

# Isolat EGCG Teh Hijau Klon GMB4 Menurunkan Ekspresi Protein Faktor Transkripsi C/EBP $\alpha$ dan Kadar Leptin pada Kultur Sel Preadiposit *Visceral* Tikus

## *EGCG Green Tea GMB4 Clone Isolate Decrease Transcription Factor Protein C/EBP $\alpha$ Expression and Leptin Level on Preadipocytes Culture Cell of Rat Visceral*

Analisa W Wardhana<sup>1</sup>, Retty Ratnawati<sup>2</sup>, Hidayat Suyuti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang

<sup>2</sup>Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

<sup>3</sup>Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

### ABSTRAK

Isolat golongan senyawa katekin teh hijau (*Camelia sinensis*) klon GMB4 dapat dikembangkan sebagai agen terapeutik potensial untuk obesitas. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui efek isolat EGCG teh hijau klon GMB4 terhadap ekspresi protein faktor transkripsi C/EBP $\alpha$  dan terhadap kadar protein leptin pada kultur preadiposit visceral tikus. Metode ELISA digunakan untuk mengukur kadar leptin dan immunositokimia untuk ekspresi protein faktor transkripsi C/EBP $\alpha$ . Kultur sel preadiposit visceral tikus yang diisolasi dari tikus *Rattus norvegicus* Wistar yang ditumbuhkan dalam medium adipogenik dan selanjutnya dipapar dengan isolat golongan senyawa katekin teh hijau (*Camelia sinensis*) klon GMB4 dengan konsentrasi 0, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, dan 200  $\mu$ M. Ekspresi C/EBP $\alpha$  paling rendah terdapat pada konsentrasi isolat EGCG 200  $\mu$ M. Kadar leptin menurun seiring dengan dosis EGCG yang dinaikkan, sehingga kadar leptin berbanding terbalik dengan dosis EGCG. Kadar leptin terendah pada pemaparan EGCG dengan dosis 200  $\mu$ M. Dapat disimpulkan bahwa isolat EGCG teh hijau klon GMB4 secara signifikan dapat menurunkan ekspresi protein faktor transkripsi C/EBP $\alpha$  pada kultur preadiposit visceral tikus pada konsentrasi 200  $\mu$ M dan menurunkan kadar protein leptin pada kultur preadiposit visceral tikus pada konsentrasi 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, dan 200  $\mu$ M.

**Kata Kunci:** C/EBP $\alpha$ , EGCG, GMB4, leptin, sel preadiposit, teh hijau

### ABSTRACT

Catechin compound of green tea (*Camelia sinensis*) GMB 4 clone isolate can be developed as potential therapeutic agent for obesity. The research aim to determine the effect of EGCG green tea GMB4 clone isolate to transcription factor protein C/EBP $\alpha$  expression and level of leptin protein on preadipocytes culture of rat visceral. ELISA method used to measure the leptin level and immunohistochemistry to count the transcription factor protein C/EBP $\alpha$  expression. Culture of Preadipocytes cell of rat visceral isolated from *Rattus norvegicus* wistar grown in the medium of adipogenic and exposed with green tea catechin compound (*Camelia sinensis*) from GMB4 clone concentrate dose 0, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, and 200  $\mu$ M. The lowest C/EBP $\alpha$  expression found in the EGCG isolate concentration of 200  $\mu$ M. Leptin level decrease as the raising dose of EGCG. The lowest leptin level found in EGCG dose 200  $\mu$ M. The research concluded that EGCG green tea isolate of GMB4 clone significantly decrease transcription factor protein C/EBP $\alpha$  on the culture of visceral preadipocytes rat on 200  $\mu$ M concentration and decrease leptin protein level on concentration of 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, dan 200  $\mu$ M.

