. Analisis statistik dan model untuk respon resolusi 3 teofilin-katekin (R ₅) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	72
Gambar 22. Analisis statistik dan model untuk respon resolusi 4 katekin-kafein (R ₆) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	73
Gambar 23. Analisis statistik dan model untuk respon resolusi 5 kafein-EGCG (R ₇) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	74
Gambar 24. Analisis statistik dan model untuk respon <i>tailing factor</i> EGCG (R ₈) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	75
Gambar 25. Analisis statistik dan model untuk respon luas area EGCG (R ₈) pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD.....	76
Gambar 26. Kromatogram KCKT kondisi optimum pada uji kesesuaian sistem	78
Gambar 27. Kurva kalibrasi pada KCKT	79
Gambar 28. Desain modifikasi ekstraksi menggunakan teknik KAI	83
Gambar 29. Evaluasi respon rendemen ekstrak (R ₁) yang dihasilkan pada orientasi KAI menggunakan pendekatan CFD	87
Gambar 30. Evaluasi respon kandungan fenolik total (R ₂) yang dihasilkan pada orientasi KAI menggunakan pendekatan CFD	88
Gambar 31. Evaluasi respon kandungan flavonoid total (R ₃) yang dihasilkan pada orientasi KAI menggunakan pendekatan CFD	89
Gambar 32. Analisis dan model pada optimasi KAI terhadap respon rendemen ekstrak (R ₁) menggunakan pendekatan CCD	96
Gambar 33. Analisis dan model pada optimasi KAI terhadap respon TPC (R ₂) menggunakan pendekatan CCD.....	97
Gambar 34. Analisis dan model pada optimasi KAI terhadap respon TFC (R ₃) menggunakan pendekatan CCD.....	98
Gambar 35. Analisis dan model pada optimasi KAI terhadap respon kadar EGCG (R ₄) menggunakan pendekatan CCD	99
Gambar 36. Analisis dan model pada optimasi KAI terhadap respon kadar kafein (R ₅) menggunakan pendekatan CCD	101
Gambar 37. Analisis dan model pada optimasi KAI terhadap respon asam gallat (R ₆) menggunakan pendekatan CCD	102

Gambar 38. Analisis dan model pada optimasi KAI terhadap respon teobromin (R ₇) menggunakan pendekatan CCD.....	103
Gambar 39. Hasil analisis PCA dari data 20 run percobaan pada optimasi KAI menggunakan CCD.....	104
Gambar 40. Pola spektra FTIR-ATR ekstrak <i>white tea</i> hasil KAI.....	107
Gambar 41. Pola difraktogram XRD sampel ekstrak <i>white tea</i>	108
Gambar 42. Hasil SEM pada serbuk white tea sebelum dan sesudah ekstraksi	110
Gambar 43. Analisis dan model pada optimasi formula nanopartikel terhadap respon diameter partikel (R ₁) menggunakan pendekatan CCD.....	116
Gambar 44. Analisis dan model pada optimasi formula nanopolimerik terhadap respon indeks polidispersitas (R ₂) menggunakan pendekatan CCD	118
Gambar 45. Analisis dan model pada optimasi formula nanopolimerik terhadap respon zeta potensial (R ₃) menggunakan pendekatan CCD	121
Gambar 46. Analisis dan model pada optimasi formula nanopolimerik terhadap respon mobilitas elektroforesis (R ₄) menggunakan pendekatan CCD	123
Gambar 47. Analisis dan model pada optimasi formula nanopolimerik terhadap respon efisiensi penjerapan EGCG (R ₅) menggunakan pendekatan CCD	125
Gambar 48. Analisis dan model pada optimasi formula nanopolimerik terhadap respon efisiensi penjerapan kafein (R ₆) menggunakan pendekatan CCD	127
Gambar 49. Analisis dan model pada optimasi formula nanopartikel terhadap respon efisiensi penjerapan kafein (R ₇) menggunakan pendekatan CCD	129
Gambar 50. Contoh hasil pengukuran diameter partikel menggunakan DLS-PSA Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical)	132
Gambar 51. Hasil pengukuran zeta potensial dan mobilitas elektroforesis menggunakan DLS-PSA Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical)	134
Gambar 52. Hasil pengujian TEM.....	137

Gambar 53. Hasil pengujian SEM	138
Gambar 54. Pola spektra FTIR nanopolimer dan komponen penyusunnya	140
Gambar 55. Grafik profil pelepasan persen EGCG dari matriks nanopolimer..	144
Gambar 56. Kadar glukosa darah tikus kelompok normal dengan induksi SZ-NA	146
Gambar 57. Profil berat badan masing-masing kelompok	147
Gambar 58. Kadar ALP sebelum perlakuan (hari ke-0) dan sesudah perlakuan (hari ke028)	148
Gambar 59. Hasil analisis SGOT pada sampel darah pada hari ke-0 dan 28	149
Gambar 60. Hasil analisis SGPT pada sampel darah pada hari ke-0 dan 28.....	150
Gambar 61. Analisis glukosa darah masing-masing perlakuan.....	152
Gambar 62. Hasil analisis kadar <i>malondialdehyde</i> (MDA).....	153
Gambar 63. Nilai SOD dari masing-masing perlakuan	155
Gambar 64. Nilai GPx dari masing-masing perlakuan.....	157
Gambar 65. Nilai GSH dari masing-masing perlakuan	158
Gambar 66. Pewarnaan <i>hematoxylin-eosin</i> (HE) jaringan pankreas perbesaran 40X	159
Gambar 67. Histologi jaringan hepar dengan pewarnaan <i>hematoxylin-eosin</i> (HE).	162
Gambar 68. Hasil pewarnaan <i>hematoxylin-eosin</i> (HE) jaringan hepar	163
Gambar 69. Interaksi antara kitosan, EGCG (polifenol dari ekstrak) dan alginat	167

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat keterangan produk white tea dari PPTK Gambung	192
Lampiran 2.	Sertifikat senyawa standard (CoA) EGCG.....	193
Lampiran 3.	Sertifikat senyawa standard (CoA) katekin.....	194
Lampiran 4.	Sertifikat senyawa standard (CoA) asam gallat.....	195
Lampiran 5.	Sertifikat senyawa standard (CoA) kafein.....	196
Lampiran 6.	Sertifikat senyawa standard (CoA) teobromin	197
Lampiran 7.	Sertifikat senyawa standard (CoA) teofilin	198
Lampiran 8.	Dokumen sertifikat kelaikan etik hewan uji.....	199
Lampiran 9.	Dokumen sertifikat baku standar (CoA) kitosan	200
Lampiran 10.	Data absorbansi pada kurva kalibrasi asam gallat.....	201
Lampiran 11.	Data absorbansi pada kurva kalibrasi katekin	202
Lampiran 12.	Desain dan percobaan pada KAI	203
Lampiran 13.	Respon waktu retensi, N-katekin, N-EGCG pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	204
Lampiran 14.	Respon resolusi 1, resolusi 3 dan resolusi 4 pada optimasi sistem KCKT dengan pendekatan CCD	205
Lampiran 15.	Respon resolusi 5, Tf-EGCG dan luas area EGCG pada optimasi system KCKT dengan pendekatan CCD	206
Lampiran 16.	Respon rendemen ekstrak, TPC dan TFC pada CFD.....	207
Lampiran 17.	Contoh data pengukuran partikel dan indeks polidispersitas	209
Lampiran 18.	Contoh data pengukuran zeta potensial.....	212
Lampiran 19.	Contoh data pengukuran mobilitas eletroforesis	213
Lampiran 20.	Respon ukuran partikel dan indeks polidispersitas hasil pengukuran menggunakan Zetasizer Nano ZSP	214
Lampiran 21.	Respon zeta potensial (Y_3) dan mobilitas (Y_4) hasil pengukuran menggunakan Zetasizer Nano ZSP	215
Lampiran 22.	Respon efisiensi penjerapan hasil pengukuran terhadap EGCG menggunakan metode KCKT.....	216
Lampiran 23.	Respon efisiensi penjerapan hasil pengukuran terhadap kafein menggunakan metode KCKT	218

Lampiran 24. Contoh Rancangan percobaan <i>central composite design</i> menggunakan piranti lunak <i>design-expert</i> 11.....	220
Lampiran 25. Analisis model dan uji ANOVA untuk diameter ukuran partikel dalam piranti lunak <i>design-expert</i> 12	222
Lampiran 26. Analisis model dan uji ANOVA untuk indeks polidispersitas (R_2) dalam piranti lunak <i>design-expert</i> 12	223
Lampiran 27. <i>Fitting model</i> dan analisis statistik untuk zeta potensial (R_3) dalam piranti lunak <i>design-expert</i> 12	224
Lampiran 28. <i>Fitting model</i> dan analisis statistik untuk mobilitas elektroforesis (R_4) dalam piranti lunak <i>design-expert</i> 12	225
Lampiran 29. <i>Fitting model</i> dan analisis statistik untuk efisiensi penjerapan EGCG (R_5) dalam piranti lunak <i>design-expert</i> 12.....	226
Lampiran 30. <i>Fitting model</i> dan analisis statistik untuk efisiensi penjerapan kafein (R_6) dalam piranti lunak <i>design-expert</i> 12.....	227
Lampiran 31. Penentuan prediksi dan campuran optimum dalam piranti lunak <i>design-expert</i> 12	228
Lampiran 32. Pengamatan morfologi partikel	231
Lampiran 33. Kelengkapan administratif uji <i>in vivo</i>	233
Lampiran 34. Sertifikat analisis (laporan hasil uji) pengujian GDP, MDA, SOD, GSH dan GPx	235
Lampiran 35. Ringkasan disertasi	239
Lampiran 36. <i>Summary</i>	236
Lampiran 37. Naskah Publikasi 1	237
Lampiran 38. Naskah Publikasi 2	238

