

## Efek *Catechins* Teh Hijau terhadap Ekspresi ROR $\alpha$ dan C/EBP- $\alpha$ pada Kultur Primer Preadiposit

### *Effect of Green Tea Catechins on ROR $\alpha$ and C/EBP- $\alpha$ Expression on Preadipocyte Primary Culture*

Faridha Khaira H<sup>1</sup>, Retty Ratnawati<sup>2</sup>, Diana Lyrawati<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Biomedik Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

<sup>2</sup>Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

<sup>3</sup>Laboratorium Farmasi Klinis Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Malang

#### ABSTRAK

Obesitas merupakan faktor risiko terjadinya berbagai penyakit yang dapat menyebabkan kematian. Pada tingkat sel, obesitas dicirikan oleh penambahan ukuran dan jumlah sel adiposit diantaranya melalui proses adipogenesis. Teh hijau merupakan minuman yang dikonsumsi di seluruh dunia, yang memiliki banyak manfaat terhadap kesehatan terutama disebabkan oleh konsentrasi polifenol *catechins* yang memiliki efek anti-obesitas. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek isolat senyawa golongan *catechins* teh hijau pada regulator negatif maupun positif pada adipogenesis yaitu ROR- $\alpha$  dan C/EBP- $\alpha$ . Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* pada kultur primer preadiposit dengan 4 kelompok perlakuan: (1) kelompok kontrol, (2) dipapar dengan *catechins* 5  $\mu$ M, (3) dipapar dengan *catechins* 10  $\mu$ M dan kelompok (4) dipapar dengan *catechins* 30  $\mu$ M. Dua hari setelah sel mencapai *confluent*, sel diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi adiposit dengan IBMX, DEX dan insulin. Pada hari ke 3 diferensiasi, sel dipapar dengan *catechins* selama 24 jam, setelah itu sel dipanen dan ekspresi ROR- $\alpha$  dan C/EBP- $\alpha$  diperiksa menggunakan metode ELISA dan immunositokimia. Isolat senyawa golongan *catechins* teh hijau pada dosis 10 dan 30  $\mu$ M secara signifikan menurunkan ekspresi C/EBP- $\alpha$  masing-masing sebesar 20,24% dan 26,43%. Pemaparan isolat senyawa golongan *catechins* teh hijau tidak memiliki efek yang signifikan terhadap ekspresi ROR- $\alpha$  meskipun ekspresinya cenderung meningkat seiring dengan penambahan dosis. Dapat disimpulkan bahwa isolat senyawa golongan *catechins* teh hijau dapat menghambat adipogenesis melalui penurunan C/EBP- $\alpha$ .

**Kata Kunci:** Adipogenesis, *catechins*, C/EBP- $\alpha$ , ROR- $\alpha$

#### ABSTRACT

*Obesity is a major risk factor for most of chronic diseases with high mortality. Catechins, the active constituent of green tea has been regarded beneficial as an anti-obesity. This study was aimed to investigate the effect of catechins on the positive and negative regulators of lipogenesis and adipogenesis; ROR- $\alpha$  and C/EBP- $\alpha$ . This study was performed in primary cultured of preadipocyte divided into 4 treatment groups: (1) control, (2) catechins 5  $\mu$ M, (3) catechins 10  $\mu$ M and (4) with catechins 30  $\mu$ M. Two days post confluence, cell were induce to differentiate into adipocyte with IBMX, DEX and insulin. On days 3 of differentiation, cells were treated with catechins for 24 hour. Cells then harvested and measurement of ROR- $\alpha$  and C/EBP- $\alpha$  were performed using ELISA and immunocytochemistry. Result show that catechins significantly reduced the expression of C/EBP- $\alpha$  by 20,24% dan 26,43%. It was identified that found that ROR- $\alpha$  expression increased, but not reach statistical significance. These results suggested that catechins at least in part inhibit adipogenesis through C/EBP- $\alpha$ .*

**Keywords:** Adipogenesis, *catechins*, C/EBP- $\alpha$ , ROR- $\alpha$

---

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 27, No. 3, Februari 2013; Korespondensi: Faridha Khaira H. Program Studi Ilmu Biomedik Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Tel. (0341) 569117 Email: faridhakh@gmail.com

## PENDAHULUAN

Obesitas merupakan masalah yang perlu diperhatikan karena berkaitan dengan peningkatan morbiditas dan mortalitas berbagai penyakit, antara lain hipertensi, gangguan kardiovaskuler, diabetes, gangguan endokrin lainnya (1). Menurut data Riset Kesehatan Dasar (Riskesmas) tahun 2007, prevalensi nasional obesitas umum pada penduduk berusia kurang lebih 15 tahun adalah 19,1%, dengan prevalensi pada laki-laki 13,9%, sedangkan pada perempuan 23,8% serta prevalensi obesitas berdasarkan IMT (10,3%) (2).

