

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam (*Camellia sinensis*) terhadap Ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada Jalur MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) Jaringan Lemak Viseral Tikus Wistar dengan Diet Tinggi Lemak

Hendra Susanto^{1*}, M. Rasjad Indra², Setyawati Karyono²

¹Jurusan Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

²Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Prevalensi obesitas meningkat di berbagai Negara Asia Pasifik, Eropa, Amerika Serikat, Australia serta di negara-negara berkembang. Perubahan preadiposit menjadi adiposit yang *mature* memegang peranan dalam patogenesis obesitas. Teh hitam memiliki komponen antioksidan yang banyak berperan dalam pengontrolan proliferasi sel. Theaflavin pada teh hitam kemungkinan dapat menghambat perubahan preadiposit menjadi *mature* adiposit, maka prevalensi terjadinya obesitas sebagai pemicu berbagai penyakit metabolik dapat dicegah sejak dini. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian sari seduh teh hitam (*Camellia sinensis*) terhadap pencegahan peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada tikus wistar dengan diet tinggi lemak. Penelitian dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan tikus strain wistar. Tikus dibagi menjadi kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol positif diberi diet tinggi lemak tanpa sari seduh teh hitam, sedangkan kelompok perlakuan diberi diet tinggi lemak dan sari seduh teh hitam dengan dosis 0,015 g, 0,030 g dan 0,045g/hari selama 90 hari secara bersamaan. Ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ diukur secara semikuantitatif dengan menghitung intensitas warna dengan *Corell Photo Paint 11*. Skor intensitas warna ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ hasil pewarnaan imunohistokimia dianalisis secara statistik dengan One way Anova dan analisis regresi dengan taraf signifikansi $p=0,05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sari seduh teh hitam dengan berbagai dosis (0,015 g, 0,030 g dan 0,045 g/hari) dapat mencegah peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ secara signifikan ($p=0,000$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Semakin besar dosis teh hitam maka ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ makin rendah. Berdasarkan analisis regresi dengan estimasi kurva logaritmik ($p<0,05$) terdapat hubungan fungsional dua arah yang kuat antara ERK1/2 dengan PPAR γ ($R=0,798$ dan $R=0,780$). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) mampu mencegah peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada tikus wistar dengan diet tinggi lemak.

Kata kunci: diet tinggi lemak, IGF-1, ERK1/2, jalur MAPK, PPAR γ , teh hitam.

Abstract

The prevalence of obesity is increasing in many countries of Asia Pacific, Europe, USA, Australia and in developing countries. Preadiposit changes into *mature* adipocytes plays essential role in the pathogenesis of obesity. Black tea has antioxidant components which majoring the role in controlling cell proliferation. Theaflavins in black tea can inhibit the possibility of pre-adipocytes change into *mature* adipocytes, thus the prevalence of obesity as a trigger of various metabolic diseases can be early prevented. The purpose of this study was to prove the effect of black tea (*Camellia sinensis*) brewed cider towards the prevention of increased expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ on wistar rat with high-fat diet. The study was conducted *in vivo* used Wistar strain rats. Rats were grouped into positive control group and the treatment group. Positive control group were given a high-fat diet without cider brewed of black tea, while the treatment group were given a high-fat diet and cider brewed of black tea with the doses of 0.015 g, 0.030 g and 0.045g/day for 90 days simultaneously. Expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ were measured semi-quantitatively by calculate the color intensity with *Corell Photo Paint 11*. Color intensity scored from expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ as the results of immunohistochemistry were analyzed statistically with One way Anova and regression with signification degree $p=0.05$. The results showed that cider brewed of black tea with various doses (0.015 g, 0.030 g and 0.045 g/day) can prevent an increase in the expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ significantly ($p=0.000$) compared to the positive control group. The greater the dose of black tea then the expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ getting lower. Based on regression analysis with the estimation of logarithmic curve ($p<0.05$), there is a functional relationship between ERK1/2 and PPAR γ ($R=0.798$ dan $R=0.780$). This study proved that the cider brewed of black tea (*C. sinensis*) able to prevent an increase in the expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ on high-fat diet wistar rat.

Keywords: high-fat diet, IGF-1, ERK1/2, MAPK pathway, PPAR γ , black tea.

PENDAHULUAN

Prevalensi obesitas meningkat di berbagai Negara Asia Pasifik, Eropa, Amerika Serikat, Australia serta di negara-negara berkembang. Obesitas baik pada dewasa maupun anak-anak menjadi pemicu berbagai penyakit seperti penyakit kardiovaskuler, diabetes dan kanker memiliki hubungan yang kuat dengan peningkatan angka kematian di berbagai negara di dunia [1]. Di Indonesia 8,1% laki-laki *overweight* dan 6,8% obesitas, 10,5% wanita *overweight* dan 13,5% obesitas [2]. Perubahan preadiposit menjadi adiposit *mature* memegang peranan pada patogenesis obesitas yang disebabkan oleh faktor genetik dan faktor lingkungan [1]. Pada kasus obesitas dan *overweight* peningkatan massa lemak dihasilkan akibat penambahan ukuran sel (*hypertrophy*) dan penambahan jumlah sel (*hyperplasia*) ataupun karena keduanya [1]. Melalui penghambatan proliferasi dan perubahan preadiposit menjadi adiposit diharapkan dapat menurunkan prevalensi obesitas serta *overweight*.