**Keywords:** C/EBP $\alpha$ , EGCG, GMB4, green tea, leptin, preadipocytes cell

---

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 27, No. 4, Agustus 2013; Korespondensi: Analisa W Wardhana. Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang, Jl. MT Haryono No. 169 Malang Tel. (0341) 573642 Email: analis\_wardhana@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Obesitas merupakan salah satu masalah kesehatan yang menjadi perhatian karena berhubungan dengan sejumlah komplikasi medis yang menyebabkan tingginya angka morbiditas dan mortalitas (1). Obesitas terjadi jika *Body Mass Index* (BMI) menunjukkan  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ . Obesitas timbul akibat ketidakseimbangan antara energi yang masuk dengan energi yang dikeluarkan. Kelebihan energi disimpan dalam jaringan adiposa dalam bentuk trigliserida.

Sel adiposit sekarang tidak lagi dianggap sebagai tempat penyimpanan kelebihan energi dalam bentuk trigliserida yang bersifat pasif, tetapi merupakan sel yang secara aktif meregulasi *pathway* yang bertanggung jawab terhadap keseimbangan energi yang aktifitasnya dikontrol oleh jaringan hormonal dan sinyal neuronal yang kompleks. Sel adiposit mensekresi *messenger* kimia diantaranya adalah leptin (2). Leptin disekresi terutama oleh sel adiposit dan merupakan salah satu dari lebih 50 adipositokin yang teridentifikasi dan terlibat dalam sinyal hormonal pada jaringan adiposit leptin merupakan faktor utama yang menentukan regulasi berat badan, metabolisme energi dan terjadinya obesitas serta kelainan yang menyertainya pada manusia (3). Leptin dikenal sebagai hormon yang digunakan sebagai marker untuk obesitas (4).

Leptin merupakan produk yang dihasilkan oleh *obese* (*ob*) *gene*, dan promoter *ob* gen tersebut diaktivasi oleh protein faktor transkripsi C/EBP $\alpha$  (CCAT/*enhancer binding protein*  $\alpha$ ) (5). Protein C/EBP $\alpha$  mempunyai fungsi yang sangat penting pada ekspresi *ob* gen, baik pada sel preadiposit dan adiposit (6). Protein C/EBP $\alpha$  meningkatkan ekspresi leptin *in vivo* dan merupakan satu-satunya prediktor dari ekspresi leptin pada jaringan ekstraperitoneal (7). Sebagai salah satu faktor transkripsi pada tahap akhir diferensiasi adiposit C/EBP $\alpha$  dapat dihambat oleh katekins di dalam teh hijau yang dapat mencegah obesitas.

*Epigallocatechin gallate* (EGCG) adalah katekin yang paling tinggi kandungannya pada teh hijau, kira-kira sebesar 35% dari jumlah katekins dan merupakan agen anti-obesigenik paling potensial. Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung telah berhasil mengembangkan klon tanaman teh hijau yaitu klon GMB4 dengan kadar katekins yang lebih tinggi (17%) daripada tanaman teh lainnya (8). Studi Herin membuktikan bahwa EGCG pada dosis 8 mg/kg BB the hijau klon GMB4 mampu menghambat resistensi insulin dengan penurunan kadar SREBP-1 jaringan adiposa dan lemak visceral (9). Hasil penelitian Ratnawati (2010) secara *in vivo*, Isolat *Epigallocatechin gallate* (EGCG) dari teh hijau klon GMB4 mampu menurunkan C/EBP- $\alpha$  dan leptin jaringan adiposa pada tikus galur *Wistar* betina yang diberikan Diet Tinggi Lemak, namun penelitian secara *in vitro* belum pernah dilakukan. Penelitian ini dilakukan untuk melihat efek isolat EGCG teh hijau klon GMB4 secara *in vitro* pada kultur sel preadiposit tikus terhadap ekspresi protein faktor transkripsi C/EBP- $\alpha$  dan kadar leptin untuk mengetahui potensi yang dimiliki oleh EGCG teh hijau klon GMB4 sehingga bisa memanfaatkan plasma nutfah asli Indonesia sebagai alternatif penanggulangan obesitas.

