

## **LYCOPENE DAN MELATONIN MELINDUNGI KULTUR SEL *RETINAL PIGMENT EPITHELIUM* MATA KAMBING YANG DIPAPAR HIDROGEN PEROKSIDA**

Aulia Abdul Hamid Abdullah\*✉

### **Abstrak**

*Age Related Macular Degeneration* (ARMD) adalah penyakit yang dapat menyebabkan kebutaan dan berkaitan dengan stres oksidatif pada *retinal pigment epithelium* (RPE). *Lycopene* dan melatonin merupakan antioksidan yang diduga berpotensi melindungi sel RPE. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek suplementasi *lycopene* dan melatonin terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) sel RPE mata kambing yang dipapar dengan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Kultur primer sel RPE mata kambing dibagi dalam beberapa kelompok perlakuan suplementasi *lycopene* atau melatonin dengan dosis 10  $\mu M$ , 30  $\mu M$ , dan 100  $\mu M$  dilanjut dengan paparan  $H_2O_2$  250  $\mu M$ . Kadar MDA pada sel kultur diukur dengan metode thiobarbituric assay (TBA). Pada kelompok *lycopene*, kadar MDA rata-rata adalah 1,2  $\mu g/ml$  pada kelompok tanpa perlakuan, dan 1,8  $\mu g/ml$  pada kelompok yang dipapar  $H_2O_2$  tanpa suplementasi. Sel yang diberi *lycopene* dengan kadar 10  $\mu M$ , 30  $\mu M$ , dan 100  $\mu M$  memiliki kadar MDA lebih rendah yaitu 0,7  $\mu g/ml$ , 1,0  $\mu g/ml$ , dan 1,0  $\mu g/ml$  secara berurutan. Rerata kadar MDA pada kelompok melatonin, pada kelompok tanpa perlakuan adalah sebesar 2,3  $\mu g/ml$  dan pada kelompok yang dipapar  $H_2O_2$  tanpa suplementasi sebesar 3,3  $\mu g/ml$ . Kadar pada kelompok perlakuan melatonin 10  $\mu M$ , 30  $\mu M$ , dan 100  $\mu M$  adalah sebesar 2,5  $\mu g/ml$ , 1,7  $\mu g/ml$ , dan 1,7  $\mu g/ml$  secara berurutan. Analisis statistik dengan ANOVA menunjukkan bahwa *lycopene* dan melatonin secara signifikan menurunkan kadar MDA dibanding dengan kelompok tanpa pemberian suplementasi ( $p = 0,01$  dan  $p = 0,001$ ). Sebagai kesimpulan, *lycopene* dan melatonin dapat melindungi kultur sel RPE mata kambing yang dipapar dengan  $H_2O_2$ . *Lycopene* dan melatonin dapat mencegah stres oksidatif pada sel RPE dalam upaya menghambat ARMD.

Kata kunci: kultur sel, *lycopene*, *malondialdehyde*, melatonin, RPE.

## **LYCOPENE AND MELATONIN PROTECT GOAT RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CELL CULTURE EXPOSED BY HYDROGEN PEROXIDE**

### **Abstract**

*Age Related Macular Degeneration* (ARMD) is a potentially blinding eye disease and is thought to be related to oxidative stress on the retinal pigment epithelial cells (RPE). *Lycopene* and melatonin are antioxidants that may reduce oxidative stress and protects RPE cells. The purpose of this study was to evaluate the effects of *lycopene* and melatonin supplementation on goat RPE cell culture exposed with  $H_2O_2$ . Primary culture of goat RPE cells were supplemented with various doses of *lycopene* or melatonin: 10  $\mu M$ , 30  $\mu M$ , and 100  $\mu M$  followed by 250  $\mu M$   $H_2O_2$ . The cells were then collected and levels of malondialdehyde (MDA) were assessed with thiobarbituric assay method (TBA). Average MDA level was increased from 1.3  $\mu g/ml$  in the non-treatment group compared to 1.8  $\mu g/ml$  in the  $H_2O_2$  treated cells. Cells treated with *lycopene* 10  $\mu M$ , 30  $\mu M$ , and 100  $\mu M$  had lower MDA levels of 0.7  $\mu g/ml$ , 1.0  $\mu g/ml$ , and 1.0  $\mu g/ml$  respectively. Average MDA level of melatonin control group was increased from 2.3  $\mu g/ml$  in the non-treatment group compared to 3.4  $\mu g/ml$  in the  $H_2O_2$  treatment group. Cells treated with melatonin 10  $\mu M$ , 30  $\mu M$ , and 100  $\mu M$  had lower MDA levels of 2.5  $\mu g/ml$ , 1.7  $\mu g/ml$ , and 1.7  $\mu g/ml$  respectively. Statistical analysis with ANOVA showed that *lycopene* and melatonin significantly decreased the MDA level compared to positive controls ( $p = 0.01$  and  $p = 0.001$  respectively). In conclusion, *lycopene* and melatonin supplementation significantly reduced oxidative stress goat RPE primary cell culture and may be beneficial in prevention of ARMD progression.

