

THEAFLAVIN MENGHAMBAT DIFERENSIASI PREADIPOSIT VISERAL MANUSIA MELALUI PPAR γ SECARA *IN VITRO*

THEAFLAVIN INHIBITS OF VISCERAL PREADIPOCYTE ON HUMAN THROUGH PPAR γ *IN VITRO*

Rasjad Indra

Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

Differentiation of pre-adipocytes into adipocytes, is a complex process that involves coordination of expression of specific genes and proteins associated with each stage of differentiation. This process is regulated by several signaling pathways. CCAAT element-binding proteins (C/EBP) α and β and sterol response element-binding protein 1 (ADD1/SREBP1) are active during the early stages of the differentiation process and induce the expression and/or activity of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), a pivotal coordinator of adipocyte differentiation. Recently, many biological effects of black tea have been reported and these effects may be partially related to its antioxidant properties. The recent study showed that black tea flavonoids inhibited adipocyte differentiation. The aim of this study was to investigate the role of theaflavin, a flavonoids in black tea, in inhibiting adipocyte differentiation through inhibition of PPAR γ expression. Preadipocytes were incubated in media containing standard-differentiated stimulator: Insulin, dexamethasone, IBMX and FBS. After 24 hours, preadipocytes culture media was added with theaflavin 50, 100, or 200 μ M. The cells were harvested after TF incubation for 24 hours and then the expression of PPAR γ was identified by immunocytochemistry and Western blot. The number of differentiation of preadipocyte decreased after incubation with TF for 24 hours. Cell differentiation significantly decreased following incubation with TF100 μ M (24.08 \pm 16.09) and TF200 μ M (28.05 \pm 6.24) compared to the control (65.84 \pm 16.92) and TF50 μ M (64.93 \pm 10.46) treatments. The number of undifferentiated cells increased significantly in groups treated with TF 100 μ M (75.92 \pm 10.46) and TF200 μ M (71.95 \pm 6.24) (p <0.05). The results of immunocytochemistry and Western blot showed that PPAR γ expression decrease in TF200 μ M treatment. Theaflavin polyphenol of black tea could decrease preadipocyte differentiation which may be through the inhibition of PPAR γ expression.

Key words: theaflavin, differentiation, PPAR γ , preadipocyte

PENDAHULUAN

Obesitas sangat berkaitan dengan prevalensi diabetes dan penyakit kardiovaskuler. Survei nasional yang dilakukan pada tahun 1996/1997 di ibukota seluruh propinsi Indonesia menunjukkan bahwa 8,1 % penduduk laki-laki dewasa (> 18 tahun) mengalami *overweight* (BMI 25-27), dan 6,8 % mengalami obesitas, 10,5 % penduduk wanita dewasa mengalami *overweight* dan 13,5 % mengalami obesitas (1). Obesitas tidak hanya disebabkan oleh hipertropi tetapi juga hiperplasi jaringan adipose. Hal ini berkaitan dengan mekanisme adipogenesis atau diferensiasi dari preadiposit menjadi adiposit (2).

Sel preadipose dapat diinduksi untuk berdiferensiasi dengan cara memberikan perlakuan kombinasi induser seperti insulin, *Dexamethasone* (DEX), *3-Isobutyl Metyl*

Xanthine (IBMX), dan *Fetal bovine serum* (FBS) (3). Induser ini mengaktifkan jalur sinyal transduksi yang melibatkan reaksi saling silang antara beberapa jalur. Paling sedikit ada tiga jalur yang berperan dalam diferensiasi seperti *cAMP-dependent protein kinase*, *glucocorticoid*, dan *insulin-like growth factor-1/insulin signaling pathway* (4).

Ada beberapa faktor transkripsi yang berperan dalam mekanisme diferensiasi adiposit. *CCAAT enhancer binding protein* (C/EBP) β dan δ dan *Adipocyte determined Differentiation / Skrol Regulated Enhancer Binding Protein 1* (ADD/SREBP1) adalah protein yang aktif selama awal proses diferensiasi dan menginduksi ekspresi dan atau aktivitas *Peroxisome Proliferator Activated Reseptor γ* PPAR γ . Saat ini dikenal 3 (tiga) macam isoform PPAR, yaitu PPAR α , PPAR γ , dan PPAR δ . PPAR γ terutama diekspresikan di jaringan adipose putih dan coklat. PPAR γ pada mulanya diidentifikasi sebagai faktor yang berkaitan pada *fat-spesific enhancer* dari gen *aP2* yang menyandi *adipose-spesific fatty acid binding protein*. Ekspresi PPAR γ ternyata mampu menginduksi diferensiasi sel-sel fibroblas

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIII, No. 1, April 2007
Korespondensi Rasjad Indra; Laboratorium Ilmu Faal FK Unibraw; Jl. Veteran Malang; Telp. 0341-560491 Ext. 115; E-mail : rasjad@fk.unibraw.ac.id

menjadi adiposit. Secara *in vivo* pada rodent, aktivasi spesifik PPAR γ menginduksi diferensiasi preadiposit menjadi adiposit. Aktivasi PPAR γ pada kultur preadiposit manusia juga dapat menginduksi diferensiasi (5).