Pada tingkatan sel, obesitas ditandai dengan peningkatan ukuran (hipertrofi) dan jumlah adiposit yang berdiferensiasi dari fibroblast preadiposit pada jaringan lemak (3). Selama proses diferensiasi faktor-faktor transkripsi seperti *peroxisome-proliferator-activated receptor* (PPAR)  $\gamma$ , dan *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBPs) terlibat dalam rangkaian transkripsional yang selanjutnya akan menentukan fenotip adiposit (4).

Salah satu anggota dari C/EBPs famili adalah C/EBP $\alpha$  yang merupakan regulator utama adipogenesis. Pada tikus yang mengalami defisiensi C/EBP- $\alpha$ , terjadi kegagalan untuk mengakumulasi lemak dalam adiposit. Oleh karena itu, C/EBP- $\alpha$  jelas sangat penting untuk perkembangan jaringan adiposa. C/EBP- $\alpha$  terutama diekspresikan di liver dan jaringan adiposa baik pada hewan maupun manusia (5).

Di samping C/EBP- $\alpha$  yang merupakan regulator positif dalam diferensiasi adiposit, terdapat juga beberapa regulator negatif, salah satunya yaitu ROR- $\alpha$  (*RAR-related orphan receptor  $\alpha$* ). ROR- $\alpha$  merupakan kelompok reseptor nuklear yang mempunyai peran penting dalam perkembangan jaringan maupun fungsi selular. Penelitian yang dilakukan oleh Duez *et al* menunjukkan bahwa over ekspresi ROR- $\alpha$  pada kultur preadiposit menyebabkan penurunan penanda-penanda adipogenik, dan akumulasi lemak serta penurunan asam lemak bebas (6). Selanjutnya ROR- $\alpha$  dilaporkan menghambat aktifitas transkripsional dari C/EBP- $\beta$  dan menghambat induksi PPAR- $\gamma$  serta C/EBP- $\alpha$  (7).

Diet terkait erat dengan perkembangan obesitas, akan tetapi beberapa komponen makanan maupun minuman tertentu dilaporkan dapat menurunkan resiko obesitas. Teh hijau merupakan salah satu minuman yang dikonsumsi di seluruh dunia, yang memiliki banyak manfaat terhadap kesehatan. Manfaat kesehatan teh hijau terutama disebabkan oleh konsentrasi polifenol, yang secara kolektif disebut dengan *catechins* yang diketahui memiliki efek anti-obesitas (8). Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung telah berhasil mengembangkan teknologi pengolahan teh klon GMB4 sehingga dapat menghasilkan isolat golongan senyawa *catechins*. Berdasarkan uraian di atas, penulis ingin menguji efek isolat golongan senyawa *catechins* teh hijau terhadap regulator positif dan negatif adipogenesis yaitu C/EBP- $\alpha$  dan ROR- $\alpha$ .

## METODE

Penelitian ini termasuk eksperimental laboratorik dengan desain penelitian menggunakan *Control Group Post Test Design* yang dilakukan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli s.d November 2011. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro*

pada kultur primer preadiposit dengan 4 kelompok perlakuan: (1) kelompok kontrol, (2) dipapar dengan katekin 5  $\mu$ M (3) dipapar dengan *catechins* 10  $\mu$ M dan kelompok (4) dipapar dengan *catechins* 30  $\mu$ M.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat bedah steril, cawan petri, freezer (-20°C), pH meter, LAF (*Laminar air flow*), *flask culture* (96 well), mikroskop *inverted* (Olympus), mikroskop *binokuler*, digital camera, inkubator CO<sub>2</sub>, *ependorf*, *syringe microfilter* 0,2  $\mu$ m, mikro pipet, tip (*yellow, blue dan white*), *falcon* 14 ml, spuit, *sentrifuge, water bath*, timbangan analitik, lampu spritus, *autoclave*, ELISA *reader, vortex tissue, object glass dan cover slip*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari isolat senyawa golongan *catechins* yang diperoleh dari hasil isolasi teh hijau klon GMB4 Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung, Bandung yang dilakukan di Laboratorium Kimia, FMIPA ITB, Bandung; *medium transport* yang terdiri dari HBSS, gentamicin, *nabic-phenol red*, dH<sub>2</sub>O), bahan kultur (medium dasar: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM)/Ham's F12 (Gibco, USA), *Nabic-phenol red* (Sigma, USA) 5,00 ml/100ml, *L-glutamin* (MP, USA) 0,9001 ml/100ml, pada pH 7,4), *Collagenase* (Gibco, USA), media kultur (medium dasar, dan 10% *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco, USA). Untuk diferensiasi sel, media adipogenik (DMEM/F12 dengan ditambahkan 10  $\mu$ g/ml insulin, 1  $\mu$ M *dexamethasone*, 0,5 mM IBMX dan 10% FBS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SA-HRP, alkohol 70%, *deionized water/ dH<sub>2</sub>O* (Otsuka Pharmaceutical Ltd., Jepang), *antimouse ROR- $\alpha$  antibody* (ABCAM, USA), *anti rat C/EBP- $\alpha$  antibody* (Sigma, USA). ELISA *separating Buffer*, SDS 1% dan *RIPA solution* (Cusabio, China). *Diamino Benzidine* (DAB, KPL, USA), *Mayer hematoxilen*, 0,25 % *Bovine serum albumin* (BSA) methanol 95%, *IgG anti mouse Biotin conjugated* (Sigma, USA).

