

# **Epigallocatechin Gallate Teh Hijau Klon GMB4 menghambat Resistensi Insulin akibat Diet Tinggi Lemak pada Tikus**

## **Epigallocatechin Gallate Green Tea GMB4 Clon Prevent Insulin Resistance due to High Fat Diet in Rat**

Inggita Kusumastuty<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>, Retty Ratnawati<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

<sup>2</sup>Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

<sup>3</sup>Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

### **ABSTRAK**

Konsumsi tinggi lemak berperan dalam resistensi insulin dan peningkatan risiko penyakit kardiovaskuler. Teh hijau klon GMB 4 merupakan hasil pengembangan teknologi yang dihasilkan oleh Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gambung, dan telah dilakukan isolasi dan purifikasi *Epigallocatechin Gallate*. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan pengaruh *Epigallocatechin Gallate* dalam menghambat resistensi insulin, penurunan ekspresi p110 PI3K dan peningkatan p38 MAPK pada aorta tikus yang diberi diet tinggi lemak. Hewan coba tikus jantan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu diet normal, diet tinggi lemak, diet tinggi lemak dengan penambahan EGCG 1 mg/kgbb/hari, 2 mg/kgbb/hari dan 8 mg/kgbb/hari yang diberikan dalam 60 hari. Parameter yang digunakan adalah resistensi insulin (metode HOMA), ekspresi p110 PI3K dan p38 MAPK dari aorta tikus yang diukur dengan metode ELISA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat EGCG menghambat resistensi insulin pada dosis 8 mg/kgbb/hari. EGCG yang diberikan bersamaan dengan diet tinggi lemak dapat menghambat penurunan kadar p110 PI3K pada dosis 2 mg/kgbb/hari dan dosis 8 mg/kgbb/hari dan menghambat peningkatan aktivitas p38 MAPK pada semua dosis perlakuan yaitu 1 mg/kgbb/hari, 2 mg/kgbb/hari dan 8 mg/kgbb/hari. Pemberian EGCG dosis 8 mg/kgbb/hari yang diberikan bersamaan dengan diet tinggi lemak dapat mengambat terjadinya resistensi insulin yang ditunjukkan dengan penghambatan peningkatan p38 MAPK dan penurunan p110 PI3K dan nilai HOMA dalam *range* normal, *superoxide dismutase*.

**Kata Kunci :** Diet tinggi lemak, EGCG, p110 PI3K, p38 MAPK, resistensi insulin

### **ABSTRACT**

*High fat diet has a role in insulin resistance and increase the risk of cardiovascular disease. Epigallocatechin gallate has been isolated and purified from green tea clone GMB developed by Tea and Kina Research Center in Gambung. This research was aimed to prove the role of Epigallocatechin Gallate in inhibiting insulin resistance, reducing p110 PI3K expression, and increasing p38 MAPK in rat aorta with high fat diet. The animal subjects were divided in 5 groups which are normal diet, high fat diet, high fat diet with EGCG 1 mg/kgBW/day 2 mg/kgBW/day, and 8 mg/kgBW/day administered in 60 days. Parameters being measured including insulin resistance (HOMA metode), p110 PI3K expression and p38 MAPK from rat aorta measured using ELISA method. The result show that EGCG isolate inhibit the insulin resistance with 8 mg/kgBW/day dosage. EGCG administered with high fat diet inhibit the reducing of p110 PI3K expression at 2 mg/kgBW/day dosage and 8 mg/kgBW/day dosage and inhibit the increasing of p38 MAPK activity at all administered dosages. Administration of EGCG dosis 8 mg/kgBW/day in combination with high fat diet will inhibit the insulin resistance as shown by inhibition of increasing p38 MAPK and reducing p110 PI3K.*

**Keywords :** EGCG, high fat diet, insulin resistance, p110 PI3K, p38 MAPK

---

*Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 26, No. 2, Agustus 2010; Korespondensi: Inggita Kusumastuty. Laboratorium Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Jl. Veteran Malang Tel. (0341) 560491 Email: kusumastutynggita@yahoo.com*

## PENDAHULUAN

Tren konsumsi tinggi lemak akan berdampak pada peningkatan *intake* energi karena lemak menyumbang energi terbesar dibandingkan protein dan karbohidrat. Ketidakseimbangan antara energi yang masuk dengan energi yang keluar secara terus menerus akan menyebabkan terjadinya obesitas (1). Pada obesitas terjadi lipositas yang menyebabkan resistensi insulin (2). Resistensi insulin adalah suatu gangguan respon biologis terhadap insulin, dengan akibat kebutuhan insulin tubuh meningkat sehingga terjadi hiperinsulinemia untuk mempertahankan kadar glukosa plasma agar tetap dalam batas normal. Pada kondisi resistensi insulin terjadi gangguan sinyal transduksi insulin yang melibatkan dua jalur utama yaitu *Phosphatidylinositol 3 Kinase* (PI3K) dan *p38 Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) (3).