Teh merupakan minuman populer yang dikonsumsi di seluruh dunia terutama di Indonesia. Menurut proses fermentasi, teh terdiri atas teh hijau, oolong, dan hitam. Masing-masing teh mempunyai senyawa bioaktif yang diketahui sebagai antioksidan, salah satu molekul antioksidan. Pada penelitian ini menguji theaflavin (TF), yaitu golongan flavonoid yang terdapat dalam teh hitam. Theaflavin mempunyai beberapa isomer seperti theaflavin, theaflavin 3-gallate, theaflavin 3'-gallate, dan theaflavin 3,3'-gallate. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa theaflavin berpotensi menghambat karsinogenesis. Mao Ji, *et al* (2004) melaporkan bahwa polifenol teh hitam mampu menghambat sinyal yang diinduksi IGF-1 melalui Akt pada sel epitel normal dan karsinoma (6). Samad (2004) melaporkan bahwa ekstrak teh hitam mampu menghambat proliferasi dan diferensiasi pada adiposit (7). Penelitian tentang pengaruh theaflavin terhadap proliferasi diferensiasi dengan mengamati faktor diferensiasi (PPAR γ) pada kultur preadiposit belum dilakukan. Hipotesis pada penelitian ini adalah TF mampu menurunkan jumlah sel total, diferensiasi preadiposit dan menghambat aktivasi PPAR γ pada kultur preadiposit.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui peranan TF terhadap penurunan jumlah sel total, diferensiasinya melalui penghambatan aktivasi PPAR γ pada kultur preadiposit yang diinduksi dengan induser standar.

METODE

Bahan kultur (medium dasar: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F12 (50:50, v:v), 15 mM HEPES, 15 mM NaHCO₃, 33 μ M biotin, 17 μ M D-pantothenate pada pH 7,4), Collagenase tipe I, media kultur (medium dasar, 100 μ g/mL Penstrep, dan 10 % fetal bovine serum (FBS), media adipogenik (medium dasar, 10 μ g/mL human transferrin, 100 μ g/mL Penstrep, 66 nM human insulin, 0,5 mM IBMX, dan 1 μ g/mL DEX. *Theaflavin from black tea extract* (Sigma), formalin 10 % (v/v), PBS steril, water infusion (Otsuka), Tris Buffer Saline (TBS), Skim, Buffer transport, nitrocellulose, antibodi primer anti human anti PPAR γ (SantaCruz, Singapura), antibodi sekunder IgG, diamino-benzadine (DAB), H₂O₂, Hematoxyline-Eosin, glycine, Ethanol 70 %, Western blue, protein marker, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), leupeptine, aprotinin, sodium deodocyle (SDS), acrylamide, Tris-HCl, Tris-Base, Temed, methanol, *brilliant blue*, dan asam asetat glasial.

Isolasi Sel dan Kultur Sel

Preadiposit diisolasi dari jaringan visceral manusia dewasa (umur: 25-52 tahun) di Instalasi Bedah Sentral Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Jaringan fibrous dan

pembuluh darah dibuang, jaringan adiposa dicuci kemudian dicacah. Suspensi jaringan diinkubasi dengan 0,2 % mg/ml Collagenase tipe I (Sigma) selama 45 menit pada suhu 37°C dengan *shaking*. Inkubasi dihentikan dengan menambahkan media kultur (DMEM/F12 (1:1) yang ditambah dengan 15 mmol/l HEPES, 14 mmol/l NaHCO₃, 33 μ mol/l biotin, 17 μ mol/l D-pantothenate, dan 10 % FBS). Setelah filtrasi dengan *nylon mesh* (250 μ m), suspensi sel diputar 1500 rpm selama 7 menit, dan lapisan lemak (*mature adipocyte* dan droplet lemak) pada supernatan dibuang. Pelet yang mengandung *fibroblast-like preadipocyte* diresuspensi dengan media kultur kemudian sel diputar 1500 rpm selama 7 menit. Pelet diresuspensi lagi dengan media kultur (8).

Stimulasi diferensiasi adiposit

Setelah hari kedua preadiposit manusia ditumbuhkan dalam media adipogenik (DMEM/F12 dengan ditambahkan 100 U/ml Penisilin dan 100 U/ml Streptomisin, 66 nM insulin, 100 nM dexamethasone, 0,5 mM IBMX, dan 10 μ g/ml transferin) untuk diferensiasi sel. Suspensi sel ditumbuhkan pada *culture plate* dengan inkubasi pada suhu 37°C, 5 % CO₂ selama 24 jam. Sel dicuci setiap 3 hari sekali (8).

Perlakuan Theaflavin dalam Ekstrak Teh Hitam (Sigma)

Setelah preadiposit mencapai monolayer maka ekstrak teh (Sigma) dipaparkan dengan beberapa dosis, yaitu 0, 50, 100, dan 200 μ M dalam media adipogenik. Sel diinkubasi selama 24 jam kemudian sel dipanen setelah hari kedua perlakuan (9).

Pengujian Diferensiasi sel dengan pengamatan Akumulasi Lipid

Metode pengecatan Oil Red O merujuk pada Johnson and Greenwood (10). Sel pada masing-masing perlakuan difiksasi dengan 10 % formalin. Sel yang ada di *well* dicuci dengan akuades kemudian dikeringkan. Sel ditetesi dengan propylene glycol 2 kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan Oil Red O selama 7 menit kemudian diagitasi. Jaringan diberi 85 % propylene glycol selama 3 menit. Sel dicuci dengan akuades kemudian ditetesi hematoksilen selama 1 menit. Sel dicuci dengan air dan ditunggu sampai kering. Sel diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400 X (11).