## METODE

### *Isolasi Sel dan Kultur Sel*

Depo jaringan lemak (prieipididimal, retroperitoneal, atau subkutan) disayat dalam kondisi steril dan dibebaskan semaksimal mungkin dari kapiler darah, kemudian dimasukkan ke dalam media transfer. Jaringan dicuci dua kali dengan dPBS, kemudian dicuci sekali lagi dengan media kultur tanpa serum FBS, pada tahap ini jaringan lemak dicacah kecil-kecil. Jaringan diambil menggunakan pinset dan dimasukkan dalam tabung 15 ml yang berisi larutan kolagenase tipe I (Sigma, USA). Jaringan diinkubasi dalam *waterbath shaker* selama 1-2 jam pada suhu 37°C, kemudian jaringan disentrifus pada kecepatan 1000 rpm selama 7 menit. Supernatan dibuang dan pelet diambil kemudian ditambahkan media serum *free* dan dihomogenisasi dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 7 menit. Selanjutnya supernatan dibuang dan pelet diambil kemudian ditambahkan media yang mengandung FBS 10% dan dihomogenisasi dilakukan penanaman pada *flask* atau *plate* kultur, kemudian diinkubasi pada suhu atmosfer lembab mengandung 5% CO<sub>2</sub> suhu 37°C selama 24 jam. Sel dicuci setiap dua hari sekali (9).

### *Stimulasi Diferensiasi Adiposit*

Setelah mencapai *preconfluent* (tumbuh hampir merata pada media kultur), sel preadiposit tikus ditumbuhkan dalam media adipogenik (DMEM/F12 dengan ditambahkan 66nM insulin, 100 nM *dexamethasone*, 0,2 mM IBMX dan 10  $\mu\text{g/ml}$  TZD) untuk diferensiasi sel. Suspensi sel ditumbuhkan di atas *cover glass* pada *culture plate* dengan inkubasi pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Sel dicuci setiap 3 hari sekali (10).

### *Perlakuan Isolat Epigallocatechin gallate (EGCG) Teh Hijau Klon GMB4*

Isolat EGCG merupakan hasil isolasi teh hijau GMB4 Lembaga penelitian Teh dan Kina Gambung, Bandung yang dilakukan di Laboratorium Kimia, FMIPA ITB, Bandung. Setelah preadiposit mengalami *preconfluent* 70% maka EGCG dilarutkan dalam medium serum *free* dan diinkubasi selama 24 jam dengan beberapa konsentrasi yaitu 0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , dan 200  $\mu\text{M}$  masing-masing 6 replikasi. Setelah diinkubasi 24 jam dilakukan pengukuran kadar leptin pada media dengan metode ELISA dan ekspresi protein faktor transkripsi C/EBP $\alpha$  diamati dengan immunositokimia (8,11).

### *Pengukuran Kadar Leptin melalui Metode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)*

Protokol pengukuran leptin menggunakan panduan manual kit ELISA dari Cusabio Biotech CO.Ltd.China. Sampel media sel adiposit dan standar sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam sumuran yang telah *dicoating* dengan anti-leptin poliklonal dan ditutup dengan *adhesive strip*, selanjutnya diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Cairan pada tiap sumuran dibuang tanpa dilakukan pembilasan. Pada sumuran ditambahkan 100 $\mu\text{L}$  *Biotin-secondary Antibody* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Sumuran dicuci dengan *wash buffer* 200  $\mu\text{L}$  sebanyak 3 kali. Selanjutnya ditambahkan HRP-*avidin* pada setiap sumuran sebanyak 100 $\mu\text{L}$  kemudian ditutup dengan *adhesive strip* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Sumuran dicuci kembali dengan *wash buffer* (200 $\mu\text{L}$ )

sebanyak 3 kali. Selanjutnya ditambahkan 90  $\mu\text{L}$  TMB *substrate* pada setiap sumuran dan diinkubasi selama 10-30 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  *stop solution* pada setiap *well* dan dibaca pada panjang gelombang 450 nm dengan *ELISA reader*.