Kerja metabolik insulin untuk merangsang *uptake* glukosa di otot skelet dan jaringan adipose dimediasi oleh stimulasi jalur sinyal yang tergantung PI3-kinase. Termasuk dalam jalur ini adalah reseptor insulin, reseptor insulin substrat (IRS-1), PI3-kinase, PDK-1, dan protein kinase B (Akt) (4). Kerja vasodilatasi insulin memerlukan jalur sinyal PI3-kinase. Insulin menginduksi stimulasi Akt yang secara langsung meningkatkan aktivitas *endothelial NO synthase* (eNOS), yang menyebabkan peningkatan produksi NO (5). Disamping bekerja sebagai vasodilator, insulin juga mempunyai efek vasokonstriksi. Efek vasokonstriksi ini terutama dimediasi oleh peptide vasokonstriksi *endotelin-1* (ET-1) (6). *Endotelin-1* diproduksi oleh endotel vaskuler melalui stimulasi jalur sinyal intraseluler MAP-kinase dan ERK1/2. Dalam hal ini jalur PI3-kinase tidak termasuk. Dengan demikian insulin mempunyai dua efek yang berlawanan sebagai vasodilator dan vasokonstriktor yang efek selanjutnya tergantung dari keseimbangan keduanya. Dalam keadaan normal akan menyebabkan keadaan netral atau vasodilator. Pada kondisi resistensi insulin terjadi penurunan *signaling* PI3K dan sebaliknya akan meningkatkan jalur MAPK (7). Jika hal ini terus berlanjut maka akan terjadi ketidakseimbangan vasokonstriksi dan vasodilatasi sehingga akan menyebabkan terjadinya disfungsi endotel.

Di Asia, teh hijau merupakan minuman yang dikonsumsi secara luas dan dipercaya dapat meningkatkan kesehatan secara signifikan. Efek terhadap kesehatan tersebut disebabkan oleh adanya kandungan *polifenolik flavonoid* dari teh hijau. *Catechin* adalah flavonol utama yang terutama terdiri dari *epigallocatechin gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC) (8). Saat ini telah dilakukan isolasi dan purifikasi golongan senyawa katekin dan EGCG teh hijau klon GMB4 oleh Lembaga Penelitian Teh dan Kina Gamsung yang menemukan bahwa pada 100 gram teh hijau terdapat 12 hingga 14% isolat golongan senyawa katekin (9).

Katekin diserap oleh sel melalui GLUT 4 yang merupakan efektor terbesar dari homeostasis insulin *mediated* glikemik yang tereksresi di sel adiposit dan sel otot (10). Katekin dalam hal ini EGCG mampu menghambat adipogenesis sel preadiposit yang terlibat dalam jalur MAPK, khususnya ERKs yang distimulasi oleh faktor-faktor pertumbuhan. Penelitian lain menyebutkan katekin merupakan *inhibitor tirosin kinase* alamiah yang dapat memodifikasi aktivitas berbagai macam *signaling kinase*

antara lain ERK1/2, protein kinase B (Akt), PI3K dan p38 MAPK (11).

Kerja EGCG diharapkan dapat menghambat resistensi insulin, menghambat penurunan PI3K dan menghambat peningkatan MAPK. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek pemberian isolat EGCG teh hijau klon GMB4 berbagai dosis terhadap resistensi insulin, kadar p38 MAPK dan kadar PI3K pada tikus wistar jantan yang diberi diet tinggi lemak. Kadar PI3K dapat diketahui dengan mengidentifikasi subunit p110 dari PI3K sebagai sub unit katalitik. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi dasar penggunaan potensi flora (teh hijau) untuk mengendalikan resistensi insulin akibat diet tinggi lemak

## METODE

Penelitian dilakukan dengan desain *post test only with control group* menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan usia  $\pm$  6-8 minggu, berat badan awal 140-200 gram, dengan warna bulu putih dan tikus aktif dengan desain. Pengelompokan tikus dilakukan dengan *simple random sampling*. Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan yaitu diet normal (P0), diet tinggi lemak (P1), diet tinggi lemak dengan EGCG 1 mg/kgbb/hari (P2), 2 mg/kgbb/hari (P3), 8 mg/kgbb/hari (P4) (12,13).