DAFTAR SINGKATAN

AG	Asam gallat
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>
ALT	<i>Alanin aminotransferase</i>
AST	<i>Aspartat aminotransferase</i>
CAT	<i>Catalase</i>
CCD	<i>Central Composite Design</i>
CFD	<i>Centroid Factorial Design</i>
CI	<i>Confidence interval</i>
CV	<i>Coefficient of variation</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DoE	<i>Design of Experiment</i>
EC	<i>Epicatechin</i>
ECG	<i>Epicatechin gallate</i>
EGC	<i>Epigallocatechin</i>
EGCG	<i>Epigallocatechin gallate</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GC	<i>Gallocatechin</i>
GCG	<i>Gallocatechin gallate</i>
GDP	Gula Darah Puasa
GPx	<i>Gluthatione peroxsidase</i>
GSH	<i>Gluthatione</i>
HE	<i>Hematoxylin-Eosin</i>
K	Katekin
KAI	<i>Kinetic-Assisted Infundation</i>
KCKT	Kromatografi cair kinerja tinggi
Kf	Kafein
LoD	<i>Limit of Detection</i>
LoQ	<i>Limit of Quantification</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
NP-B	Nanopolimer Basis
NP-EWT	Nanopolimer Ekstrak <i>White Tea</i>
PCA	<i>Principle Component Analysis</i>
PDI	<i>Polydispersity index</i>
PI	<i>Prediction interval</i>
PSA	<i>Particle Size Analyzer</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Synthase</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SGOT	<i>Serum glutamic oxaloacetic transaminase</i>
SGPT	<i>Serum glutamic pyruvic transaminase</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
STZ-NA	Streptozotosin-Nikotinamid

TB	Teobromin
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TF	Teofilin
TFC	<i>Total Flavonoid Content</i>
TPC	<i>Total Phenolic Content</i>
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible</i>
XRD	<i>X-ray diffractometer</i>

INTISARI

Senyawa *epigallocatechin gallate* (EGCG) dalam *white tea* memiliki sifat yang tidak stabil dan absorpsi dalam tubuh yang kurang baik. Formulasi *drug carrier* perlu dilakukan untuk meningkatkan stabilitas dan efektivitasnya sebagai agen antioksidan dalam menghambat parameter stres oksidatif. Harapannya dapat diperoleh aktivitas biologis atau farmakologis yang lebih baik.

Proses ekstraksi menggunakan metode infundasi dimodifikasi menjadi *kinetic-assisted infundation* (KAI) untuk memperoleh ekstrak dengan kandungan EGCG yang melimpah. Kuantifikasi ekstrak meliputi penetapan fenolik total dan flavonoid total (metode spektrofotometri) dan kadar EGCG (metode KCKT). Formulasi nanopolimerik pembawa ekstrak *white tea* menggunakan metode gelasi ionik dengan variasi kitosan dan alginat. Optimasi formula menggunakan pendekatan *design of experiment* (DoE). Karakterisasi nanopolimer meliputi morfologi partikel, evaluasi partikel, studi interaksi komponen bahan. Nanopolimer optimum dan ekstrak bebas dilakukan pengujian bioaktivitas secara *in vivo* pada pemodelan stres oksidatif dengan hewan uji diabetes tipe 2. Hewan uji diinduksi streptozotisin-nikotinamid (STZ-NA) dengan monitoring kadar glukosa darah. Parameter stres oksidatif yang diukur meliputi *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione* (GSH) dan *glutathione peroxidase* (GPx). Organ pankreas dan hepar dibuat preparat histologik dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE).

Metode ekstraksi menggunakan teknik KAI mampu menghasilkan ekstrak *white tea* dengan karakteristik yang baik. Kondisi ekstraksi yang optimal pada teknik KAI dapat meningkatkan perolehan rendemen, kandungan EGCG, TPC dan TFC dengan faktor optimal pada konsentrasi 14,75%, kecepatan pengadukan 440 rpm dan waktu ekstraksi 12,32 menit. Campuran optimum antara kitosan 0,11%, alginat 0,04% dan ekstrak 0,06% menghasilkan nanopolimer dengan ukuran partikel $294,3 \pm 6,98$, muatan ionik partikel besar $29,7 \pm 1,31$ dan efisiensi penjerapan EGCG sebesar $77,21 \pm 0,80$. Pemberian nanopolimer ekstrak *white tea* dapat membantu dalam penanganan stres oksidatif pada model tikus diabetes tipe 2 yang sebelumnya diinduksi menggunakan STZ-NA. Keseluruhan hasil riset ini dapat digunakan pada rancangan produk nutrasetika yang dapat membantu pasien diabetes.

Kata kunci: EGCG, *white tea*, nanopolimer, kitosan, stres oksidatif, diabetes

ABSTRACT

The epigallocatechin gallate (EGCG) in white tea has unstable properties and poor absorption in the body. Drug carrier formulation needs to be done to improve its stability and effectiveness as an antioxidant in inhibiting oxidative stress. The hope is that it can obtain better biological or pharmacological activity.

The extraction process using the infundation method is modified into kinetic-assisted infundation (KAI) to obtain an extract with abundant EGCG content. Extract quantification includes the determination of total phenolic and total flavonoid (spectrophotometric method) and EGCG levels (HPLC method). The nano polymeric formulation of white tea extract carrier uses the ionic gelation method with variations of chitosan and alginate. Formula optimization uses the design of experiment (DoE) approach. The characterization of nanopolymers includes particle morphology, particle evaluation, a study of material component interactions. Optimum nanopolymers and free extracts were carried out *in vivo* bioactivity testing on oxidative stress modeling with type 2 diabetes test animals. Test animals were induced by streptozotocin-nicotinamide (STZ-NA) by monitoring blood glucose levels. Oxidative stress parameters measured included superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx). Pancreatic and liver organs are made histological preparations with hematoxylin-eosin (HE) staining.

The extraction method using the KAI technique can produce white tea extract with good characteristics. The optimal extraction conditions in the KAI technique can increase the yield, EGCG, TPC, and TFC content with the optimal factor at a concentration of 14.75%, stirring speed 440 rpm, and extraction time of 12.32 minutes. The optimum mixture of 0.11% chitosan, 0.04% alginate, and 0.06% extract produces a nano polymer with a particle size of 294.3 ± 6.98 , a large particle ionic charge of 29.7 ± 1.31 , and an EGCG absorption efficiency of $77,21 \pm 0.80$. Administration of white tea extract nanopolymers has been shown to suppress oxidative stress in type 2 diabetes using mice that were previously induced using STZ-NA. The overall results of this research can be used in the design of nutraceutical products that can help diabetes patients.

Key word: EGCG, white tea, nanopolymers, chitosan, oxidative stress, diabetes

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

White tea merupakan produk teh yang banyak mengandung senyawa polifenol dibandingkan jenis lainnya. Pengolahannya melalui pelayuan dan pengeringan yang singkat sehingga tidak melalui proses oksidasi enzimatik. Menurut Almajano dkk. (2008), polifenol utama pada *white tea* adalah katekin dan derivatnya. Katekin merupakan polifenol utama daun teh yang meliputi *epicatechin* (EC), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin gallate* (ECG), *gallocatechin* (GC), *gallocatechin gallate* (GCG) dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) (Dias dkk., 2013; C. J. Hu dkk., 2016; Tounekti dkk., 2013). Secara umum total derivat katekin dalam sampel kering mencapai 30% (Zhang dan Ruan, 2016). Menurut Zhao dkk. (2011), kandungan katekin total pada *white tea* lebih banyak dari teh hijau dengan kandungan senyawa yang mirip.

Potensi daun teh utamanya *white tea* sangat menarik karena adanya berbagai aktivitas farmakologi yang sudah diketahui terutama diabetes. Ekstrak *white tea* memiliki aktivitas antidiabetes pada tikus yang diinduksi streptozotisin (Islam, 2011). Salah satu target terapi dari diabetes adalah reduksi dan penghambatan stres oksidatif yang muncul (Dharshini dkk., 2020; Dias dkk., 2013; Halim dan Halim, 2019; Ighodaro, 2018). Senyawa EGCG daun teh memiliki peran utama sebagai agen penghambat stres oksidatif pada kondisi diabetes (Chowdhury dkk., 2016; Yoon dkk., 2014). Hasil uji *in vitro* dan *in vivo* untuk *white tea* maupun EGCG memiliki aktivitas yang baik sebagai agen penghambat stres oksidatif (Raposo dkk., 2015; Su dkk., 2016; Yen dkk., 2013; Zhong dkk., 2016).

Stabilitas senyawa fenolik terutama EGCG dalam ekstrak *white tea* berkaitan dengan aktivitas farmakologi yang dihasilkan. Senyawa EGCG maupun fenolik yang lain memiliki sifat sensitif terhadap oksigen, temperatur, cahaya dan pH (Li dan Wang, 2015; Liu dkk., 2016b). Senyawa EGCG juga memiliki bioavailabilitas yang rendah, tidak stabil dalam suasana netral dan lingkungan basa di saluran cerna (Dube dkk., 2011, 2010a, 2010b; B. Hu dkk., 2016). Oleh karena itu, inovasi untuk meningkatkan stabilitas dan mencegah degradasi ketika diaplikasikan dalam sediaan oral sangat dibutuhkan. Nanopolimerik menjadi terobosan yang dapat dikembangkan dalam formulasi. Menurut Zorzi dkk. (2015), keuntungan aplikasi sistem penghantaran untuk mengasosiasikan ekstrak kompleks berdasarkan respon biologis yaitu meningkatkan efek farmakologis karena pelepasan dapat dikendalikan.

