

Respon Proliferasi, Diferensiasi dan Ekspresi C/EBP α Akibat Paparan Quercetin Pada Kultur Preadiposit Tikus (*Rattus Norvegicus*) Strain Wistar Secara *In Vitro* *

Retty Ratnawati *), Satuman, dan Tinny E. Hernowati **)

*) Laboratorium Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

***) Patologi Klinik, RS. Saiful Anwar, Malang

E-mail : rettyratnawati@yahoo.com / rettyr.fk@ub.ac.id

ABSTRACT

Introduction. Obesity is a metabolic syndrome as risk factor to the cardiovascular disease. Obesity occurs caused by adipocyte massive that is started by proliferation and differentiation of preadipocytes that involves transcription factors such as C/EBP α , PPAR γ and SREBP-1. Is known the TNF α and [Ca²⁺]_i Increase when adiponectin decrease at the end of adipocyte differentiation. Therefore it is a deemed treat the obesity through the inhibition of adipocyte proliferation and differentiation using natural resources. Quercetin in due of the flavonoid found in apple, vegetables etc. The aim of this study is to prove the affectivity of quercetin to inhibit proliferation and differentiation of preadipocyte through inhibited of C/EBP α in rat preadipocytes culture method.

Methods. Their study was a laboratory experimental. Quercetin was exposed to the preadipocytes human culture, after it was induced by differentiation stimulator the doses quercetin was grouped in: control, 50 μ M (Q50), 125 μ M (Q125) and 625 μ M (Q625) groups. The amount of proliferation and differentiation was descriptive analyzed. The expression of C/EBP α , were identified by Immunocytochemistry and western blotting.

Result. Quercetin 100 inhibited the rate of proliferation cell, while quersetin 625 inhibited differentiation in preadipocytes culture. There was a dose dependent to quersetin towards the decrease of PPAR γ

expression and C/EBP α expression in this preadipocytes culture.

Conclusion. It is conclusion that quersetin inhibits proliferation and differentiation preadipocytes culture through the decrease of the expresion of C/EBP α .

Keywords: quercetin, preadipocyte, differentiation.

Latar Belakang. Obesitas merupakan faktor resiko untuk beberapa penyakit misal *non-insulin-dependent diabetes*, hipertensi, hiperlipidemia dan penyakit kardiovaskuler. Obesitas disebabkan oleh tidak hanya hipertropi jaringan adipose tetapi juga hiperplasi jaringan adipose. Hal ini dipengaruhi oleh adanya mekanisme diferensiasi dari preadiposit menjadi adiposit. Diferensiasi sel merupakan proses kompleks yang melibatkan faktor adipogenik seperti *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ)¹, IGF-1 dan LPL. Quersetin merupakan golongan flavonoid dan diketahui sebagai antioksidan. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa quersetin dapat menghambat proliferasi sel kanker. Penelitian tentang peranan quersetin terhadap diferensiasi adiposit masih sangat terbatas. Pada penelitian ini dilakukan untuk menguji pengaruh quersetin terhadap jumlah proliferasi dan diferensiasi serta ekspresi C/EBP α sebagai faktor diferensiasi adipose.

Metode. Sel preadipose ditumbuhkan dalam media yang mengandung stimulator

diferensiasi standart seperti insulin, dexamethasone, IBMX dan FBS. Setelah satu hari, kultur preadiposit diinkubasi dengan quersetin. Dosis quersetin yang diberikan adalah 0, 50, 125 dan 625 μM . Setelah dipapar quersetin selama 24 jam, jumlah proliferasi sel dihitung dengan uji MTT sedangkan jumlah diferensiasi dihitung berdasarkan perubahan morfologi sel. Ekspresi C/EBP α dianalisa dengan teknik imunositokimia.

Hasil. Hasil perhitungan jumlah proliferasi preadiposit menunjukkan penurunan secara nyata pada perlakuan 125 μM ($19,56 \pm 7,30$) sedangkan pada perlakuan quersetin 625 μM ($62,68 \pm 18,40$) terjadi peningkatan ($p \leq 0,05$). Jumlah sel yang berdiferensiasi menurun setelah sel preadiposit dipapar dengan quersetin. Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa diferensiasi sel menurun secara nyata pada perlakuan 125 μM ($24,08 \pm 16,10$) dibandingkan dengan kontrol ($65,84 \pm 16,92$) dan quersetin 50 μM . Diferensiasi sel kembali meningkat pada perlakuan 625 μM ($28,05 \pm 6,24$). Hasil analisa imunositokimia menunjukkan bahwa pemberian quersetin 625 μM dapat menurunkan ekspresi C/EBP α dibandingkan dengan kontrol.