### Isolasi Sel dan Kultur Sel

*Fibroblastic preadipocyte* diisolasi dari jaringan visceral menci yang berumur 5-6 minggu. Jaringan *fibroblastic preadipocyte* dicuci dengan PBS dan dicacah kemudian diinkubasi dalam DMEM yang mengandung *collagenase* 1 mg/ml pada 37°C selama 60 menit dengan *shaking water bath*. Setelah 60 menit sel disaring dengan microfilter 100  $\mu$ m. Suspensi sel selanjutnya diputar pada 1200 rpm selama 10 menit dan lapisan lemak pada supernatan dibuang. Pelet yang mengandung *fibroblastic preadipocyte* diresuspensi dalam DMEM dengan 10% FBS sebanyak 3 kali. Pelet kemudian ditumbuhkan pada *culture plate* selama 24 jam. Sel ditumbuhkan hingga mencapai *confluent* pada DMEM dengan 10% FBS. Sel dicuci setiap 2 hari sekali (7).

### Stimulasi Diferensiasi Adiposit

Dua hari setelah mencapai *confluent* (hari ke 0), sel preadiposit menci-ditumbuhkan dalam media adipogenik (DMEM dengan ditambahkan 10% *fetal bovine serum*, 1 M *dexamethasone*, 10  $\mu$ g/ml insulin, and 0,5 mM 3-methyl-1-isobutylxanthine (IBMX)) selama 2 hari. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam medium yang terdiri dari DMEM, 10% fetal bovine serum dan 10  $\mu$ g/ml insulin. Media diganti setiap 2 hari sekali.

### Perlakuan Isolat Senyawa Golongan Catechins Teh Hijau

Isolat senyawa golongan *catechins* merupakan hasil isolasi teh hijau klon GMB4 Lembaga Penelitian Teh dan Kina

Gambung, Bandung. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Furuyashiki *et al* durasi yang efektif dalam pemberian *catechins* selama diferensiasi adalah pada tahapan awal-pertengahan diferensiasi (hari ke 3-6), sehingga dalam penelitian ini *catechins* dengan dosis 5,10, dan 30  $\mu\text{M}$  diberikan pada hari ke tiga, masing-masing 3 replikasi. Setelah 24 jam inkubasi, ekspresi ROR- $\alpha$  dan ekspresi C/EBP- $\alpha$  diperiksa menggunakan metode ELISA dan immunositokimia (4).

#### Pengukuran Ekspresi ROR- $\alpha$ dan C/EBP- $\alpha$ dengan Metode ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)

Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  larutan sampel suspensi protein dari isolasi protein total sel preadiposit, dan blanko dimasukkan ke dalam *well* lalu diinkubasi *overnight* pada suhu 37°C. Selanjutnya sampel dicuci dengan PBS selama 3 kali (dilakukan setiap mengganti reagen) kemudian pada *well* di tambahkan antibodi primer; *anti mouse ROR- $\alpha$  antibody* dan *anti rat C/EBP- $\alpha$  antibody* dan diinkubasi selama 1 jam suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan antibodi sekunder yang telah dikonjugasi dengan biotin; *IgG anti rabbit biotin conjugated antibody* selama 1 jam dalam suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 1,5  $\mu\text{L}$  SA-HRP dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Pada tahap berikutnya ditambahkan TMB substrat lalu diinkubasi 10 hingga 30 menit dalam suhu 37°C lalu dakhiri dengan pemberian 50  $\mu\text{L}$  *stop solution* kemudian dibaca pada  $\lambda$  450 nm dengan ELISA reader.

