

Regulasi Adipogenesis oleh mTORC1 melalui Jalur STAT3

Adipogenesis Regulation of mTORC1 through STAT3 Pathway

Triawanti¹, M Rasjad Indra², Askandar Tjokroprawiro³, Hidayat Sujuti⁴

¹Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin

²Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³Pusat Diabetes dan Nutrisi Surabaya (PDNS) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya

⁴Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Obesitas merupakan suatu penyakit kelebihan massa lemak tubuh yang mempunyai efek merugikan bagi kesehatan. Pada saat ini proses adipogenesis menjadi salah satu target terapi obesitas. Salah satu jalur yang diduga teraktivasi pada proses adipogenesis adalah melalui aktivasi STAT3 yang salah satu jalur hulunya melalui protein *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTOR). Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan proses adipogenesis melalui jalur STAT3 yang diaktivasi oleh mTORC1. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control*. Untuk penghambatan mTORC1 digunakan *rapamycin* dan penghambatan STAT3 digunakan *inhibitor STAT3 peptide*. Subjek penelitian adalah kultur primer sel preadiposit yang diambil dari lemak visceral tikus putih *Rattus norvegicus*. Setelah kultur sel preadiposit dinilai konfluen minimal 70-80% dilakukan induksi diferensiasi dan dibagi menjadi 4 kelompok yakni (K) kontrol (A): diberi *rapamycin* 10 nM, (B): diberi inhibitor STAT3 100 μ M (C): diberi inhibitor STAT3 100 μ M dan *rapamycin* 10 nM. Parameter yang diukur adalah aktivasi p70S6K1, STAT3, ekspresi C/EBP δ , aktivitas enzim *Glycerol-3-fosfodehidrogenase* (GPDH) pada hari ke-2, ke-4 dan ke-6 serta gambaran morfologis sel adiposit. Analisis statistik menggunakan uji ANOVA, *Duncan* dan korelasi *Pearson* dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil penelitian membuktikan terjadi penghambatan proses adipogenesis karena penghambatan aktivasi p70S6K1, dan STAT3 oleh *rapamycin* dan inhibitor STAT3. Penghambatan akan lebih kuat pada pemberian kombinasi *rapamycin* dengan inhibitor STAT3. Secara statistik terdapat hubungan antara p70S6K1 dengan STAT3 serta antara STAT3 dengan enzim GPDH. Dapat disimpulkan bahwa proses adipogenesis dapat diregulasi oleh mTORC1 melalui aktivasi p70S6K1 dan STAT3.

Kata Kunci: Adiposit, obesitas, mTORC1, p70S6K1, STAT3

ABSTRACT

Recently, the processes of adipogenesis become a treatment target for obesity. One of the pathways that allegedly participated in the process of adipogenesis is activated via STAT3. The upstream line of is protein of mammalian targets of rapamycin complex 1 (mTOR). This study aimed to determine the role of STAT3 in adipogenesis through activation of p70S6K1 by mTORC1. This was an experimental study with a post test only with control group design. Subjects were primary cultured preadipocytes taken from visceral fat white rat (*Rattus norvegicus*). As cell cultured were at least 70-80% confluent, the induction of differentiation of preadipocytes were initiated. Cell cultures were divided into 4 groups: (K) Control of adipogenesis (A): added a rapamycin 10 nM, (B): added a 100 μ M inhibitor STAT3 peptide, (C): added a inhibitor STAT3 peptide and rapamycin 100 μ M and 10 nM. The indicator of adipocytes were p70S6K1, STAT3 activation, and the activity of Glycerol-3-phospho dehidrogenase (GPDH) and the morphology of adipocytes. Data was analyzed using ANOVA test, Duncan test and Pearson Correlation test with 95% confidence level. The data indicated that adipogenesis can be blocked as the inhibition of p70S6K1 and STAT3 activation by rapamycin and STAT3 inhibitor. The inhibition was stronger at the rapamycin+STAT3 inhibitor group. Statistically, there were a significant correlation between p70S6K1 and STAT3; STAT3 and GPDH enzyme. It can be concluded that adipogenesis can be regulated by mTORC1 through the activation p70S6K1, STAT3.