Proses adipogenesis dipicu oleh *growth signal* (sinyal pertumbuhan), salah satunya adalah *insulin like growth factor-I* (IGF-1). Adanya pengikatan IGF-1 pada reseptor permukaan membran menyebabkan fosforilasi reseptor dilanjutkan aktivasi jalur MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) [3]. IGF-1 merupakan ligand yang berperan pada sintesis insulin, faktor mitogen dan pertumbuhan sel serta juga berperan dalam diferensiasi beberapa sel termasuk preadiposit [4]. Jalur *signaling* proses adipogenesis melalui aktivasi MAPK khususnya *extracellular signal-regulated kinase* (ERKs) yang terstimulus oleh signal pertumbuhan menjadi penentu proses adipogenesis. Fosforilasi ERK1/2 akan memulai ekspresi C/EBP dan PPAR γ yang menjadi 2 faktor kunci adipogenesis [1].

Salah satu bahan yang berperan pada proses penghambatan pertumbuhan (pengontrolan proliferasi) sel adalah teh hitam (*Camellia sinensis*). Teh hitam memiliki kandungan senyawa antioksidan *theaflavin* (TF) yang terdiri dari *theaflavin* (TF₁), *theaflavin-3-gallate* (TF_{2A}), *theaflavin-3'-gallate* (TF_{2B}) dan *Theaflavin-3-3'-digallate* (TF₃) dengan memiliki kemiripan struktur kimia seperti *catechin* pada teh hijau.

Theaflavin dan *thearubigin* sebagai komponen utama teh hitam adalah hasil konversi *catechin* oleh enzim polifenol oksidase. *Theaflavin* dapat menjadi agen protektif untuk penyakit kardiovaskuler dan kanker, termasuk sebagai agen antihipertensi, antioksidatif dan aktivitas hipolipidemik [5]. Diet tinggi lemak dapat menstimulasi peningkatan proliferasi preadiposit serta ekspresi gen-gen spesifik adiposit yang terlibat dalam program adipogenik. Diet tinggi lemak menstimulasi peningkatan *release growth factor* khususnya IGF-1 yang banyak berperan dalam proliferasi dan diferensiasi preadiposit [6, 7, 8].

Sampai saat ini masih belum pernah dilaporkan secara ilmiah bahwa secara *in vivo* teh hitam dapat menghambat proses perubahan preadiposit menjadi adiposit *mature* melalui penghambatan jalur MAPK terhadap ekspresi IGF-1, ERK1/2, dan PPAR γ . Berdasarkan beberapa fakta tersebut diprediksi *theaflavin* pada teh hitam kemungkinan dapat menghambat perubahan preadiposit menjadi adiposit *mature* melalui penghambatan signaling baik pada *reseptor growth factor* IGF-1 dan PPAR γ sehingga signal transduksi untuk ekspresi gen spesifik adipogenesis dapat dihambat. Adanya proses inhibisi pada IGFR dan PPAR γ diharapkan dapat menekan prevalensi obesitas sebagai pemicu berbagai penyakit metabolik sejak dini dengan pemanfaatan teh hitam sebagai terapi. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk membuktikan pengaruh sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) terhadap pencegahan peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada tikus wistar dengan diet tinggi lemak.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini bersifat eskperimental laboratorik dengan rancangan acak lengkap (RAL) petak terbagi secara *in vivo* menggunakan model hewan coba tikus (*Rattus novergicus* strain wistar).

Perlakuan Diet Tinggi Lemak dan Pemberian Sari Seduh Teh Hitam

Tikus *R. novergicus* strain wistar jantan sejumlah 24 ekor diberi diet tinggi lemak selama 90 hari yang diperoleh dari total kolesterol, asam kolat dan minyak babi (energi=6341,35 Kal) yang diberikan dalam bentuk pakan/pelet. Pada saat bersamaan dilakukan pemberian sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) dari daun teh kering (*Natural Exclusive Taste Black Tea, Medical Herb Centre*

* Alamat Korespondensi:

Hendra Susanto

Email : susantohendra@yahoo.com

Alamat : Jurusan Biomedik, Fakultas Kedokteran,
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang

Yogyakarta Indonesia) dengan tiga kelompok dosis yaitu 0,015 g; 0,030 g; dan 0,045 g/hari dari konversi berat makanan tikus perhari 30 g/1000 gr pakan. Daun tanaman teh sesuai dosis diseduh dengan air mendidih 1,5 mL; 3 mL; dan 4,5 mL (volume air yang digunakan yaitu dosis g/hari x 100 ml), didiamkan 15 menit disaring dan diambil filtratnya kemudian diberikan secara peroral pada tikus perlakuan [9].

Pengambilan Jaringan Lemak Viseral

Tikus percobaan setelah memiliki surat keterangan etika penelitian dibunuh dan diambil jaringan lemak viseral (bagian omentum) menggunakan alat seksi. Kemudian sampel jaringan lemak viseral dari 4 kelompok dari masing-masing ulangan diletakkan pada cawan petri yang berisi larutan PBS. Sampel jaringan lemak kemudian diletakkan pada botol film berisi PFA (paraformaldehid) untuk proses *embedding* [10].

Proses Embedding Jaringan Lemak Viseral

Organ lemak viseral direndam dalam etanol 70% selama minimal 24 jam, dan dilanjutkan dengan etanol 80% selama 2 jam. Direndam dalam etanol 90% dan 95% secara berurutan selama masing-masing 30 menit. Dilanjutkan perendaman sebanyak 3 kali dalam etanol absolut selama 30 menit masing-masing dalam botol yang berbeda. Kemudian direndam dalam *xylo* sebanyak 2 kali masing-masing selama 30 menit. Proses selanjutnya dikerjakan dalam inkubator dengan suhu 56-58°C. Organ direndam *xylo*, kemudian ke dalam parafin sebanyak 3 kali. Dilanjutkan *embedding* dengan mencelupkan organ dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat, parafin akan memadat dan organ berada dalam blok parafin [10].

