

# **Efek Ateroprotektif dan Vasoprotektif Katekin Teh Hijau terhadap Ekspresi eNOS pada Tikus Wistar Jantan dengan Diet Tinggi Lemak**

Erna Susanti<sup>1</sup> Retty Ratnawati<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dosen Akademi Analis Farmasi dan Makanan Putra Indonesia Malang

<sup>2</sup>Lab. Ilmu Faal Divisi Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

## **ABSTRACT**

Catechins, isolate from green tea GMB4 clones could be developed as a potential preventive agent for atherosclerosis. This activity is thought to be based on the structure epimerisation, hydroxy phenolic and galloil group of these isolates. The purpose of this study is to prove the influence catechins, isolate from green tea, on the inhibition of the decrease eNOS expression in male wistar rats induced by high fat diet. The method used in this study consisted of ELISA for measurement of eNOS expression. The results showed that catechins inhibits the decreasing expression of eNOS at a dose of 6 mg / day and 24 mg / day was significantly but not dose 3mg / day. This suggests a dose 6mg / day and 24 mg / day is able to repair the damage signaling insulin on PI3K pathway caused by insulin resistance. These results are based on the ability of catechins as antioxidants. Catechins with hydroxy phenolic group is a potential electron donor to bind free radicals. Polyphenol catechins may also modulate signaling cellular processes such as NFκ, activator protein 1 DNA binding, glutathione biosynthesis, PI3K / Akt, MAPK pathway and the Nrf2 transcription factor that regulates expression of several antioxidant genes. It can be concluded catechins inhibits decreasing expression of eNOS at a dose of 6 mg / day and 24 mg / day and can be developed as an agent and vasoprotective ateroprotective.

Keywords: green tea catechins, eNOS expression, male wistar rats, a diet high in fat, and vasoprotektif ateroprotektif.

## **ABSTRAK**

Isolat golongan senyawa katekin teh hijau klon GMB 4 dapat dikembangkan sebagai agen preventif potensial untuk atherosklerosis. Aktivitas ini diduga didasarkan pada struktur epimerisasi, gugus hidroksi fenolik dan galloil dari isolat tersebut. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan efek katekin teh hijau terhadap penghambatan penurunan ekspresi eNOS pada tikus wistar jantan dengan diet tinggi lemak. Metode yang digunakan pada penelitian ini terdiri ELISA untuk pengukuran ekspresi eNOS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa katekin menghambat penurunan ekspresi eNOS pada dosis 6 mg/ hari dan 24 mg / hari secara bermakna tetapi tidak untuk dosis 3mg / hari. Ini menunjukkan dosis 6mg/ hari dan 24 mg / hari mampu memperbaiki kerusakan sinyaling insulin pada jalur PI3K yang disebabkan oleh resistensi insulin. Hasil ini didasarkan pada kemampuan katekin sebagai antioksidan. Gugus hidroksi fenolik

katekin diduga merupakan donor elektron yang potensial untuk berikatan dengan radikal bebas. Polifenol katekin diduga juga dapat memodulasi proses sinyaling seluler seperti NF- $\kappa$ B, ikatan DNA activator protein 1, biosintesis glutation, jalur PI3K/ Akt, jalur MAPK dan factor transkripsi Nrf2 yang meregulasi ekspresi beberapa gen antioksidan. Dengan demikian dapat disimpulkan katekin menghambat penurunan ekspresi eNOS pada dosis 6 mg/ hari dan 24 mg/hari dan dapat dikembangkan sebagai agen ateroprotektif dan vasoprotektif.

Kata kunci : katekin teh hijau, ekspresi eNOS, tikus wistar jantan, diet tinggi lemak, ateroprotektif dan vasoprotektif.

## LATAR BELAKANG

Penyakit Jantung Koroner ( PJK ) merupakan penyebab mortalitas dan morbiditas yang cukup tinggi. Berdasarkan data WHO diperkirakan 3,8 juta pria dan 3,4 juta wanita di seluruh dunia setiap tahun meninggal karena PJK. Atherosklerosis merupakan kontributor utama terhadap patogenesis terjadinya penyakit jantung koroner yang menjadi penyebab utama kematian <sup>[1]</sup>. Salah satu faktor resiko yang menyebabkan progresivitas atherosklerosis adalah dislipidemia. Diet tinggi lemak dan obesitas merupakan salah satu pencetus dislipidemia. Diet tinggi lemak dapat memicu terjadinya inflamasi kronik yang disebabkan karena peningkatan sitokin proinflamasi antara lain C- Reaktif Protein ( CRP ) dan Interleukin-6 ( IL-6 ) yang akan mengakibatkan disfungsi endotel. Disfungsi endotel berperan penting pada pathogenesis dari atherosklerosis lebih utama disebabkan karena deregulasi aktivitas enzimatis eNOS dan inaktivasi NO oleh stress oksidatif. eNOS uncoupling merupakan mekanisme penting yang berkontribusi terhadap peningkatan stress oksidatif pada atherosclerosis <sup>[2]</sup>. eNOS uncoupling merupakan suatu kondisi yang memicu terbentuknya anion superoksida (  $O_2^-$  ) dan berkurangnya pelepasan NO. Anion superoksida beserta enzim-enzim yang lain bereaksi dengan NO menjadi oksidan