Nanopolimer sudah seharusnya memiliki kualitas ideal sebagai pengembangan sistem penghantaran senyawa bahan alam. Oleh karena itu, nanopolimerik ekstrak *white tea* dirancang dan dibangun dari awal preparasi ekstrak, formulasi, hingga uji aktivitas. Teknologi dan metode ekstraksi daun teh terus dikembangkan baik menggunakan pelarut air maupun organik hingga modifikasi perlakuan (Banerjee dan Chatterjee, 2015; Cui dkk., 2017; Hajiaghaalipour dkk., 2016; He dkk., 2014; Ko dkk., 2014; Nkhili dkk., 2009; Nshimiyimana dan He, 2010; Sousa dkk., 2016; Zderic dan Zondervan, 2017). Akan tetapi, serangkaian metode ekstraksi saat ini masih memiliki sisi kelemahan diantaranya efisiensi dan efektivitas pelarut. Modifikasi pelarut dan optimasi terkait ekstraksi diperlukan untuk memperoleh ekstrak kaya EGCG (meningkatkan rendemen dan menjaga stabilitas). Selain itu, belum ada laporan terkait evaluasi

prosedur ekstraksi *multi step* menggunakan pelarut air yang dimodifikasi dengan teknik penambahan pengadukan yang kontinyu. Modifikasi dalam pengembangan ekstraksi ini selanjutnya disebut *kinetic-assisted infundation* (KAI).

Teknologi nanopolimer berbahan aktif ekstrak teh maupun senyawa EGCG juga terus dikembangkan (Liu dkk., 2016a; Sanna dkk., 2015; Wrona dkk., 2017; Zou dkk., 2015). Namun demikian, modifikasi polimer untuk mengasosiasikan ekstrak *white tea* menggunakan kitosan dan alginat belum dilaporkan. Kitosan sebagai polimer bermuatan positif terbukti memiliki kemampuan menembus sistem saluran pencernaan dengan baik hingga plasma (Dube dkk., 2011, 2010b; Wang dkk., 2017). Kitosan banyak diaplikasikan dalam formulasi karena sifatnya yang biodegradabel, biokompatibel, tidak beracun dan mukoadhesif (Azuma dkk., 2015; Nilsen-Nygaard dkk., 2015; Saikia dkk., 2015). Alginat memiliki kelebihan sebagai polimer bermuatan negatif dengan ikatan yang lebih panjang dibandingkan *cross link* lainnya. Kombinasi kitosan dan alginat sangat cocok untuk mengasosiasikan ekstrak kompleks dengan karakter saling melengkapi (Park dkk., 2016). Evaluasi *in vivo* terhadap parameter stres oksidatif nanopolimer kitosan-alginat pembawa ekstrak *white tea* juga belum ada laporan publikasi, utamanya pada kondisi diabetes tipe 2.

Berdasarkan potensi EGCG dalam *white tea* dilakukan penelitian tentang modifikasi ekstraksi, formulasi nanopolimer dan parameter stres oksidatif pada kondisi diabetes tipe 2. Selain modifikasi ekstraksi, juga dilakukan optimasi ekstraksi pada pengembangan teknik KAI. Penetapan TPC dan TFC menggunakan metode spektrofotometri dan kadar EGCG menggunakan instrumen kromatografi

cair kinerja tinggi (KCKT). Optimasi proses ekstraksi *white tea* menggunakan pendekatan dengan *central composite design* (CCD).

Optimasi formula menggunakan pendekatan CCD dengan faktor utama konsentrasi kitosan, alginat dan ekstrak *white tea*. Karakterisasi meliputi morfologi partikel menggunakan *transmission electron microscopy* (TEM) dan *scanning electron microscopy* (SEM), diameter ukuran partikel dan zeta potensial menggunakan *particle size analyzer* (PSA), studi interaksi bahan menggunakan *fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR). Studi pelepasan EGCG secara *in vitro* dan studi stabilitas partikel nanopolimer dievaluasi dengan menetapkan ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial dan mobilitas elektroforesis.

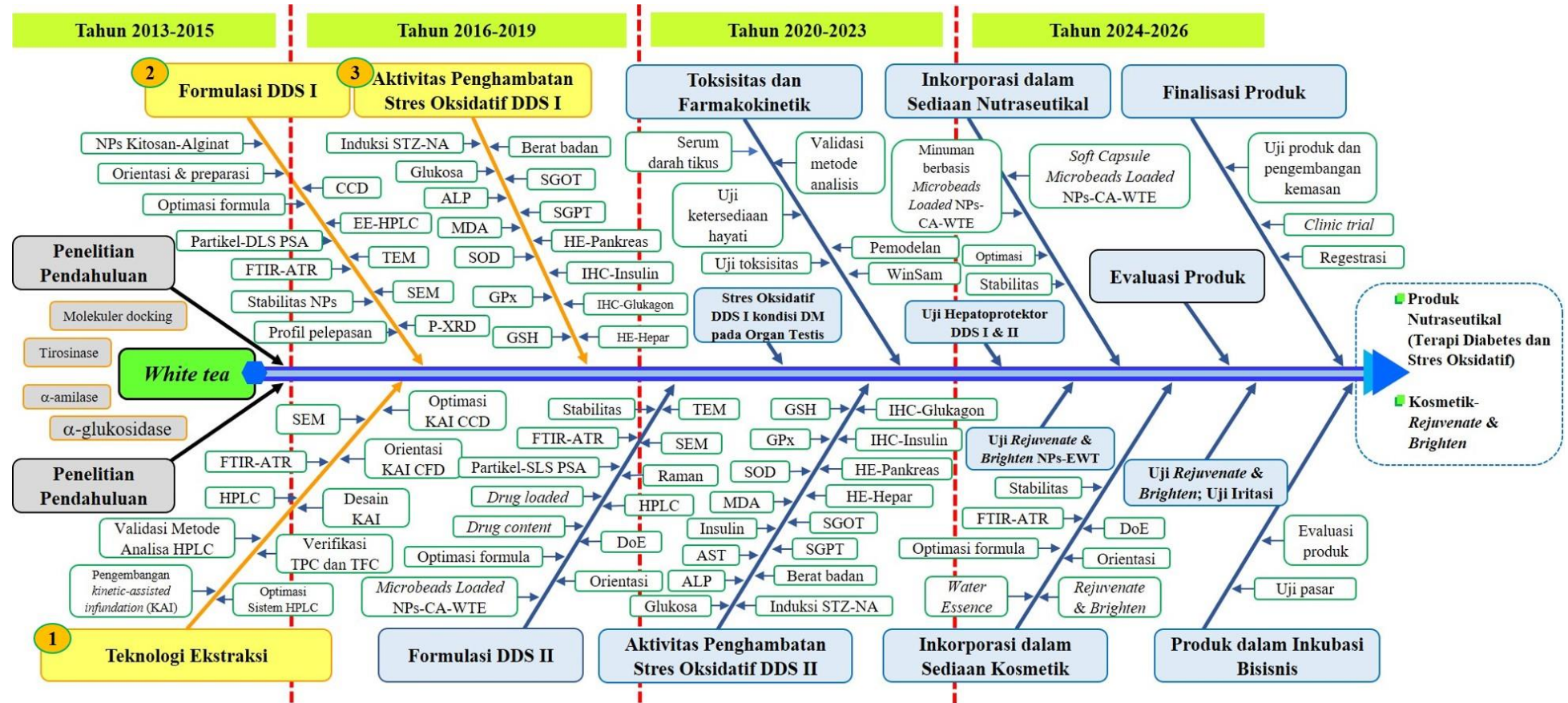
Evaluasi parameter stres oksidatif menggunakan hewan uji tikus dengan model diabetes tipe 2. Hewan uji diinduksi streptozotosin-nikotinamid (STZ-NA) dengan monitoring kadar glukosa darah. Parameter stres oksidatif yang diukur dari homogenat hepar meliputi *malondialdehyde* (MDA), *superoxide dismutase* (SOD), *gluthatione peroxidase* (GPx) dan pengukuran *gluthatione* (GSH) total. Organ pankreas dan hepar dibuat preparat histologik untuk evaluasi morfologi jaringan. Harapan kedepan dapat diperoleh produk nutraseutika berbasis nanopolimerik ekstrak *white tea* yang memiliki khasiat sebagai agen penghambat maupun reduksi stres oksidatif pada penderita diabetes tipe 2.

1. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang, fokus permasalahan pada penelitian ini dirumuskan sebagai berikut.

1. Apa yang menjadi parameter kritis dalam pengembangan teknik ekstraksi menggunakan *kinetic-assisted infundation* (KAI) dan kondisi yang optimal dari proses KAI?
2. Bagaimana formula optimum hasil formulasi nanopolimer kitosan-alginat pembawa ekstrak *white tea* (NP-EWT) dan karakteristik nanopolimer optimum yang dihasilkan?
3. Apakah pemberian nanopolimer ekstrak *white tea* pada hewan uji tikus dapat mempengaruhi parameter stres oksidatif yang meliputi MDA, SOD, GPx dan GSH total pada kondisi diabetes tipe 2?