Pewarnaan Organ dengan Metode Imunohistokimia

Setelah organ dalam blok parafin dipotong dan diletakkan pada gelas objek, dilakukan deparafinisasi dan rehidrasi dengan mencelupkan organ dalam *xylo* sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%), dan akuades secara berurutan dan dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Mencuci sel 1 kali dengan PBS dilanjutkan inkubasi sel pada 3% H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit suhu ruang, dilanjutkan mencuci sel 3 kali dengan PBS. Menginkubasi sel pada 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 1 jam pada suhu ruang dan

mencuci 3 kali dengan PBS. Mengencerkan antibodi primer dalam Goat serum/FBS/BSA hingga konsentrasi dan volume yang diinginkan (Antibodi PPAR γ , ERK1/2 dan IGF-1, Santa Cruz 1:100 dalam Goat serum atau FBS). Menginkubasi sel pada antibodi primer pada suhu 4°C selama 12 jam atau pada suhu ruang selama 2 jam. Mencuci sel dalam PBS selama 3x5 menit. Mengencerkan antibodi sekunder berlabel biotin dalam PBS sampai konsentrasi dan volume yang diinginkan. (Anti Rabbit IgG berlabel Biotin, SIGMA 1:500 dalam PBS) dilanjutkan dengan menginkubasi sel dengan antibodi sekunder selama 1 jam pada suhu ruang. Mencuci sel pada PBS selama 3x5 menit. Menetesi dengan SA-HRP (*Streptavidin horseradish peroxidase*) 1:500 dalam PBS selama 40 menit. Mencuci sel dengan PBS selama 3x5 menit. Menetesi dengan DAB (*Diaminobenzidine*) selama 10 menit. Mencuci sel dengan akuades 3x5 menit dilanjutkan *counterstain* dengan *Mayer's hematoxilen* selama 10 menit. Mencuci/tetesi dengan air kran. Mencuci dengan akuades selama 10 menit dan dibiarkan pada suhu kamar. Setiap slide diberi label dan ditetesi medium *mounting* (entellan) dijatuhkan ke atas preparat. *Cover glass* ditutupkan ke atas preparat yang telah diberi *mounting* medium [11].

Penghitungan Ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ Hasil Imunohistokimia

Setelah dilakukan pewarnaan dengan teknik imunohistokimia, preparat untuk masing-masing perlakuan dan masing-masing ulangan difoto dengan fotomikroskop Merk Olympus dengan perbesaran 400x. Hasil dari pemotretan kemudian dihitung intensitas warna ekspresi dari IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ dengan software *Corell Photo Paint ver 11* dengan mengukur intensitas warna hasil pemeriksaan imunohistokimia yang dilakukan dengan memblok area yang akan diamati kemudian mencatat mean yang muncul pada histogram (semakin besar nilai intensitas warna/semakin cerah menunjukkan ekspresi yang semakin sedikit) [11].

Analisis Data

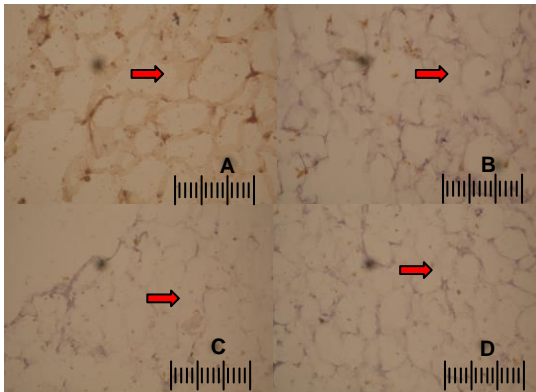
Data hasil pengukuran ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ berdasarkan intensitas warna kemudian dianalisis statistik dengan menggunakan *one way* Anova ($p < 0,05$) untuk mengetahui adanya pengaruh/perbedaan bermakna pada berbagai perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji Tukey HSD dan LSD untuk

mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan. Untuk mengetahui hubungan antar variabel penelitian/analisis jalur dilakukan uji regresi dengan estimasi kurva logaritmik ($p < 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam Pada Morfologi Adiposit

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian sari seduh teh hitam menyebabkan terjadinya penurunan ukuran sel adiposit dan juga diperoleh suatu gambaran pemberian sari seduh teh hitam menyebabkan jumlah sel lemak yang terbentuk sebagai hasil proliferasi dari preadiposit meningkat. Gambaran hasil pengamatan morfologi dari adiposit jaringan lemak visceral seperti Gambar 1.