peroksinitrit yang lebih poten yang akan menginaktivkan Tetrahydro Biopterin (  $BH_4$  ) suatu kofaktor yang diperlukan untuk mengubah L- arginin menjadi NO serta meningkatkan akumulasi Asymetric Dimethylarginin (ADMA) suatu endogenous inhibitor eNOS. Kondisi inilah yang memicu terjadinya disfungsi endotel yang menjadi awal dari atherogenesis. <sup>[2]</sup>

Selain menyebabkan disfungsi endotel, adanya akumulasi metabolit toksik lemak yaitu fatty acyl CoA, diacylglycerol, ceramide pada jaringan termasuk juga pada arteri akan menyebabkan terjadinya resistensi insulin karena metabolit tersebut akan merusak signal insulin dan metabolisme glukosa. Kondisi ini juga akan memicu percepatan terjadinya atherosclerosis.<sup>[3]</sup> Pada kondisi resistensi insulin terjadi gangguan sinyal transduksi insulin yang melibatkan dua jalur utama yaitu PI3K dan MAPK. <sup>[4]</sup>.

Aktivasi jalur PI3K pada endotel mengaktivasi eNOS yang menghasilkan NO sebagai vasodilator serta mengaktivasi guanylate cyclase untuk meningkatkan kadar cGMP yang memicu relaksasi otot polos vaskuler. Sedangkan aktivasi jalur MAPK akan meningkatkan produksi endotelin-1 ( ET-1 ) suatu vasokonstriktor, aktivasi pompa kation serta peningkatan ekspresi VCAM-1. Pada kondisi resistensi insulin akan menyebabkan terjadi penurunan pada

signaling PI3K dan sebaliknya terjadi peningkatan pada jalur MAPK. Stimulasi terus menerus pada jalur MAPK akan menyebabkan proliferasi VSMC, peningkatan pembentukan kolagen, produksi berlebihan growth faktor dan sitokin proinflamasi yang berkontribusi terhadap percepatan terjadinya atherosklerosis. [3]

Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai antioksidan adalah katekin yang diisolasi dari tanaman teh (*Camellia sinensis*). Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung telah mengembangkan klon tanaman teh yaitu klon GMB4 dengan kadar katekin lebih tinggi (14% - 16%) yang diekstraksi dari pucuk ketiga (P3). [5] Jumlah hidroksi fenolik dan gugus galloil serta struktur epimerisasi isolat ini berpengaruh terhadap aktivitasnya meskipun kadar katekin total sama. Beberapa penelitian yang mendukung aktivitas katekin teh terhadap fungsi vaskuler diantaranya penelitian Anter yang menunjukkan bahwa fraksi polifenol dari black tea menstimulasi aktivitas katalitik eNOS. Mekanisme stimulasi ini melibatkan aktivasi yang diperantarai p38 MAPK dan jalur PI3K/Akt yang menyebabkan fosforilasi eNOS pada serin-1177 dan defosforilasi pada Thr-495. Aktivitas ini yang mengakibatkan aktivasi eNOS dependent calmodulin dan meningkatkan bioaktivitas NO<sup>[6]</sup>. Penelitian lain membuktikan bahwa terdapat bukti kuat keterlibatan NO dalam menginduksi vasorelaksasi dari polifenol teh. [7]

Katekin dengan gugus galloilnya merupakan inhibitor tirosin kinase alamiah yang dapat memodifikasi aktivitas berbagai macam signaling kinases antara lain ERK1/2, protein kinase B (Akt), PI3K dan p38 MAPK [8]. Gugus hidroksi fenolik pada katekin berperan terhadap penangkapan radikal bebas, penghambatan lipid

peroksidasi dan hidrolisis fat sedangkan gugus galloilnya berperan terhadap produksi prostasiklin, pengurangan ekspresi VCAM-1 dan penghambatan proliferasi VSMC. [9].

Berdasarkan data penelitian di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan efek pemberian isolat golongan senyawa katekin teh hijau Klon GMB 4 dengan berbagai dosis ekspresi eNOS pada tikus wistar jantan dengan diet tinggi lemak sehingga dapat dijelaskan efek ateroprotektif dan vasoprotektif dari isolat tersebut.