Sebelum perlakuan, tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 7 hari di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya dan dikelompokkan berdasarkan perlakuannya. Selama perlakuan tikus ditimbang 1 minggu sekali dan dihitung *intake* pakannya untuk mengetahui asupan energi, karbohidrat, protein dan lemak. *Epigallocatechin gallate* yang diberikan adalah EGCG murni dalam bentuk serbuk yang diperoleh dari hasil isolasi dan purifikasi EGCG teh hijau klon GMB4 dan diberikan melalui sonde.

Pakan diberikan per oral setiap hari. Pakan standar (normal) 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 terdiri dari pakan standar (pakan ayam/PARS 57.3% dan tepung terigu 31.8%) ditambah kolesterol 1.9%, asam folat 0,1% dan minyak babi 8.9%. Perhitungan *intake* energi dan zat gizi dihitung melalui jumlah rata-rata *intake* makan tikus dalam sehari (gram) dibagi dengan gram pakan yang disajikan dan dikalikan dengan jumlah energi atau zat gizi yang terdapat pada standar nilai pakan tersebut. Hasil analisis dengan *one way ANOVA* menunjukkan kelima kelompok homogen bila ditinjau dari berat badan awal ( $p=0.592$ ) maupun pertumbuhan berat badan sesudah pengkondisian ( $p=0.099$ ) maupun rata-rata asupan energi ( $p=0.068$ ).

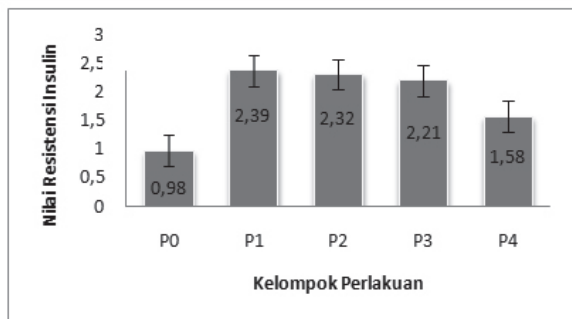
Resistensi insulin diukur dengan cara *the Homeostasis Model Assessment* (HOMA) yang dikelompokkan menjadi normal, patologis dan pre diabetes (14). Pengukuran kadar p13K dan p38MAPK dilakukan dengan metode ELISA. Langkah awal yang dilakukan pada metode ELISA ini adalah menentukan jumlah *well* yang digunakan pada *microtiter*. Untuk pembuatan kurva standar, dipipet 100 $\mu$ l *assay buffer* ke dalam sumuran (sebagai *blank well*), dipipet 100 $\mu$ l PI3K standar 1-7 atau P38 MAPK *fosforilated* standar 1-7 (pada pengukuran kadar p38 MAPK) ke dalam *well* yang telah ditentukan. Sampel jaringan diisolasi terlebih dahulu dengan menggunakan *buffer RIPA (radio*

digunakan untuk pengukuran kadar PI3K intrasel. Untuk sampel perlakuan, hal yang dilakukan adalah memipet 100  $\mu$ l masing-masing sampel perlakuan dan dimasukkan ke dalam sumuran. *Microtiter* diinkubasi pada suhu 37C selama 2 jam. Masing-masing *blank well* dicuci dengan *wash buffer* 3x 400  $\mu$ l. Masing-masing *blank well* diisi 100  $\mu$ l *conjugate*, kecuali pada *blank*. *Microtiter* diinkubasi pada suhu 37C selama 30 menit. Masing-masing *blank well* dicuci dengan *wash buffer* 3x400  $\mu$ l 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 panjang gelombang 492 nm.

Data hasil penelitian yaitu nilai resistensi insulin, kadar p13K dan p38 MAPK setiap kelompok perlakuan disajikan dalam mean  $\pm$  SD. Data resistensi insulin dianalisis menggunakan *one-way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tuckey* sedangkan kadar PI3K dan p38 MAPK dianalisis menggunakan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Mann Whitney* karena distribusi tidak normal meskipun telah ditransformasi.