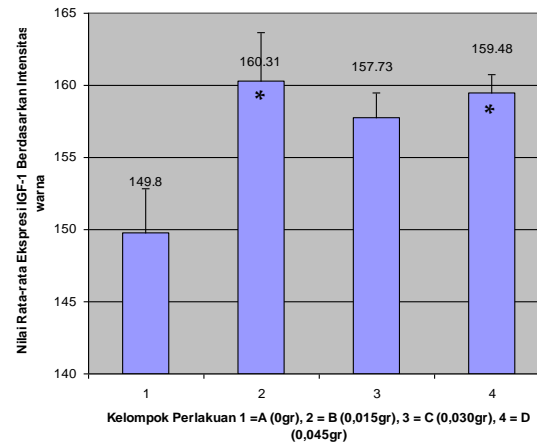
Gambar 1. Morfologi sel adiposit jaringan lemak visceral setelah perlakuan pemberian teh hitam hasil pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi anti PPAR γ . Gambar diambil dengan fotomikroskop olympus dengan perbesaran 400x. (Tanda panah menunjukkan perbandingan ukuran sel adiposit pada 4 kelompok). Keterangan: A. Kontrol; B. Perlakuan 0,015 g/hari; C. Perlakuan 0,030 g/hari; D. Perlakuan 0,045 g/hari.

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam terhadap Ekspresi IGF-1

Hasil Ekspresi IGF-1 pada adiposit jaringan lemak visceral setelah pemberian sari seduh teh hitam selama 90 hari menunjukkan penurunan, tetapi penurunan kadar IGF-1 tidak konsisten pada setiap perlakuan. Ekspresi IGF-1 adiposit jaringan lemak visceral dengan diet tinggi lemak menurun setelah dipapar dengan sari seduh teh hitam 0,015 g/hari tetapi meningkat pada perlakuan 0,030 g/hari dan kemudian diikuti penurunan ekspresi IGF-1 pada perlakuan 0,045 g/hari.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ekspresi IGF-1 pada perlakuan 0,015 g/hari dan 0,045 g/hari menurun secara nyata dibandingkan dengan kontrol, tetapi tidak didapatkan beda bermakna ekspresi IGF-1 antara

kontrol dengan perlakuan 0,030 g/hari sari seduh teh hitam.



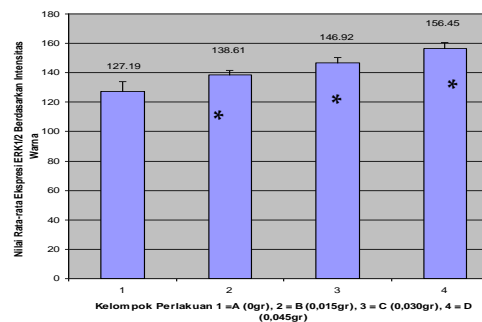
Gambar 2. Hubungan antara pemberian teh hitam terhadap intensitas warna ekspresi IGF-1 (*, signifikan pada $p \leq 0.05$).

Pada gambar diatas dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis sari seduh teh hitam dapat menekan peningkatan ekspresi IGF-1 adiposit lemak visceral tikus wistar dengan diet tinggi lemak meskipun tidak konsisten.

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam terhadap Ekspresi ERK1/2

Hasil Ekspresi ERK1/2 pada adiposit jaringan lemak visceral setelah pemberian sari seduh teh hitam selama 90 hari menunjukkan penurunan konsisten pada setiap perlakuan. Ekspresi ERK1/21 adiposit jaringan lemak visceral dengan diet tinggi lemak menurun setelah dipapar dengan sari seduh teh hitam 0,015 g/hari, 0,030 g/hari dan juga diikuti penurunan ekspresi ERK1/2 pada perlakuan 0,045 g/hari.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ekspresi ERK1/2 pada perlakuan 0,015 g/hari 0,030 g/hari dan 0,045 g/hari menurun secara nyata dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 3. Hubungan antara pemberian teh hitam terhadap intensitas warna ekspresi ERK1/2 (*, signifikan pada $p \leq 0.05$).

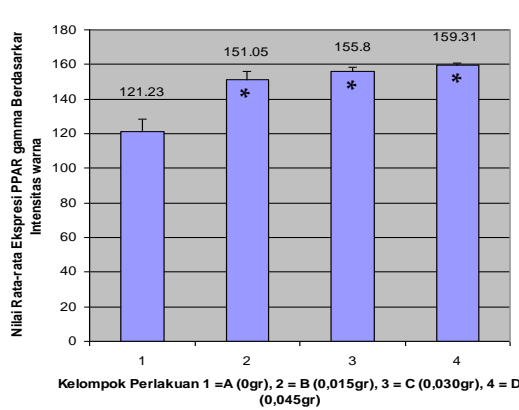
Pada gambar diatas dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis sari seduh teh hitam dapat menekan peningkatan ekspresi ERK1/2 adiposit lemak visceral tikus wistar dengan diet tinggi lemak secara konsisten.

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam terhadap Ekspresi PPAR γ

Untuk ekspresi PPAR γ pada adiposit jaringan lemak visceral dengan pemberian sari seduh teh hitam selama 90 hari menunjukkan penurunan konsisten pada setiap dosis perlakuan. Ekspresi PPAR γ adiposit jaringan lemak visceral dengan diet tinggi lemak menurun setelah dipapar dengan sari seduh teh hitam 0,015 g/hari, 0,030 g/hari dan juga diikuti penurunan ekspresi PPAR γ pada perlakuan 0,045 g/hari.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ekspresi PPAR γ pada perlakuan 0,015 g/hari 0,030 g/hari dan 0,045 g/hari menurun secara nyata dibandingkan dengan kontrol ($p \leq 0,05$).

Pada gambar di atas dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis sari seduh teh hitam dapat menekan peningkatan ekspresi PPAR γ adiposit lemak visceral tikus wistar dengan diet tinggi lemak secara konsisten.