Keywords: cell culture, *lycopene*, *malondialdehyde*, melatonin, RPE.

\* Departemen Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

---

✉ E-mail: aulia\_fkub@yahoo.com

## Pendahuluan

Stres oksidatif diduga merupakan faktor penyebab dari penyakit neurodegeneratif, penyakit jantung, beberapa jenis kanker, katarak, dan degenerasi makula terkait usia atau *Age Related Macular Degeneration* (ARMD). Di bidang mata, ARMD merupakan salah satu penyebab kebutaan yang perlu mendapat perhatian khusus. Prevalensi ARMD stadium awal yang ditandai dengan adanya drusen dan degenerasi retinal pigmen epithelium (RPE) atau hiperpigmentasi adalah sebesar 18% pada populasi usia 65-74 tahun dan 30% pada populasi di atas 74 tahun. Dengan meningkatnya usia harapan hidup, beban dari penyakit ini akan terus meningkat. Stres oksidatif pada tingkat seluler dapat dilihat melalui beberapa indikator, salah satunya adalah dari tingginya kadar *malondialdehyde* (MDA). MDA cukup sering digunakan sebagai indikator stres oksidatif karena berhubungan dengan kerusakan protein seluler dan peroksidasi lipid serta pengukurannya cukup mudah dan akurat.<sup>1-4</sup>

*Lycopene* adalah suatu karotenoid yang memiliki sifat antioksidan yang kuat. Bahan ini banyak terdapat pada buah-buahan seperti tomat dan pepaya. Melatonin adalah hormon alami tubuh yang berfungsi dalam pengaturan siklus sirkadian dan reproduksi. *Lycopene* dan melatonin diketahui memiliki efek antioksidan, namun manfaatnya pada pencegahan ARMD belum banyak diteliti karena jumlahnya pada makula tidak sebanyak lutein dan zeaxanthin.<sup>5,6</sup> *Lycopene* telah dilaporkan ditemukan dalam bentuk metabolit aktifnya pada RPE dan badan siliaris. Khachik *et al.* mengemukakan bahwa diduplikasinya metabolit dari *lycopene* pada retina, RPE, dan badan siliaris menunjukkan bahwa *lycopene* sangat mungkin berfungsi melindungi jaringan tersebut dari stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk

mengetahui pengaruh pemberian *lycopene* dan melatonin secara terpisah, dengan dosis 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, and 100  $\mu$ M terhadap kadar MDA pada kultur sel RPE mata kambing yang dipapar dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>7-10</sup>

## Bahan dan Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### *Kultur sel RPE*

Kultur sel RPE dilakukan dengan metode sesuai dengan yang dideskripsikan oleh Engelmann *et al.* dengan modifikasi pada tahap pembilasan antibiotika.<sup>11</sup> Sel RPE didapat dari mata kambing yang baru disembelih untuk kepentingan konsumsi (kurang dari 6 jam). Mata dicuci dengan povidone iodine 10% dan dibilas dengan larutan ringer laktat kemudian dibuka secara steril dengan potongan mengelilingi limbus. Jaringan segmen anterior, lensa, vitreus dan retina dibuang secara mekanis sehingga menyisakan lapisan RPE pada mangkuk mata. Mangkuk mata diisi dengan 2 ml trypsin 0,1% dan dibiarkan pada suhu ruangan selama 10 menit. Sel RPE dilepaskan dari dinding dalam mangkuk mata dengan irigasi secara berulang menggunakan cairan trypsin. Selanjutnya ditambahkan medium M199 sebanyak 2 ml dan sel disentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya sel diresuspendi dengan medium M199 dan fetal bovine serum (FBS) 10%. Sel yang berhasil diisolasi, dicuci dengan medium antibiotika dosis tinggi yang mengandung Penicillin 100.000 unit, Streptomycin 200 mg, Gentamycin 25 mg, dan Amphotericin B 2 mg (dalam 100 ml medium kultur) selama 30 menit. Kultur sel dilakukan pada *plate 12 well* dengan medium M199 dan FBS 10% pada suhu 37 °C dan konsentrasi CO<sub>2</sub> 5%. Sel