## HASIL

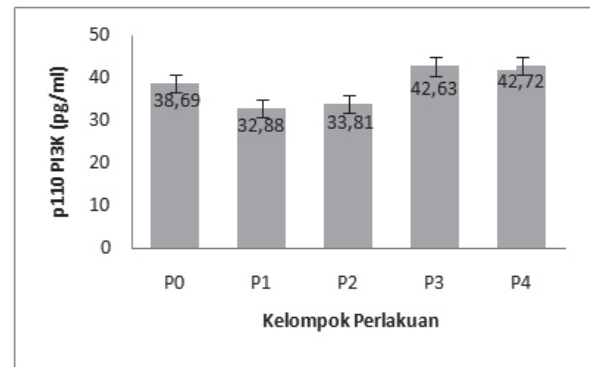
Hasil penelitian menggambarkan perbedaan tingkat resistensi insulin, ekspresi p110 PI3K dan p38 MAPK pada masing-masing kelompok perlakuan. Notasi pada semua gambar merujuk pada kelompok perlakuan berikut: diet normal (P0), diet tinggi lemak (P1), diet tinggi lemak dengan penambahan berturut-turut EGCG 1mg/kg BB/hari (P2), 2 mg/kg BB/hari (P3) dan 8 mg/kg BB/hari (P4)



Gambar 1. Rerata nilai resistensi insulin pada setiap kelompok

Gambar 1 menunjukkan bahwa rata-rata nilai resistensi insulin terendah didapatkan pada kelompok perlakuan diet normal (P0) sebesar  $0.98 \pm 0.16$ . Nilai resistensi insulin tertinggi didapatkan pada kelompok perlakuan diet tinggi lemak (P1) sebesar  $2.39 \pm 0.26$ . Jika dibandingkan antar kelompok perlakuan diet tinggi lemak dengan pemberian EGCG maka kelompok perlakuan diet tinggi lemak + EGCG 8mg/kgbb/hari memiliki rata-rata nilai resistensi insulin terendah yaitu sebesar  $1.58 \pm 0.18$ . Hasil uji statistik *One Way ANOVA* ( $\alpha = 0.05$ ) menunjukkan ada perbedaan rata-rata nilai resistensi insulin yang signifikan antar kelompok ( $p < 0.001$ ). Hasil pengujian dengan uji *Post Hoc Tuckey* menunjukkan pemberian EGCG dosis 1mg/kg BB/hari dan 2 mg/kgBB/hari pada diet tinggi lemak masih menunjukkan tingkat resistensi insulin yang lebih tinggi secara bermakna dibandingkan diet normal. Pemberian EGCG 8 mg/kgbb/hari pada diet tinggi lemak

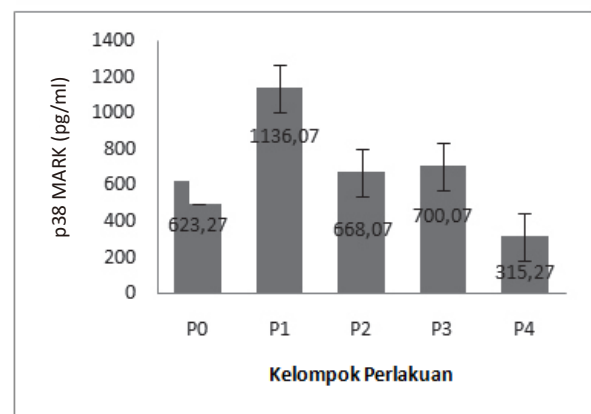
menunjukkan resistensi insulin yang sama dengan diet normal.



Gambar 2. Grafik rata-rata nilai ekspresi p110 PI3K dengan metode ELISA

Gambar 2 menunjukkan bahwa nilai ekspresi p110 PI3K terendah pada kelompok perlakuan diet tinggi lemak (P1) sebesar  $32.88 \pm 0.41$  g/ml, sedangkan nilai tertinggi pada kelompok perlakuan diet tinggi lemak + EGCG 8 mg/kgbb/hari (P4) yaitu sebesar  $42.73 \pm 2.25$  g/ml. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan ekspresi antar dua kelompok perlakuan ( $p < 0.001$ ).

Uji lanjut *Mann Whitney* menunjukkan bahwa terjadi penurunan ekspresi p110 PI3K yang signifikan dibandingkan normal pada diet tinggi lemak dan diet tinggi lemak dengan pemberian EGCG dosis 1 mg/kgbb/hari dan 2mg/kgbb/hari (P3). Pemberian EGCG 8 mg/kgbb/hari pada diet tinggi lemak (P4) mampu memperbaiki ekspresi p110 PI3K sehingga sama dengan normal.