Gambar 4. Hubungan antara pemberian teh hitam terhadap intensitas warna ekspresi PPAR γ (*, signifikan pada $p \leq 0.05$).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian teh hitam dosis 0,015 g, 0,030 g dan 0,045 g menyebabkan pengecilan morfologi sel adiposit (Gambar 1). Teh sebagai agen antiproliferasi berperan di dalam pengontrolan massa sel adiposit dan juga sebagai agen anti hipertropi pada sel adiposit. Sebagian besar pertumbuhan jaringan lemak setelah lahir berasal dari hipertropi yang akan dapat mencapai ukuran 150 μ m pada beberapa spesies [11].

Marques *et al.* [7], menyebutkan bahwa induksi diet tinggi lemak akan meningkatkan ukuran sel lemak inguinal, apabila dibandingkan dengan hasil penelitian ini tampak dengan pemberian sari seduh teh hitam ukuran sel lemak mengalami penurunan pada tiga kelompok dosis perlakuan (peningkatan ukuran sel lemak dapat ditekan).

Rosen *et al.* [12], menyebutkan bahwa proses normal adipogenesis terjadi apabila terdapat perubahan fenotip adiposit yang menyebabkan perubahan morfologis serta adanya akumulasi lipid vakuola akibat induksi oleh faktor transkripsi kunci yaitu PPAR γ dalam proses adipogenesis. Pada penelitian ini, ukuran sel lemak kelompok kontrol berbeda dengan tiga kelompok perlakuan dosis teh hitam dalam hal ukuran vakuola sel lemak. Adanya inhibisi mekanisme kerja dari PPAR γ sebagai faktor transkripsi kunci adipogenesis, menyebabkan proses pemasukan asam lemak melintasi membran yang disandi oleh gen target PPAR γ dan pengikatan lemak intraseluler menurun oleh aktivitas metabolik senyawa aktif teh hitam. Hal ini berpengaruh terhadap ukuran sel lemak jaringan lemak visceral hasil proses adipogenesis yang secara normal memiliki vakuola besar. Akan tetapi, pada penelitian ini proses pembentukan karakteristik sel lemak normal tersebut terhambat oleh pemberian sari seduh teh hitam.

Pada hewan yang diberi pakan tinggi lemak dan kolesterol, teh hijau, teh hitam, serta polifenol teh menyebabkan pencegahan peningkatan lipida serum dan hati, menurunkan kolesterol total serum atau indeks aterogenik, dan meningkatkan ekskresi fekal dari lipida dan kolesterol total. Polifenol teh menghambat aktivitas *catechol-O methyltransferase* dan bereaksi sinergis dengan kafein untuk memperpanjang stimulasi simpatetik dari *thermogenesis* [13]. Hal tersebut mengindikasikan bahwa semakin besar dosis teh hitam yang diberikan pada kelompok perlakuan menyebabkan penurunan ukuran sel lemak akibat terhambatnya pemasukan asam lemak ke vakuola dan aktivitas *thermogenesis*.

Hasil penelitian juga diperoleh gambaran efek pemberian sari seduh teh hitam dapat menekan ekspresi IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) yang berperan sebagai suatu *growth factor* penting proses adipogenesis. IGF-1 bekerja secara autokrin pada sel lemak memegang peranan dalam stimulasi mitogenik maupun diferensiasi preadiposit menjadi adiposit. Menurut Scavo, *et al.* [14], menyebutkan bahwa secara *in vitro* IGF-1 bekerja melalui IGF-R kemudian mengalami

phosphorilasi substrat spesifik seperti Shc dan IRS-1. IGF-1 dalam proses adipogenesis dengan melalui 2 jalur signal transduksi yaitu MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) yang berperan pada mekanisme diferensiasi dan jalur PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) untuk proses pembelahan sel dan penekanan diferensiasi [3]. Ekspresi IGF-1 menurun pada kelompok perlakuan dari tiga dosis perlakuan yang berarti sari seduh teh hitam menghambat autophosphorilasi IGFR dan menyebabkan penurunan ekspresi IGF-1.

Adanya penghambatan reseptor tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya dimana pemberian EGCG dan *theaflavin* secara *in vitro* dilaporkan dapat menekan autophosphorilasi dari EGFR dan PDGFR sebagai reseptor dari kedua *growth factor* tersebut [15]. Penelitian ini menunjukkan semakin besar dosis teh hitam semakin rendah ekspresi dari IGF-1 setelah 90 hari perlakuan diet tinggi lemak ($p=0,00$) dengan taraf signifikansi $P<0,05$. Terjadinya variasi penurunan ekspresi dari IGF-1 untuk 3 kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol, dimungkinkan adanya proses homeostasis internal sel lemak. Posovsky *et al.* [16], menyebutkan pada preadiposit dan adiposit apoptosis memegang peranan penting dalam regulasi massa sel lemak. Reseptor untuk ligan apoptosis (CD 95, TRAIL-R1 dan 2, dan TNFR) diekspresikan baik pada sel adiposit manusia ataupun pada hewan. Penghambatan aktivitas autokrin dari IGF-1 akan memicu ligan untuk berikatan pada *death* reseptor serta menginduksi jalur apoptosis.

Adanya fluktuasi nilai rata-rata ekspresi IGF-1 pada 3 kelompok perlakuan adalah gambaran konsep pengurangan adiposit dengan apoptosis yang berkontribusi secara signifikan terhadap massa jaringan lemak. Pada penelitian ini juga diketahui ekspresi TNF- α meningkat. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa terjadinya apoptosis sel lemak pada hewan coba merupakan sebuah mekanisme homeostasis terhadap pengontrolan jumlah sel lemak akibat induksi ligand pemicu apoptosis. IGF-1 memiliki kemampuan untuk mempertahankan preadiposit dan adiposit dari induksi ligand pada reseptor apoptosis untuk segera melakukan program *cell death*. Pemblokiran jalur PI3K dan p38 MAPK akan memacu CD 95, TRAIL, dan TNF- α untuk segera berikatan pada reseptornya [16].