## **METODE PENELITIAN**

### **Desain penelitian**

Penelitian ini termasuk eksperimental laboratorik dengan desain penelitian menggunakan *Control Group Post Test Design*. Penentuan objek penelitian dengan Rancangan Acak Lengkap dengan lima perlakuan, yaitu (1) Tikus dengan diet pakan standart (2) Tikus dengan diet tinggi lemak, (3) Tikus dengan diet tinggi lemak + katekin 3 mg/hari (4) Tikus dengan diet tinggi lemak + katekin 6 mg/hari (5) Tikus dengan diet tinggi lemak + katekin 24 mg/hari. Perlakuan dilaksanakan selama 60 hari. Penelitian ini telah memenuhi kelayakan etik penelitian dari komisi etik penelitian kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### **Waktu dan tempat penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni 2010 s.d Maret 2011. Sampel yang digunakan adalah tikus percobaan berjumlah 25 ekor sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut, kriteria inklusi : Tikus jenis *Rattus*

*norvegicus strain wistar*, jenis kelamin jantan, umur 6 - 8 minggu, berat badan antara 130 gram s.d. 155 gram, warna bulu putih tikus aktif dan kriteria eksklusi : tikus yang tidak mau makan dan tikus yang mengalami penurunan keadaan fisik atau mati.

## **Prosedur Penelitian**

### **Pembuatan pakan tikus**

Pakan tikus diberikan secara oral, sedangkan katekin diberikan melalui sonde. Pakan standart yang terdiri dari pakan ayam / Pars (dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, coccidiostat) 66.6% dan tepung terigu 33.4%. Diet tinggi lemak yang terdiri dari pakan standart (pakan ayam / PARS 57.3% dan tepung terigu 31.8%) ditambah kolesterol 1.9%, asam kolat 0,1% dan minyak babi 8.9%.<sup>[10]</sup>

### **Perlakuan pada hewan coba**

Sebelum perlakuan, tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 7 hari. Pada awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan dengan metode simple random sampling agar setiap hewan coba mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan. Tikus dibagi dalam lima kelompok perlakuan, tikus dibedah setelah 60 hari perlakuan diambil jaringan aortanya.

### **Pengukuran ekspresi eNOS dengan metode ELISA**

Metode ELISA adalah sebagai berikut, pertama adalah menentukan jumlah well yang digunakan pada microtiter. Untuk pembuatan kurva standar, dipipet 100  $\mu$ l assay buffer dalam sumuran (sebagai *blank well*), dipipet 100  $\mu$ l p 38 MAPK

fosforilated maupun p110 PI3K standar 1-7 ke dalam well yang telah ditentukan. Sampel jaringan aorta diisolasi proteinnnya terlebih dahulu dengan menggunakan buffer RIPA. Hasil isolasi protein ini digunakan untuk pengukuran kadar p38 MAPK dan p110 PI3K. Untuk sampel perlakuan, hal yang dilakukan adalah memipet 100 $\mu$ l sampel perlakuan dan dimasukkan ke dalam well. Mikrotiter diinkubasi pada suhu 37  $^{\circ}$ C selama 2 jam. Masing- masing well dicuci dengan wash buffer 3x 400  $\mu$ l. Masing- masing well diisi dengan 100 $\mu$ l conjugate kecuali pada blanko.

Microtiter diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 30 menit. Masing- masing well dicuci dengan wash buffer 3x 400  $\mu$ l. Substrat TMB dipipet sebanyak 100  $\mu$ l dan dimasukkan pada masing- masing well, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Stop solution (HCl) dipipet sebanyak 100 $\mu$ l dan dimasukkan pada masing- masing well selama 5 menit. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan pada OD 492 nm.<sup>[12]</sup>

### **Analisis Statistik**

Data hasil pengukuran ekspresi eNOS pada masing masing perlakuan ditampilkan mean sebagai ukuran pemusatan dan standar deviasi sebagai ukuran penyebaran jika data mempunyai distribusi normal. Tetapi jika distribusi data tidak normal maka dilakukan transformasi data atau digunakan median sebagai ukuran pemusatan dan minimum maksimum sebagai ukuran penyebaran. Analisis data menggunakan one-way ANOVA dilanjutkan dengan Uji Tukey untuk melihat perbedaan masing- masing variabel. Analisis data dilakukan dengan komputerisasi menggunakan program SPSS for Windows versi 17.