Isolasi protein sel kultur adiposit

Metode isolasi protein ini merujuk dari Karsten *et al.*, (2005) (11). Metode ini digunakan untuk mendapatkan protein dari sel kultur. Sel dipanen dengan melarutkan sel dalam buffer A (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 μ M DTT, 1 μ M PMSF, 10 μ g/mL leupeptin, dan 2,5 μ g/mL aprotinin). Sel diaspirasi selama 20 menit agar sel tersebut terlepas dari dasar plate kultur. Suspensi sel diputar 1000 x g selama 5 menit. Pelet dicuci dengan buffer A selama 2 kali. Supernatan diputar 10000 x g selama 30

menit suhu 4° C. Pelet diresuspensi dengan buffer B (20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 10 % glycerol, 1 mM EDTA, 1 µM DTT, 1 µM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, dan 2,5 µg/mL aprotinin) kemudian suspensi sel dicampur dengan menggunakan vorteks. Suspensi diputar 7000 x g selama 10 menit dan supernatan disimpan dalam -20°C. Fraksinasi sel dipreparasi pada gel SDS-PAGE untuk analisis lanjutan.

Identifikasi PPAR γ dengan Imunositokimia

Kultur sel adiposa masing-masing perlakuan difiksasi dengan formalin 10 % (v/v) dalam PBS pH 7,4 selama 20 menit. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan 0,02 % (w/v) sodium azide. Jaringan dapat disimpan dalam lemari pendingin untuk beberapa hari. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali selama 5 menit. Jaringan ditetesi dengan larutan H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit. Sel ditetesi dengan *blocking serum* 5 % FBS yang mengandung Triton-X 0,25 % selama 1 jam. Sel dicuci dengan PBS. Inkubasi antibodi anti IGF-1, PPAR- γ , dan LPL dalam serum 1 : 500 selama 24 jam. Jaringan disimpan pada suhu 4 °C. Jaringan dikeluarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Jaringan dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit. Sel diinkubasi dengan antibodi sekunder anti rabbit 1 : 500 selama 1 jam pada suhu ruang. Jaringan dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan SA-HRP selama 40 menit kemudian dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan Diamono Benzidine (DAB) dalam buffer DAB. Sel ditetesi dengan courstexin dengan Mayer hematoksilen selama 10 menit. Jaringan dicuci dengan air kran kemudian dicuci dengan akuades selama 10 menit. Jaringan dibiarkan pada suhu kamar. Jaringan diletakkan pada *object glass* dan ditetesi dengan entellan (12).

Deteksi protein PPAR γ dengan Western blot

Kultur sel masing-masing perlakuan yang sudah mencapai monolayer disuspensi dengan buffer yang mengandung 20mM TrisHCl, 1mM EDTA, dan 0,1 mM PMSF. Suspensi sel diputar 12.000 rpm selama 5 menit, 4°C kemudian diputar lagi 15.000 rpm, 1 jam, 4°C Sampel diseparasi dengan 15 % gel SDS-PAGE. Gel hasil elektroforesis dicuci dengan aquades dan direndam dalam buffer blotting. Membran NC (nitroselulose) dipotong, selanjutnya dibasahi dengan PBS selama 10 menit pada suhu kamar. Membran direndam dalam buffer blotting sebelum dilakukan proses blotting. Selanjutnya transfer dilakukan selama 12 jam pada 25 Volt pada suhu 4°C. Setelah selesai transfer, membran di-*blocking* dalam PBS-T Skim milk 5% selama 1 jam sambil digoyang. Dicuci 3x5 menit dalam PBS-T. Inkubasi dengan antibodi primer yang telah diencerkan dalam PBS-T Skim 5% (1:200) semalam pada suhu 4°C. Dicuci 3x5 menit dengan TBS. Diinkubasi

dengan antibodi sekunder AP *Conjugated* (1:2500 dalam TBS) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS-T selama 4x5 menit. Selanjutnya dideteksi pita protein atau antigen dengan penambahan substrat *Western Blue* (dalam ruang gelap) ke membran selama semalam atau sampai terlihat warna *band*. Reaksi dihentikan dengan pencucian membran dalam akuades (11).

Analisis Data

Data kuantitatif seperti jumlah total sel, dan diferensiasi sel preadiposit dan kadar IGF-1 dianalisis dengan menggunakan SPSS ver. 11. Uji anova dan Tukey digunakan untuk mengetahui perbedaan antara masing – masing perlakuan. Data kualitatif seperti imunositokimia dan Western Blot dianalisis dengan menggunakan Software Coral Draw ver. 11. Data disajikan dalam *Mean ± SD*.

HASIL

Perubahan prosentase jumlah sel, diferensiasi, dan undiferensiasi preadiposit akibat paparan theaflavin (TF)

Pada penelitian ini telah digunakan theaflavin (TF) (Sigma) untuk membuktikan pengaruh senyawa aktif teh hitam tersebut terhadap jumlah sel yang mengalami proliferasi, diferensiasi, dan undiferensiasi (tidak berdiferensiasi). Jumlah proliferasi sel dihitung berdasarkan atas jumlah sel baik sel yang mengalami diferensiasi maupun tidak berdiferensiasi. Jumlah diferensiasi sel preadiposit viseral dihitung berdasarkan atas perubahan morfologi sel preadiposit menjadi adiposit dewasa (*mature adipocyte*) sedangkan jumlah undiferensiasi sel ditentukan atas jumlah sel yang tidak mengalami perubahan morfologi (kebalikan diferensiasi sel). Diferensiasi sel juga dapat ditandai dengan peningkatan akumulasi lemak (12).