Gambar 3. Grafik rata-rata nilai aktivitas p38 MAPK dengan metode ELISA

Gambar 3 menunjukkan bahwa nilai aktivitas p38 MAPK terendah terdapat pada kelompok perlakuan diet tinggi lemak + EGCG 8 mg/kgbb/hari (P4) sebesar  $315.27 \pm 44.59$  g/ml, sedangkan nilai tertinggi pada kelompok perlakuan diet tinggi lemak (P1) yaitu sebesar  $1136.1 \pm 295.71$  g/ml. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa paling tidak

kelompok perlakuan. Perbedaan tersebut tampak dari uji lanjut *Mann Whitney* bahwa kelompok diet normal (P0) berbeda dengan kelompok diet tinggi lemak (P1) dan kelompok diet tinggi lemak + EGCG 8mg (P4), sedangkan kelompok diet tinggi lemak (P1) berbeda dengan semua kelompok perlakuan (P0, P2, P3 dan P4).

## DISKUSI

Diet tinggi lemak yang diberikan pada penelitian ini bertujuan untuk membentuk resistensi insulin. Pemberian diet tinggi lemak tersebut diharapkan dapat meningkatkan asupan *intake* energi sehingga dapat menyebabkan *positive energy balance* dan sebagai konsekuensi kondisi ini adalah terjadi *positive fat balance*. Keadaan ini menyebabkan tingginya kadar *free fatty acid* (FFA) yang dapat memicu terjadinya resistensi insulin. Sejalan dengan teori tersebut penelitian ini menemukan resistensi insulin tertinggi pada kelompok dengan diet tinggi lemak bila dibandingkan diet normal.

Pada vaskuler, tingginya FFA ini menginisiasi beberapa proses seluler yaitu kerusakan *signaling* insulin, stres oksidatif, peningkatan RAAS (*Renin Angiotensin Aldosteron System*) lokal dan peningkatan sensitivitas adrenergic VSMC (*vascular smooth muscle cell*). Selain itu, peningkatan FFA oksidasi akan meningkatkan *intramitokondrial acetyl CoA/CoA* dan rasio NADH/NAD<sup>+</sup> yang selanjutnya akan menginaktivasi piruvat dehidrogenase. Hal ini menyebabkan konsentrasi sitrat meningkat sehingga memicu penghambatan fosfotruktokinase yang selanjutnya terjadi akumulasi G-6 fosfat. Peningkatan konsentrasi G-6 fosfat akan menghambat *hexokinase II* yang menyebabkan penurunan *uptake* glukosa (15). Intraseluler metabolit toksik dari metabolit triasilgliserol dan NEFA yaitu DAG, *ceramide* menyebabkan resistensi insulin yang lebih berat dengan jalan merusak jalur *signaling* insulin dan banyak tahapan metabolisme glukosa intraseluler (2).

Mekanisme lain disebutkan bahwa dengan pemberian diet tinggi lemak dapat meningkatkan FFA sehingga terjadi peningkatan ROS yang akan memicu aktivasi *stress activated protein kinase* yang menyebabkan peningkatan fosforilasi serin dan penurunan fosforilasi tirosin pada IRS-1. Hal inilah yang menjadi penyebab resistensi insulin. Selain jalur ROS tersebut, juga terdapat dua jalur lainnya yang menginduksi resistensi insulin yaitu jalur fosforilasi serin dan jalur PKC. Pada jalur fosforilasi serin, fosforilasi serin yang berlebihan akan menyebabkan penurunan kemampuan IRS untuk berikatan dengan PI3K sehingga menyebabkan penurunan aktivitas PI3K (16). Selain itu, sitokin-sitokin yang dihasilkan oleh sel lemak seperti TNF $\alpha$ , IL-6 dan resistin dapat menyetuskan terjadinya resistensi insulin dikarenakan kerjanya sebagai proinflamasi. Efek-efek ini dapat mengganggu fungsi GLUT-4 sebagai transporter glukosa sehingga tidak dapat memasukkan glukosa ke dalam sel (17).

Pada kelompok diet tinggi lemak tanpa konsumsi EGCG didapatkan hasil penurunan kadar p110 PI3K terendah ( $32.88 \pm 0.41$  pg/ml) dan kadar p38 MAPK tertinggi ( $1136.07 \pm 295.71$  pg/ml) pada aorta hewan coba secara bermakna. Hal ini menunjukkan resistensi insulin pada diet tinggi lemak mempengaruhi jalur PI3K dan MAPK pada vaskuler. Pada kelompok diet tinggi lemak didapatkan nilai resistensi insulin tertinggi yaitu  $2.39 \pm$

0.26 atau dapat dimasukkan dalam kategori patologis (Nilai HOMA  $\geq 2$ ). Kondisi ini diduga disebabkan oleh defek pada jalur *signaling* insulin pada PI3K karena terjadinya peningkatan fosforilasi serin IRS-1 dan penurunan insulin yang memicu fosforilasi tirosin IRS-1, fosforilasi PI3K, Akt dan aktivitas eNOS. Fosforilasi serin atau *threonin* IRS-1 menyebabkan desensitisasi *signaling* insulin. Fosforilasi serin berperan penting dalam degradasi beberapa protein yang terlibat dalam jalur *signaling* termasuk degradasi IRS-1 (17).