Keywords: Adipocytes, obesity, mTORC1, p70S6K1, STAT3

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 27, No. 3, Februari 2013; Korespondensi: Triawanti. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin, Jl. Brigjen. H. Hasan Basri Kotak Pos 219 Banjarmasin Tel. (0511) 54177 Email: tria_fkunlam@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Obesitas merupakan penyakit kelebihan lemak tubuh dan memberikan efek merugikan bagi kesehatan seseorang. Saat ini obesitas telah menjadi permasalahan kesehatan masyarakat dunia (1). Hampir 1,6 milyar orang dewasa di seluruh dunia mengalami berat badan berlebih dan sekurang-kurangnya 400 juta diantaranya mengalami obesitas. Pada tahun 2015, diperkirakan 2,3 milyar orang dewasa akan mengalami berat badan berlebih dan 700 juta diantaranya obesitas. Sementara itu, sedikitnya 20 juta anak-anak dibawah 5 tahun mengalami obes secara global pada tahun 2005 (2). Di Indonesia, menurut data Riset Kesehatan Dasar (Riskesmas) tahun 2010, prevalensi nasional obesitas umum pada penduduk berusia >18 tahun adalah 11,7%. Sementara itu prevalensi berat badan berlebih anak-anak balita 14,0%, usia 13-15 tahun sebesar 2,5% dan usia 16-18 tahun sebesar 1,4% (3). Angka ini meningkat dibandingkan prevalensi tahun 2007 (4).

Banyak faktor yang menyebabkan seseorang mengalami obesitas. Secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa berat badan berlebih dan obesitas merupakan akibat dari interaksi banyak faktor yaitu genetik, metabolik, perilaku dan pengaruh lingkungan (5). Dengan demikian obesitas menjadi suatu keadaan yang tidak mudah diterapi oleh karena etiologi yang kompleks. Sebagai konsekuensinya, obat yang mampu untuk menyembuhkan obesitas sangat sedikit, mekanisme kerjanya sulit dipahami dan efek samping yang ditimbulkan pada umumnya serius (6). Selain itu, meskipun homeostasis energi tubuh secara keseluruhan dipelihara oleh berbagai jalur, kebanyakan target obat-obat antiobesitas hanya satu tempat (7). Agar dapat mencari suatu obat antiobesitas yang ideal maka perlu diketahui tempat dan molekul yang tepat dan dapat dijadikan sebagai agen target. Untuk itu perlu pemahaman yang lebih mendalam terhadap patomekanisme obesitas.

Salah satu jaringan yang paling berperan dalam patomekanisme obesitas adalah jaringan adiposa terutama yang dibentuk oleh sel-sel lemak putih. Pada obesitas terjadi akumulasi jaringan lemak putih akibat peningkatan ukuran sel lemak (hipertrofi) dan peningkatan jumlah sel-sel matang baru dari prekursor yang sebelumnya tidak terdiferensiasi (hiperplasi). Proses diferensiasi dan pematangan sel adiposit (adipogenesis) menjadi salah satu target terapi obesitas. Tahap ini memerlukan pengaktifan sejumlah *cascade* faktor transkripsi yang mampu untuk menginduksi dan menghilangkan secara terkoordinasi peran lebih dari 2000 gen yang terlibat dalam regulasi seluruh aspek morfologi dan fisiologi adiposit. Satu dari tahap pertama adipogenesis adalah peningkatan ekspresi dan akumulasi faktor transkripsi CCAAT/*enhancer-binding proteins* C/EBP β dan C/EBP δ . Selanjutnya secara bertahap terjadi pengaktifan transkripsi C/EBP α dan PPAR γ 2 yang merupakan regulator dari proses adipogenesis (8,9).

Peningkatan ekspresi C/EBP β dan C/EBP δ diregulasi oleh faktor transkripsi di atasnya yaitu *cAMP respon element binding protein* (CREB) (10) dan diduga juga oleh *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) (11). Aktivasi STAT3 memerlukan faktor transkripsi di atasnya. Pada umumnya, STAT3 difosforilasi oleh jalur JAK dan Src. Sementara itu belum banyak penelitian yang mengungkap jalur lain yang mungkin turut mengaktifasi STAT3

khususnya pada proses adipogenesis.