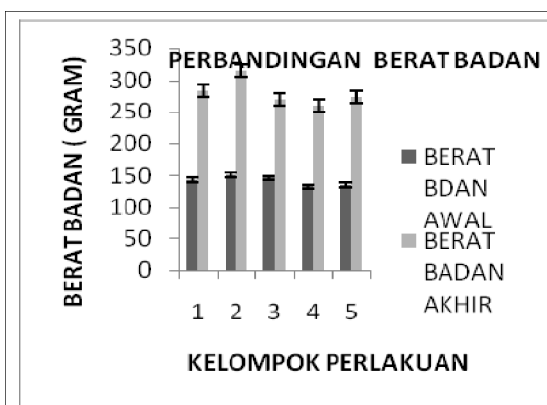
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

## Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Maret 2011 s.d. Juni 2011. Pada penelitian ini digunakan 25 hewan coba yang terbagi dalam 5 kelompok dengan diberikan diet tinggi lemak selama 8 minggu dan diamati efeknya pada aorta dengan parameter ekspresi eNOS. Pemberian diet tinggi lemak bertujuan untuk menstimulasi terjadinya kondisi resistensi insulin yang menjadi pemicu terjadinya gangguan sinyaling insulin pada vaskular.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini harus memenuhi syarat homogenitas sampel sehingga layak digunakan untuk penelitian. Salah satu langkah yang dilakukan adalah menentukan homogenitas sampel berdasarkan berat badan hewan coba dengan uji kesamaan ragam Shapiro Wilk. Berat badan hewan coba homogen dan distribusi datanya normal karena berdasarkan hasil uji Shapiro- Wilk didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,162 dan lebih besar dari alfa 0,05 sehingga layak digunakan dalam penelitian ini.

Perubahan berat badan tidak berbeda



Gambar 1. Perbandingan berat badan awal dan akhir pada masing- masing kelompok perlakuan(1) kontrol negatif ( 2) kontrol positif(3) katekin dosis I ( 4) Katekin dosis II (5) Katekin dosis III.

bermakna antar perlakuan sedangkan asupan pakan masing- masing kelompok perlakuan secara umum tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna kecuali pada masing- masing kelompok perlakuan dengan kelompok katekin dosis II.

Hasil pengukuran ekspresi eNOS dengan metode ELISA ada pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengukuran ekspresi eNOS pada aorta

KELOMPOK PERLAKUAN	KADAR eNOS ( $\mu\text{g/ml}$ )
Kontrol negatif	1.212 $\pm$ 0,14 *c)
Kontrol positif	2,184 $\pm$ 0,12*ab)
Katekin dosis I	2,839 $\pm$ 0,18*a)
Katekin dosis II	1,694 $\pm$ 0,15*bc)
Katekin dosis III	2,091 $\pm$ 0,61*ab)

Ket : \* notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

Berdasarkan analisis Anova ekspresi eNOS, hasil  $F_{\text{hitung}} = 8,036$  dimana  $F_{\text{tabel}}$  dengan tingkat signifikansi 0,05 dengan  $df_1 = 4$  dan  $df_2 = 12$  berdasarkan tabel sebesar 3,259. Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$  maka  $H_0$  ditolak. Sedangkan berdasarkan signifikansi yang didapat sebesar 0,000 dimana nilai ini lebih kecil dari 0,05 maka  $H_0$  ditolak. Berdasarkan data di atas maka disimpulkan adanya perbedaan yang signifikan ekspresi eNOS minimal dua kelompok perlakuan . Hasil pengujian berganda dengan menggunakan uji Tukey didapatkan bahwa kelompok perlakuan yang berbeda secara bermakna adalah kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif ( $p = 0,012$ ), dengan katekin dosis I ( $p = 0,000$ ), dengan katekin dosis III ( $p = 0,12$ ). Sedangkan katekin dosis I dan dosis II juga

berbeda bermakna(  $p= 0,033$ ).