Pada vaskuler, aktivitas insulin dimulai dari adanya ikatan dengan insulin reseptor unit alfa. Reseptor ini akan mengaktifkan reseptor tirosin kinase intrinsik dan akan menghasilkan autofosforilasi insulin reseptor unit beta dan tirosin fosforilasi dari protein adaptor intraseluler seperti IRS, baik IRS-1 maupun IRS-2, dan Shc. IRS-1 dan IRS-2 yang telah terfosforilasi tirosin akan berikatan dengan Src homologi 2 (SH2) domain dari protein intraseluler termasuk p85 subunit *regulatory* dari PI3K. Interaksi dari IRS dan subunit p85 ini menyebabkan aktivasi dari p110 subunit katalitik dari PI3K. Hasil penelitian lain menyebutkan kerusakan *signaling* pada jalur PI3K ditunjukkan melalui penurunan ekspresi mRNA dan protein IRS-1 dan IRS-2, ekspresi subunit *regulatory* dan katalitik p110 serta ekspresi tirosin fosforilasi pada IRS-1 dan IRS-2 (18).

Pada kondisi resistensi insulin akibat diet tinggi lemak memicu peningkatan aktivitas p38 MAPK secara bermakna. Kondisi ini menunjukkan terjadinya stimulasi insulin pada jalur MAPK. Hal ini dapat dijelaskan dengan prinsip *signaling* sel, yaitu ketika terjadi kerusakan pada salah satu jalur maka *signaling* akan tetap diteruskan melalui jalur yang lain. Hal yang terjadi pada *signaling* insulin ketika terjadi hambatan pada jalur PI3K maka akan diteruskan pada jalur MAPK sehingga memicu jalur MAPK secara berlebihan.

*Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) merupakan rangkaian kinase yang terdiri dari 3 kinase yaitu *extracellular signal regulated kinase* (ERK1/2), *c-JUN N-terminal kinases/ stress activated protein kinase* (JNK/SAPK) dan p38. P38 MAPK diaktifkan oleh stimuli sinar UV, peningkatan osmolaritas ekstrasel, sitokin proinflamasi atau produk mikroba patogen. Sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF  $\beta$  dan adipositokin sebagai akibat pemberian diet tinggi lemak dapat mengaktifkan rangkaian kinase dalam jalur MAPK termasuk p38 MAPK.

*Receptor Tyrosin Kinase* (RTKs) merupakan jalur *signaling* insulin yang dapat mengaktifkan MAPK dan PI3K. RTKs merupakan regulator kunci termasuk proliferasi, diferensiasi, migrasi dan kematian sel. RTKs pada jalur *signaling* berperan dalam katalisis transfer fosfat dari ATP ke residu tirosin pada substrat protein. Fosforilasi ini menyebabkan aktivitas enzimatis dan membentuk tempat ikatan untuk *downstream signaling* rekrutmen protein berikutnya. Jalur MAPK diaktivasi oleh RTKs dan aktivasi dari adapter protein (Grb2, Shc dan Sos) yang akan mengaktifkan Ras. *Serin/threonin* kinase Raf- diaktifkan oleh Ras yang kemudian memfosforilasi dan mengaktifkan MEK  $\frac{1}{2}$  pada dua residu serin. MEK  $\frac{1}{2}$  kemudian mengaktifkan ERK1 dan ERK2. Hasil aktivasi MAPK adalah aktivasi faktor transkripsi seperti AP-1 yang memacu perubahan ekspresi gen yang penting dalam proliferasi dan migrasi sel. Jalur PI3K juga diaktifkan oleh RTKs. PI3K yang teraktivasi oleh RTKs menginduksi sintesis *second*



messenger lipid PIP3. PIP3 diperlukan untuk fosforilasi Akt.

Hasil penelitian menunjukkan pada kelompok perlakuan diet tinggi lemak dengan EGCG 8 mg/kgbb/hari tidak terjadi resistensi insulin. Hubungan ini menunjukkan bahwa pada EGCG dosis 8 mg/kgbb/hari merupakan dosis yang optimum dalam menghambat terjadinya resistensi insulin dan diharapkan dapat mencegah terjadinya disfungsi endotel.