IGF-1 memediasi jalur *survival* melewati MAPK akan lebih dominan jika jalur PI3K tidak

dapat berfungsi. IGF-1 menginisiasi aktivasi jalur PI3K, p38 MAPK, p42/44 MAPK sebagai sinyal *survival* terhadap stimulasi ligan untuk apoptosis sel lemak seperti TNF- α [16]. Hal ini juga diperkuat dengan gambaran hasil uji regresi dimana jalur IGF-1 yang menginduksi terhadap PPAR γ memiliki koefisien lebih besar dibandingkan melalui jalur ERK1/2. Hal ini berarti, akibat terhambatnya aktivitas ERK1/2, maka untuk menjaga homeostasis massa jaringan lemak aktivitas jalur PI3K akan meningkat. Adanya fluktuasi nilai ekspresi dari IGF-1 dimungkinkan karena aktivitas *survival* terhadap inhibisi jalur ERK1/2 oleh pemberian teh hitam dan meningkatnya ekspresi TNF- α . Yu *et al.* [15], menyatakan bahwa efek penghambatan autophosphorilasi *growth factor* pada reseptornya paling kuat terjadi oleh senyawa aktif dalam teh hitam yaitu TF3 (*Theaflavin-3-3'-digallate*). Sedangkan penelitian Bode dan Dong [17], memberikan hipotesis komponen aktif teh hitam diduga menghambat fosforilasi pada beberapa bagian seperti pada reseptor *growth factor*, pada jalur Ras, anggota jalur MAPKs dan aktivasi serta translokasi faktor transkripsi sitoplasmik. Jalur yang digunakan oleh IGF-1 adalah melalui jalur MAPK. Pada hasil penelitian ini, ekspresi dari ERK1/2 pada tiga kelompok dosis perlakuan mengalami penurunan. Hasil tersebut didukung oleh penelitian Chung *et al.* [18] yang menggunakan *mouse epidermal cell line* dengan pemberian EGCG dan TF3 berhasil menurunkan level fosforilasi jalur ERK1/2 dan MEK1/2 sampai 50%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa efek senyawa aktif teh hitam dapat menekan fosforilasi IGF-1 pada reseptornya dan menyebabkan penurunan ekspresi IGF-1 yang berkelanjutan dengan penurunan ekspresi ERK1/2. Akan tetapi, apakah dengan terjadinya penurunan ekspresi IGF-1 dan ERK1/2 menyebabkan ekspresi dari PI3K meningkat masih memerlukan penelitian lebih lanjut sebab jalur PI3K berperan dalam mitogenesis dan penekanan diferensiasi. Disamping itu, perlu penyelidikan lebih lanjut terhadap ekspresi protein jalur lain seperti Ras yang juga akan mengaktifkan jalur MAPK serta ekspresi dari beberapa protein *marker* untuk perubahan morfologi seperti MMP-14, Co6a1, dan Gjb3 yang berperan dalam proses akhir adipogenesis. Hasil analisis statistik dengan *one way Anova* menunjukkan makin besar dosis teh hitam

ekspresi ERK1/2 semakin menurun ($p=0,000$) dengan taraf signifikansi $p<0,05$.

Pemberian sari seduh teh hitam pada penelitian ini juga menyebabkan penurunan level ekspresi PPAR γ pada 3 kelompok dosis perlakuan. Ekspresi PPAR γ sendiri sangat tergantung dari *inducer* alami maupun sintetik yang akan mengaktifkannya. Selain itu, PPAR γ akan teraktivasi setelah terjadi induksi sinyal transduksi jalur MAPK khususnya jalur ERK1/2 untuk segera translokasi pada *coding region* di genom dan mengaktifkan gen-gen penting untuk tahap akhir diferensiasi [19]. Akan tetapi, pada penjelasan sebelumnya telah disebutkan bahwa terjadi penghambatan autofosforilasi dari IGF-1 pada reseptornya serta penurunan ekspresi ERK1/2. Akibat adanya penghambatan tersebut, dari hasil penelitian ini menunjukkan semakin besar dosis perlakuan ekspresi PPAR γ menurun secara signifikan ($p=0,000$) dengan taraf signifikansi $p<0,05$.

PPAR γ akan teraktivasi dan meningkatkan ekspresinya oleh ligan alami berupa asam lemak yang terdapat pada diet tinggi lemak sebagai *inducer* diferensiasi serta memicu peningkatan ekspresi *growth factor* IGF-1. Adanya inhibisi autofosforilasi IGF-1 pada reseptornya oleh senyawa aktif teh hitam mengakibatkan penurunan ekspresi PPAR γ secara tidak langsung. Chiba *et al.* [8] menyebutkan adanya induksi diet tinggi lemak khususnya VLDL akan meningkatkan ekspresi PPAR γ pada level mRNA. Senyawa aktif dalam teh hitam menyebabkan penurunan ekspresi dari PPAR γ memiliki kemungkinan jalur penghambatan, yaitu melalui penghambatan *growth factor* IGF-1 di reseptor membran dan jalur signal transduksinya yaitu jalur MAPK khususnya ERK1/2. Mekanisme kerja komponen senyawa aktif teh hitam mungkin langsung memblokir aktivasi PPAR γ pada *binding site* tempat ligan berikatan pada PPAR γ seperti yang dikemukakan dalam hipotesis Bode dan Dong [17] dan hal ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Komponen teh hitam dimungkinkan dapat menekan level ekspresi PPAR γ dengan menghambat ataupun menurunkan ekspresi faktor transkripsi lain yaitu kelompok C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) isoform serta SREBP1/ADD1 (*Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1*) ataupun pengikatan keduanya pada PPAR γ . Kedua faktor transkripsi ini merupakan aktivator PPAR γ dalam proses adipogenesis dan masih belum diketahui secara *in vivo* apakah komponen aktif teh hitam dapat .