### **Pembahasan**

Telah dilakukan penelitian untuk membuktikan pengaruh isolat golongan senyawa katekin terhadap ekspresi p110 Phosphatidil Inositol 3- Kinase ( PI3K ) dan p38 Mitogen Activated Protein Kinase ( MAPK ) pada aorta tikus yang diberikan diet tinggi lemak selama 8 minggu. Pemberian diet tinggi lemak ini bertujuan untuk menginduksi terjadinya resistensi insulin. Penelitian Schrauwen menunjukkan bahwa ketidakseimbangan asupan energi dengan penggunaannya mengakibatkan terjadinya positif fat balance. <sup>[13]</sup> Kondisi ini yang menyebabkan tingginya kadar FFA yang dapat menstimulasi resistensi insulin. Pada vascular tingginya kadar FFA ini menginisiasi beberapa proses seluler yaitu kerusakan signaling insulin, stress oksidatif, peningkatan local RAAS ( Renin Angiotensin Aldosteron System ) dan peningkatan sensitivitas adrenergik VSMC. RAAS merupakan system hormon yang meregulasi tekanan darah dan keseimbangan cairan ( air ). Ketika volume darah rendah, sel juxtaglomerular di ginjal mensekresi renin. Renin menstimulasi produksi Angiotensin I yang kemudian dikonversi menjadi angiotensin II. Angiotensin II menyebabkan konstiksi pembuluh darah. Angiotensin II juga menstimulasi sekresi hormon aldosteron dari korteks adrenal. Aldosteron menyebabkan tubulus ginjal meningkatkan reabsorpsi Na dan air dalam darah. Kondisi ini akan meningkatkan volume cairan di dalam tubuh yang otomatis meningkatkan tekanan darah. Selain itu peningkatan FFA oksidasi akan meningkatkan intramitokondrial acetyl CoA / CoA & NADH/ NAD<sup>+</sup> rasio yang selanjutnya menginaktifkan

dehidrogenase. Ini menyebabkan konsentrasi sitrat meningkat yang memicu penghambatan fosfofruktokinase yang selanjutnya terjadi akumulasi G-6 fosfat. Akhirnya peningkatan konsentrasi G-6 fosfat ini akan menghambat hexokinase II yang menyebabkan penurunan glukosa uptake.<sup>[14]</sup> Penelitian DeFronzo menunjukkan bahwa intraseluler metabolit toksik dari metabolit triasilgliserol dan NEFA ( Non Esterified Fatty Acid ) yaitu fatty acyl CoA, Diasilgliserol (DAG), ceramide menyebabkan resistensi insulin yang lebih berat dengan jalan merusak jalur signaling insulin dan banyak tahapan metabolisme glukosa intraseluler.<sup>[15]</sup>

Mekanisme lain yang dapat dijelaskan adalah menurut Kim menunjukkan bahwa TLR4 ( Toll- Like Reseptor 4 ) berperan dalam memodulasi sistem imun dan merupakan mediator penting resistensi insulin serta inflamasi.<sup>[16]</sup> TLR bisa diaktivasi oleh ligan salah satunya adalah asam laurat, suatu FFA yang dapat mengalami peningkatan dengan pemberian diet tinggi lemak. TLR4 diekspresikan pada semua sel termasuk sel target insulin , dapat mengaktivasi proinflammatory kinases JNK, IKK dan p38 yang merusak sinyal transduksi insulin secara langsung melalui penghambatan fosforilasi IRS pada residu serin. Aktivasi TLR4 juga memicu peningkatan transkripsi gen proinflamasi yang menghasilkan peningkatan sitokin, kemokin, ROS dan kadar eicosanoid yang mengarah pada desensitisasi insulin pada sel target itu sendiri maupun sel lain melalui parakrin dan efek sistemik. FFA juga dilaporkan berikatan dan mengaktivasi TLR4. Dua jalur signaling yang diaktivasi TLR4 adalah melalui MyD88 dan TIRAP yang mengaktivasi IKK, p38, JNK, CREB, AP2 dan NFkB

yang menginduksi gen proinflamasi. Jalur lain melalui TRAM dan TRIF yang mengaktifasi IKK, NFκB dan IRF3 yang menginduksi gen interferon type 1. Aktivasi transkripsional pada jalur ini menginduksi ekspresi ratusan gen yang terlibat dalam mekanisme pertahanan dari innate immunity. Jalur yang teraktivasi oleh TLR4 ini menghambat system sinyaling yang lain seperti sinyal insulin melalui fosforilasi serin IRS-1. Palmitat juga dapat mengaktifasi TLR4, pada aorta palmitat meningkatkan aktivitas IKK dan mengurangi sinyaling insulin dan aktivitas eNOS. Pada kultur sel endotel berkurangnya sinyaling IRS-1 dan aktivitas eNOS yang diinduksi oleh palmitat tergantung pada masing-masing protein kunci pada jalur sinyaling TLR4 yaitu TLR4, MyD88, IRAK, IKK dan NFκB. Aktivasi NFκB menghambat fosforilasi tyrosin IRS-1 melalui mekanisme yang belum jelas. Beberapa kandidat mediator penghambatan sinyaling IRS-1 yang diperantarai NFκB adalah S6 kinase, mTOR (mammalian target of rapamycin), suppressor of cytokine Signaling (SOCS3), c-JUN-NH2 (JNK), Akt dan beberapa isoform PKC. Masing-masing enzim ini mempunyai kemampuan untuk menghambat sinyaling IRS-1 dengan fosforilasi satu atau lebih dari residu serin 70 IRS-1, suatu modifikasi IRS-1 yang diketahui merusak sinyaling IRS-1.<sup>[17]</sup>