Pada jaringan adiposit dan jaringan otot, insulin memiliki efek biologi yang sangat penting terhadap *vasculature*. Insulin memiliki efek terhadap vasodilatasi dan vasokonstriksi dengan NO sebagai mediator utama pada vasodilatasi dan mediator utama pada vasokonstriksi pada *endotelin-1* (19). Pada kondisi insulin resisten ditandai dengan gangguan spesifik pada jalur PI3K-*dependent signaling*, mengingat jalur dari insulin signaling lainnya seperti Ras/ MAPK-*dependent* tidak memberikan efek. Dalam *vasculature* dan ditempat lain, insulin yang meningkat tidak mempengaruhi jalur MAPK-*dependent* yang memicu ketidak seimbangan antara PI3K dan MAPK yang bergantung pada fungsi insulin. *Prohipertensif* mempengaruhi insulin untuk meningkatkan sekresi ET-1, mengaktifkan pompa kation, dan meningkatkan ekspresi VCAM-1 dan adesi molekul lain yang masih di bawah kontrol jalur MAPK signaling. Pada endotelium, penurunan signal PI3K dan peningkatan *signal* MAPK dalam merespon insulin kemungkinan menyebabkan penurunan produksi NO dan peningkatan sekresi ET-1 yang menandai disfungsi endotel (20).

Katekin yakni EGCG mampu menghambat adipogenesis dari sel preadiposit terkait dengan jalur MAPK, khususnya ERKs yang distimulasi oleh faktor-faktor pertumbuhan. Katekin merupakan *inhibitor tirosin kinase* alamiah yang dapat memodifikasi aktivitas berbagai macam signaling kinase antara lain ERK1/2, protein kinase B (Akt), PI3K dan p38 MAPK (12). Penelitian lain terkait intervensi EGCG pada tikus dijelaskan efek EGCG terhadap fungsi endotel pada kultur endotel atau isolate aorta tikus, dimana hasil yang ada menunjukkan bahwa EGCG mengaktifasi eNOS dan memproduksi "*endothel-dependent*" relaksasi pada arteri. Dengan menggunakan inhibitor farmakologi, menunjukkan bahwa EGCG mengaktifkan eNOS yang tergantung pada PI3K, siklus *adenosine monophosphate-*

*dependent protein kinase* (PKA) dan Akt (17).

*Epigallocatechin gallate* (EGCG) memberikan pengaruh terhadap resistensi insulin, PI3K dan p38 MAPK pada aorta hewan coba yang diberikan diet tinggi lemak berdasarkan mekanismenya sebagai *flavonoid*. *Flavonoid* merupakan antioksidan yang dapat menangkap ROS dan menghambat peroksidasi lipid. Polifenol memiliki efek proteksi tidak langsung melalui aktivitas sistem pertahanan endogen dan dengan memodulasi proses signaling seluler seperti NFkB, ikatan DNA activator protein-1 (AP-1), biosintesis glutation, jalur PI3K/PKB (Akt), aktivasi MAPK (ERK, JNK, p38) dan translokasi ke nukleus 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 salah satu pertahanan seluler utama terhadap stress oksidatif. Hasil penelitian Chen (2000), menunjukkan bahwa EGCG dan ECG menginduksi ekspresi gen yang diperantarai oleh ARE melalui aktivasi protein MAPK yaitu ERK, JNK, dan p38 (13).

*Epigallocatechin gallate* (EGCG) dapat mengaktifasi eNOS melalui dua mekanisme yaitu melalui peningkatan  $Ca^{2+}$  serta fosforilasi eNOS melalui jalur PI3K/ Akt. *Bovine Aortic Endothelial Cell* (BAEC) EGCG dapat menginduksi Aktivasi Akt, ERK1/2, dan fosforilasi eNOS pada serin 1179. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang telah dilakukan dimana EGCG dapat menghambat penurunan ekspresi p110 PI3K pada aorta sebagai *upstream signaling* Akt dan eNOS (4).