Kesimpulan. Quersetin dengan dosis optimal 125 μM dapat menurunkan jumlah proliferasi dan diferensiasi melalui penghambatan ekspresi C/EBP α pada kultur preadiposit tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang distimulasi dengan faktor diferensiasi standart.

Kata kunci: Quersetin, proliferasi, diferensiasi, preadiposit.

PENDAHULUAN

Obesitas dicirikan dengan kelebihan jaringan adiposa dan merupakan masalah kesehatan global dimana prevalensinya semakin meningkat di dunia (WHO, 2007).

Obesitas merupakan faktor resiko terjadinya beberapa penyakit seperti diabetes mellitus tipe 2, aterosklerosis dan penyakit jantung koroner. Obesitas berkaitan dengan penambahan massa jaringan adiposa yang dihasilkan dari peningkatan ukuran sel adiposa (hipertropi) dan jumlah sel adiposa (hiperplasia). Volume adiposit menggambarkan keseimbangan antara lipogenesis dan lipolisis sedangkan volume adiposit ini ditentukan oleh perubahan (diferensiasi) *adipocyte precursor cell* (preadiposit) menjadi *mature adipocyte* (adiposit matang) dan kematian sel (apoptosis). Apabila mekanisme proliferasi dan diferensiasi preadiposit tidak diimbangi dengan program kematian sel terutama apoptosis maka terjadi peningkatan hipertropi dan hiperplasia (Evan *et al*, 2000).

Ada tiga molekul yang terlibat pada saat awal terjadinya diferensiasi adiposit yaitu CCAAT-*enhancer binding protein- α* (C/EBP α), *peroxisome proliferator activated receptor γ* (PPAR γ) dan *sterol regulated enhancer binding protein* (SREBP)-1 (Francine *et al*, 1998). Stimulator diferensiasi (dexamethasone, isobutyl methyl xanthine, insulin) menyebabkan aktivasi C/EBP kemudian meregulasi PPAR γ dan SREBP-1. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa paparan stimulator diferensiasi mampu meningkatkan ekspresi PPAR γ , C/EBP α , dan kalsium intraseluler pada preadiposit (Ratnawati dkk, 2007).

Pada akhir diferensiasi, gen terstimulasi untuk mensintesis beberapa protein dan sitokin yang dapat bertindak sebagai biomarker terjadinya sindroma metabolik. Salah satu sitokin yang disekresi oleh adiposit adalah leptin dan adiponektin. Peningkatan kadar leptin dalam darah manusia dapat mengakibatkan resistensi leptin, resistensi insulin dan aterosklerosis. Indra dkk, 2007 menyimpulkan bahwa

paparan leptin dosis 25 ng/mL pada sel endotel mampu meningkatkan ekspresi *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) dan PPAR γ . PPAR γ berfungsi untuk menginduksi terjadinya resistensi insulin sedangkan VCAM-1 berperan pada awal terjadinya aterosklerosis. Karena mekanisme diferensiasi sel adiposit sangat berkaitan dengan patogenesis sindroma metabolik maka perlu dilakukan penghambatan proliferasi dan diferensiasi preadiposit serta stimulasi apoptosis preadiposit dengan menggunakan penghambat yang efektif dan aman seperti bahan alami.

Indonesia mempunyai kekayaan nutrisi dan bahan alam yang berpotensi sebagai obat yang berbasis *natural drug*, tetapi masih perlu penelitian lebih mendalam. Quercetin termasuk flavonoid yang banyak terkandung di bawang kuning, cherry, tomat, brokoli, apel, teh hijau, teh hitam, anggur dan blueberry. Quercetin diketahui sebagai antioksidan yang dapat menghambat radikal bebas, xanthine oxidase, *inducible nitric oxide synthase* (iNOs) dan menghambat ekspresi Akt/PKB dan ERK. Peranan quercetin pada sel adiposa masih belum banyak diketahui (Morand *et al*, 1998; Moskuag *et al*, 2004; Peluso, 2006). Menurut Hui dan Chen (2007) mengatakan bahwa quercetin dapat menghambat akumulasi lipid pada kultur preadiposit 3T3-L1. Sampai saat ini masih belum diketahui tentang peranan quercetin terhadap penghambatan proliferasi dan diferensiasi adiposit. Karena itu perlu penelitian untuk mengetahui mekanisme penghambatan quercetin terhadap C/EBP α , SREBP-1 dan sekresi adipositokin yang berperan dalam diferensiasi preadiposit dan patogenesis faktor resiko obesitas.