didiamkan selama 48 jam untuk terjadinya pertumbuhan dan menjadi lebih rapat.<sup>11</sup>

#### *Pemaparan Lycopene, Melatonin, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Medium kultur sel RPE yang telah tumbuh diganti dengan medium M199 dan FBS 10% baru yang mengandung *lycopene* (*Sigma-Aldrich*) atau melatonin (*Sigma-Aldrich*) dengan konsentrasi 10  $\mu$ M (kelompok 3), 30  $\mu$ M (kelompok 4), dan 100  $\mu$ M (kelompok 5), kemudian diinkubasi selama 24 jam. Medium dibuang, dan sel dipapar dengan medium M199 dan FBS 10% yang mengandung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 250  $\mu$ M, kemudian diinkubasi selama 1 jam. Pada *plate* kontrol positif (kelompok 2) ditambahkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanpa pemberian *lycopene* atau melatonin sebelumnya.<sup>12,13</sup>

#### *Pengukuran kadar MDA dan Analisis Data*

MDA diukur dengan metode Trichloroasetic Acid (TCA) dan Thiobarbituric Acid 1% (TBA) dengan pengamatan spektrofotometer.<sup>14</sup> Data dianalisis dengan uji homogenitas Levene, *one way* ANOVA, dan analisis *post Hoc* dengan *Least Significant Difference* (LSD). Software statistik yang digunakan adalah SPSS versi 16. Perlakuan dilakukan dengan tiga pengulangan (*triplicate*).

## **Hasil**

#### *Kultur Sel RPE*

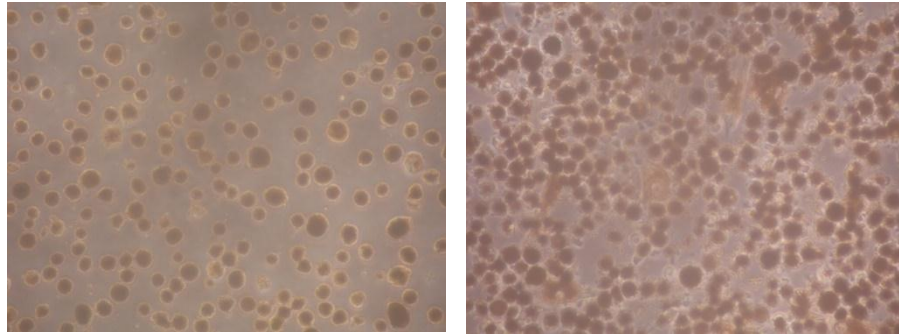
Kultur sel RPE yang ditampilkan pada Gambar 1 menunjukkan pertambahan kerapatan sel RPE yang berbentuk bulat setelah inkubasi selama 48 jam. Sel RPE tampak berwarna kehitaman dan berbentuk bulat.

#### *Hasil pengukuran MDA*

Hasil pengukuran dan rata-rata kadar MDA pada berbagai kelompok ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 2. Pada Tabel 1

tampak bahwa rata-rata kadar MDA pada kultur sel RPE tanpa perlakuan adalah sebesar 1,3  $\mu$ g/ml. Dengan perlakuan pemaparan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 250  $\mu$ M selama 60 menit terlihat peningkatan rata-rata kadar MDA menjadi 1,8  $\mu$ g/ml. Sementara itu, pada kelompok perlakuan yaitu kultur sel yang telah dipapar *lycopene* selama 24 jam sebelum pemaparan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tampak terjadi kecenderungan adanya penurunan kadar MDA. Kadar MDA rata-rata pada kelompok *lycopene* 10  $\mu$ M (kelompok 3), 30  $\mu$ M (kelompok 4), dan 100  $\mu$ M (kelompok 5) berturut-turut adalah sebesar 0,7  $\mu$ g/ml, 1,0  $\mu$ g/ml, dan 1,0  $\mu$ g/ml ( $p = 0,01$ ). Untuk kelompok melatonin, kadar MDA pada kultur sel tanpa perlakuan adalah 2,3  $\mu$ g/ml. Dengan pemaparan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kadar MDA meningkat menjadi 3,4  $\mu$ g/ml. Perlakuan dengan suplementasi melatonin memberikan hasil kadar MDA 2,5  $\mu$ g/ml, 1,7  $\mu$ g/ml, dan 1,7  $\mu$ g/ml untuk dosis 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, dan 100  $\mu$ M secara berturut-turut.