#### Pengamatan Ekspresi Protein C/EBP $\alpha$ dengan Immunositokimia

Prosedur Immunositokimia yang digunakan berpedoman pada *Dakocytomation Staining kits LSAB 2 System-HRP Code K0673*, Denmark, pada masing-masing perlakuan, sel kultur diblock dengan hidrogen peroksida, dan diinkubasi selama 5 ( $\pm$ 1) menit dan kemudian dicuci dengan *buffer solution*. Sel kultur ditambahkan antibodi primer monoklonal (anti C/EBP $\alpha$ , Santa Cruz Biotechnology, USA) atau *negative control reagen* sampai menutup semua bagian cover slip diinkubasi selama 60 menit, dan kemudian dicuci dengan *buffer solution*. Sel kultur ditambahkan *Link Antibody*, dan diinkubasi selama 10 ( $\pm$ 1) menit dan kemudian dicuci dengan *buffer solution*. Selanjutnya sel kultur ditambah dengan reagen streptavidin, dan diinkubasi selama 10 ( $\pm$ 1) menit kemudian dicuci dengan *buffer solution*. Sel kultur ditambahkan *DAB substrate-Chromogen solution*, kemudian diinkubasi 5-10 menit Slide sel kultur dicelupkan pada *hematoxylen* dan diinkubasi selama 2-5 menit kemudian cuci dengan *distilled water*. Selanjutnya slide dimasukkan 10 kali ke dalam 0,037ml/L *ammonia water*, kemudian dicuci dengan *distilled water* selama 2-5 menit kemudian *cover slip* diangkat dari *plate culture* kemudian dilanjutkan tahap monitoring. Dilakukan tahap *mounting* dengan cara sel diletakkan pada *object glass* dan ditetesi dengan *aqueous-based mounting medium*, seperti *Faramount* atau Gliserol. Selanjutnya, preparat sel tersebut diamati di bawah mikroskop lalu dihitung jumlah sel yang berwarna coklat (merupakan indikator ekspresi dari C/EBP $\alpha$ ). Ekspresi C/EBP $\alpha$  dapat dilihat pada bagian inti sel yang terwarnai dengan warna coklat.

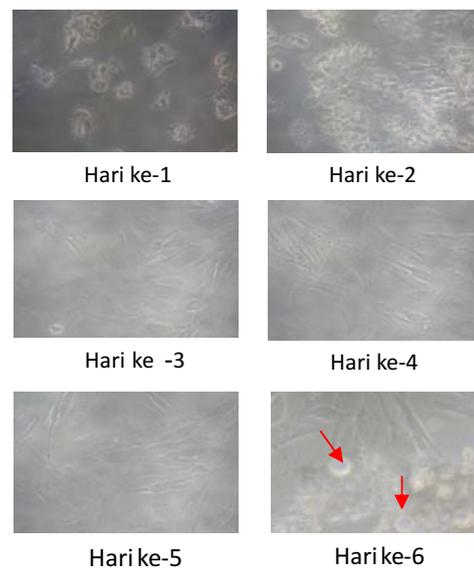
Setelah data dari hasil pengamatan dan pengukuran dikumpulkan, kemudian dilakukan analisis data dengan menggunakan statistik parametrik. Data hasil penelitian akan disajikan dalam *mean  $\pm$  SD*. Data penelitian merupakan data kuantitatif dan kualitatif. Untuk data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan *software SPSS release 17* menggunakan *One-Way ANOVA*.