Penelitian ini dilakukan selama 3 (tiga) tahun. Tahun pertama bertujuan untuk mengetahui dosis optimum quercetin,

mekanisme penghambatan C/EBP α dan SREBP-1 dan akumulasi lipid yang terlibat dalam proliferasi dan diferensiasi adiposit secara nutripoteomik. Tahun kedua, mengetahui peranan quercetin dosis optimum dalam menghambat sekresi adiposit seperti mRNA leptin dan mRNA adiponektin serta peranannya terhadap apoptosis sel. Tahun ketiga, penelitian dilakukan secara *in vivo* pada tikus strain Wistar. Pada tahap ini dilakukan untuk mengetahui peranan quercetin terhadap reseptor leptin dan ERK1/2 MAPK.

METODE PENELITIAN

Isolasi Sel dan Kultur Sel. Preadiposit diisolasi dari jaringan lemak tikus (umur: 4-8 minggu). Jaringan fibrous dan pembuluh darah dibuang; jaringan adipose dicuci kemudian jaringan dicacah. Suspensi jaringan diinkubasi dengan 0,2 % mg/ml Collagenase tipe I (Sigma) selama 45 menit, 37 °C dengan *shaking*. Inkubasi dihentikan dengan menambahkan media kultur (DMEM/F12 (1:1) yang ditambahkan dengan 15 mmol/l HEPES, 14 mmol/l NaHCO $_3$, 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 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. 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 (Karsten *et al*, 2005).

Induksi diferensiasi sel. 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 µg/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 (Karsten *et al.*, 2005).

Perlakuan Quercetin (Sigma, USA)

Setelah diinkubasi media adipogenik, sel dicuci dan diperlakukan quercetin. Metode perlakuan ini merujuk hasil penelitian Kobuchi *et al* (1999). Kadar quercetin terdiri dari 4 level yaitu 0 (kontrol), 50 µM, 125 µM, dan 625 µM. Setelah ditambahkan sel diinkubasi pada 37°C, 5 % CO₂ dan 95 % kelembaban udara selama 6 jam.

Jumlah proliferasi dan diferensiasi adiposit.

Sebelum dan setelah inkubasi media adipogenik, sel yang mengalami proliferasi dan diferensiasi dihitung. Demikian juga sebelum dan sesudah inkubasi quercetin selama 6 jam. Metode perhitungan proliferasi dan diferensiasi ini merujuk Karsten *et al*, 2005).

Identifikasi protein C/EBPα 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 SREBP-1, C/EBPα 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 Diamino Benzidine (DAB) dalam buffer DAB. Sel ditetesi dengan courstexin dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit. Jaringan dicuci dengan air kran kemudian dicuci dengan aquades selama 10 menit. Jaringan dibiarkan pada suhu kamar. Jaringan diletakkan pada *object glass* dan ditetesi dengan entellan (Keiko *et al*, 2007).

Pengamatan Akumulasi Lipid. Metode pengecatan Oil Red O merujuk pada Johnson *and* Greenwood (1988). Sel pada masing-masing perlakuan difiksasi dengan 10 % formalin. Sel yang ada di *well* dicuci dengan aquades 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 aquades kemudian ditetesi hematoxylin selama 1 menit. Sel dicuci dengan air dan ditunggu sampai kering. Sel diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400 X.