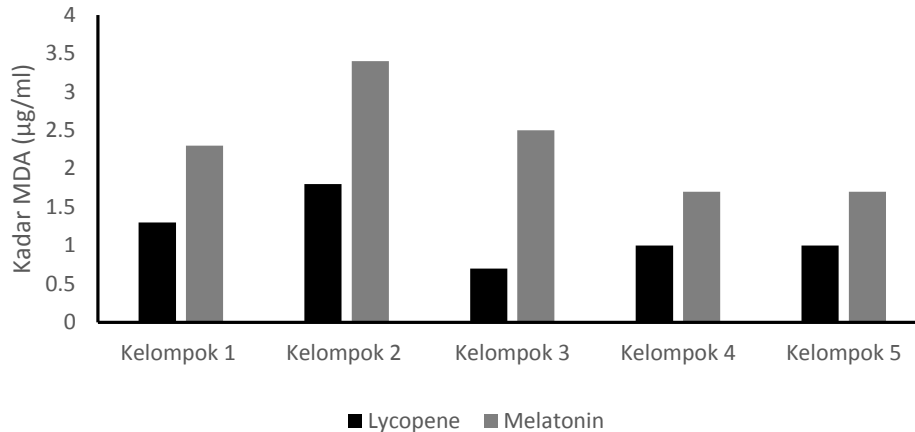
Hasil analisis dengan ANOVA dan LSD pada penelitian ini menunjukkan bahwa *lycopene* dengan dosis 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, dan 100  $\mu$ M secara signifikan dapat menurunkan kadar MDA pada kultur sel RPE yang dipapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dibandingkan dengan kontrol positif.



Gambar 1. Kultur sel RPE mata kambing pasca isolasi (400x), dan kultur sel RPE mata kambing setelah inkubasi selama 48 jam (400x).

Tabel 1. Rerata kadar MDA pada kultur sel RPE mata kambing dengan pemberian *lycopene* atau melatonin pada berbagai dosis dengan paparan  $H_2O_2$  250  $\mu$ M.

Kelompok Sel Kultur RPE	Kadar MDA ( $\mu$ g/ml)			
	<i>Lycopene</i>		Melatonin	
	Rata-rata	+SD	Rata-rata	+SD
Kelompok 1 (tanpa suplemen tanpa $H_2O_2$ )	1,3	0,1	2,3	0,7
Kelompok 2 (tanpa suplemen dengan $H_2O_2$ )	1,8	0,1	3,4	0,6
Kelompok 3 (suplemen 10 $\mu$ M + $H_2O_2$ )	0,7	0,1	2,5	0,2
Kelompok 4 (suplemen 30 $\mu$ M + $H_2O_2$ )	1,0	0,1	1,7	0,2
Kelompok 5 (suplemen 100 $\mu$ M + $H_2O_2$ )	1,0	0,4	1,7	0,1



Gambar 2. Rata-rata kadar MDA pada kultur sel RPE mata kambing

keterangan: kelompok 1. Kultur RPE tanpa perlakuan; kelompok 2. Kultur RPE dengan paparan  $H_2O_2$  250  $\mu$ M; kelompok 3,4,5 Kultur RPE dengan perlakuan suplemen lycopene atau melatonin dengan dosis 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, dan 100  $\mu$ M secara berturut-turut dengan paparan  $H_2O_2$  250  $\mu$ M.