Tiga rumusan masalah di atas merupakan bagian dari *roadmap* besar penelitian yang dikerjakan peneliti. Masing-masing rumusan mendukung arah pengembangan dalam produk nutraseutik untuk membantu terapi diabetes tipe 2 maupun produk kosmeseutika. Adapun *roadmap* penelitian tersebut disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Roadmap penelitian dengan objek white tea dari *Camellia sinensis* (L.) Kuntze

2. Keaslian Penelitian

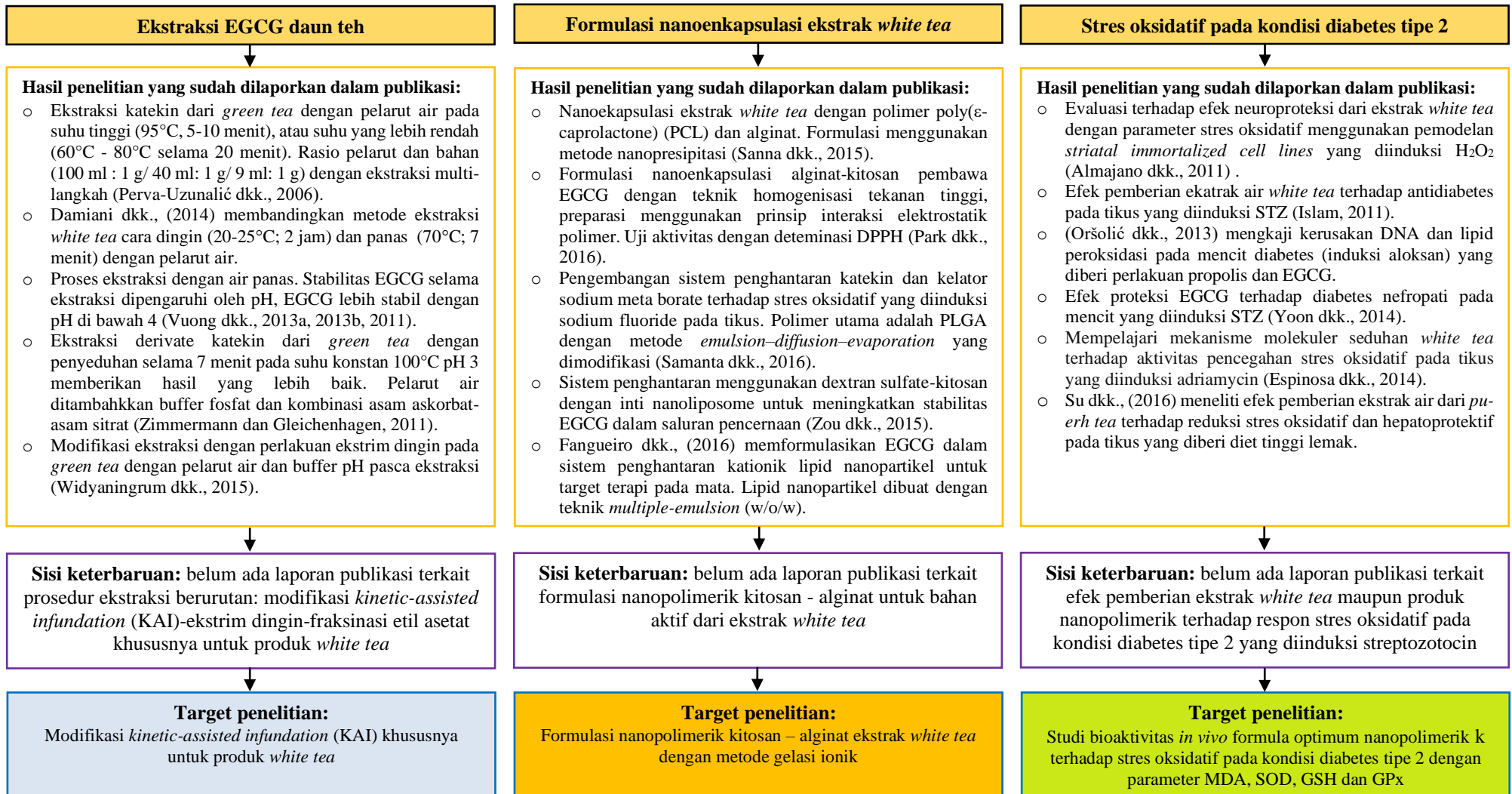
Penelitian pada disertasi ini adalah bagian dari *roadmap* pengembangan produk fitofarmasetika dan sistem penghantaran material aktif berbasis bahan alam dari penulis (Gambar 1). Penelitian ini berfokus pada modifikasi teknologi ekstraksi sederhana, formulasi dan pengujian bioaktivitasnya. Selanjutnya mengerucut menjadi tiga topik utama, yaitu modifikasi teknik ekstraksi dan optimasi ekstraksi *white tea*, formulasi dan optimasi nanopolimer pembawa ekstrak *white tea* dan uji bioaktivitas secara *in vivo* terhadap parameter stres oksidatif pada kondisi diabetes tipe 2 (diagram alir penelitian disertasi pada *roadmap* penelitian dapat dilihat pada Gambar 1). Secara umum ketiga ide gagasan ini belum pernah dipublikasikan baik pada jurnal nasional maupun internasional. Skema detail dari keaslian penelitian dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan penelusuran penulis melalui indeks jurnal-jurnal internasional (Scopus, Science Direct, Elsevier, Springer, ACS Publications, Nature, Taylor and Francis, Wiley *online library*, PubMed, American Chemistry Society, Plosone, MDPI dan lain-lain), disertasi *online* maupun *website* institusi, ketiga sub tema dalam diagram alir konsep penelitian disertasi ini belum dilaporkan. Berbagai metode ekstraksi daun teh yang sudah dikembangkan dengan perlakuan suhu (Bazinet dkk., 2007; Damiani dkk., 2014; Li dkk., 2012; Venditti dkk., 2010), perlakuan pH dalam proses ekstraksi (Park dkk., 2002; Vuong dkk., 2013; Zimmermann dan Gleichenhagen, 2011), perlakuan ekstrim dingin dan *buffer* pH setelah ekstraksi (Widyaningrum dkk., 2015). Namun demikian, belum ada penelitian terkait modifikasi ekstraksi, khususnya pengembangan infundasi dengan

teknik KAI. Metode ekstraksi KAI dikombinasikan dengan perlakuan ekstrim dingin dan fraksinasi.

Formulasi senyawa tunggal EGCG sudah dikembangkan dalam berbagai sistem penghantaran seperti nanoenkapsulasi, nanoliposom, *solid lipid nanoparticles*, dan beberapa kompleksasi dalam bentuk sediaan cair (Fangueiro dkk., 2016, 2014; Fu dkk., 2011; Gómez-Mascaraque dkk., 2016; Istenič dkk., 2016; Krupkova dkk., 2016; Park dkk., 2016; Radhakrishnan dkk., 2016; Smith dkk., 2010; Wei dkk., 2015; Zou dkk., 2015, 2014). Formulasi ekstrak *white tea* sudah dikembangkan dalam bentuk polimerik nanopartikel dengan polimer poly (ϵ -caprolactone) – alginat dan metode yang digunakan adalah nanopresipitasi (Sanna dkk., 2015). Penelitian disertasi ini mengoptimalkan enkapsulasi dengan target terbentuk nanopartikel ekstrak *white tea* dengan mengembangkan polimer kitosan – alginat. Sisi keterbaruan ada pada polimer kitosan dan alginat yang belum diaplikasikan pada pengembangan sistem penghantaran ekstrak kompleks dengan metode gelasi ionik.

Studi bioaktivitas pada stres oksidatif kondisi diabetes tipe 2 terhadap nanopolimer ekstrak *white tea* belum pernah dilaporkan. Studi yang ada terbatas pada eksplorasi ekstrak *white tea* terhadap antidiabetes dengan parameter utama penurunan glukosa darah (Islam, 2011). Efek pemberian *white tea* terhadap peningkatan *cardiac glycolitic* dan profil oksidatif prediabetes (Alves dkk., 2015). Senyawa tunggal EGCG sebagai agen proteksi terhadap diabetes nefropati (Yoon dkk., 2014). Keterbaruan pada tahapan ini adalah evaluasi parameter stres oksidatif pada kondisi diabetes tipe 2 yang diinduksi streptozotosin dengan pemberian formula nanopolimer ekstrak *white tea*.



Gambar 2. Skema keaslian dan keterbaruan penelitian disertasi

3. Urgensi atau Kepentingan Penelitian

Indonesia memiliki potensi perkebunan teh yang potensial baik di pulau Jawa, Sumatera maupun Kalimantan. Teh menjadi komoditi penting dalam perekonomian di Indonesia. Adapun urgensi untuk terus dikembangkan dapat diuraikan pada poin-poin berikut.

- a. Bagi dunia kefarmasian riset ini akan memberikan informasi dalam pengembangan konsep ekstraksi dan pengembangan formulasi pada banyak produk nutrasetika, kosmetik maupun farmasi herbal menggunakan ekstrak dari daun teh yang melimpah dan memiliki efek farmakologis. Studi bioaktivitas *in vivo* dapat mendukung formulasi nanopolimer yang dikembangkan dalam terapi diabetes terutama penghambatan parameter stres oksidatif pada pemodelan diabetes tipe 2.
- b. Bagi peneliti sendiri ini akan membantu dalam pengembangan kepakaran yang ditekuninya. Penelitian ini mengembangkan formulasi nanopolimerik ekstrak *white tea* menggunakan polimer kitosan dan alginat yang belum pernah dikembangkan. Indonesia sendiri sangat potensial sebagai produsen kitosan dan alginat karena kekayaan kemaritiman yang ada.
- c. Bagi industri dibidang farmasi, kosmetik dan pangan tentunya dapat menjadikan ide gagasan baru dalam membuat produk berbasis material aktif dari bahan alam. Studi pengembangan metode ekstraksi *white tea* sangat mendukung preparasi bahan baku ekstrak untuk keperluan industri. Teknologi ini dapat memberikan terobosan dalam produk yang siap ditransfer pada bentuk sediaan farmasi tertentu. Sehingga harapannya

dapat dibuat produk farmasi dengan target sebagai nutrasetika atau membantu dalam terapi diabetes.