Proliferasi dan diferensiasi sel dapat dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan seperti media. Pada penelitian ini menggunakan media adipogenik. Media adipogenik adalah media yang mestimulasi terjadinya diferensiasi dari preadiposit menjadi adiposit dewasa. Media tersebut mengandung bahan yang menginduksi proliferasi dan diferensiasi sel seperti insulin (INS), dexamethasone (DEX), isobutyl methylxantine (IBMX), dan *Fetal bovine serum* (FBS). Setelah preadiposit viseral diinkubasi dengan media adipogenik selama 24 jam, sel dipapar dengan theaflavin dengan beberapa kadar theaflavin, yaitu kontrol, 50, 100, dan 200 µM. Dengan pemberian theaflavin diharapkan bioaktif teh hitam ini mampu menghambat proses diferensiasi preadiposit viseral. Secara morfologi, pengaruh theaflavin terhadap proliferasi, diferensiasi, dan undiferensiasi preadiposit dapat diamati pada Gambar 1A.

Pada Gambar 1B dapat dilihat prosentase jumlah diferensiasi dan undiferensiasi sel preadipose setelah dipapar dengan theaflavin. Hasil perhitungan jumlah sel

yang berdiferensiasi menurun setelah sel preadipose dipapar dengan theaflavin. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa diferensiasi sel menurun secara nyata pada perlakuan 100 μM ($24,08 \pm 16,10$) dibandingkan dengan kontrol ($65,84 \pm 16,92$). Diferensiasi sel kembali meningkat pada perlakuan 200 μM ($28,05 \pm 6,24$). Jumlah sel diferensiasi pada kelompok 200 μM lebih sedikit dan menurun secara nyata jika dibandingkan dengan kontrol dan 50 μM ($64,93 \pm 10,46$). Jumlah undiferensiasi sel mengalami peningkatan setelah sel dipapar dengan TF 100 ($75,92 \pm 16,10$) dan 200 μM ($71,95 \pm 6,24$). Menurut hasil analisis statistik menunjukkan bahwa jumlah undiferensiasi meningkat secara nyata jika dibandingkan dengan kontrol dan TF 50 μM ($p < 0,05$) (Gambar 1B). Jadi hasil penelitian ini membuktikan bahwa theaflavin dengan kadar 100 μM mampu menghambat laju proliferasi sel sedangkan kadar theaflavin 200 μM mampu menghambat diferensiasi kultur preadiposit.

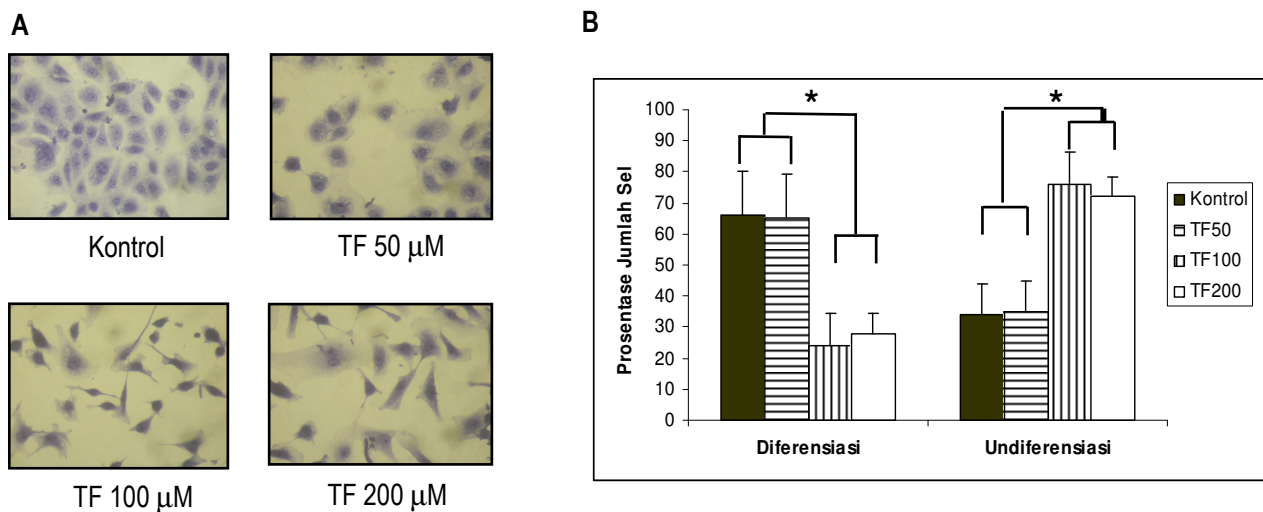
Theaflavin menghambat ekspresi PPAR γ pada kultur preadiposit

Pada penelitian dilakukan untuk mendeteksi aktivitas theaflavin terhadap ekspresi protein PPAR γ secara kualitatif (Western blot dan Imunositokimia). Pengaruh penghambatan theaflavin terhadap penurunan ekspresi PPAR γ dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil analisis imunositokimia dapat dilihat bahwa PPAR γ terekspresi di intraseluler dan

ekspresinya dapat dipengaruhi oleh paparan theaflavin (Gambar 2A). Hasil analisis imunositokimia ini dapat didukung oleh data analisis Western blot. Hasil analisis Coral Draw ver.11 menunjukkan bahwa ada penurunan intensitas warna setelah preadiposit viseral terpapar dengan theaflavin. Data analisis Western blot PPAR γ menunjukkan bahwa pada kontrol ($42,20 \pm 35,47$), TF 50 μM ($132,62 \pm 18,02$), TF 100 μM ($141,13 \pm 17,49$), dan TF 200 μM ($196,20 \pm 7,98$) (Gambar 2B). Dari data di atas menunjukkan bahwa semakin tinggi rerata (*mean*) maka intensitas warna atau ekspresi PPAR γ semakin sedikit. Dari data tersebut membuktikan bahwa theaflavin dari ekstrak teh hitam mampu menurunkan ekspresi PPAR γ preadiposit viseral.