#### Prosedur Pemeriksaan Ekspresi ROR- $\alpha$ dan C/EBP- $\alpha$ dengan Metode Immunositokimia.

Prosedur pemeriksaan immunositokimia dalam penelitian ini menggunakan prosedur standar pemeriksaan immunositokimia. Sel yang telah dipanen difiksasi dengan metanol selama 20 menit. Selanjutnya sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali (dilakukan setiap mengganti reagen) setelah itu ditambahkan H2O2 3% selama 20 menit dan *blocking serum* (BSA) selama 30 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan antibodi primer; *anti mouse ROR- $\alpha$  antibody* dan *anti rat C/EBP- $\alpha$  antibody* dan diinkubasi selama 1 jam suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan sekunder yang telah dikonjugasi dengan biotin; *IgG anti rabbit biotin conjugated antibody* selama 1 jam dalam suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan 1,5  $\mu\text{L}$  SA-HRP dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah itu dilakukan pewarnaan dengan DAB selama 20 menit, kemudian dicuci dengan *aquadest* dan selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan *meyer hematoxilen*. Setelah dicuci sel kemudian di *mounting* dengan entelan dan diamati di bawah mikroskop.

#### Penyajian dan Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam *mean* $\pm$ SEM. Kuantifikasi gambar dianalisis menggunakan *software* ImageJ versi 14.5 dan Adobe Phothoshop CS3. Kemudian semua data dianalisis dengan menggunakan statistik parametrik dengan SPSS versi 17, yaitu *One Way ANOVA* setelah memenuhi persyaratan distribusi data yang normal dan varians data yang sama.

## HASIL

### *Ekspresi ROR $\alpha$ pada sel Preadiposit yang Berdiferensiasi dan Dipapar dengan Isolat Senyawa Golongan Catechins The Hijau*

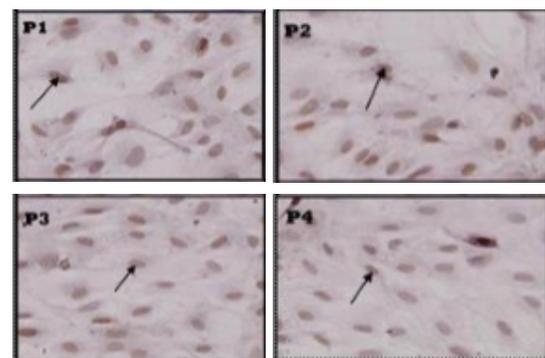
ROR- $\alpha$  merupakan salah satu reseptor nuklear yang

berperan dalam adipogenesis. Dalam penelitian ini, ekspresi ROR- $\alpha$  pada sel preadiposit yang berdiferensiasi dan dipapar dengan isolat senyawa golongan *catechins* dosis 10  $\mu\text{M}$  lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Demikian juga pada sel preadiposit yang berdiferensiasi dan dipapar dengan isolat senyawa golongan *catechins* dosis 30  $\mu\text{M}$ , ekspresi ROR $\alpha$  lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol namun peningkatan ekspresi tersebut tidak signifikan. Berdasarkan uji *One Way ANOVA* yang dilakukan ekspresi ROR $\alpha$  pada kelompok perlakuan 10  $\mu\text{M}$ , tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p=0,997$ ). Demikian juga pada kelompok perlakuan isolat senyawa golongan *catechins* dosis 30  $\mu\text{M}$ , tidak berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p=0,986$ ).

Tabel 1. Uji *One Way ANOVA* ekspresi ROR- $\alpha$  (ng/mL)

Perlakuan	Ulangan	Mean $\pm$ SEM*
Kontrol	3	208,22 $\pm$ 18,58 (a)
<i>Catechins</i> 5 $\mu\text{M}$	3	194,00 $\pm$ 9,50 (a)
<i>Catechins</i> 10 $\mu\text{M}$	3	213,33 $\pm$ 26,21 (a)
<i>Catechins</i> 30 $\mu\text{M}$	3	216,33 $\pm$ 5,84 (a)

Keterangan: \*notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan



Gambar 1. Ekspresi ROR- $\alpha$  pada sel preadiposit yang berdiferensiasi setelah dipapar dengan isolat senyawa golongan katekin teh hijau selama 24 jam.