Secara umum patomekanisme resistensi insulin adalah melalui jalur fosforilasi serin, jalur ROS serta jalur PKC. Fosforilasi serin yang berlebihan menyebabkan penurunan kemampuan IRS untuk berikatan dengan PI3K sehingga menyebabkan penurunan aktivitas PI3K dan terjadi juga akselerasi degradasi protein IRS-1. Penelitian Paz et al menunjukkan adanya peningkatan fosforilasi serin mampu

menghambat ikatan IRS dengan region juxtamembran (JM) pada reseptor insulin dan mengganggu kemampuan IRS-1 untuk menginduksi tirosin fosforilasi.<sup>[18]</sup>

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran berat badan tikus setiap minggu serta perhitungan asupan pakan masing-masing kelompok perlakuan. Data tersebut diperlukan untuk konfirmasi apakah terjadinya perubahan secara fisik (perubahan berat badan) juga menyebabkan perubahan secara biomolekuler yaitu ekspresi eNOS. Pada kelompok perlakuan katekin dosis II menunjukkan bahwa asupan pakan tertinggi tetapi berat badannya paling rendah. Ini menunjukkan bahwa katekin dosis II mampu menurunkan berat badan meskipun asupan pakan banyak. Kondisi ini tentunya dapat dimanfaatkan sebagai treatment untuk penurunan berat badan. Menurut Murase et al, konsumsi katekin selama 10 minggu menstimulasi oksidasi lemak pada tikus BALB/C [19]. Pada tikus Sprague Dawley model obeis, EGCG salah satu komponen dari katekin juga mampu menurunkan berat badan selama 4 minggu secara signifikan. Pada model ini juga menunjukkan intake energy tidak berpengaruh terhadap berat badan.<sup>[20]</sup> Sementara Choo dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa katekin teh hijau menurunkan lemak tubuh dan meningkatkan penggunaan energi melalui aktivasi adrenoreseptor. Kadar protein pada interscapular jaringan adiposa coklat juga meningkat. Kondisi ini menunjukkan peningkatan kapasitas termogenik.<sup>[21]</sup>

Hasil pengukuran ekspresi eNOS pada kelompok diet tinggi lemak dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan terjadinya peningkatan. Perbedaan ekspresi ini disebabkan oleh kemungkinan terjadinya perbedaan ekspresi DDAH (Dimetilarginin

Dimetilaminohidrolase ) suatu enzim yang berperan mendegradasi ADMA menjadi citrulin dan dimetilamin. DDAH memiliki dua isoform yaitu DDAH-1 dan DDAH-2. Penelitian Razny U , et al, 2011, menunjukkan bahwa apabila terjadi overekspresi DDAH-1 maka akan meningkatkan kadar ADMA ( suatu analog arginin yang berperan sebagai inhibitor endogenus dari jalur eNOS ) yang kemudian akan meningkatkan aktivitas eNOS sehingga kadar NO menjadi lebih tinggi.<sup>[29]</sup> Sementara katekin pada ketiga dosis mampu berperan meningkatkan kadar eNOS dibandingkan kelompok kontrol dengan diet normal. Hal ini kemungkinan disebabkan banyak faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim eNOS antara lain substrat L- arginin, ADMA ( inhibitor eNOS ), DDAH serta BH<sub>4</sub> ( kofaktor yang diperlukan untuk mengubah L-Arginin menjadi NO.

Beberapa pengaruh katekin terhadap peningkatan ekspresi eNOS pada aorta tikus dengan diet tinggi lemak adalah berdasarkan mekanisme flavonoid sebagai antioksidan yaitu penangkapan ROS dan penghambatan peroksidasi lipid. Flavonoid juga menghambat oksidasi LDL. Katekin sebagai salah satu dari flavonoid berperan meningkatkan aktivitas antioksidan total. Katekin juga meningkatkan aktivitas SOD pada serum dan ekspresi katalase pada aorta, enzim yang berperan pada proteksi seluler terhadap ROS. Aktivitas ini juga bergabung dengan efek langsung pada spesies oksigen dengan penurunan kadar NO plasma. Malondialdehid , suatu marker stress oksidatif juga menurun. Ini menunjukkan katekin dapat berefek langsung ( AO ) maupun tidak langsung.( meningkatkan aktivitas atau ekspresi ). Karena katekin dapat berperan sebagai antioksidan, katekin dapat mencegah oksidasi dari antioksidan

yang lain seperti Vitamin E. Katekin juga dapat menormalkan rasio PGI<sub>2</sub> : TXA<sub>2</sub> serta mensupresi aktivitas fosfolipase A<sub>2</sub> dan siklooksigenase. Hasil ini menunjukkan efek antitrombotik.<sup>[26]</sup>