Pengaruh Theaflavin terhadap akumulasi droplet lipid pada preadiposit

Pada penelitian ini juga mengamati pengaruh theaflavin terhadap penurunan akumulasi droplet lipid. Akumulasi droplet lipid diamati dengan metode pengecatan spesifik yaitu Oil Red O. Hasil pengecatan imunositokimia menunjukkan bahwa terjadi penurunan droplet lipid. Hal ini terlihat pada perlakuan TF 200 μM dengan membandingkan kontrol (Gambar 3). Jadi pemberian theaflavin mampu menurunkan droplet lipid pada preadiposit sehingga bioaktif teh hitam ini dapat digunakan untuk menurunkan lipid dalam metabolisme tubuh.

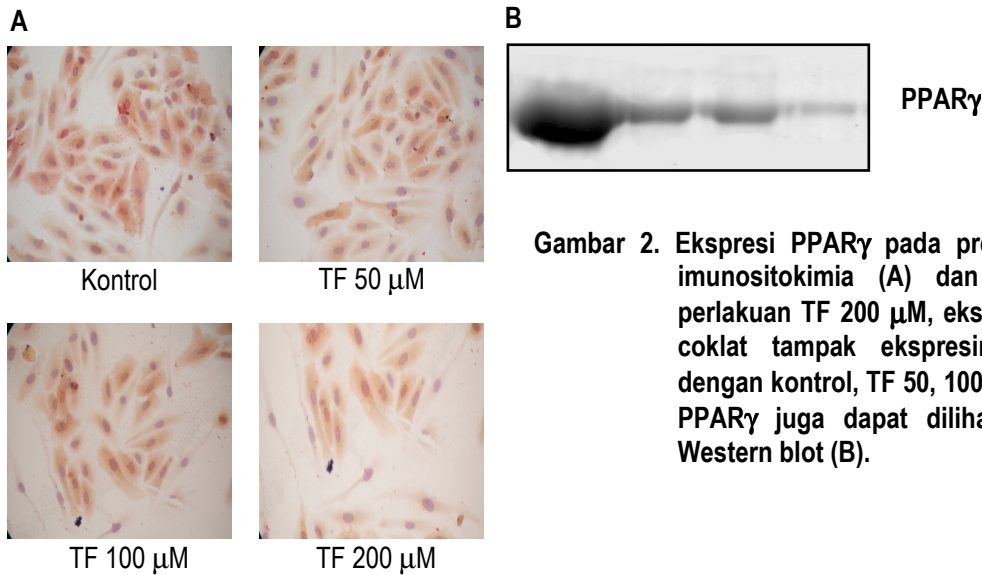


Gambar 1.A. Morfologi sel preadiposa setelah diinkubasi dengan theaflavin (TF) selama 24 jam pada kultur preadiposit yang diinduksi dengan insulin, dexamethasone, IBMX, dan FBS selama 1 hari dengan pengecatan hematoxyline. Tampak pada kontrol dan perlakuan TF 50 μM sel sudah berdiferensiasi membentuk adiposa dewasa. Sedangkan pada perlakuan TF 100 dan 200 μM sel masih berbentuk *fibroblast-like preadipocyte* Perbesaran 400 X.

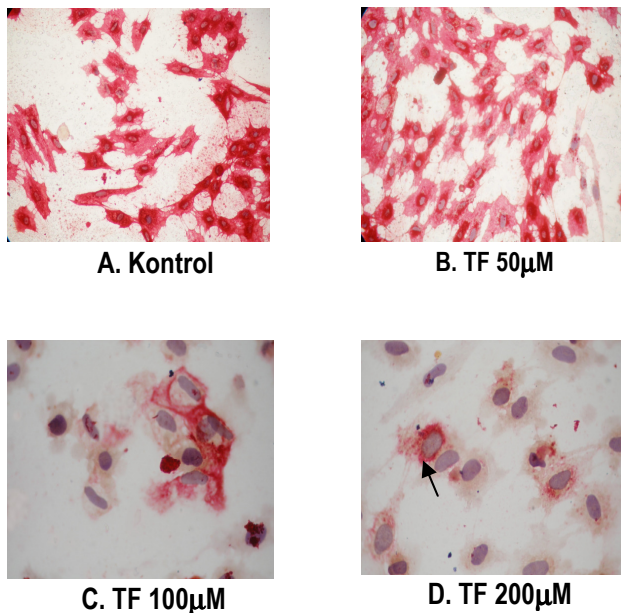
B. Prosentase diferensiasi dan undiferensiasi preadiposit. Pada grafik di atas menunjukkan bahwa pada TF100 prosentase diferensiasi sel pada perlakuan TF 100 dan 200 μM menurun secara nyata dibandingkan kontrol dan TF 50 μM sedangkan pada undiferensiasi, perlakuan TF100 dan 200 meningkat secara nyata dibandingkan dengan kontrol dan TF50 ($p < 0.05$).