## HASIL

Penelitian ini dilakukan pada bulan Nopember 2010 sampai bulan Maret 2011 di Laboratorium ilmu Faal Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini merupakan penelitian *in vitro* dengan menggunakan sel preadiposit yang diisolasi dari tikus *Rattus norvegicus Wistar* yang ditumbuhkan dalam medium adipogenik dan selanjutnya dipapar dengan isolat EGCG teh hijau klon GMB4 dengan konsentrasi 0, 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ . Hasil dari kultur perkembangan sel fibroblast *like preadipocyte* yang ditandai dengan bentukan sel fibroblast menjadi sel adiposit *mature* yang ditandai dengan pembentukan butiran lemak (Gambar 1).

#### Ekspresi Protein Faktor Transkripsi C/EBP $\alpha$ Sel preadiposit yang Dipapar dengan Isolat EGCG Teh Hijau Klon GMB4

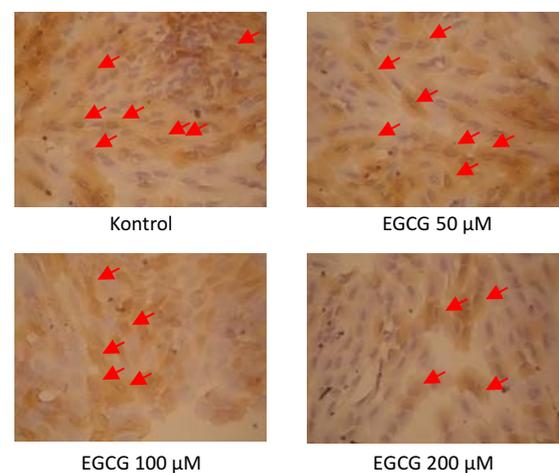
Untuk mengetahui pengaruh isolat EGCG terhadap ekspresi C/EBP $\alpha$ , maka dilakukan pewarnaan immunositokimia yang menggunakan DAB (*Diamino Benzidine*). Pada hari ke-6 kultur sel *fibroblast like*



**Gambar 1.** Perkembangan sel fibroblast *like preadipocyte*

**Keterangan:** Perkembangan ditandai dengan pembentukan sel fibroblast yang belum berkembang menjadi sel preadiposit; inkubasi pada sel preadiposit dengan medium diferensiasi dilakukan pada hari ke-5 dan hari ke-6 mulai tampak bentuk butiran lemak (tanda panah merah) (fotomikroskop Olympos CX31 perbesaran 400x).

*preadipocyte* diinduksi dengan medium diferensiasi dan dipapar dengan isolat EGCG selama 24 jam, sel yang telah membentuk *monolayer* dan konfluen dilakukan pewarnaan immunositokimia dan dihitung jumlah sel yang mengekspresikan C/EBP $\alpha$  per 100 sel (Gambar 2).



**Gambar 2.** Ekspresi C/EBP $\alpha$  pada sel preadiposit setelah terpapar dengan isolat EGCG teh hijau klon GMB4 selama 24 jam.

**Keterangan:** Ekspresi C/EBP $\alpha$  (tanda panah merah) paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol dan semakin menurun ekspresinya seiring meningkatnya dosis EGCG yang diberikan (fotomikroskop Olympos CX31 perbesaran 400X).

Ekspresi C/EBP $\alpha$  ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel, dimana ekspresi C/EBP $\alpha$  paling tinggi terlihat pada kelompok kontrol (75,1667 $\pm$ 11,16094). Ekspresi C/EBP $\alpha$  semakin rendah pada dosis isolat EGCG teh hijau klon GMB4 yang semakin tinggi (Tabel 1). Ekspresi C/EBP $\alpha$

paling rendah terdapat pada konsentrasi isolat EGCG 200  $\mu\text{M}$  ( $28,5000 \pm 14,67992$ ) yang terlihat dari sediaan apusan sel yang tidak menyerap pewarna DAB, sehingga sel hanya berwarna biru.