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian isolat EGCG teh hijau klon GMB4 dapat memperbaiki resistensi insulin dengan menghambat ekspresi p110 PI3K dan aktivasi MAPK, dengan dosis optimum 8mg/kg BB/hari. Fakta ini perlu didukung dengan kajian lebih lanjut tentang *downstream* jalur MAPK dan PI3K yaitu NO dan ET-1 serta parameter spesifik dari resistensi insulin seperti *Glukosa Tolerance Test* (GTT) dan *Insulin Tolerance Test* (ITT) sehingga dapat mendukung potensi isolat EGCG teh hijau klon GMB4 dalam menghambat terjadinya resistensi insulin dan mencegah terjadinya disfungsi endotel.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Almtsier S. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama; 2001.
2. Hotamisligil GS, Shargill NS, and Spiegelman BM. *Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance*. Science. 1993; 259(5091): 87-91.
3. Hsueh WA and Law RE. *Endotelial Dysfunction an Important Componen of Insulin*. Circulation. 2001; 103: 207-212.
4. Kim YI, Lee FN, and Choi WS. *Insulin Regulation of Sceletal Muscle PDK4 mRNA Expression is Impaired in Acute Insulin Resistant state*. Diabetes. 2006; 55(8): 2311-2317.
5. Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, et al. *Insulin Resistance in Spontaneously Hypertensive Rats is Associated with Endothelial Dysfunction*
6. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, and Quon MJ. *Reciprocal Relationships between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: Molecular and Pathophysiological Mechanisms*. Circulation. 2006; 113: 1888-1904.
7. Eringa EC, Stehouwer CD, Van Nieuw Amerongen GP, Ouwehand L, Westerhof N, and Sipkema P. *Vasoconstrictor Effects of Insulin in Skeletal Muscle Arterioles are Mediated by ERK 1/ 2 Activation in Endothelium*. American Journal of Physiology Hearth and Circulatory Physiology. 2004; 287(5): 2043-2048.
8. Wolfram S. *Effect of Green Tea and EGCG on Cardiovascular and Metabolic Health*. Journal of the American Collage of Nutrition. 2007; 26(4): 373S-388S.

*Characterized by Imbalance between NO and ET-1 Production*. American Journal of Physiology Hearth and Circulatory Physiology. 2005; 289(2): 813-822.

9. Ratnawati, Ciptati R, dan Satuman. *Isolasi EGCG dari Teh Hijau Klon GMB4 Jawa Barat*. [Laporan Program Intensif Riset Dasar]. RISTEK Kementerian Negara Riset dan Teknologi. 2009.
10. Passamonti S, Terdoslavich M, Franca R, et al. *Bioavailability of Flavonoids. A Review of Their Bilitranslocase in Animal and Plant Organism*. Current Drug Metabolism. 2009; 10(4): 369-394.
11. Stang V, Dreger H, Stangl K, and Lorenz M. *Molecular Targets of Tea Polyphenols in the Cardiovascular System*. Cardiovascular Research. 2007;73:348–358.
12. Potenza MA, Marasciulo MA, and Tarquino M. *EGCG, a Green Tea Polyphenol, Improves Endothelial Function and Insulin Sensitivity, Reduces Blood Pressure, and Protects Against Myocardial I/R Injury in SHR*. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism. 2007; 292(5): 1378-1387.
13. Chen N, Bezzina R, Hinch E, et al. *Green Tea, Black Tea, and Epigallocatechin Modify Body Composition, Improve Glucose Tolerance, and Differentially Alter Metabolic Gene Expression in Rats Fed A High-Fat Diet*. Nutrition Research. 2009; 29(11): 784-793.
14. Sink A. *Insulin Resistance in Patients with Chronic Hepatitis*. Journal Timisoarea Medical. 2007; 57: 240–244.
15. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, and Yang CS. *The Major Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, Inhibits Obesity, Metabolic Syndrome, and Fatty Liver disease in High-Fat-Fed Mice*. The Journal of Nutrition. 2008; 138(9): 1677-1683.
16. Rockenfeller P, Ring Julia, and Muschett V. *Fatty Acids Trigger Mitochondrion-dependent Necrosis*. Cell Cycle. 2010; 9(14): 2836-2842
17. Lorenz M, Wessler S, Follmann E, et al. *A Constituent of Green Tea, Epigallocatechin-3-Gallate, Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase by a Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-, cAMP-Dependent Protein Kinase Vasorelaxation*. The Journal of Biological Chemistry. 2004; 279(7): 6190-6195.
18. Ueki K, Yballe CM, Brachmann SM, et al. *Increase Insulin Sensitivity in Mice Lacking p85 $\beta$  Sub Unit of Phosphoinositol 3 Kinase*. Proceeding of National Academy of Academic Science of United State of America. 2002; 99(1): 419-424.
19. Ritchie SA, Ewart MA, Perry CG, Connell JM, and Salt IP. *The Role of Insulin and the Adipocytokines in Regulation of Vascular Endothelial Function*. Clinical Science. 2004; 107(6): 519-532.
20. Montagnani M, Inga G, Injune K, et al. *Inhibition of Phosphatidylinositol 3- Kinase Enhance Mitogenic Actions of Insulin in Endhotelial Cells*. The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277(3): 1794-1799.