Tabel 1. Hasil analisis statistik prosentase jumlah diferensiasi dan undiferensiasi pada kultur preadiposit yang telah dipapar theaflavin dan setelah diinkubasi dengan media adipogenik.

Parameter	Perlakuan	Jumlah Pengamatan	Mean±SD
Prosentase Diferensiasi Sel	Kontrol	25	65,84 ± 16,92 **
	TF50µM	25	64,93 ± 10,46 **
	TF100µM	25	24,08 ± 16,09 *
	TF200µM	25	28,05 ± 6,24 *
Prosentase Undiferensiasi Sel	Kontrol	25	34,16 ± 16,92 *
	TF50µM	25	35,07 ± 16,92 *
	TF100µM	25	75,92 ± 10,46 **
	TF200µM	25	71,95 ± 6,24 **



Gambar 2. Ekspresi PPAR γ pada preadiposit visceral baik pada imunositokimia (A) dan Western blot (B). Pada perlakuan TF 200 μ M, ekspresi PPAR γ yang berwarna coklat tampak ekspresinya turun dibandingkan dengan kontrol, TF 50, 100 dan 200 μ M. Penghambatan PPAR γ juga dapat dilihat pada hasil pemeriksaan Western blot (B).



Gambar 3. Akumulasi lipid pada preadiposit bagian visceral setelah dipapar dengan theaflavin selama 24 jam. Dengan pengecatan Oil Red O di atas menunjukkan bahwa terjadi penurunan droplet lipid pada preadiposit yang dipapar dengan theaflavin 100 dan 200 μ M jika dibandingkan dengan kontrol. Warna merah menunjukkan droplet lipid. Perbesaran 400 x.

DISKUSI

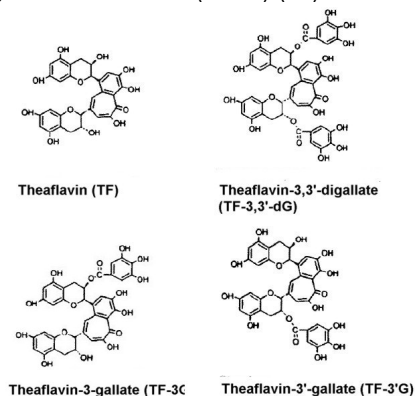
Obesitas tidak hanya disebabkan oleh hipertropi tetapi juga hiperplasi jaringan adiposa. Hiperplasi dan hipertropi jaringan lemak berkaitan dengan mekanisme adipogenesis atau diferensiasi dari preadiposit menjadi adiposit (2). Upaya penghambatan proliferasi dan diferensiasi adiposit sebagai mekanisme dasar obesitas telah dilakukan melalui berbagai cara, antara lain dengan penggunaan daun teh (*Camelia sinensis*). Khasiat teh hitam sebagai obat obesitas berkaitan dengan kandungan theaflavin yang didapat melalui fermentasi dengan mengaktifkan enzim oksidatif. Theaflavin (TF) merupakan kelompok flavonoid yang banyak terdapat pada teh hitam dan merupakan senyawa oligomer sedangkan polimernya dikenal sebagai thearubigin (13).

Teh hitam dihasilkan dari daun teh segar dengan proses fermentasi melalui oksidasi enzimatik. Senyawa aktif teh hitam terdiri dari theaflavin (TF), theaflavin-3-gallate (TF-3-G), theaflavin-3'-gallate (TF-3'-G), dan theaflavin-3,3'-diGallate (TF-3,3'-dG) (12). Ekstrak teh hitam dalam air panas mengandung 2-6 % campuran polifenol theaflavin dan 20 % thearubigin. Aktivitas antioksidan polifenol teh hitam sebanding dengan teh hijau (14). Hasil penelitian juga melaporkan bahwa ekstrak teh hitam mempunyai aktivitas antiinflamasi pada tikus model edema. Beberapa molekul target yang mempengaruhi inflamasi telah menunjukkan pengaruh setelah dipapar dengan teh hitam. Luceri, *et al.*, (2002) melaporkan bahwa dengan pemberian ekstrak teh hitam sekitar 40 mg polifenol teh hitam/kg/tikus telah menghambat ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2), *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *glutathione S-transferase* (GST), GST-M2 dan GST-P pada tumor kolon (10). Pan, *et al.*, (2000) melaporkan bahwa polifenol teh hitam menghambat aktivasi NF- κ B pada sel makrofag (15). Penelitian lainnya melaporkan bahwa theaflavin dan TF-3,3'-dG mampu menghambat ekspresi interleukin (IL)-1 β dan IL-6 yang diinduksi dengan 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) melalui peningkatan kadar PGE₂ dan LTB₄ (10). TF-2 (gabungan antara TF-3-G dan TF-3'-G) menunjukkan penghambatan COX-2 pada *cell lines*. Temuan-temuan tersebut membuktikan keutamaan teh hitam sebagai anti-inflamasi dan agen antikanker. Teh hitam sebagai agen antiobesitas masih belum banyak penelitian terutama terkait dalam diferensiasi adiposit.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa theaflavin 100 μ M mampu menghambat diferensiasi preadiposit. Penghambatan diferensiasi masih terjadi pada theaflavin 200 μ M. Menurut Liu *et al.*, (2003) polifenol teh hitam mempunyai aktivitas antioksidan lebih besar dibandingkan dengan polifenol teh hijau (12). Mekanisme TF terhadap penghambatan perubahan fenotip preadiposit masih belum diketahui. Peningkatan kembali proliferasi adiposit pada paparan theaflavin 200 μ M perlu dikaji lebih lanjut dengan

mengamati sinyal transduksi yang berperan di dalam proliferasi preadiposit dan diferensiasi sel kultur preadiposit.