Keterangan: Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi ROR- $\alpha$  yang positif (berwarna coklat) pada perbesaran 400 x. (P1) kelompok kontrol, (P2) dipapar dengan katekin 5  $\mu\text{M}$ , (P3) dipapar dengan katekin 10  $\mu\text{M}$  dan kelompok (P4) dipapar dengan katekin 30  $\mu\text{M}$

Dari Gambar 1 dapat dilihat ekspresi ROR- $\alpha$  pada perlakuan isolat senyawa golongan *catechins* dosis 10  $\mu\text{M}$  (P3) cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Demikian juga pada kelompok perlakuan isolat senyawa golongan *catechins* dosis 30  $\mu\text{M}$  (P4), ekspresi ROR- $\alpha$  cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dengan menggunakan DAB (*diamino benzidine*) sel preadiposit yang positif mengekspresikan ROR- $\alpha$  akan berwarna coklat.

### *Ekspresi C/EBP $\alpha$ pada Sel Pre Adiposit yang Berdiferensiasi dan Dipapar dengan Isolat Senyawa Golongan Catechins Teh Hijau.*

Ekspresi C/EBP- $\alpha$  pada kelompok perlakuan P3 (335,00

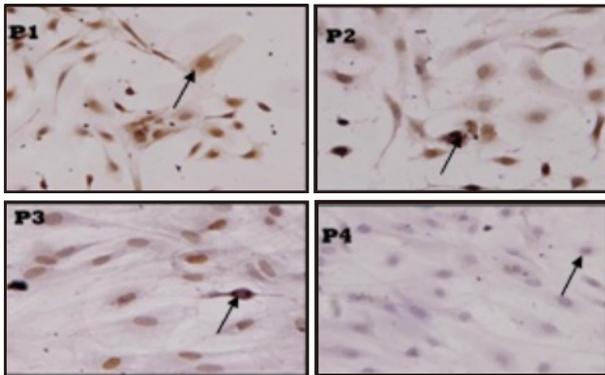
$\pm 21,17$ ) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $420,33 \pm 17,13$ ), demikian juga dengan kelompok perlakuan P4. Ekspresi C/EBP $\alpha$  yang paling rendah terdapat pada kelompok perlakuan P4 ( $309,67 \pm 7,86$ ). Dari hasil uji *OneWay* ANOVA didapatkan bahwa penurunan ekspresi C/EBP- $\alpha$  pada dosis 10  $\mu$ M (P3) berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p=0,012$ ). Demikian juga pada kelompok perlakuan dengan dosis 30  $\mu$ M (P4), ekspresi C/EBP- $\alpha$  mengalami penurunan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p=0,003$ ). Penurunan ekspresi tersebut masing-masing sebesar 20,24% dan 26,43%.

Tabel 2 Uji *One Way* ANOVA ekspresi C/EBP $\alpha$  (ng/mL)

Perlakuan	Ulangan	Mean $\pm$ SEM*
Kontrol	3	420,33 $\pm$ 17,13 (b)
<i>Catechins</i> 5 $\mu$ M	3	446,33 $\pm$ 2,40 (b)
<i>Catechins</i> 10 $\mu$ M	3	335,00 $\pm$ 21,17 (b)
<i>Catechins</i> 30 $\mu$ M	3	309,67 $\pm$ 7,86 (b)

Keterangan: \*notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

Dari Gambar 2 dapat dilihat ekspresi C/EBP $\alpha$  pada perlakuan isolat senyawa golongan *catechins* dosis 10  $\mu$ M (P3) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Demikian juga pada kelompok perlakuan isolat senyawa golongan *catechins* dosis 30  $\mu$ M (P4), ekspresi C/EBP $\alpha$  lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dengan menggunakan DAB (*diamino benzidine*) sel preadiposit yang positif mengekspresikan C/EBP $\alpha$  akan berwarna coklat.



Gambar 2. Ekspresi C/EBP- $\alpha$  pada sel preadiposit yang berdiferensiasi setelah dipapar dengan isolat senyawa golongan *catechins* teh hijau selama 24 jam

Keterangan: Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi C/EBP- $\alpha$  yang positif (berwarna coklat) pada perbesaran 400 x. (P1) kelompok kontrol, (P2) dipapar dengan katekin 5  $\mu$ M, (P3) dipapar dengan katekin 10  $\mu$ M dan kelompok (P4) dipapar dengan katekin 30  $\mu$ M