HASIL PENELITIAN

Kultur preadiposit merupakan model kultur yang optimal untuk mengamati diferensiasi adiposit. Pada penelitian ini menggunakan induser diferensiasi dengan memaparkan INS, DEX, IBMX dan insulin selama 1 hari. Pada penelitian ini telah

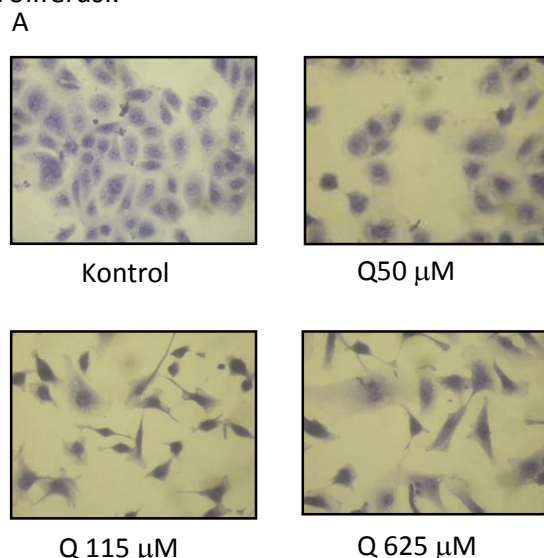
digunakan quersetin (Q) (Sigma) untuk membuktikan pengaruh senyawa aktif teh hitam tersebut terhadap proliferasi, diferensiasi dan preadiposit.

Perubahan prosentase jumlah sel, diferensiasi dan undiferensiasi preadiposit akibat paparan quersetin.

Proliferasi sel dihitung berdasarkan jumlah sel baik sel yang mengalami diferensiasi maupun tidak berdiferensiasi. Jumlah diferensiasi sel preadiposit visceral 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).

Proliferasi dan diferensiasi adiposit dapat dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan, antara lain media. Penelitian ini menggunakan media adipogenik untuk mestimulasi proliferasi dan diferensiasi preadiposit menjadi adiposit dewasa. Media tersebut mengandung insulin (INS), dexamethasone (DEX), isobutyl methylxantine (IBMX) dan *Fetal bovine serum* (FBS). Setelah preadiposit visceral diinkubasi dengan media adipogenik selama 24 jam, sel dipapar dengan quersetin (bioaktif apel) dengan beberapa kadar yaitu 0, 50, 125 dan 625 μM . Paparan quersetin ini ternyata mampu menghambat proliferasi dan diferensiasi preadiposit visceral. Secara morfologi, pengaruh quersetin terhadap proliferasi, diferensiasi dan undiferensiasi preadiposit dapat dilihat pada gambar 1A. Jumlah sel total, prosentase sel yang diferensiasi dan undiferensiasi mengalami penurunan setelah dipapar dengan quersetin (Gambar 4B.). Hasil perhitungan jumlah sel total preadiposit menunjukkan penurunan secara nyata pada perlakuan 100 μM ($28,80 \pm 17,16$) dibandingkan dengan

kontrol (100%) dan Q50 ($73,08 \pm 54,40$), Jumlah sel kembali meningkat pada perlakuan Q 125 μM ($92,04 \pm 48,01$) sehingga bedanya tidak bermakna terhadap kontrol dan Q50 ($p < 0,05$). Prosentase jumlah preadiposit yang berdiferensiasi menurun setelah sel dipapar quersetin. Hasil analisa statistik (Tabel 3) menunjukkan bahwa diferensiasi sel menurun secara nyata pada perlakuan Q125 μM ($24,08 \pm 16,09$) dan Q625 μM ($28,08 \pm 6,24$) dibandingkan dengan kontrol ($65,84 \pm 16,92$) dan Q50 μM ($64,93 \pm 10,46$). Di sisi lain, prosentase jumlah undiferensiasi sel mengalami peningkatan secara signifikan pada perlakuan Q125 ($75,92 \pm 16,10$) dan Q625 μM ($71,95 \pm 6,24$) dibandingkan dengan kontrol ($34,16 \pm 16,92$) dan Q50 ($35,07 \pm 16,92$). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa quersetin 100 μM mampu menghambat proliferasi dan diferensiasi preadiposit. Penghambatan diferensiasi masih terjadi pada quersetin 625 μM , tetapi pada kadar tersebut justru terjadi peningkatan proliferasi.



Gambar 1. A. Morfologi sel preadiposa setelah diinkubasi dengan quersetin (Q) 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 Q 50 μM sel sudah berdiferensiasi membentuk adiposa dewasa. Sedangkan pada perlakuan Q 125 dan 625 μM sel masih berbentuk *fibroblast-like preadipocyte* Perbesaran 400 X. **B.** Prosentase jumlah sel total, diferensiasi dan undiferensiasi preadiposit. Pada grafik di atas menunjukkan bahwa pada Q100 prosentase jumlah sel total menurun secara nyata dibandingkan dengan kontrol dan Q50 tetapi perlakuan Q200 jumlah sel mengalami peningkatan. Diferensiasi sel pada perlakuan Q 125 dan 625 μM menurun secara nyata dibandingkan kontrol dan Q 50 μM sedangkan pada undiferensiasi, perlakuan Q125 dan 625 meningkat secara nyata dibandingkan dengan kontrol dan Q50 ($p < 0.05$).