Mekanisme penghambatan theaflavin terhadap proliferasi dan diferensiasi sel terkait dengan jalur sinyal *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Chung, *et al.*, (2001) melaporkan bahwa TF-3,3'-dG berpotensi dan secara cepat menghambat protein fosfo-Erk1/2 dan MEK1/2 (16). Masih sangat sedikit informasi tentang mekanisme penghambatan theaflavin terhadap proliferasi dan diferensiasi adiposit. Ada kemungkinan bahwa theaflavin dalam penelitian ini menghambat ikatan Raf-1 dengan MEK1 seperti mekanisme fosforilasi Elk-1 oleh Erk1/2. Molekul yang banyak mengandung prolin sangat terlibat baik interaksi antara Raf-1 dan MEK1 maupun ikatan antara Erk1/2 dan Elk-1. Penurunan kadar protein Raf-1 oleh theaflavin tersebut merupakan mekanisme yang berkontribusi penurunan ekspresi pho-MEK1/2 tetapi timbul pertanyaan bagaimana theaflavin ini menstimulasi degradasi Raf-1 yang dimediasi lisosom. Sedangkan Chung *et al.*, (1999) dan Masaaki *et al.*, (2000) melaporkan bahwa theaflavin menghambat fosforilasi *Inhibitory kappa B α* ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) pada gugus asam amino Serin 32 (17,18). Golongan theaflavin juga efektif menghambat NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*), fosforilasi $\text{I}\kappa\text{B}$ sitosol dan akumulasi NF- κ B subunit p65 dan p50 yang diinduksi dengan lipopolisakarida (LPS) atau inducer proliferasi dan diferensiasi seperti DEX, insulin atau IBMX. Pada sel kanker, masih banyak pendapat tentang penghambatan theaflavin terhadap proliferasi dan diferensiasi sel kanker. Menurut Bode and Zsigang (2003) menyebutkan bahwa theaflavin menghambat faktor pertumbuhan, aktivasi MAPK, *adipocyte protein-1* (AP-1), NF- κ B, fosforilasi dan degradasi $\text{I}\kappa\text{B}$ serta *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI-3K) (19).



Gambar 4. Senyawa yang terdapat dalam ekstrak teh hitam (20). Theaflavin (TF) merupakan senyawa polimer teh hitam sedangkan monomernya terdiri dari 3 (tiga), yaitu theaflavin-3,3'-digallate (TF-3,3'-dG), theaflavin-3-gallate (TF-3G) dan theaflavin-3'-gallate (TF-3'-G).

Proses adipogenesis sangat terkait dengan proses diferensiasi sel dan proses ini melibatkan mekanisme transkripsi. Preadiposit dapat berdiferensiasi apabila ditambahkan mitogen dan agen hormonal seperti insulin, glucocorticoid serta agen-agen lainnya yang mempengaruhi peningkatan *cyclic Adenin Monophosphate* (cAMP) (20). Hasil imunositokimia dan analisis protein Western blot menunjukkan bahwa pemberian theaflavin menurunkan ekspresi reseptor nuklear PPAR γ . *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) adalah reseptor nuklear yang aktivitas transkripsinya dimodulasi oleh interaksi ligan-reseptor (20,21). Mekanisme kerja TF terhadap penurunan ekspresi protein reseptor nuklear PPAR γ masih belum diketahui. Pada penelitian ini menggunakan mitogen dan inducer diantaranya FBS, DEX, Insulin, dan IBMX. Wu *et al.*, (1999) dan Rosen *et al.*, (1999) menyatakan bahwa secara langsung beberapa inducer tersebut akan menstimulasi *CCAAT-enhancer binding protein* (C/EBP) β dan C/EBP δ (5,21). Aktivitas C/EBP akan memediasi ekspresi PPAR γ dan membentuk heterodimer yang fungsional dengan *retinoid x receptor* (RXR). Aktivasi PPAR γ akan menstimulasi C/EBP α dan mekanisme aktivasi ini terjadi saling bolak-balik (*crossstalk*). *Signal transducers and activators of transcription* (STAT) terstimulasi jika PPAR γ aktif kemudian STAT merangsang ekspresi gen adiposit untuk melakukan diferensiasi sel.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya penghambatan theaflavin terhadap ekspresi PPAR γ . Prusty, *et al.*, (2002) melaporkan bahwa adanya inducer diferensiasi adiposit menyebabkan aktivasi jalur sinyal MEK/Erk sampai dengan 12 jam awal adipogenesis (22). Peningkatan aktivasi ini menyebabkan aktivasi ekspresi baik C/EBP α maupun PPAR γ . Berkaitan dengan peranan theaflavin dalam ekstrak teh hitam terhadap penurunan ekspresi PPAR γ pada kultur preadiposit ini perlu penelitian lanjut untuk mengungkap mekanisme penghambatan TF pada aktivasi PPAR γ dengan mengamati sinyal yang terlibat dalam aktivasi MAPK.

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa theaflavin dari ekstrak teh hitam dapat menghambat diferensiasi dan proliferasi preadiposit visceral manusia melalui penghambatan ekspresi PPAR γ .