## Pembahasan

Studi dengan kultur sel RPE yang diisolasi dari mata kambing merupakan yang

pertama kali dilakukan di Indonesia, dan berdasar pengetahuan penulis belum ada publikasi mengenai kultur RPE dari sumber ini. Pemilihan mata kambing sebagai bahan

untuk kultur sel RPE adalah sebagai bahan alternatif yang dapat dicoba. Kultur RPE sebelumnya telah ditumbuhkan dari mata sapi, babi, tikus, kelinci, dan manusia (kultur primer dan *cell line*).<sup>11</sup> Mata kambing termasuk bahan yang relatif paling mudah didapatkan di Indonesia dan proses diseksi untuk memperoleh sel RPE relatif lebih mudah. Pada penelitian ini, telah dicoba mengkultur sel RPE dengan teknik yang standar dan telah dipublikasi sebelumnya dengan sedikit modifikasi, khususnya dalam optimasi sterilisasi bahan kultur. Sel RPE mata kambing pada penelitian ini dapat tumbuh selama 7-10 hari dan mencapai kerapatan yang cukup untuk dilakukan perlakuan yang direncanakan. Namun, peluang optimasi kultur masih dapat dilakukan sehingga bisa didapat sel yang tahan lebih lama dan dapat disubkultur beberapa kali. Untuk tujuan tersebut tentunya diperlukan persiapan bahan dan kemampuan teknis laboratorium yang lebih baik<sup>11,12</sup>.

*Lycopene* memiliki sifat protektif sebagai antioksidan yang kuat. Pengamatan ini bersesuaian dengan beberapa penelitian lain dan menguatkan bukti potensi *lycopene* sebagai terapi antioksidan.<sup>10,12,13</sup> Di sisi lain, pada penelitian ini tidak terlihat adanya efek relasi dosis *lycopene* dengan peningkatan efek yang diharapkan, yaitu makin menurunnya kadar MDA dengan dosis yang lebih tinggi. Sebaliknya, pada dosis 30  $\mu\text{M}$  dan 100  $\mu\text{M}$  kadar MDA terlihat pada kisaran sedikit lebih tinggi, yaitu 1,0  $\mu\text{g/ml}$ . Analisis LSD menunjukkan bahwa kadar tersebut tidak berbeda signifikan dengan kadar MDA pada *lycopene* dosis 10  $\mu\text{M}$ . Peningkatan kadar MDA pada dosis 30  $\mu\text{M}$  dan 100  $\mu\text{M}$  kemungkinan merupakan variasi dari pengukuran dalam kelompok. Jadi, dapat disimpulkan bahwa pada penelitian ini tidak terlihat efek perbedaan dosis *lycopene*. Diketahui pula bahwa dosis

*lycopene* 10  $\mu\text{M}$  telah cukup untuk menurunkan kadar MDA secara signifikan.

Pemberian melatonin pada kultur sel RPE mata kambing yang dipapar dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  menyebabkan terjadinya penurunan kadar MDA. Hal ini ditunjukkan dengan hasil analisis dengan *one way ANOVA* yang menunjukkan bahwa pemberian melatonin dosis 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , dan 100  $\mu\text{M}$  dapat secara signifikan ( $p = 0,001$ ) menurunkan kadar MDA pada kultur sel RPE mata kambing yang dipapar  $\text{H}_2\text{O}_2$  dibandingkan dengan paparan  $\text{H}_2\text{O}_2$  saja. Penurunan kadar MDA ini menjelaskan bahwa pemberian melatonin dapat menghambat proses peroksidasi lemak membran sel RPE mata kambing akibat stres oksidatif paparan  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Hal ini membuktikan hipotesis penelitian dan mendukung penelitian sebelumnya bahwa melatonin memiliki efek protektif sebagai antioksidan yang kuat. Pada penelitian ini tampak pula adanya efek relasi dosis melatonin dengan efek yang diharapkan yaitu makin menurunnya kadar MDA dengan pemberian dosis yang lebih tinggi. Dosis melatonin yang dapat menurunkan kadar MDA lebih rendah dari kelompok tanpa perlakuan adalah dosis 30  $\mu\text{M}$ , dan 100  $\mu\text{M}$ .<sup>6,10</sup>

*Lycopene* dan melatonin bekerja dengan menangkap singlet oksigen dan mencegah terbentuknya reaksi oksidasi berantai. Berkurangnya peroksidasi lemak dan turunnya MDA merupakan salah satu mekanisme antioksidan dalam melindungi sel. Dengan makin banyaknya cadangan antioksidan pada RPE, diharapkan berbagai bentuk stres oksidatif termasuk pembentukan lipofuscin dapat ikut berkurang sehingga dapat memperpanjang ketahanan hidup RPE dan selanjutnya mencegah degenerasi makula. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Sundelin *et al.* yang menunjukkan bahwa *lycopene* dapat mengurangi pembentukan lipofuscin pada kultur sel RPE dan oleh