## DISKUSI

Adipogenesis merupakan proses dimana preadiposit berdiferensiasi menjadi adiposit. Proses ini diregulasi oleh serangkaian faktor-faktor transkripsi yang saling

berinteraksi satu sama lain untuk mengatur ekspresi dari gen-gen adipogenik. C/EBP- $\alpha$  merupakan salah satu faktor transkripsi yang memicu terjadinya diferensiasi sementara ROR- $\alpha$  dalam beberapa penelitian diketahui menghambat diferensiasi dari preadiposit menjadi adiposit. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Ohoka *et al* menggunakan kultur sel 3T3-L1 mencit, dikatakan bahwa ekspresi ROR- $\alpha$  diinduksi selama proses adipogenesis (7). Duez *et al* dalam penelitiannya menunjukkan bahwa over ekspresi ROR- $\alpha$  pada kultur preadiposit menyebabkan penurunan penanda adipogenik, dan akumulasi lemak serta penurunan asam lemak bebas (6). Dalam penelitian ini ditemukan bahwa isolat senyawa golongan *catechins* dosis 10  $\mu$ M (P3) dan 30  $\mu$ M (P4) meningkatkan ekspresi ROR- $\alpha$  masing-masing sebesar 2,40% dan 3,85% tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dalam hal ini, isolat senyawa golongan *catechins* kemungkinan tidak mempengaruhi ekspresi dari ROR- $\alpha$ , akan tetapi mempengaruhi aktifitasnya. Analog dengan penelitian yang dilakukan oleh Ohoka *et al* yang mengemukakan bahwa ROR- $\alpha$  menghambat adipogenesis dengan menghambat aktifitas C/EBP- $\beta$  tanpa mempengaruhi ekspresinya (7). Selain itu terdapat kemungkinan bahwa *catechins* maupun ROR- $\alpha$  bekerja secara sinergis dalam menghambat adipogenesis melalui mekanisme yang berbeda (8).

Kemungkinan lain yang mungkin bisa menjelaskan hal ini adalah terkait dengan jalur ERK1/2. Secara *in vitro* ERK-2 merupakan protein kinase yang memfosforilasi ROR- $\alpha$ , aktifitasnya diduga tergantung pada status fosforilasi ERK1/2 (9). Dalam beberapa penelitian, terdapat hasil yang bertentangan mengenai efek *catechins* yang terkait dengan fosforilasi ERK1/2. Hung *et al* dalam penelitiannya mengatakan bahwa EGCG pada konsentrasi 50  $\mu$ M dapat meningkatkan fosforilasi ERK1/2 pada 3T3-L1 preadiposit (10). Sementara Mehra mengemukakan bahwa EGCG dapat meningkatkan fosforilasi pada sel adiposit yang telah 90% terdiferensiasi (11). Selain itu, efek *epicatechin* pada fosforilasi ERK1/2 pada kortikol neuron juga telah diteliti (12). Perlakuan selama 15 menit dengan dosis *epicatechin* 100-300  $\mu$ M dapat menstimulasi fosforilasi ERK1/2. Akan tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi, menyebabkan fosforilasi ERK1/2 yang lebih rendah, kembali menuju tingkat basal pada konsentrasi lebih dari 1  $\mu$ M.

Mekanisme kerja dari *flavonoid* dalam kaitannya dengan fosforilasi ERK1/2 belum diketahui secara pasti. 67 kDa laminin reseptor kemungkinan berperan dalam hal ini karena laminin reseptor diduga merupakan reseptor EGCG dan telah ditemukan pada sel kanker (13). Terdapat bukti lain yang menyebutkan bahwa jalur sinyaling 67 kDa laminin reseptor melibatkan jalur ERK1/2. Laminin telah diidentifikasi pada adiposit meski demikian belum terdapat bukti adanya reseptor laminin pada adiposit (14).

Waktu pemberian *catechins* dan lama inkubasi juga memiliki pengaruh yang penting. Mehra dalam penelitiannya mengatakan bahwa fosforilasi ERK1/2 dapat diamati 30 menit setelah perlakuan, 6 jam diyakini merupakan waktu yang cukup untuk dapat mengamati ekspresi gen dan 24 jam akan menunjukkan apakah perubahan yang terjadi bersifat jangka panjang (11). Furuyashiki *et al*, menyebutkan bahwa *catechin gallate* mempengaruhi sinyaling diferensiasi adiposit selama tahap awal hingga pertengahan diferensiasi (hari ke 0-6) (4).

Konsentrasi *flavonoid* yang digunakan dalam penelitian *in vitro* sangat penting, karena beberapa *flavonoid* pada konsentrasi rendah dapat memiliki efek yang berlawanan dengan efek yang timbul pada konsentrasi tinggi. EGCG dan *epicatechin* mempunyai konsentrasi optimal yang berbeda. Terdapat 100 kali lipat perbedaan pada konsentrasi optimal untuk menimbulkan efek peningkatan yang sama dan signifikan. *Catechin gallate*, terutama EGCG diketahui lebih aktif dibandingkan dengan *catechins* lainnya (10). Hal ini kemungkinan disebabkan EGCG mengandung *hydroxyl groups* yang paling banyak di antara *catechins* teh lainnya. Selain itu, EGCG juga mempunyai *gallyl* sekaligus *galloyl groups* (Mehra, 2010). Dalam penelitian ini, digunakan isolat golongan senyawa *catechins* yang terdiri dari (-)-*epigallocatechin-3-gallate* (EGCG), (-)-*epigallocatechin* (EGC), (-)-*epicatechin-3-gallate* (ECG), dan (-)-*epicatechin*. Sehingga kemungkinan konsentrasi optimalnya berbeda dengan konsentrasi optimal masing-masing *catechins*.