**Tabel 1. Hasil kuantifikasi ekspresi C/EBP $\alpha$  (sel/100 sel) dengan Analisis *One-Way ANOVA***

Perlakuan	N	Mean $\pm$ SD* p(<0,05)
Kontrol	6	75,1667 $\pm$ 11,16094(b*)
EGCG50 $\mu\text{M}$	6	67,8333 $\pm$ 14,26067(b*)
EGCG 100 $\mu\text{M}$	6	63,8333 $\pm$ 12,23792(b*)
EGCG 200 $\mu\text{M}$	6	28,5000 $\pm$ 14,67992(a*)

**Keterangan:** \*Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

Berdasarkan hasil analisis uji statistik *One-Way ANOVA* ( $\alpha=0,05$ ) diketahui ada perbedaan yang signifikan pemaparan isolat EGCG teh hijau klon GMB4 pada beberapa dosis terhadap ekspresi C/EBP $\alpha$  pada sel preadiposit tikus ( $p=0,000$ ). Hasil pengujian berganda dengan uji *Tukey HSD* didapatkan bahwa ekspresi C/EBP $\alpha$  pada kelompok kontrol menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan yang diberikan isolat EGCG dengan konsentrasi 200  $\mu\text{M}$  ( $p=0,000$ ), kelompok perlakuan konsentrasi 200  $\mu\text{M}$  juga berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  ( $p=0,000$ ) dan kelompok perlakuan konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  ( $p=0,001$ ). Antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  dan kelompok perlakuan konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hasil ini menunjukkan bahwa pada pemberian isolat EGCG teh hijau klon GMB4 dosis 50 dan 100  $\mu\text{M}$  belum memberikan penurunan ekspresi C/EBP $\alpha$  yang bermakna dibandingkan kontrol. Penurunan signifikan baru didapatkan pada dosis 200  $\mu\text{M}$ .

#### Kadar Leptin Sel Preadiposit yang Dipapar

Kultur sel preadiposit yang diberi isolat EGCG teh hijau klon menunjukkan kadar leptin yang lebih rendah secara signifikan dengan kontrol yang dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 4. Pada konsentrasi EGCG 50  $\mu\text{M}$  ( $691,665 \pm 40,230$ ) diperoleh kadar leptin yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan kontrol ( $867,313 \pm 14,976$ ). Pada konsentrasi EGCG 100  $\mu\text{M}$  ( $689,43 \pm 101,672$ ) diperoleh kadar leptin yang jauh lebih rendah dari kontrol dan pada konsentrasi EGCG 200  $\mu\text{M}$  ( $516,413 \pm 66,221$ ) juga diperoleh kadar leptin yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Kadar leptin menurun seiring dengan dosis EGCG yang dinaikkan. Kadar leptin terendah pada pemaparan EGCG dengan dosis 200  $\mu\text{M}$ .

**Tabel 2. Hasil kuantifikasi kadar leptin (pg/ml) dengan analisis *One-Way ANOVA***

Perlakuan	N	Mean $\pm$ SD* p(<0,05)
Kontrol	6	867,313 $\pm$ 14,976(c*)
EGCG50 $\mu\text{M}$	6	691,665 $\pm$ 40,230(b*)
EGCG 100 $\mu\text{M}$	6	689,43 $\pm$ 101,672(b*)
EGCG 200 $\mu\text{M}$	6	516,413 $\pm$ 66,221(a*)

**Keterangan:** \*Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

Berdasarkan uji statistik *One-Way ANOVA* ( $\alpha=0,05$ ) menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan pada pemaparan isolat EGCG terhadap kadar leptin pada media kultur sel preadiposit tikus. Hasil pengujian berganda dengan *Tukey HSD* didapatkan bahwa terdapat perbedaan kadar leptin medium yang signifikan antara kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  ( $p=0,001$ ), konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  ( $p=0,001$ ) dan perlakuan konsentrasi 200  $\mu\text{M}$  ( $p=0,000$ ). Pada kelompok perlakuan konsentrasi 200  $\mu\text{M}$  berbeda signifikan dengan perlakuan konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  ( $p=0,001$ ) dan perlakuan konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  ( $p=0,001$ ), sedangkan antar perlakuan konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  dan perlakuan konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  tidak ada perbedaan yang signifikan. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian isolat EGCG teh hijau klon GMB4 pada semua dosis memberikan kadar leptin yang lebih rendah dibandingkan kontrol. Efek penurunan pada dosis 50 dan 100  $\mu\text{M}$  tidak berbeda signifikan. Perbedaan efek yang signifikan ditemukan pada dosis 200 , sehingga dapat disimpulkan dosis merupakan dosis optimum