Chichili *et al.* yang membuktikan sifat protektif ekstrak tomat pada kultur sel RPE<sup>10,13,15,16</sup>.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang pertama, pengukuran variabel penanda stres oksidatif yang hanya satu jenis yaitu MDA. Kedua, kultur RPE dari mata kambing sendiri belum berhasil mendapatkan subkultur yang *viable* atau *aktif*, sehingga penyediaan jumlah sel kultur menjadi terbatas.

### Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah *lycopene* dan melatonin memiliki efek protektif pada kultur sel RPE mata kambing yang ditunjukkan dengan kemampuannya menurunkan secara signifikan kadar MDA pada sel yang dipapar dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan secara *in vitro* adalah pemberian *lycopene* dan melatonin sebagai kombinasi antioksidan untuk melihat apakah dapat memberikan hasil proteksi yang lebih efektif terhadap sel RPE. Penelitian *in vivo* dengan *lycopene* dan melatonin pada binatang coba atau manusia juga dapat dilakukan untuk dapat menilai efek suplementasi *lycopene* dan melatonin terhadap stres oksidatif pada RPE.

### Daftar Pustaka

1. American Academy of Ophthalmology Staff. Basic and Clinical Science Course: Retina and Vitreous. San Francisco: American Academy of Ophthalmology. 2008-2009. P. 60-75.
2. Bressler SB, Do DV, Bressler NM. Age Related Macular Degeneration: Drusen and Geographic Atrophy. In: Albert DM (Editor). *Principles and Practice of Ophthalmology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Vol II. Philadelphia: Saunders. 2008. P.1901-16.
3. Zarbin MA. Current Concepts in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122(4):598-614.
4. Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative Damage and Age-Related Macular Degeneration. *Mol Vis*. 1999; 5:32.
5. Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Adv Food Nutr Res*. 2006; 51:99-164.
6. Brzezinski A. Melatonin in Humans. *NEJM*. 1997. 336: p. 186-95.
7. Fraser SE. New Sight for Old Eyes. *Engineering and Science*. 2006; 3:22-31.
8. Thumann G, Hinton DR. Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium. In: Ryan SJ, Schachat AP, (Editors). *Retina*. 4<sup>th</sup> Edition. Vol 1. St.Louis: Mosby. 2006. P.104-122.
9. Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB. Chemistry, Distribution, and Metabolism of Tomato Carotenoids and Their Impact on Human Health. *Exp Biol Med*. 2002; 227(10):845-51.
10. Osborne NN, Nash MS, and Wood JPM. Melatonin Counteracts Ischemia-Induced Apoptosis in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39:2374-83.
11. Engelmann K, Valtink M. RPE Cell Cultivation. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004; 242:65-67.
12. Kim MH, Chung J, Yang JW, Chung SM, Kwag NH, Yoo JS. Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death in A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line ARPE-19. *Korean J Ophthalmol*. 2003;17(1):19-28.
13. Sundelin SP, Nilsson SE. Lipofuscin-Formation in Retinal Pigment Epithelial Cells is Reduced by Antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(2):217-25.

14. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma Malondialdehyde as Biomarker Foroxidative Stress: Reference Interval and Effects of Life-Style Factors. *Clinical Chemistry*. 1997; 43(7):1209–1214.
15. Cardinault N, Abalain JH, Sairafi B, Coudray C, Grolier P, Rambeau M, Carré JL, Mazur A, Rock E. *Lycopene* but not *Lutein* Nor *Zeaxanthin* Decreases in Serum and Lipoproteins in Age-Related Macular Degeneration Patients. *Clin Chim Acta*. 2005; 357(1):34-42.
16. Chichili GR, Nohr D, Frank J, Flaccus A, Fraser PD, Enfissi EM, and Biesalski HK. Protective Effects of Tomato Extract with Elevated  $\beta$ -Carotene Levels on Oxidative Stress in ARPE-19 Cells. *British Journal of Nutrition*. 2006; (96):643–649.