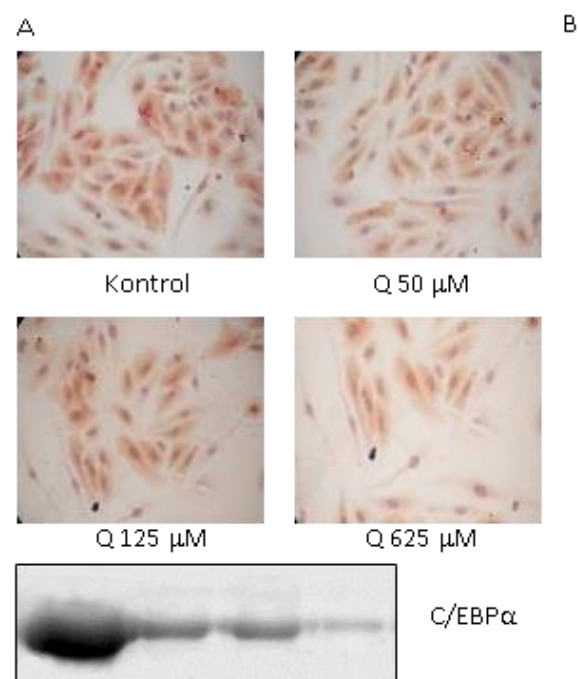
Parameter	Perlakuan	Jumlah Pengamatan	Mean \pm SD
Jumlah Sel	Kontrol	25	100 \pm 0,00 **
	Q50 μM	25	73,08 \pm 54,40 **
	Q125 μM	25	28,80 \pm 17,16 *
	Q625 μM	25	92,04 \pm 48,01 **
Prosentase Diferensiasi Sel	Kontrol	25	65,84 \pm 16,92 **
	Q50 μM	25	64,93 \pm 10,46 **
	Q125 μM	25	24,08 \pm 16,09 *
	Q625 μM	25	28,05 \pm 6,24 *
Prosentase Undiferensiasi Sel	Kontrol	25	34,16 \pm 16,92 *
	Q50 μM	25	35,07 \pm 16,92 *
	Q125 μM	25	75,92 \pm 10,46 **
	Q625 μM	25	71,95 \pm 6,24 **

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

Peranan quersetin dalam penghambatan ekspresi C/EBP α .

Ekspresi C/EBP α pada kultur preadiposit akibat paparan quersetin diamati dengan menggunakan metode imunositokimia dan dibandingkan ekspresinya dengan western blot. CCAAT enhancer

binding protein α (C/EBP α) diketahui mempunyai berat molekul 57 kDa. Hasil analisis imunositokimia dan perhitungan jumlah sel yang terekspresi menunjukkan bahwa ada penurunan ekspresi C/EBP α jika preadiposit dipapar dengan quersetin dosis tinggi. Hasil identifikasi C/EBP α dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 2. Profil ekspresi C/EBP α pada preadiposit visceral baik pada imunositokimia (A) dan Western blot (B). Pada perlakuan Q 625 μM , ekspresi C/EBP α yang berwarna coklat tampak ekspresinya turun dibandingkan dengan kontrol, Q 50, 125 dan 625 μM . Penghambatan C/EBP α juga dapat dilihat pada profil Western blot (B). Jadi quersetin dapat menurunkan ekspresi C/EBP α . Data disajikan dalam Mean \pm SD. Perbesaran 400 x.

Tabel 2. Hasil analisis statistik C/EBP α dengan One Way Anova.

Perlakuan	Ulangan	Mean \pm SD
Kontrol	6	75,17 \pm 11,16 ^a
Q 50	6	67,83 \pm 14,26 ^a
Q 125	6	63,83 \pm 12,24 ^a
Q 625	6	28,50 \pm 14,68 ^b

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata.