Katekin memiliki aktivitas antioksidan selain melalui penangkapan radikal bebas ( ROS ) juga dengan jalan membentuk khelat dengan ion logam yang mengaktifkan system redoks, menghambat factor transkripsi yang peka terhadap redoks, menghambat enzim prooksidan dan menginduksi enzim antioksidan. Mekanisme penangkapan radikal bebas melalui delokalisasi electron, pembentukan intra dan intermolekul ikatan hidrogen, menyusun ulang struktur molekul dan khelat logam yang berperan dalam oksidasi. Gugus hidroksi fenolik dari katekin merupakan electron donor yang potensial dan efisien menangkap radikal bebas seperti anion superoksid, oksigen singlet, NO dan peroksi nitrit. Kapasitas penangkapan FR tergantung pada jumlah gugus orto dihidroksil dan ortodihidroksilketol, ikatan rangkap C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>. Aktivitas antioksidan menurun dengan menurunnya jumlah gugus hidroksi pada cincin B.<sup>[9]</sup>

Menurut Han X , polifenol memiliki efek proteksi tidak langsung melalui aktivasi system pertahanan endogen dan dengan memodulasi proses sinyaling seluler seperti NFκB, ikatan DNA activator protein -1, biosintesis glutation, jalur PI3K/ PKB ( Akt ), aktivasi MAPK ( ERK, JNK, p38 ) dan translokasi ke nucleus dari nuclear factor erythroid 2 related factor 2 ( Nrf2 ) . Faktor transkripsi Nrf2 meregulasi ekspresi beberapa gen antioksidan. Sistem Nrf2- Kelch- Like ECH- associated protein 1 ( Keap 1 )-ARE merupakan satu dari mekanisme pertahanan seluler utama terhadap stress oksidatif.<sup>[27]</sup> Penelitian Chen



C, menunjukkan bahwa EGCG dan ECG menginduksi ekspresi gen yang diperantarai oleh ARE melalui aktivasi protein MAPK ( ERK, JNK, p 38 ).<sup>[28]</sup>

EGCG suatu komponen dari katekin serta kandungan polifenolnya mengaktifasi eNOS melalui dua mekanisme yaitu melalui peningkatan  $Ca^{2+}$  serta fosforilasi eNOS melalui jalur PI3K/ Akt. Hasil studi in vitro Kim pada Bovine Aortic Endothelial Cell ( BAEC ) EGCG menginduksi aktivasi Akt, ERK1/2, dan fosforilasi eNOS pada Serin 1179. Ini sejalan dengan hasil penelitian kami yang menunjukkan bahwa katekin meningkatkan ekspresi eNOS sebagai downstream sinyaling PI3K.<sup>[15]</sup>

Pada penelitian ini terdapat kelemahan dan keterbatasan yaitu belum dapat menjelaskan mekanisme katekin dalam mempengaruhi penghambatan penurunan ekspresi eNOS. Jalur sinyaling yang berperan terhadap hasil penelitian ini sangatlah kompleks sehingga perlu penelitian lebih lanjut untuk menjelaskan jalur sinyaling utama yang berpengaruh terhadap hasil penelitian ini.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan :

1. Pemberian diet tinggi lemak dapat menurunkan ekspresi eNOS
2. Isolat golongan senyawa katekin menghambat penurunan ekspresi eNOS pada dosis 6 mg / hari dan 24 mg/ hari sehingga dapat digunakan sebagai agen untuk ateroprotektif dan vasoprotektif.

## Saran

Beberapa hal yang perlu dilakukan berdasarkan hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Perlu diteliti lebih lanjut apakah peningkatan ekspresi eNOS disertai

dengan peningkatan NO dan penurunan ET-1 sehingga dapat diprediksi efek isolat golongan senyawa katekin pada vascular.

2. Perlu penelitian lebih lanjut tentang jalur pasti yang berperan dalam memperbaiki kerusakan jalur sinyaling karena resistensi insulin yang dipengaruhi katekin misalnya dengan jalan memblokir jalur signaling dengan inhibitor tertentu.