Salah satu jalur *upstream* dari STAT3 yang diduga turut teraktivasi pada proses adipogenesis adalah protein *mammalian target of rapamycin* (mTOR). mTOR adalah suatu *serine/threonin* protein kinase yang berfungsi sebagai sensor nutrisi intraseluler untuk mengontrol sintesis protein, pertumbuhan sel dan metabolisme (12). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mTOR mengintegrasikan input dari banyak jalur *upstream* meliputi insulin, faktor pertumbuhan (misalnya IGF-1 dan IGF-2), dan mitogen, *downstream* dan jalur transduksi sinyal paralel untuk meregulasi beberapa aspek fisiologi seluler (11,13).

Mammalian target of rapamycin mengikat komponen regulator lainnya untuk membentuk 2 kompleks multiprotein yang berbeda (12). Kompleks pertama adalah mTORC1, mengandung mTOR, *regulator-associated protein of mTOR* (Raptor), dan G protein β *subunit-like protein* (G β L). Kompleks kedua adalah mTORC2 mengandung mTOR, *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor), *mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1* (mSin 1) dan G β L (12,14-16). Sesuai komponen yang terkandung di dalamnya, mTORC1 sangat sensitif terhadap *rapamycin* yang dapat menghambat aktivitas mTORC1 (12). Beberapa penelitian yang menggunakan *rapamycin* untuk menghambat aktivasi mTORC1 menunjukkan adanya perbedaan fosforilasi p70S6K1, 4E-BP1 dan ekspresi C/EBP α dan PPAR γ yang merupakan regulator utama adipogenesis (17,18).

Berdasarkan hal-hal tersebut timbul suatu permasalahan apakah penghambatan mTORC1 oleh *rapamycin* efektif untuk mencegah diferensiasi adiposit melalui jalur STAT3. Perlu dilakukan suatu penelitian untuk membuktikan regulasi mTORC1 dalam proses adipogenesis melalui pengaktifan STAT3. Apabila jalur ini terbukti maka dapat diaplikasikan dalam upaya mencari obat atau bahan alam yang dapat bekerja sebagai inhibitor molekul-molekul yang terlibat dalam jalur tersebut.

METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan kultur sel primer preadiposit. Rancangan penelitian adalah *post-test only control group*. Kultur sel preadiposit dibagi menjadi beberapa kelompok perlakuan yaitu: 1) kelompok kontrol adipogenesis: kultur sel preadiposit yang diinduksi diferensiasinya tanpa pemberian *rapamycin*, inhibitor STAT3 maupun RNAi CREB; 2) kelompok perlakuan A: kultur sel preadiposit yang diinduksi diferensiasinya ditambah *rapamycin* dengan dosis 10 nM; 3) kelompok perlakuan B: kultur sel preadiposit yang diinduksi diferensiasinya ditambah dengan inhibitor STAT3 100 μ M tanpa *rapamycin*; 4) kelompok perlakuan C: kultur sel preadiposit yang diinduksi diferensiasinya ditambah dengan inhibitor STAT3 100 μ M ditambah *rapamycin* 10 nM. Jumlah pengulangan (sampel) untuk tiap-tiap perlakuan sebanyak 6 kali. Penelitian ini menggunakan kultur primer sel preadiposit yang diambil dari jaringan adiposa viseral tikus putih (*Rattus norvegicus*). Sel preadiposit diisolasi dari jaringan adiposa viseral tikus kemudian dikultur dan diinduksi proses adipogenesisnya.

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *collagenase* tipe I (Sigma), larutan HEPES, NaHCO₃, biotin, *D-pantothenate* dan 10% FBS, *nylon mesh*, 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), etanol 95%, *Dublbeco phosphate buffer saline* (dPBS) sebagai larutan pencuci, *deionized water* sebagai pelarut, *Rapamycin*, L-glutamat, *STAT3 inhibitor peptide*, *Oil Red O*, formalin 10%, *Meyer hematoksilin*, *propylene glycol* 85 %, *propilen glikol* 100%, gelatin, *aquadest*, DAB, *Streptavidin horse radish peroxidase* (SA-HRP), *entellan*.