PEMBAHASAN

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) Paling sedikit ada tiga jalur yang berperan dalam diferensiasi preadiposit yaitu jalur sinyal *cAMP-dependent protein kinase*, glukokortikoid dan IGF-1/insulin. Pada kondisi terstimulasi, ketiga jalur tersebut akan menstimulasi IKK, kemudian. IKK akan mengaktifkan I κ B α . Selanjutnya I κ B α yang teraktifasi akan memfosforilasi dan mengaktifkan NF- κ B subunit p65 dan p50. Subunit p65 dan p50 ini bermigrasi ke inti sel kemudian menstimulasi faktor transkripsi untuk menstimulasi gen penyandi protein yang dibutuhkan untuk proliferasi dan diferensiasi sel sedangkan I κ B α terdegradasi (12,13,14,15). 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 (16).

Sementara itu Lin et.al. (2005) melaporkan bahwa quersetin dosis 200 μ M merupakan dosis efektif untuk menurunkan jumlah dan ukuran droplet lipid., prosentase angka dan jumlah total sel 3T3-L1 pada kultur adiposity. Hasil lain yang dilaporkan adalah setelah paparan 24 jam dengan quersetin dosis 50 dan 200 μ M meningkatkan apoptosis

adiposity, namun tak signifikan pada dosis quersetin 100 μ M.

Selain itu juga dilaporkan adanya efek inhibisi pada diferensiasi yaitu adanya apoptosis yang meningkat selama proses diferensiasi dengan quersetin. Hal ini menunjukkan bahwa quersetin dapat mereduksi massa jaringan lemak melalui inhibisi maturasi dan meningkatkan sel yang mati (Lin et al. 2005). Tetapi studi Lie et al (2005) ini tidak dapat menunjukkan peningkatan apoptosis pada kultur pre adiposity setelah diinkubasi dengan quersetin selama 24 jam. Hal ini yang tidak sama dengan hasil yang telah dicapai di laboratorium kami. Alasan perbedaan hasil ini diduga akibat dari jenis kultur sel yang digunakan, pada studi kami menggunakan kultur primer pada manusia sedangkan pada Lin et al (2005) menggunakan cell line 3T3-L1. Sedangkan perbedaan lainnya belum dapat kami laporkan. Dibutuhkan studi untuk elaborasi mekanismenya lebih lanjut.

Dugaan mekanisme inhibisi adipogenesis akibat paparan quersetin dapat melibatkan mitogen activated protein kinase (MAPK), khususnya extracellular signal regulated kinases (ERKs) yang distimulasi oleh sinyal-sinyal faktor pertumbuhan (Lin et al, 2005). Quersetin dilaporkan lebih efektif menurunkan jumlah protein phospho-ERK1/2 (Hung et.al., 2005; Liu et.al. , 2006). Namun Hung et al., (2005) juga melaporkan bahwa tidak meningkatkan ekspresi protein Cdk2 pada inkubasi quersetin 24 jam pada kultur preadiposit 3T3-L1, tetapi diperlihatkan bahwa dosis 20-100 μ M menurunkan aktivitas Cdk2, yang dikenal sebagai protein yang meregulasi mitogenesis sel secara down-stream.

Mekanisme penghambatan theaflavin terhadap proliferasi dan diferensiasi sel terkait dengan jalur sinyal *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Chung, et al., (23)

melaporkan bahwa TF-3,3'-dG berpotensi dan secara cepat menghambat protein fosfo-Erk1/2 dan MEK1/2. 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.*, (15) dan Masaaki *et al.*, (25) melaporkan bahwa theaflavin menghambat fosforilasi *Inhibitory kappa B alpha* ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) pada gugus asam amino Serin 32. 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 Zigang (26) 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).

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) (27). Pada penelitian ini dilakukan pengujian pemberian theaflavin terhadap ekspresi faktor transkripsi reseptor nuklear PPAR γ , IGF-1 dan LPL. 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 (27,28). 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.*, (28) dan Rosen *et al.*, (29) menyatakan bahwa secara langsung beberapa inducer tersebut akan menstimulasi *CCAAT-enhancer binding protein* (C/EBP) β dan C/EBP δ . 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 (*crosstalk*). *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.*, (30) melaporkan bahwa adanya inducer diferensiasi adiposit menyebabkan aktivasi jalur sinyal MEK/Erk sampai dengan 12 jam awal adipogenesis. 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.