Apabila ekspresi dan aktivasi dari PPAR γ terhambat ataupun menurun, proses akhir diferensiasi yang ditentukan oleh beberapa gen target PPAR γ juga akan terhambat dan secara tidak langsung proses diferensiasi juga menurun. Hal ini didukung oleh penelitian [20] yang menyebutkan penyisipan suatu sekuens basa (PTHrP) dalam kultur 3T3-L1 dapat menghambat aktivitas PPAR γ dan menyebabkan tingkat diferensiasi menjadi menurun. Tanabe *et al.* [21] juga menjelaskan adanya pemberian *stretching* mekanik pada kultur 3T3-L1 menyebabkan penghambatan aktivitas PPAR γ dengan *down regulation* jalur ERK/MAPK sehingga proses akhir dari diferensiasi preadiposit menjadi adiposit menurun secara signifikan.

Pada penelitian ini pemberian sari seduh teh hitam sebagai bahan alam yang menyebabkan penurunan ekspresi PPAR γ secara tidak langsung seperti yang disebutkan di awal akan menentukan perubahan morfologi serta akumulasi lipid pada vakuola sel lemak. Hal ini terjadi karena penghambatan autofosforilasi pada IGF-1 serta penurunan aktivitas jalur MAPK (khususnya ERK1/2) maka beberapa protein spesifik (*morphological modifier*) yang akan menginduksi PPAR γ juga akan menurun ekspresinya serta akan mempengaruhi terhadap bentuk dan ukuran akhir sel lemak setelah diferensiasi selesai. PPAR γ sendiri menurut Desvergne dan Wahli [22] sangat berperan untuk menginduksi gen spesifik seperti *aP2* yang berperan untuk pengikatan intraseluler asam lemak, *CPT1* untuk pemasukan asam lemak ke mitokondria, *FATP* untuk transport asam lemak melintasi membran, *GLUT 4* untuk homeostasis glukosa, *LPL* untuk pelepasan asam lemak dari trigliserida serta beberapa gen spesifik lain untuk tahap akhir diferensiasi dan apabila aktivasi serta ekspresi PPAR γ terhambat maka perubahan fenotip akhir sel lemak akan mengalami perubahan dibandingkan pada kondisi normal.

Pada hasil analisis jalur terlihat bahwa ekspresi IGF-1 memiliki keterkaitan baik pada ERK1/2 ataupun terhadap PPAR γ secara langsung. Dari kerangka konseptual dan gambaran mekanisme kerja dari IGF-1 sebagai *growth factor* seperti yang dikemukakan oleh Yu Hua *et al.* [3] dimana IGF-1 dalam mekanisme kerjanya untuk menginduksi proses diferensiasi dalam proses adipogenesis bisa melewati jalur MAPK khususnya jalur ERK1/2 ataupun jalur PI3K. Secara jelas nampak bahwa diantara ERK1/2 dan PPAR γ nilai keeratan hubungan fungsional yang cukup tinggi sesuai dengan koefisien regresi

(R=0,798 dan R=0,780) dan keduanya memiliki hubungan saling menginduksi dalam 2 arah/timbal balik. Dari analisis regresi diperoleh hasil bahwa ERK1/2 dan PPAR γ tidak memiliki hubungan fisiologis dua arah atau menginduksi balik yang cukup kuat terhadap IGF-1. Aktivitas ERK1/2 dan PPAR γ ditentukan oleh stimulasi IGF-1 yang bekerja terlebih dahulu pada reseptor membran dimana IGF-1 bekerja secara autokrin [4, 14, 23].

Berdasarkan hasil analisis jalur timbul suatu dugaan apabila teh hitam dapat menurunkan ekspresi dari IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ terlihat bahwa adanya induksi IGF-1 terhadap PPAR γ kemungkinan juga melewati jalur sinyal transduksi lain dilihat dari koefisien regresi lebih besar (0,721) dibandingkan induksi lewat jalur ERK1/2 (0,580). Hal ini memunculkan suatu hipotesis bahwa jalur PI3K yang disebutkan oleh Yu Hua *et al.* [3] dilalui oleh IGF-1 untuk menekan proses diferensiasi mungkin meningkat aktivitasnya dengan pemberian sari seduh teh hitam pada tikus yang diinduksi dengan diet tinggi lemak dan menyebabkan ekspresi PPAR γ sebagai faktor transkripsi kunci adipogenesis mengalami penurunan. Dari hasil penelitian ini perubahan ekspresi beberapa protein penting sebagai *marker* morfologis untuk proses diferensiasi yang berperan penting pada tahap akhir adipogenesis masih belum diketahui perubahan ekspresinya. Berdasarkan fakta hasil penelitian dan kajian teoritik maka hipotesis yang menyatakan bahwa sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) dapat menurunkan proses diferensiasi adiposit pada tikus wistar yang diberi diet tinggi lemak melalui pencegahan peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ terbukti.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan dari hasil penelitian ini maka dapat dibuat suatu kesimpulan sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) dapat mencegah peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada tikus wistar yang diberi diet tinggi lemak.

Masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh teh hitam secara *in vivo* terhadap ekspresi protein *biomarker* MMP-14, Co6a1, dan Gjb3, jalur sinyal transduksi PI3K dan faktor transkripsi C/EBP, SREBP serta bagaimanakah pengaruh teh hitam terhadap ekspresi protein CD95, TRAIL dan TNF- α sebagai pemicu apoptosis sel lemak pada proses adipogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Lin L., Delta-Fera M.A., dan Baile C.A. 2005. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocyte. *Obesity a Research Journal*. 13 (6): 982-990.
- [2] Adiningsih S. 2005. Indonesia nutritional pattern in contributing prevalence of obesity. Faculty of Public Health. Airlangga University. Surabaya.
- [3] Yu H.T., Atul J.B., Efi K., Vijay K.Y., Cullen M.T., Kristina M.K., Aaron M.C., Michio N., Kazuaki Y., Mary E.P., dan Kahn C.R. 2005. Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nature Cell Biology*. 7(6): 601-611.
- [4] Kamai Y., Mikawa S., Endo K., Sakai H., dan Komano T. 1996. Regulation of Insulin-Like Growth Factor-I expression in mouse preadipocyte Ob1771 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (17): 9883-9886.
- [5] Leung L.K., Su Y., Chen R., Zhang Z., Huang Y., dan Chen Z. 2001. Theaflavin in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *The Journal Nutrition*. 131 (1): 2248-2251.
- [6] Bastie C., Holst D., Gaillard D., Jehl-Pietri C., dan Grimaldi P.A. 1999. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPAR δ promotes induction of PPAR γ and adipocyte differentiation in 3T3C2 Fibroblast. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (31): 21920-21925.
- [7] Marques B.G., Hausman D.B., Latimer A.M., Kras K.M., Grossman B.M., dan Martin R.J. 2000. Insulin-like Growth Factor I mediates high-fat diet-induced adipogenesis in Osborne-Mendel Rats. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 278 (3): 654-662.
- [8] Chiba T., Nakazawa T., Yui K., Kaneko E., dan Shimokado K. 2003. VLDL induces adipocyte differentiation in ApoE-Dependent manner. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (23):1423-1429.
- [9] Hartoyo A. 2003. Teh dan khasiatnya bagi kesehatan-sebuah tinjauan ilmiah. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- [10] Indra M.R. 2005. Dasar genetik obesitas visceral. Dalam Sumarno *et al.* (Eds). Fourth Basic Molecular Biology Course in Pathophysiology of Obesity. Program Pascasarjana UB. Malang. 61-72.

- [11] Indra M.R. 2005. Kultur adiposit Dan pemeriksaan adipositokin. Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang.
- [12] Rosen E.D., Walkey C.J., Puigserver P., dan Spiegelman B.M. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes and Development*. 14: 1293-1307.
- [13] Tuminah S. 2004. Efek teh hitam [*Camellia sinensis* O.K. var. Assamica (Mast)] sebagai salah satu sumber antioksidan. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran*. 144. 52-54.
- [14] Scavo L.M., Karas M., Murray M., dan Leroith D. 2004. Insulin-Like Growth Factor-I stimulate both cell growth and lipogenesis during differentiation on Human mesenchymal stem cells into adipocyte. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89 (7): 3543-3553.
- [15] Liang Y., Chen Y., Lin Y., Lin-Shiau S., Ho C., dan Lin J. 1999. Suppression of extracellular signals and cell proliferation by The black tea polyphenol, Theaflavin-3,3'-Digallate. *Carcinogenesis*. 20 (4): 733-736
- [16] Fischer-Posovszky P., Tornqvist H., Debatin K., dan Wabitsch M. 2004. Inhibition of Death-Receptor mediated apoptosis in human adipocytes by The (IGF-1)/IGF-1 receptor autocrine circuit. *Endocrinology*. 145 (4). 1849-1859.
- [17] Bode A.M. dan Dong Z. 2003. Signal transduction pathways: targets for green and balck tea polyphenols. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 36 (1): 66-77.
- [18] Chung J.Y., Park J.O., Phyu H., Dong Z., dan Yang C.S. 2001. Mechanism 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 Journal of the Federation of America Societies for Experimental Biology*. 15: 2022-2024.
- [19] Gregoire F.M., Smas C.M., dan Sul H.S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*. 78 (3): 783-809.
- [20] Chan G.K., Deckelbaum R.A., Bolivar I., Goltzman D., dan Karaplis A.C. 2001. PTHrP inhibits adipocyte differentiation by down-regulating PPAR γ activity via a MAPK-dependent pathway. *Endocrinology*. 142 (11): 4900-4909.
- [21] Tanabe Y., Koga M., Saito M., Matsunaga Y., dan Nakayama K. 2004. Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching THROUGH ERK-mediated down regulation of PPAR γ 2. *Journal of Cell Science*. 117: 3605-3614.
- [22] Desvergne B. dan Wahli W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor: nuclear control-metabolism, *Endocrine Rev*. 20 (5): 649-688.
- [23] Boney C.M., Gruppuso P.A., Faris R.A., dan A.R. Frackelton. 2000. The critical role of Shc in Insulin-Like Growth Factor-I mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 Preadipocyte. *Molecular Endocrinology*. 14 (6):805-813.