B. Tujuan Penelitian

Penelitian disertasi ini memiliki tujuan sebagai berikut.

1. Menetapkan parameter kritis dalam pengembangan teknik ekstraksi menggunakan *kinetic-assisted infundation* (KAI) dan menetapkan kondisi yang optimal dari proses KAI.
2. Menetapkan formula optimum hasil formulasi nanopolimerik kitosan-alginat pembawa ekstrak *white tea* (NP-EWT) dan menetapkan karakteristik nanopolimer optimum.
3. Menetapkan parameter stres oksidatif dengan parameter MDA, SOD, GPx dan GSH total pada kondisi diabetes tipe 2 dari formula optimum nanopolimer kitosan-alginat pembawa ekstrak *white tea*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja, S. dan Dong, M., 2005. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Elsevier, hal. 20–22; 201–203.
- Alara, O.R., Mudalip, S.K.A., Abdurahman, N.H., Mahmoud, M.S., dan Obanijesu, E.O.O., 2019. Data on parametric influence of microwave-assisted extraction on the recovery yield, total phenolic content and antioxidant activity of *Phaleria macrocarpa* fruit peel extract. *Chemical Data Collections*, **24**: 100277.
- Almajano, M.P., Carbó, R., Jiménez, J.A.L., dan Gordon, M.H., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, **108**: 55–63.
- Almajano, M.P., Vila, I., dan Gines, S., 2011. Neuroprotective effects of white tea against oxidative stress-induced toxicity in striatal cells. *Neurotoxicity Research*, **20**: 372–378.
- Aluani, D., Tzankova, V., Kondeva-Burdina, M., Yordanov, Y., Nikolova, E., Odzhakov, F., dkk., 2017. Evaluation of biocompatibility and antioxidant efficiency of chitosan-alginate nanoparticles loaded with quercetin. *International Journal of Biological Macromolecules*, **103**: 771–782.
- Alves, M.G., Martins, A.D., Teixeira, N.F., Rato, L., Oliveira, P.F., dan Silva, B.M., 2015. White tea consumption improves cardiac glycolytic and oxidative profile of prediabetic rats. *Journal of Functional Foods*, **14**: 102–110.
- Armstrong, N.A., 2006. *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation*, 2nd ed. Informa Healthcare.
- Azman, N.A.M., Peiró, S., Fajarí, L., Julià, L., dan Almajano, M.P., 2014. Radical scavenging of white tea and its flavonoid constituents by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**: 5743–5748.
- Azuma, K., Izumi, R., Osaki, T., Ifuku, S., Morimoto, M., Saimoto, H., dkk., 2015. Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials. *Journal of Functional Biomaterials*, **6**: 104–142.
- Banerjee, B., 1992. Botanical classification of tea, dalam: Willson, K.C., Clifford, M.N. (Eds.), *Tea*. Springer Netherlands, hal. 25–51.
- Banerjee, S. dan Chatterjee, J., 2015. Efficient extraction strategies of tea (*Camellia sinensis*) biomolecules. *Journal of Food Science and Technology*, **52**: 3158–3168.
- Barbosa, M.L., de Meneses, A.A.P.M., de Aguiar, R.P.S., de Castro e Sousa, J.M., de Carvalho Melo Cavalcante, A.A., dan Maluf, S.W., 2020. Oxidative

stress, antioxidant defense and depressive disorders: A systematic review of biochemical and molecular markers. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*, **36**: 65–72.

Bazinet, L., Labbé, D., dan Tremblay, A., 2007. Production of green tea EGC- and EGCG-enriched fractions by a two-step extraction procedure. *Separation and Purification Technology*, **56**: 53–56.

Bharadwaz, A. dan Bhattacharjee, C., 2012. Extraction of polyphenols from dried tea leaves. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, **3**: 1–5.

Bilia, A.R., Isacchi, B., Righeschi, C., Guccione, C., dan Bergonzi, M.C., 2014. Flavonoids loaded in nanocarriers: an opportunity to increase oral bioavailability and bioefficacy. *Food and Nutrition Sciences*, **5**: 1212.

Cabrera, C., Artacho, R., dan Giménez, R., 2006. Beneficial effects of green tea - a review. *Journal of the American College of Nutrition*, **25**: 79–99.

Cai, J., Wang, Y., Xi, X., Li, H., dan Wei, X., 2015. Using FTIR spectra and pattern recognition for discrimination of tea varieties. *International Journal of Biological Macromolecules*, **78**: 439–446.

Cano, A., Ettcheto, M., Chang, J.H., Barroso, E., Espina, M., Kühne, B.A., dkk., 2019. Dual-drug loaded nanoparticles of epigallocatechin-3-gallate (EGCG)/ascorbic acid enhance therapeutic efficacy of EGCG in a APPswe/PS1dE9 alzheimer's disease mice model. *Journal of Controlled Release*, **301**: 62–75.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., dan Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis; Philadelphia*, **10**: .

Chaturvedula, V.S.P. dan Prakash, I., 2011. The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**: 2110–2124.

Cheong, W.J., Park, M.H., Kang, G.W., Ko, J.H., dan Seo, Y.J., 2005. Determination of catechin compounds in korean green tea infusions under various extraction conditions by high performance liquid chromatography. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **26**: 747–754.

Choung, M.G., Hwang, Y.S., Lee, M.S., Lee, J., Kang, S.T., dan Jun, T.H., 2013. Comparison of extraction and isolation efficiency of catechins and caffeine from green tea leaves using different solvent systems. *International Journal of Food Science and Technology*, **49**: 1572–1578.

Choung, M.G. dan Lee, M.S., 2011. Optimal extraction conditions for simultaneous determination of catechins and caffeine in green tea leaves. *Food Science and Biotechnology*, **20**: 327–333.

- Chowdhury, A., Sarkar, J., Chakraborti, T., Pramanik, P.K., dan Chakraborti, S., 2016. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **78**: 50–59.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Aríñez-Soriano, J., Cortés, P., Maspoch, D., dkk., 2017. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Scientific Reports*, **7**: 41441.
- Cui, L., Liu, Y., Liu, T., Yuan, Y., Yue, T., Cai, R., dkk., 2017. Extraction of epigallocatechin gallate and epicatechin gallate from tea leaves using β -cyclodextrin. *Journal of Food Science*, 1–7.
- da Silva Carvalho, A.G., da Costa Machado, M.T., de Freitas Queiroz Barros, H.D., Cazarin, C.B.B., Maróstica Junior, M.R., dan Hubinger, M.D., 2019. Anthocyanins from jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation. *Powder Technology*, **345**: 283–291.
- da Silveira, T.F.F., Meinhart, A.D., Ballus, C.A., dan Godoy, H.T., 2014. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. *Food Research International*, **60**: 241–245.
- Dai, W., Ruan, C., Sun, Y., Gao, X., dan Liang, J., 2020. Controlled release and antioxidant activity of chitosan and β -lactoglobulin complex nanoparticles loaded with epigallocatechin gallate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **188**: 110802.
- Dai, W., Ruan, C., Zhang, Y., Wang, J., Han, J., Shao, Z., dkk., 2020. Bioavailability enhancement of EGCG by structural modification and nano-delivery: A review. *Journal of Functional Foods*, **65**: 103732.
- Damiani, E., Bacchetti, T., Padella, L., Tiano, L., dan Carloni, P., 2014. Antioxidant activity of different white teas: comparison of hot and cold tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, **33**: 59–66.
- Dharshini, L.C.P., Vishnupriya, S., Sakthivel, K.M., dan Rasmi, R.R., 2020. Oxidative stress responsive transcription factors in cellular signalling transduction mechanisms. *Cellular Signalling*, **72**: 109670.
- Dias, T.R., Tomás, G., Teixeira, N.F., Alves, M.G., Oliveira, P.F., dan Silva, B.M., 2013. White tea (*Camellia sinensis* (L.)): antioxidant properties and beneficial health effects. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, **2**: 19–26.
- Dong, J.J., Ye, J.H., Lu, J.L., Zheng, X.Q., dan Liang, Y.R., 2011. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination. *Food and Bioproducts Processing*, **89**: 62–66.

- Dube, A., Ng, K., Nicolazzo, J.A., dan Larson, I., 2010a. Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution. *Food Chemistry*, **122**: 662–667.
- Dube, A., Nicolazzo, J.A., dan Larson, I., 2010b. Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (–)-epigallocatechin gallate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41**: 219–225.
- Dube, A., Nicolazzo, J.A., dan Larson, I., 2011. Chitosan nanoparticles enhance the plasma exposure of (–)-epigallocatechin gallate in mice through an enhancement in intestinal stability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **44**: 422–426.
- Effendi, D.S., Syakir, M., Yusron, M., dan Wiratno, 2010. *Budidaya Dan Pasca Panen Teh*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Kementerian Pertanian, Bogor, Indonesia.
- Eleazu, C.O., Eleazu, K.C., Chukwuma, S., dan Essien, U.N., 2013. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, **12**: 60.
- Ezzat, H.M., Elnaggar, Y.S.R., dan Abdallah, O.Y., 2019. Improved oral bioavailability of the anticancer drug catechin using chitosomes: Design, in-vitro appraisal and in-vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*, **565**: 488–498.
- Fàbregas, A., Miñarro, M., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Carrillo, C., Sarrate, R., dkk., 2013. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **446**: 199–204.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., dan Ni, H., 2012. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **90**: 21–27.
- Fangueiro, J.F., Andreani, T., Fernandes, L., Garcia, M.L., Egea, M.A., Silva, A.M., dkk., 2014. Physicochemical characterization of epigallocatechin gallate lipid nanoparticles (EGCG-LNs) for ocular instillation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **123**: 452–460.
- Fangueiro, J.F., Calpena, A.C., Clares, B., Andreani, T., Egea, M.A., Veiga, F.J., dkk., 2016. Biopharmaceutical evaluation of epigallocatechin gallate-loaded cationic lipid nanoparticles (EGCG-LNs): In vivo, in vitro and ex vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*, **502**: 161–169.