Penurunan ekspresi C/EBP α dan SREBP-1 akibat pemberian quersetin ini sangat terkait dengan penurunan ekspresi PPAR γ tetapi mekanismenya belum diketahui. Menurut Rosen *et al.*, (23) PPAR γ bersama C/EBP α menstimulasi beberapa gen yang berperan dalam metabolisme seperti *glucose transporter-4* (GLUT-4), IGF-1, lipoprotein lipase (LPL) dan *adipocyte-specific fatty acid-binding protein* (aP2). Pada awal diferensiasi adiposit, hormon pertumbuhan meningkat. Peningkatan hormon ini menstimulasi gen transkripsi IGF-1 yang sangat penting dalam diferensiasi adiposit. Hongbin *et al.*, (4) menyatakan bahwa IGF-1 secara autokrin / parakrin disekresi oleh adiposit untuk menginduksi diferensiasi melalui aktivasi p42 / p44 MAPK dan *Insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP). Dalam adipogenesis, aktivitas IGF-1 melibatkan mekanisme fosforilasi-defosforilasi, reseptor IGF-1 dan sinyal intraseluler dan protein Raf-1. Awal terjadinya sinyal Raf-1 tidak mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) atau RS kinase tetapi mengaktifkan jalur antara aktivasi Raf-1 dengan MAPK/RSK yaitu serine/threonine kinase Akt (PKB). Akt diaktivasi oleh insulin dan faktor pertumbuhan lainnya melalui jalur *phosphatidylinositol 3-kinase* (21;4).

Penurunan droplet lipid akibat paparan quersetin pada studi ini mungkin ada kaitannya dengan penurunan ekspresi PPAR γ . Penurunan aktivasi PPAR γ menyebabkan berkurangnya stimulasi penyimpanan *fatty acid* (FA) di dalam adiposit *mature* melalui berbagai mekanisme seperti pelepasan dari trigliserida yang terkandung dalam partikel lipoprotein dengan cara menstimulasi LPL, transportasi FA intrasel, aktivasi *acyl-CoA-*

synthase dan esterifikasi FA dengan menstimulasi gen PEPCK. Berkurangnya stimulasi penyimpanan FA ini juga berkaitan dengan penurunan diferensiasi adiposit (31). Penghambatan ekspresi C/EBP α dan SREBP-1 akibat paparan quersetin pada penelitian ini merupakan sebagian kecil dari mekanisme molekular penghambatan diferensiasi dan proliferasi adiposit yang sangat kompleks dan melibatkan efektor positif maupun negatif yang selanjutnya mengatur jalur sinyal transduksi yang berkaitan dengan pengaturan diferensiasi dan proliferasi.

KESIMPULAN

Quersetin mampu menghambat proliferasi dan diferensiasi kultur preadiposit melalui penurunan ekspresi C/EBP α dan SREBP-1. Dosis optimum quersetin untuk menghambat proliferasi dan diferensiasi preadiposit adalah 200 μ M.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal BB. Tumour necrosis factor receptor associated signaling molecules and their role in activation of apoptosis. *JNK and NF-kappa B. Ann. Rheum. Dis.* 2000;59:6-16.
- Benito, Sonia, Susana Buxaderas, and M. Teresa Mitjavila. Flavonoid metabolites and susceptibility of rat lipoproteins to oxidation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2819–H2824, 2004
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scriver PE. The adipocyte-secreted protein Acrp 30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med* 7: 947-953.2001
- Byyny, RL., Loverde, M., Lloyd, S., Mitchell, W and Draznin, B., Cytosolic calcium and insulin resistance in elderly patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 5;459-464.1992.