## DAFTAR PUSTAKA

- 1) World Health Organization. 2003. Deaths from coronary heart disease, International Society of Hypertension Writing Groups, J. Hypertension . Vol 21 No.11.p 1983-1992 Available:from URL: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_14\\_deathHD](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_14_deathHD)
- 2) Yang Z, Ming XF . 2006. Recent Advances in Understanding Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis, *Clinical Medicine & Research Review* . 4(1): 53-65.
- 3) DeFronzo, R.A. 2010. Insulin Resistance, Lipotoxicity, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis : the Missing Link, *Diabetologia Reviews*. 53(7): 1270–1287.
- 4) Muniyappa R, Montagnani M, Kon Koh K, Guon, MJ. 2007. Cardiovascular Actions of Insulin, *Endocrine Reviews*. 28 (5) :463-491
- 5) Ratnawati, R.; Ciptati; Satuman .2009. Isolasi EGCG dari Teh Hijau Klom GMB4 Jawa Barat. Laporan

- penelitian Program Insentif Riset Dasar, RISTEK Kementerian Negara Riset dan Teknologi
- 6) Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira, O.M, Vita J.A., Keaney J.F. 2004 . Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by The p38 MAPK in Response to Black Tea Polyphenols, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 279(45):46637-43.
  - 7) Lorens M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Dusterhoft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V. 2003. A Constituent of Green Tea, EGCG, Activates eNOS by a Phosphatidylinositol-3- OH- kinase, cAMP- Dependent Protein Kinase, and Akt- Dependent Pathway and Leads to Endothelial Dependent Vasorelaxation. *J Biol Chem*. 279(7):6190-5.
  - 8) Stangl V, Dreger H, Stangl K, ,Moleculer Targets of Tea Polyphenols in the Cardiovascular System , Cardiovascular Research, Oxvord Journal, vol 73 issue 2, p. 348-358.
  - 9) Velayutam P. Babu and Liu. 2008. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health ; An Update, *Current Medicinal Chemistry*, vol 15. No. 18, pp. 1840-1850
  - 10) Ali M, Muliarta IK. 2004. Optimasi Diet Tinggi Lemak pada Tikus Model Atherogenik, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 3(2) : 15-21
  - 11) Aulanni'am . 2004. Prinsip dan teknik analisis biomolekuler. Cetakan Pertama. FPUB Press. p.80-83.
  - 12) Rantam FA. 2003. Metode Imunologi. Cetakan pertama. Airlangga University Press, Surabaya.p. 105-116
  - 13) Schrauwen P. 2007. High fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance, *Proceedings of the nutrition society*, 66(1):33-41
  - 14) Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Schulman GI. 1996. Mechanism of free fatty acid induced insulin resistance in humans. *J. Clin Invest*. 97(12):2859-65.
  - 15) DeFronzo RA. 2006. Is insulin resistance atherogenic? Possible mechanisms. *Atherosclerosis*. 7:11–15
  - 16) Kim J, Sears D. 2010. TRL and Insulin resistance. *Gastroenterology Research and Practice. Volume 2010*, 2 pages
  - 17) Kim J, Formoso G, Li Y, Potenza M, A, Marasciulo F. L, Montagnani M, Quon, M.J. 2007. Epigallocatechin Gallate, A Green Tea Poliphenol, Mediates NO Dependent Vasodilatation Using Signaling Pathways in Vascular Endothelium Requiring Reactive Oxygen Species and Fyn J. Biol. Chem. Vol. 282, Issue 18, 13736-13745.
  - 18) Paz K, Hemi R, LeRoith D, et al. 1997. A Moleculer Basic for Insulin Resistance, *The Journal Biological Chemistry*. 272 (47): 29911-29918
  - 19) Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Nagasawa A, Tokimitsu I . 2005. Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288 : R708-R715.
  - 20) Klaus S, Pultz S, Thone Reineke C, Wolfram S. 2005. Epigallocatechin gallate attenuates diet induced obesity in mice by decreasing energy

absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 29 : 615-623.

- 21) Choo JJ. 2003. Green tea reduces body fat accretion caused by high fat diet in rats through betaadrenoceptor activation of thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Nutr. Biochem* 14 : 671-676.
- 22) Pederson, TM, Kramer DL, Rondinone CM., 2001. Serine/ Threonine Phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation, possible regulation by tyrosine phosphorylation, *Diabetes* 50 : 24-31
- 23) Anai M, Funaki M, Ogihara T, Kanda A, Onishi Y, Sakoda H, Inukai K, Nawano M, Fukushima Y, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. 1999. Enhanced Insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high fat-fed rats. *Diabetes* 48, 158-168.
- 24) Katagiri H, T Asano, H Ishihara, K Inukai, Y Shibasaki, M Kikuchi, Y. Yazaki and Y. Oka. 1996. Overexpression of catalytic subunit p110 $\alpha$  of phosphatidylinositol 3 kinase increases glucose transport activity with translocation of glucose transporters in 3T3-L1 adipocyte. *J. Biol. Chem.* 271:16987-16990