- Fu, N., Zhou, Z., Jones, T.B., Tan, T.T.Y., Wu, W.D., Lin, S.X., dkk., 2011. Production of monodisperse epigallocatechin gallate (EGCG) microparticles by spray drying for high antioxidant activity retention. *International Journal of Pharmaceutics*, **413**: 155–166.
- Ghiteșcu, L.D., Gugliucci, A., dan Dumas, F., 2001. Actin and annexins I and II are among the main endothelial plasmalemma-associated proteins forming early glucose adducts in experimental diabetes. *Diabetes*, **50**: 1666–1674.
- Gómez-Mascaraque, L.G., Soler, C., dan Lopez-Rubio, A., 2016. Stability and bioaccessibility of EGCG within edible micro-hydrogels. Chitosan vs. gelatin, a comparative study. *Food Hydrocolloids*, **61**: 128–138.
- González, A.G. dan Herrador, M.A., 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **26**: 227–238.
- Gowda, S.N.S., Rajasowmiya, S., Vadivel, V., Banu Devi, S., Celestin Jerald, A., Marimuthu, S., dkk., 2018. Gallic acid-coated silver nanoparticle alters the expression of radiation-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small lung cancer cells. *Toxicology in Vitro*, **52**: 170–177.
- Goyal, S.N., Reddy, N.M., Patil, K.R., Nakhate, K.T., Ojha, S., Patil, C.R., dkk., 2016. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes – A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions*, **244**: 49–63.
- Grasel, F. dos S., Ferrão, M.F., dan Wolf, C.R., 2016. Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **153**: 94–101.
- Guzmán, K., Kumar, B., Vallejo, M.J., Grijalva, M., Debut, A., dan Cumbal, L., 2019. Ultrasound-assisted synthesis and antibacterial activity of gallic acid-chitosan modified silver nanoparticles. *Progress in Organic Coatings*, **129**: 229–235.
- Hajiaghaalipour, F., Kanthimathi, M.S., Sanusi, J., dan Rajarajeswaran, J., 2015. White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food Chemistry*, **169**: 401–410.
- Hajiaghaalipour, F., Sanusi, J., dan Kanthimathi, M.S., 2016. Temperature and time of steeping affect the antioxidant properties of white, green, and black tea infusions. *Journal of Food Science*, **81**: 246–254.
- Halim, M. dan Halim, A., 2019. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, **13**: 1165–1172.

- Han, J., Guenier, A.S., Salmieri, S., dan Lacroix, M., 2008. Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 2528–2535.
- Handayani, D., Mun'im, A., dan Ranti, A.S., 2015. Optimization of green tea waste extraction using microwave assisted extraction to yield green tea extract. *Traditional Medicine Journal*, **19**: 29–35.
- Hasan, K.Md.M., Tamanna, N., dan Haque, Md.A., 2018. Biochemical and histopathological profiling of wistar rat treated with *Brassica napus* as a supplementary feed. *Food Science and Human Wellness*, **7**: 77–82.
- He, J., Wu, Z., Zhang, S., Zhou, Y., Zhao, F., Peng, Z., dkk., 2014. Optimization of microwave-assisted extraction of tea saponin and its application on cleaning of historic silks. *Journal of Surfactants and Detergents*, **17**: 919–928.
- Hecht, H. dan Srebnik, S., 2016. Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. *Biomacromolecules*, **17**: 2160–2167.
- Hilal, Y. dan Engelhardt, U., 2007. Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, **2**: 414–421.
- Hirun, S. dan Roach, P.D., 2011. An improved solvent extraction method for the analysis of catechins and caffeine in green tea. *Journal of Food and Nutrition Research*, **50**: 160–166.
- Holme, H.K., Davidsen, L., Kristiansen, A., dan Smidsrød, O., 2008. Kinetics and mechanisms of depolymerization of alginate and chitosan in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, **73**: 656–664.
- Hu, B., Ma, F., Yang, Y., Xie, M., Zhang, C., Xu, Y., dkk., 2016. Antioxidant nanocomplexes for delivery of epigallocatechin-3-gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**: 3422–3429.
- Hu, C.J., Gao, Y., Liu, Y., Zheng, X.Q., Ye, J.H., Liang, Y.R., dkk., 2016. Studies on the mechanism of efficient extraction of tea components by aqueous ethanol. *Food Chemistry*, **194**: 312–318.
- Hu, Q., Wang, T., Zhou, M., Xue, J., dan Luo, Y., 2016. Formation of redispersible polyelectrolyte complex nanoparticles from gallic acid-chitosan conjugate and gum arabic. *International Journal of Biological Macromolecules*, **92**: 812–819.
- Huang, J., Xie, Z., Wang, Y., Zhang, J., dan Wan, X., 2015. Recent advances of anti-hyperglycemia and anti-diabetes actions of tea in animal studies. *Current Opinion in Food Science*, **2**: 78–83.
- ICH, 2005. 'Validation of analytical procedures: text and methodology', dalam: *Q2 (R1)*.

- Ighodaro, O.M., 2018. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **108**: 656–662.
- Islam, Md.S., 2011. Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. *Phytomedicine*, **19**: 25–31.
- Istenič, K., Cerc Korošec, R., dan Poklar Ulrih, N., 2016. Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**: 4623–4632.
- Jahromi, M.A.M., Al-Musawi, S., Pirestani, M., Ramandi, M.F., Ahmadi, K., Rajayi, H., dkk., 2014. Curcumin-loaded chitosan tripolyphosphate nanoparticles as a safe, natural and effective antibiotic inhibits the infection of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. *Iranian Journal of Biotechnology*, **12**: 1–8.
- Kazi, J., Sen, R., Ganguly, S., Jha, T., Ganguly, S., dan Debnath, M.C., 2020. Folate decorated epigallocatechin-3-gallate (EGCG) loaded PLGA nanoparticles; in-vitro and in-vivo targeting efficacy against MDA-MB-231 tumor xenograft. *International Journal of Pharmaceutics*, 119449.
- Khan, N. dan Mukhtar, H., 2007. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, **81**: 519–533.
- Ko, M.J., Cheigh, C.I., dan Chung, M.S., 2014. Optimization of subcritical water extraction of flavanols from green tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**: 6828–6833.
- Kohane, D.S., 2007. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, **96**: 203–209.
- Kothamasu, P., Kanumur, H., Ravur, N., Maddu, C., Parasuramrajam, R., dan Thangavel, S., 2012. Nanocapsules: the weapons for novel drug delivery systems. *BioImpacts : BI*, **2**: 71–81.
- Krupkova, O., Ferguson, S.J., dan Wuertz-Kozak, K., 2016. Stability of (–)-epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **37**: 1–12.
- Kulig, D., Zimoch-Korzycka, A., Jarmoluk, A., dan Marycz, K., 2016. Study on alginate–chitosan complex formed with different polymers ratio. *Polymers*, **8**: 167.
- Kumar, D., Gulati, A., dan Sharma, U., 2016. Determination of theanine and catechin in *Camellia sinensis* (kangra tea) leaves by HPTLC and NMR techniques. *Food Analytical Methods*, **9**: 1666–1674.

- Labbé, D., Têtu, B., Trudel, D., dan Bazinet, L., 2008. Catechin stability of EGC- and EGCG-enriched tea drinks produced by a two-step extraction procedure. *Food Chemistry*, **111**: 139–143.
- Lee, L.S., Lee, N., Kim, Y.H., Lee, C.H., Hong, S.P., Jeon, Y.W., dkk., 2013. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic antioxidants from green tea using response surface methodology. *Molecules*, **18**: 13530–13545.
- Li, F., Jin, H., Xiao, J., Yin, X., Liu, X., Li, D., dkk., 2018. The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent. *Food Research International*, **111**: 351–360.
- Li, J. dan Wang, X., 2015. Binding of (–)-epigallocatechin-3-gallate with thermally-induced bovine serum albumin/ι-carrageenan particles. *Food Chemistry*, **168**: 566–571.
- Li, N., Taylor, L.S., Ferruzzi, M.G., dan Mauer, L.J., 2012. Kinetic study of catechin stability: effects of pH, concentration, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**: 12531–12539.
- Li, Q., Liu, C.G., Huang, Z.H., dan Xue, F.F., 2011. Preparation and characterization of nanoparticles based on hydrophobic alginate derivative as carriers for sustained release of vitamin D3. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 1962–1967.
- Li, X., Xie, H., Lin, J., Xie, W., dan Ma, X., 2009. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*, **94**: 1–6.
- Liang, H., Liang, Y., Dong, J., dan Lu, J., 2007. Tea extraction methods in relation to control of epimerization of tea catechins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**: 1748–1752.
- Liu, F., Antoniou, J., Li, Y., Majeed, H., Liang, R., Ma, Y., dkk., 2016a. Chitosan/sulfobutylether-β-cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for tea polyphenol encapsulation. *Food Hydrocolloids*, **57**: 291–300.
- Liu, F., Majeed, H., Antoniou, J., Li, Y., Ma, Y., Yokoyama, W., dkk., 2016b. pH and temperature stability of (–)-epigallocatechin-3-gallate-β-cyclodextrin inclusion complex-loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, **149**: 340–347.
- Lobatto, M.E., Fuster, V., Fayad, Z.A., dan Mulder, W.J.M., 2011. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery*, **10**: 835–852.
- López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L., dan Bastos-González, D., 2005. Physicochemical characterization of chitosan

- nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*, **283**: 344–351.
- Maity, S., Mukhopadhyay, P., Kundu, P.P., dan Chakraborti, A.S., 2017. Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals—An in vitro and in vivo approach. *Carbohydrate Polymers*, **170**: 124–132.
- Mansur, A.R., Song, N.E., Jang, H.W., Lim, T.G., Yoo, M., dan Nam, T.G., 2019. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts. *Food Chemistry*, **293**: 438–445.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., dan Watkins, J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **17**: 24–38.
- Martien, R., Adhyatmika, Irianto, I.D., Farida, V., dan Sari, D.P., 2012. Perkembangan teknologi nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. *Majalah Farmaseutik*, **8**: 133–144.
- Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N., dan Mohamed, J., 2012. The role of oxidative stress and antioksidants in diabetic complications. *Journal of SQU Medical*, **12**: 5–18.
- Merisko-Liversidge, E.M. dan Liversidge, G.G., 2008. Drug nanoparticles: Formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicologic Pathology*, **36**: 43–48.
- Mohammed, M., Syeda, J., Wasan, K., dan Wasan, E., 2017. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, **9**: 53.
- Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Bhattacharya, S., Mishra, R., dan Kundu, P.P., 2015. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, **72**: 640–648.
- Nagpal, K., Singh, S.K., dan Mishra, D.N., 2010. Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **58**: 1423–1430
- Nasr, A., Gardouh, A., Ghonaim, H., Abdelghany, E., dan Ghorab, M., 2016. Effect of oils, surfactants and cosurfactants on phase behavior and physicochemical properties of self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for irbesartan and olmesartan. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, **8**: 13–24.
- Nguyen, S., Pascariu, M., dan Ghitescu, L., 2006. Early glycation products of endothelial plasma membrane proteins in experimental diabetes.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, **1762**: 94–102.

- Niedowicz, D.M. dan Daleke, D.L., 2005. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **43**: 289–330.
- Nilsen-Nygaard, J., Strand, S.P., Vårum, K.M., Draget, K.I., dan Nordgård, C.T., 2015. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers*, **7**: 552–579.
- Nkhili, E., Tomao, V., El Hajji, H., El Boustani, E.S., Chemat, F., dan Dangles, O., 2009. Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochemical Analysis*, **20**: 408–415.
- Nshimiyimana, D.S. dan He, Q., 2010. Radical scavenging capacity of rwandan ctc tea polyphenols extracted using microwave assisted extraction. *Pakistan Journal of Nutrition*, **9**: 589–593.
- Oguntibeju, O.O., Aboua, Y., dan Kachepe, P., 2020. Possible therapeutic effects of vindoline on testicular and epididymal function in diabetes-induced oxidative stress male Wistar rats. *Heliyon*, **6**: e03817.
- Oliveira, R.N., Mancini, M.C., Oliveira, F.C.S. de, Passos, T.M., Quilty, B., Thiré, R.M. da S.M., dkk., 2016. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria (Rio de Janeiro)*, **21**: 767–779.
- Ortsäter, H., Grankvist, N., Wolfram, S., Kuehn, N., dan Sjöholm, Å., 2012. Diet supplementation with green tea extract epigallocatechin gallate prevents progression to glucose intolerance in db/db mice. *Nutrition and Metabolism*, **9**: 11.
- Othman, A.I., El-Sawi, M.R., El-Missiry, M.A., dan Abukhalil, M.H., 2017. Epigallocatechin-3-gallate protects against diabetic cardiomyopathy through modulating the cardiometabolic risk factors, oxidative stress, inflammation, cell death and fibrosis in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **94**: 362–373.
- Park, S.J., Garcia, C.V., Shin, G.H., dan Kim, J.T., 2015. Fabrication and optimization of EGCG-loaded nanoparticles by high pressure homogenization. *Journal of Applied Polymer Science*, **133**: 1–7.
- Park, S.J., Garcia, C.V., Shin, G.H., dan Kim, J.T., 2016. Fabrication and optimization of EGCG-loaded nanoparticles by high pressure homogenization. *Journal of Applied Polymer Science*, **133**: 1–7.
- Park, Y.H., Kung, E., dan Son, D.J., 2002. Effect of pH on the stability of green tea catechins. *ResearchGate*, **17**: 117–123.
- Parmar, N., Singla, N., Amin, S., dan Kohli, K., 2011. Study of cosurfactant effect on nanoemulsifying area and development of lercanidipine loaded

- (SNEDDS) self nanoemulsifying drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **86**: 327–338.
- Pasrija, D. dan Anandharamakrishnan, C., 2015. Techniques for extraction of green tea polyphenols: a review. *Food and Bioprocess Technology*, **8**: 935–950.
- Patil, M.A., Suryanarayana, P., Putcha, U.K., Srinivas, M., dan Reddy, G.B., 2014. Evaluation of Neonatal Streptozotocin Induced Diabetic Rat Model for the Development of Cataract. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**: .
- Peiró, S., Gordon, M.H., Blanco, M., Pérez-Llamas, F., Segovia, F., dan Almajano, M.P., 2014. Modelling extraction of white tea polyphenols: The influence of temperature and ethanol concentration. *Antioxidants*, **3**: 684–699.
- Pękal, A. dan Pyrzyńska, K., 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, **7**: 1776–1782.
- Pérez-Burillo, S., Giménez, R., Rufián-Henares, J.A., dan Pastoriza, S., 2018. Effect of brewing time and temperature on antioxidant capacity and phenols of white tea: Relationship with sensory properties. *Food Chemistry*, **248**: 111–118.
- Perumal, V., Manickam, T., Bang, K.S., Velmurugan, P., dan Oh, B.T., 2016. Antidiabetic potential of bioactive molecules coated chitosan nanoparticles in experimental rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, **92**: 63–69.
- Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., dan Grüner, S., 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, **96**: 597–605.
- Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., dan Veiga, F., 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2**: 8–21.
- Pitocco, D., Tesauro, M., Alessandro, R., Ghirlanda, G., dan Cardillo, C., 2013. Oxidative Stress in Diabetes: Implications for Vascular and Other Complications. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 21525–21550.
- Plapied, L., Duhem, N., des Rieux, A., dan Prétat, V., 2011. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **16**: 228–237.
- Pratiwi, G., Martien, R., dan Murwanti, R., 2019. Chitosan nanoparticle as a delivery system for polyphenols from meniran extract (*Phyllanthus niruri* L.): Formulation, optimization, and immunomodulatory activity. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 50–58.

- Pulicharla, R., Marques, C., Das, R.K., Rouissi, T., dan Brar, S.K., 2016. Encapsulation and release studies of strawberry polyphenols in biodegradable chitosan nanoformulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **88**: 171–178.
- Radhakrishnan, R., Kulhari, H., Pooja, D., Gudem, S., Bhargava, S., Shukla, R., dkk., 2016. Encapsulation of biophenolic phytochemical EGCG within lipid nanoparticles enhances its stability and cytotoxicity against cancer. *Chemistry and Physics of Lipids*, **198**: 51–60.
- Ramalho, S.A., Nigam, N., Oliveira, G.B., de Oliveira, P.A., Silva, T.O.M., dos Santos, A.G.P., dkk., 2013. Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. *Food Research International*, **51**: 155–161.
- Raposo, D., Morgado, C., Pereira-Terra, P., dan Tavares, I., 2015. Nociceptive spinal cord neurons of laminae I–III exhibit oxidative stress damage during diabetic neuropathy which is prevented by early antioxidant treatment with epigallocatechin-gallate (EGCG). *Brain Research Bulletin*, **110**: 68–75.
- Rodrigues, V. de C., da Silva, M.V., dos Santos, A.R., Zielinski, A.A.F., dan Haminiuk, C.W.I., 2015. Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. *International Journal of Food Science and Technology*, **50**: 2038–2045.
- Rohdiana, D., 2015. Teh: proses, karakteristik dan komponen fungsionalnya. *Food Review Indonesia*, **10**: 34–37.
- Rolim, W.R., Pelegrino, M.T., de Araújo Lima, B., Ferraz, L.S., Costa, F.N., Bernardes, J.S., dkk., 2019. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science*, **463**: 66–74.
- Roshanak, S., Rahimmalek, M., dan Goli, S.A.H., 2016. Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. *Journal of Food Science and Technology*, **53**: 721–729.
- Rowe, R.C. (Ed.), 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6. ed. ed. APhA, (PhP) Pharmaceutical Press, London.
- Sæther, H.V., Holme, H.K., Maurstad, G., Smidsrød, O., dan Stokke, B.T., 2008. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **74**: 813–821.
- Saikia, C., Gogoi, P., dan Maji, T.K., 2015. Chitosan: a promising biopolymer in drug delivery applications. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 1–10.