- Calamia KT. Current and future use of anti-TNF agents in the treatment of autoimmune, inflammatory disorders. *Adv. Exp. Med. Biol* 2003;528:545-9.
- Davis W. Lamson, MS, ND, and Matthew S. Brignall. Antioxidants and Cancer III: Quercetin. *Altern Med Rev*.5(3):196-208.2000Bottom of Form
- Depkes, RI. Profil kesehatan Indonesia 2001. Jakarta. 2004.
- Evan, DR., Christopher, JW., Pere P., and Bruce, MS. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Genes and Development* 14:1293-1307. 2000.
- Faraj M. Havel PJ. Phelis S. Blanck D. Snideman AD. Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectine, leptin and ghrelin before and after weight loss induce by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 1594-1602.2003.
- Ferre, P., The biology of peroxisome proliferator-activated receptor. Relationship with lipid metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes.* 53 (Suppl.1);S43-S50.2004
- Francine, M. Gregoire, Cynthia M. Smas and Hei Sook Sul. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological review.* Vol. 78 No.3. 1998.
- Fuller, S., Khasiat teh hijau. Prestasi pustaka Publisher. Jakarta. 2004
- Gabriele ES. Glenn RK. and Ahmed HK. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obesity research.* Vol. 12. No.2. 2004.
- Hui-Chun Yeh and Chu-Liang Chen. Flavonoid Inhibits Fat Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes. *Tunghai Journal* Volume 45 : 15~22, 2007
- Indra, MR. Satuman. Ekspresi VCAM-1 dan PPAR- γ pada sel endotel yang dipapar dengan 25 ng/ml leptin. in pressing.2007
- Indra, MR., Dasar genetik obesitas visceral. Fourth Basic Molecular Biology Cours in Patophysiology of Obesity, p: 61-73.2005.
- Inoue S., Kanazawa M, Yoshiike N, Osaka T, Numba Y, Zimmet P. Criteria and classification of obesity in Japan and Asia-Oceania. *Asia Pac J Clin Nutr.* Dec; 11 Suppl 8:S732-S737. 2002
- Johnson PR. and MRC, Greenwood. The adipose tissue. In: "Cell and Tissue Biology: A Textbook of Histology." (ed. by L. Weiss), 6th edition, Urban and Schwarzenberg, Baltimore, MD. pp. 191-209.1988.
- Jones, BH., Kim, JH., Zemel, MB., Woychik, RP., Michaud, EJ., Wilkinson, WO., and Moustaid N. Upregulation of adipocyte metabolisms by agouti protein: possible paracrine actions in yellow mouse obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 270:E192-E196.1996.
- Karsten H. Dennis VH. Kathrin C. Sevine H. Norbert P. Optimization of the differentiation of human preadipocytes in vitro. *Differentiation* 73:28-35. 2005.
- Keiko Morikawa, Chiharu Ikeda, Mitsuko Nonaka, Ikue Suzuki. Growth arrest and apoptosis induced by quercetin is not linked to adipogenic conversion of human preadipocytes. Vol.56 Issue 12. 2007
- Laurence D.J. and B. A. Gusterson. The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organism and in cancer cells. *Tumor Biol.* 11: 229-261. 1990.
- Morand, Christine, Vanessa Crespy, Claudine Manach, Catherine Besson, Christian Demigné, and Christian Re´me´sý.

- Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am. J. Physiol.* 275 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 44): R212–R219, 1998.
- Moskuag JO, Carlson H, Myhrstad M, et al. Molecular Imaging of the biological effects of Quercetin and Quercetin-rich foods. *Mechanism of Ageing and Development* 2004;125: 315-24.
- Murphy Karen J, Chronopoulos Andriana K, Singh I, et al. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003;77(6): 1466-73
- Pe'russe, L., Chagnon, YC., Weisnagel, J. The human obesity gene map: the 2000 update. *Obes Res.* 9: 135-169.2001.
- Peluso MR. Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. *Exp Biol Med* 231: 1287–1299, 2006
- Ratnawati,R., Indra,MR., Satuman. QUERSETIN of green tea inhibits differentiation, proliferation and TNF α in Primary culture of the human visceral preadipocyte. *MIFI*, in press. 2008
- Ratnawati,R., Indra,MR., Satuman. Green tea epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis in the primary human visceral preadipocyte culture. Presented in International Conference on Traditional Medicine and Medicinal Plants: Women's Health and Traditional Medicine. Surabaya 8-9 September 2007.
- Rosen ED. The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*: 979: 143-58.2002.
- Silvia Mandel, Orly Weinreb, Tamar Amit, et al. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases *Journal of Neurochemistry* 2004;88: 1555-69.
- Spanger L. Kroke A. Mohlig M. Wletek B. Harung HU. et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361: 226-228. 2003
- Taylor PC, Williams RO, Feldmann M. Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004;15: 557-63.
- Tomas E., Tsao TS., Saha AK., Murrey HE., Zhang CC., Itani SL. et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP 30 globular domain: acetyl CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99: 16309-16313. 2002.
- Wajant H, Henkler F, Scheurich P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell. Signal.* 2001;13: 389-400.