#### DISKUSI

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa isolat EGCG dengan dosis 200  $\mu\text{M}$  mampu menurunkan ekspresi C/EBP $\alpha$  yang berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol dan juga menurunkan kadar leptin pada medium kultur sel preadiposit, baik ekspresi C/EBP $\alpha$  dan kadar leptin menurun seiring dengan peningkatan dosis EGCG yang diberikan.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Lin *et al* bahwa isolat EGCG dengan dosis 200  $\mu\text{M}$  yang merupakan dosis yang mempunyai efek paling kuat, mampu menurunkan lipogenesis dan jumlah sel adiposit dan meningkatkan persentase total sel yang mengalami apoptosis serta menurunkan ukuran butiran lemak (11). C/EBP  $\alpha$  merupakan regulator utama adipogenesis dan ekspresi dari gen adipogenik (12). C/EBP  $\alpha$  merupakan suatu aktivator transkripsi dari gen leptin (7). Leptin dikenal sebagai hormon yang digunakan sebagai marker untuk obesitas (3), karena leptin merupakan faktor utama yang menentukan regulasi berat badan, metabolisme energi dan terjadinya obesitas serta kelainan yang menyertainya pada manusia (4).

Pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa isolat EGCG dengan dosis 50 $\mu\text{M}$  dan 100 $\mu\text{M}$  menghambat proliferasi sel preadiposit, dengan dosis 100  $\mu\text{M}$  mempunyai efek yang paling kuat, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ratnawati *et al* bahwa pada dosis EGCG 100 $\mu\text{M}$  mampu menurunkan mRNA PPAR $\gamma$ , SREBP-1, C/EBP $\alpha$  dan gen TNF $\alpha$  pada sel adiposa visceral manusia (8).

Mekanisme yang mendasari kerja EGCG dalam menghambat adipogenesis menurut Lin *et al* berkaitan dengan *Mitoge-Activated Protein (MAP) Kinase*, terutama *Extracellular Signal-Related Kinase (ERKs)* (10). Fosforilasi ERK  $\frac{1}{2}$  meningkatkan ekspresi CEBP $\alpha$  dan PPAR $\gamma$  yang keduanya merupakan mediator kunci dari adipogenesis pada kultur sel 3T3-L1, dan hambatan pada ERK  $\frac{1}{2}$  secara signifikan melemahkan ekspresi C/EBP $\alpha$  dan PPAR $\gamma$ . EGCG dapat menghambat fosforilasi dari ERK  $\frac{1}{2}$  dan AKT kinase pada kultur sel epidermis dan sel mast (13). EGCG terbukti mampu menurunkan fosfo-ERK1 dan fosfo-ERK2 pada kultur sel preadiposit 3T3-L1, sehingga EGCG diduga

bekerja menghambat ERK *signaling pathway* pada adiposit, yang menyebabkan terjadinya hambatan pada lipogenesis. Menurut Hui *et al* aktifitas EGCG pada sel preadiposit disebabkan oleh adanya reseptor EGCG pada sel preadiposit dan sel adiposit yaitu Laminin Reseptor (67LR), sehingga EGCG dapat menghambat fosforilasi ERK ½ melalui hambatan stimulasi insulin yang merupakan salah satu faktor adipogenik yang memicu proses diferensiasi adiposit.