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung dan didanai oleh Departemen Kesehatan RI melalui Riset Pembinaan Iptekdok 2006. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Kesehatan RI, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Dr. Siti Chandra dan partisipan yang menyumbangkan organ adiposanya untuk penelitian ini.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Depkes RI. *Profil Kesehatan Indonesia 2001*. Jakarta. 2004.
2. Caro JF, Dohm LG, Pories WJ, and Sinha MK. *Obesity Developments*. *Diabetes Metab. Review*; 1989; 5: 665-689.
3. Anders HB, Ying L, Michael PL, and Philipp ES. *Adipocyte Differentiation Induces Dynamic Changes in NF- κ B Expression and Activity*. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E1178-E1188.
4. Hongbin Zhang, Jane Nohr, Charlotte H. Jensen, Rasmus K. Petersen, Elin Bachmann, Borge Teisner, Leif K. Larsen, Susanne Mandrup, and Karsten Kristiansen. *Insulin-like Growth Factor-1/Insulin Bypasses Pref-1/FA1-mediated Inhibition of Adipocyte Differentiation*. *The Journal Of Biological Chemistry* 2003; 278 (23): 20906–20914.
5. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM & Mortensen RM. *PPAR gamma is Required for the Differentiation of Adipose Tissue in Vivo and in Vitro*. *Mol. Cell* 1999; 4: 611–617.
6. Mao JI, Joshua DL, Saileta PXM, Hong Lu, Pius M, Chi-Tang Ho, and Chung S. *Delivery of Tea Polyphenol to Oral Cavity by Green Tea Leaves and Black Tea Extract*. *Cancer Epidemiology, Biomarker, and Prevention*, 2004; 13: 132-137.
7. Samad AM. *Tea Extracts Inhibit the Proliferation and Differentiation of Adipocytes*. Abstract. California Science Fair 2004.
8. Lin J, Mary ADF and Clifton AB. *Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes*. *Obesity Research* 2005; 13: 982-990.
9. Johnson PR and MRC Greenwood. *Theadipose Tissue In Celland Tissue Biology. A Texbook of Histology*. (ed. By L. Weiss). 6th Edition. Urban and Schwarzenberg Baltimore, MP, 1988; 191-209.
10. Luceri C, Cadermi G, Sanna A, Dolara P. *Red Wine and Black Tea Polyphenols Modulate the Expression of Cyclooxygenase-2, Inducible Nitric Oxide Synthase and Glutathione-Related Enzymes in Azoxymethane-Induced F344 Rat Colon Tumors*. *J Nutr.* 2002; 132: 1376-1379.
11. Karsten H, Dennis vH, Kathrin C, Sevine H, Norbert P. *Optimization of the Differentiation of Human Preadipocytes in Vitro*. *Differentiation* 2005; 73: 28-35.

12. Liu Y, Rosen RT, Ho C-T, Ghai GR, Huang M-T. *Inhibitory Effects of Black Tea Constituents on 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate Induced Inflammation, pro-Inflammatory Cytokine Expression, and Arachidonic Acid Metabolism*. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2003; 44:1101-1102.
13. Ho Chi-Tang, Huang MT, Lin JK. *Health Promoting Properties of Black Tea*. www.worldnutra.com
14. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. *Suppression of Inducible Cyclooxygenase and Inducible Nitric Oxide Synthase by Apigenin and Related Flavonoids in Mouse Macrophages*. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1945-1952.
15. Pan MH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JH, Lin JK. *Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Nuclear Factor-kappaB Activity by Theaflavin-3,3'-Digallate from Black Tea and Other Polyphenols Through Down-Regulation of IkappaB Kinase Activity in Macrophages*. *Biochem. Pharmacol* 2000; 59: 357-367.
16. Chung JY, Jae OP, Hnin P, Zigang D, and Chung SY. *Mechanisms of Inhibition of the Ras-MAP Kinase Signaling Pathway in 30.7b Ras 12 cells by Tea Polyphenols (-)epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate*. *The FASEB Journal* 2001; 15: 2022-2024.
17. Chung JY, Huang C, Meng X, Dong Z and Yang CS. *Inhibition of Activator Protein 1 Activity and Cell Growth by Purified Green Tea and Black Tea Polyphenols in H-rastransformed cells: Structure-activity Relationship and Mechanisms Involved*. *Cancer Res* 1999; 59: 4610-4617.
18. Masaaki N, Wei-ya M, Nanyue C, Ann MB and Zigang D. *Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF- κ B Activation by Tea Polyphenols,(-)-epigallocatechin Gallate and Theaflavins*. *Carcinogenesis* 2000; 21(10): 1885-1890.
19. Bode AM and Zigang Dong. *Signal Transduction Pathways: Targets for Green and Black Tea Polyphenols*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 36 (1): 66-77.
20. Ron F. Morrison and Stephen R. Farmer. *Hormonal Signaling and Transcriptional Control of Adipocyte Differentiation*. *J. Nutr.* 2000; 130: 3116S-3121S.
21. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ & Spiegelman BM. *Cross-Regulation of C/EBP Alpha and PPAR Gamma Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity*. *Mol. Cell* 1999; 3: 151-158.
22. Prusty D, Bae-Hang P, Kathryn ED, and Stephen RF. *Activation of MEK/ERK Signaling Promotes Adipogenesis by Enhancing PPAR γ and C/EBP α Gene Expression During the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes*. *The journal of biological chemistry* 2002; 277(48): 46226-46232.