- Samanta, A., Chanda, S., Bandyopadhyay, B., dan Das, N., 2016. Establishment of drug delivery system nanocapsulated with an antioxidant (+)-catechin hydrate and sodium meta borate chelator against sodium fluoride induced oxidative stress in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **33**: 54–67.
- Sanna, V., Lubinu, G., Madau, P., Pala, N., Nurra, S., Mariani, A., dkk., 2015. Polymeric nanoparticles encapsulating white tea extract for nutraceutical application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**: 2026–2032.
- Santoso, B.S.A., 2018. 'Aktivitas antioksidan dan antidiabetes kombinasi jus buah mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) dan rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) pada tikus yang diinduksi streptozotocin', *Disertasi*, Dr., Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sechi, M., Syed, D.N., Pala, N., Mariani, A., Marceddu, S., Brunetti, A., dkk., 2016. Nanoencapsulation of dietary flavonoid fisetin: Formulation and in vitro antioxidant and α -glucosidase inhibition activities. *Materials Science and Engineering: C*, **68**: 594–602.
- Shah, M.A., Reanmongkol, W., Radenahmad, N., Khalil, R., Ul-Haq, Z., dan Panichayupakaranant, P., 2019. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of rhinacanthins-rich extract from *Rhinacanthus nasutus* leaves in nicotinamide-streptozotocin induced diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **113**: 108702.
- Sharpe, E., Hua, F., Schuckers, S., Andreescu, S., dan Bradley, R., 2016. Effects of brewing conditions on the antioxidant capacity of twenty-four commercial green tea varieties. *Food Chemistry*, **192**: 380–387.
- Sheikhpour, R., 2013. Diabetes and oxidative stress: The mechanism and action. *Iranian Journal of Diabetes and Obesity*, **5**: 40–45.
- Shtay, R., Keppler, J.K., Schrader, K., dan Schwarz, K., 2019. Encapsulation of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in solid lipid nanoparticles for food applications. *Journal of Food Engineering*, **244**: 91–100.
- Siemionow, M. dan Demir, Y., 2004. Diabetic neuropathy: Pathogenesis and treatment. A review. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, **20**: 241–252.
- Smith, A., Giunta, B., Bickford, P.C., Fountain, M., Tan, J., dan Shytle, R.D., 2010. Nanolipidic particles improve the bioavailability and α -secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of Pharmaceutics*, **389**: 207–212.
- Snyder, L.R. dan Dolan, J.W., 2010. , dalam: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons Inc. Publication, USA, hal. 542–543.

- Sochor, J., Ruttkay-Nedecky, B., Babula, P., dan Kizek, R., 2012. *Automation of Methods for Determination of Lipid Peroxidation*.
- Sökmen, M., Alomar, S.Y., Albay, C., dan Serdar, G., 2017. Microwave assisted production of silver nanoparticles using green tea extracts. *Journal of Alloys and Compounds*, **725**: 190–198.
- Sousa, L. dos S., Cabral, B.V., Madrona, G.S., Cardoso, V.L., dan Reis, M.H.M., 2016. Purification of polyphenols from green tea leaves by ultrasound assisted ultrafiltration process. *Separation and Purification Technology*, **168**: 188–198.
- Stat-Ease, 2018. *Handbook for Experimenters: A Concise Collection of Handy Tips to Help You Set up and Analyze Your Designed Experiments*, 11. Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA.
- Stoica, R., Şomoghi, R., dan Ion, R.M., 2013. Preparation of chitosan – tripolyphosphate nanoparticles for the encapsulation of polyphenols extracted from rose Hips. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **8**: 955–963.
- Su, J., Wang, X., Song, W., Bai, X., dan Li, C., 2016. Reducing oxidative stress and hepatoprotective effect of water extracts from Pu-erh tea on rats with high-fat diet. *Food Science and Human Wellness*, **5**: 199–206.
- Sulistyo, H., Kurniawan, D.W., dan Rujito, L., 2017. Biochemical and histopathological effects of green tea nanoparticles in ironized mouse model. *Research in Pharmaceutical Sciences*, **12**: 99–106.
- Susanti, E., Ciptati, Ratnawati, R., Aulanni'am, dan Rudijanto, A., 2015. Qualitative analysis of catechins from green tea GMB-4 clone using HPLC and LC-MS/MS. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **5**: 1046–1050.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiological research*, **50**: 536-546: .
- Tang, W.Q., Li, D.C., Lv, Y.X., dan Jiang, J.G., 2011. Concentration and drying of tea polyphenols extracted from green tea using molecular distillation and spray drying. *Drying Technology*, **29**: 584–590.
- Tiyaboonchai, W., 2003. Chitosan nanoparticles : a promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal*, **11**: 51–66.
- Tounekti, T., Joubert, E., Hernández, I., dan Munné-Bosch, S., 2013. Improving the Polyphenol Content of Tea. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **32**: 192–215.

- Ueno, Y., Kizaki, M., Nakagiri, R., Kamiya, T., Sumi, H., dan Osawa, T., 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *The Journal of nutrition*, **132**: 897–900.
- Venditti, E., Bacchetti, T., Tiano, L., Carloni, P., Greci, L., dan Damiani, E., 2010. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity. *Food Chemistry*, **119**: 1597–1604.
- Venkatesan, J., Bhatnagar, I., dan Kim, S.-K., 2014. Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Marine Drugs*, **12**: 300–316.
- Vuong, Q.V., Golding, J.B., Stathopoulos, C.E., Nguyen, M.H., dan Roach, P.D., 2011. Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *Journal of Separation Science*, **34**: 3099–3106.
- Vuong, Q.V., Golding, J.B., Stathopoulos, C.E., dan Roach, P.D., 2013. Effects of aqueous brewing solution pH on the extraction of the major green tea constituents. *Food Research International*, , Tea – from bushes to mugs: composition, stability and health aspects **53**: 713–719.
- Wang, H., Chen, L., Zhang, L., Gao, X., Wang, Y., dan Weiwei, T., 2016. Protective effect of sophoraflavanone G on streptozotocin (STZ)-induced inflammation in diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **84**: 1617–1622.
- Wang, H., Helliwell, K., dan You, X., 2000. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, **68**: 115–121.
- Wang, J., Kong, M., Zhou, Z., Yan, D., Yu, X., Cheng, X., dkk., 2017. Mechanism of surface charge triggered intestinal epithelial tight junction opening upon chitosan nanoparticles for insulin oral delivery. *Carbohydrate Polymers*, **157**: 596–602.
- Wei, Z., Yang, W., Fan, R., Yuan, F., dan Gao, Y., 2015. Evaluation of structural and functional properties of protein–EGCG complexes and their ability of stabilizing a model β -carotene emulsion. *Food Hydrocolloids*, **45**: 337–350.
- Weissman, S.A. dan Anderson, N.G., 2015. Design of experiments (DoE) and process optimization. A review of recent publications. *Organic Process Research & Development*, **19**: 1605–1633.
- Widyaningrum, N., Fudholi, A., Sudarsono, dan Setyowati, E.P., 2015. Stability of epigallocatechin gallate (EGCG) from green tea (*Camellia sinensis*) and its antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *Propionibacterium acnes* ATCC 6919. *Asian Journal of Biological Sciences*, **8**: 93–101.

- Wrona, M., Cran, M.J., Nerín, C., dan Bigger, S.W., 2017. Development and characterisation of HPMC films containing PLA nanoparticles loaded with green tea extract for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, **156**: 108–117.
- Xu, L., Huang, Y.A., Zhu, Q.J., dan Ye, C., 2015. Chitosan in molecularly-imprinted polymers: current and future prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**: 18328–18347.
- Yen, W.J., Chyau, C.C., Lee, C.P., Chu, H.L., Chang, L.W., dan Duh, P.D., 2013. Cytoprotective effect of white tea against H₂O₂-induced oxidative stress in vitro. *Food Chemistry*, **141**: 4107–4114.
- Yoon, S.P., Maeng, Y.H., Hong, R., Lee, B.R., Kim, C.G., Kim, H.L., dkk., 2014. Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Acta Histochemica*, **116**: 1210–1215.
- Younes, I. dan Rinaudo, M., 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, **13**: 1133–1174.
- Yu, K., Ho, J., McCandlish, E., Buckley, B., Patel, R., Li, Z., dkk., 2013. Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **425**: 31–41.
- Yu, M., Wang, B., Qi, Z., Xin, G., dan Li, W., 2019. Response surface method was used to optimize the ultrasonic assisted extraction of flavonoids from *Crinum asiaticum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **26**: 2079–2084.
- Zderic, A. dan Zondervan, E., 2017. Product-driven process synthesis: Extraction of polyphenols from tea. *Journal of Food Engineering*, **196**: 113–122.
- Zhang, Q. dan Ruan, J., 2016. Tea: Analysis and Tasting, dalam: *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford, hal. 256–267.
- Zhao, Y., Chen, P., Lin, L., Harnly, J.M., Yu, L., dan Li, Z., 2011. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. *Food chemistry*, **126**: 1269–1277.
- Zhong, J., Xu, C., Reece, E.A., dan Yang, P., 2016. The green tea polyphenol EGCG alleviates maternal diabetes-induced neural tube defects by inhibiting DNA hypermethylation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **215**: 368.e1-368.e10.
- Zielinski, A.A.F., Haminiuk, C.W.I., dan Beta, T., 2016. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC–DAD–Q–TOF–MS/MS. *LWT - Food Science and Technology*, **65**: 897–907.

- Zimmermann, B.F. dan Gleichenhagen, M., 2011. The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: How to get most out of it. *Food Chemistry*, **124**: 1543–1548.
- Zorzi, G.K., Carvalho, E.L.S., von Poser, G.L., dan Teixeira, H.F., 2015. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **25**: 426–436.
- Zou, L., Peng, S., Liu, W., Chen, X., dan Liu, C., 2015. A novel delivery system dextran sulfate coated amphiphilic chitosan derivatives-based nanoliposome: Capacity to improve in vitro digestion stability of (-)-epigallocatechin gallate. *Food Research International*, **69**: 114–120.
- Zou, L., Peng, S., Liu, Wei, Gan, L., Liu, Wei-lin, Liang, R., dkk., 2014. Improved in vitro digestion stability of (-)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation. *Food Research International*, **64**: 492–499.