Dalam penelitian ini ditemukan bahwa *catechins* mampu menurunkan ekspresi C/EBP- $\alpha$ , dan hal ini tergantung pada dosis yang digunakan. *Catechins* pada dosis 10  $\mu$ M (P3) dan 30  $\mu$ M (P4) secara signifikan menurunkan ekspresi C/EBP- $\alpha$  masing-masing sebesar 20,24% dan 26,43%. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Furuyashiki *et al* yang menyatakan bahwa *catechins* dosis 10  $\mu$ M dan 30  $\mu$ M menekan diferensiasi adiposit pada tahap awal menuju tahap pertengahan dan hal ini melibatkan down-regulasi PPAR- $\gamma$  dan C/EBP- $\alpha$  (4). Studi ini menunjukkan bahwa *catechins* dapat mencegah obesitas melalui supresi diferensiasi adiposit tanpa menimbulkan risiko yang fatal seperti sitotoksitas dan penurunan sensitifitas insulin. Selain itu Chien *et al* melaporkan bahwa *catechin*, *quercetin* dan kaempferol dapat menurunkan ekspresi C/EBP- $\alpha$  pada dosis 100  $\mu$ M masing-masing sebesar 31,5%, 31,5% dan 23,8% (15).

Penurunan ekspresi C/EBP- $\alpha$  diduga terjadi melalui penurunan ekspresi maupun aktifitas C/EBP- $\beta$  maupun C/EBP- $\delta$ . Mengingat bahwa *catechins* dapat mempengaruhi status fosforilasi ERK1/2 dan C/EBP- $\beta$

difosforilasi oleh ERK1/2 selama adipogenesis berlangsung (16). Selain itu, penurunan ekspresi C/EBP- $\alpha$  kemungkinan dapat terjadi melalui penurunan SREBP-1. Pada penelitian yang dilakukan oleh Chien *et al* diketahui bahwa *catechin*, *quercetin* dan kaempferol pada dosis 100  $\mu$ M mampu menurunkan akumulasi lipid dan kandungan trigliserida, penurunan ekspresi mRNA PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$  dan SREBP-1 (15). Hasil ini menunjukkan bahwa *catechin*, *quercetin* dan kaempferol menekan diferensiasi sel 3T3-L1 dengan menghambat ekspresi SREBP-1. SREBP-1 dapat meregulasi ekspresi PPAR- $\gamma$  dan secara langsung mengaktifasi transkripsi PPAR- $\gamma$ . PPAR- $\gamma$  juga dapat mengaktifasi C/EBP- $\alpha$  (17,18).

Meskipun mekanisme molekuler yang mengontrol adipogenesis belum sepenuhnya dimengerti, setidaknya ada dua hal yang dominan. Pertama agar diferensiasi adiposit bisa terjadi, beberapa rangkaian peristiwa harus terjadi secara berurutan, temporal dan terkoordinasi, dimulai dengan stimulasi hormonal, terjadi melalui aktivasi gen C/EBP- $\beta$  dan C/EBP- $\delta$  kemudian dilanjutkan dengan aktivasi C/EBP $\alpha$  dan PPAR- $\gamma$  yang nantinya akan mengaktifasi dan meregulasi gen-gen yang diperlukan untuk fungsi dan fenotip sel-sel lemak. Kedua semua jalur mengarah pada C/EBP- $\alpha$  dan PPAR- $\gamma$ . Meskipun banyak peristiwa lain yang mendukung terjadinya diferensiasi, pada akhirnya secara langsung maupun tidak akan berujung pada satu titik yaitu mempengaruhi ekspresi C/EBP- $\alpha$  dan PPAR- $\gamma$  (19).