Pada penelitian ini telah terbukti efek anti-obesitas dari isolat EGCG dari teh hijau klon GMB4 yang mampu menghambat proses adipogenesis dengan menurunkan ekspresi protein faktor transkripsi C/EBP $\alpha$  yang merupakan regulator utama adipogenesis dan mampu menurunkan kadar leptin yang merupakan faktor utama yang menentukan regulasi berat badan, metabolisme energi dan terjadinya obesitas pada dosis optimum 200

$\mu$ M. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis dan waktu inkubasi, baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dan variabel-variabel lain yang mendasari kerja dari EGCG yaitu reseptor 67LR dan jalur sinyaling yang berperan terutama ERK 1/2 serta pengaruh isolat EGCG terhadap teh hijau klon GMB4 protein faktor transkripsi dan adiponektin yang lain untuk melengkapi *pathway* dari EGCG dalam mempengaruhi proses adipogenesis dalam rangka menggali potensi isolat EGCG teh hijau klon GMB4 sebagai agen anti-obesitas.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat EGCG teh hijau klon GMB4 secara signifikan dapat menurunkan ekspresi protein faktor transkripsi C/EBP $\alpha$  pada kultur preadiposit viseral tikus pada konsentrasi 200 $\mu$ M. Isolat EGCG teh hijau klon GMB4 dapat menurunkan kadar protein leptin pada kultur preadiposit viseral tikus pada konsentrasi 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, dan 200  $\mu$ M.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan RI. *Laporan Hasil RISKESDAS Nasional*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2010.
2. Andrew M and Prentice. *The Emerging Epidemic of Obesity in Developing Countries*. International Journal of Epidemiology. 2006; 35: 93–99.
3. Yang R and Barouch LA. *Leptin Signaling and Obesity*. Circulation Research. 2004; 101: 545-559.
4. Livshits G, Pantsulaia I, and Gerber LM. *Association of Leptin Level With Obesity and Blood Pressure: Possible Common Genetic Variation*. International Journal of Obesity. 2005; 29(1): 85-92.
5. He Y, Chen H, Quon MJ, and Reitman M. *The Mouse Obese Gene: Genomic Organisation Promoter Activity and Activation By CEPB/ $\alpha$* . The Journal of Biological Chemistry. 1995; 9(19): 2350-2363.
6. Miller SG, de Vos P, Guerre-Millo M, *et al*. *The Adipocyte Specific Transcription Factor C/EBP $\alpha$  Modulates Human Ob Gene Expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996; 93(11): 5507-4411.
7. Krempler F, Breban D, Oberkofler H, *et al*. *Leptin Peroxidase Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  and CCAAT/Enhancer Binding Protein- $\alpha$  mRNA Expression in Adipose Tissue of Humans and Their Relation to Cardiovascular Risk Factors Arterioscler. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20: 443-449
8. Ratnawati R, Indra MR, and Satuman. *Green Tea Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis in the Primary Human Visceral Preadipocyte Culture*. Majalah Ilmu Faal Indonesia. 2007; 6(3): 160-164.
9. Mawarti H, Ratnawati R, dan Lyrawati D. *Epigallocatechin Gallate Menghambat Resistensi Insulin pada Tikus dengan Diet Tinggi Lemak*. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2012; 27(1): 43-50.
10. Indra MR. *Dasar Genetik Obesitas Visceral*. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2006; 22(1): 10-19.
11. Lin J, Della-Fera MA, and Baile CA. *Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induce Apoptosis in 3T3-L1 Adipocyte*. Obesity Research. 2005; 13(6): 982-990.
12. Musri MM, Gomis R, and Parrizas M. *Chromatin and Chromatin Modifying Proteins in Adipogenesis*. Biochemistry and Cell Biology. 2007; 85(4): 397-410.
13. Meydani M and Hasan ST. *Dietary Polyphenols and Obesity*. Nutrients. 2010; 2(7): 737-751.