Inhibisi diferensiasi adiposit berhubungan dengan pencegahan obesitas. Dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa isolat senyawa golongan *catechins* teh hijau dosis 10  $\mu$ M dan 30  $\mu$ M secara signifikan dapat menghambat adipogenesis melalui penurunan ekspresi C/EBP- $\alpha$ . Isolat senyawa golongan *catechins* teh hijau dosis 10  $\mu$ M dan 30  $\mu$ M juga cenderung meningkatkan ekspresi ROR- $\alpha$  meskipun tidak secara signifikan. Penelitian selanjutnya perlu dilakukan untuk mengetahui apakah dosis yang lebih tinggi dapat lebih meningkatkan ekspresi maupun aktifitas dari ROR- $\alpha$

## DAFTAR PUSTAKA

1. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, and Gail MH. *Excess Deaths Associated with Underweight, Overweight, and Obesity*. The Journal of the American Medical Association. 2005; 293: 1861–1867.
2. Departemen Kesehatan RI. *Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar 2007*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2008.
3. Musri MM, Gomis R, and Párrizas M. *Chromatin and Chromatin Modifying Proteins in Adipogenesis*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2007; 85(4): 397-410.
4. Furuyashiki T, Nagayashu H, Aoki Y, *et al*. *Tea Catechin Suppress Adipocyte Differentiation Accompanied by Down-regulation of PPAR  $\gamma$  and C/EBP in 3T3-L1 Cell*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 2004; 68: 2353-2359.
5. Olofsson LE, Melander MO, Olsson LW, *et al*. *CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) in Adipose Tissue Regulates Genes in Lipid and Glucose Metabolism and a Genetic Variation in C/EBP- $\alpha$  is Associated with Serum Levels of Triglycerides*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2008; 93(12): 4880-4886.
6. Duez H, Duhem C, Laitinen S, *et al*. *Inhibition of Adipocyte Differentiation by ROR- $\alpha$* . Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters. 2009; 583(12):2031-2036.
7. Ohoka N, Kato S, Takahashi Y, Hayashi H, and Sato R. *The Orphan Nuclear Receptor ROR- $\alpha$  Restrains Adipocyte Differentiation through a Reduction of C/EBP- $\beta$  Activity and Perilipin Gene Expression*. Journal of Molecular Endocrinology. 2009; 23: 759-771.
8. Cabrera C, Artacho R, and Gimenez R. *Beneficial Effects of Green Tea-A Review*. Journal of the American College of Nutrition. 2006; 25(2): 79-99.
9. Lechtken A, Hörnig M, Werz O, *et al*. *Extracellular Signal-Regulated Kinase-2 Phosphorylates ROR- $\alpha$  In*

- Vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007; 358(3): 890-896.
10. Hung PF, Wu BT, Chen HC, *et al.* *Antimitogenic Effect of Green Tea (-)-Epigallocatechin Gallate on 3T3-L1 Preadipocytes Depends on the ERK and Cdk2 Pathways*. American Journal of Physiology Cell Physiology. 2005; (5): 1094-1108.
  11. Mehra A. *The Effects of Green Tea Derived Catechins Upon Adipocyte Metabolism*. [Thesis]. The University of Nottingham, Nottingham. 2010.
  12. Schroeter H, Bahia P, Spencer JP, *et al.* *(-)-Epicatechin Stimulates ERK Dependent Cyclic AMP Response Element Activity and Up-Regulates GluR2 in Cortical Neurons*. Journal of Neurochemistry. 2007; 101(6): 1596-1606.
  13. Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, and Yamada K. *A Receptor for Green Tea Polyphenol EGCG*. Nature Structural and Molecular Biology. 2004; 11(4): 380-381.
  14. Niimi T, Kumagai C, Okano M, and Kitagawa Y. *Differentiation-dependent Expression of Laminin-8 ( $\alpha 4 \ 1\gamma 1$ ) mRNAs in Mouse 3T3-L1 Adipocytes*. Matrix Biology. 1997; 16(4): 223-230.
  15. Chien PJ, Chen YC, Lu SC, and Sheu F. *Dietary Flafonoids Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes*. Journal of Food and Drug Analysis. 2005; 13: 168-175.
  16. Park BH, Qiang L, and Farmer SR. *Phosphorylation of C/EBPbeta at a Consensus Extracellular Signal-Regulated Kinase/Glycogen Synthase Kinase 3 Site is Required for the Induction of Adiponectin Gene Expression During the Differentiation of Mouse Fibroblasts into Adipocytes*. Molecular and Cellular Biology. 2004; 24(19): 8671-8680.
  17. Kim JB, Wright HM, Wright M, and Spiegelman BM. *ADD1/SREBP1 Activates PPARgamma through the Production of Endogenous Ligand*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95(8): 4333-4337.
  18. Fajas L, Fruchart C, and Auwerx J. *Transcriptional Control of Adipogenesis*. Current Opinion in Cell Biology. 1998. 10(2): 165-173.
  19. Cowherd RM, Lyle RE, and McGehee RE Jr. *Molecular Regulation of Adipocyte Differentiation*. Seminars in Cell and Developmental Biology. 1999; 10(1): 3-10.