Antibodi primer untuk pemeriksaan imunositokimia digunakan: *polyclonal rat anti p70S6K1 Ser⁴²⁴/Thr⁴²¹* (Santa Cruz Biotech. No cat. sc-7984-R), *Rat-anti phospho-specific STAT3 (Ser⁷²⁷)* (Santa Cruz Biotech. No cat. sc-21876). Untuk pewarnaan imunositokimia digunakan *ImmunoCruz mouse LSAB staining system* (Santa Cruz Biotech. No cat. sc-2050). Untuk pemeriksaan aktivitas enzim GPDH digunakan kit *GPDH Assay* (AK O1 *Primary Cell Co.*Ltd).

Prosedur Penelitian

1. Isolasi Sel dan Kultur Sel

Preadiposit diisolasi dari jaringan lemak visceral tikus putih *Rattus norvegicus strain wistar* yang berumur 4-6 minggu melalui pembedahan. Sebelum dibedah tikus dianestesi dengan ketamin. Kemudian dibuka bagian abdomen dan diambil jaringan lemak di retroperitoneal dan epididimis. Pengambilan jaringan dilakukan secara steril. Jaringan lemak yang diperoleh dimasukkan ke dalam larutan transpor. Selanjutnya pekerjaan dilanjutkan di ruang kultur. Jaringan lemak yang diperoleh dipisahkan dari jaringan fibrous dan pembuluh darah, jaringan adiposa dicuci kemudian jaringan dicacah. Suspensi jaringan diinkubasi dengan 0,2% mg/ml *Collagenase* tipe I (Sigma) selama 45-60 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 NaHCO₃, dan 10% FBS yang telah difiltrasi dengan *nylon mesh* (250 µm). 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. Selanjutnya sel ditanam pada *plate* 24 yang telah dilapisi dengan *cover glass* di tiap *well*-nya dan dilapisi gelatin, kemudian ditambah media kultur yang mengandung FBS 10%. Sel juga ditanam pada *flask* yang telah diberi media kultur+FBS 10% (18).

2. Induksi Diferensiasi Sel disertai Pemberian Rapamycin dan Inhibitor STAT3

Setelah preadiposit mengalami *confluence* 70-80%, sel 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 *isobuthylmethylxanthine* [IBMX]). *Rapamycin* dan inhibitor *STAT3* dilarutkan dengan pelarut DMSO. Pada kelompok yang telah ditentukan diberi perlakuan penambahan *rapamycin* 10 nM (kelompok A), inhibitor

STAT3 100 µM (kelompok B), inhibitor *STAT3* 100 µM+*rapamycin* 10 nM (kelompok C). Selanjutnya sel ditumbuhkan pada *culture plate* dengan inkubasi pada suhu 37°C, 5 % CO₂. Kemudian dilakukan pengukuran pada masing-masing kelompok pada hari ke-2, ke-4 dan ke-6.

3. Pemanenan Sel

Panen sel untuk pewarnaan *Oil Red O* dimulai dari: *plate* dikeluarkan dari inkubator didiamkan pada suhu ruang, selanjutnya dicuci dengan PBS 2 kali. Kemudian sel difiksasi dengan formalin 10% 1 mL tiap *well* selama 20 menit. Setelah 20 menit, formalin diaspirasi dan sel dicuci dengan PBS, untuk selanjutnya sel siap diberi pewarnaan *Oil Red O*. Panen sel untuk imunositokimia dimulai dari: *plate* dikeluarkan dari inkubator didiamkan pada suhu ruang. Selanjutnya sel dicuci dengan PBS 2 kali. Kemudian sel difiksasi dengan metanol 60% selama 10 menit. Setelah itu sel dicuci dengan PBS 2 kali dan siap untuk dilakukan pengecatan imunositokimia.

4. Pemeriksaan Imunositokimia untuk Aktivasi p70S6K1 dan STAT3

Pada sel yang telah difiksasi dilakukan permeabilisasi sel dengan cara sel dicuci 1 kali dengan PBS, sel diinkubasi pada 3% H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit suhu ruang. Kemudian sel dicuci 3 kali dengan PBS. Selanjutnya dilakukan blocking sel dengan cara sel diinkubasi pada 10% Goat serum atau FBS atau BSA yang mengandung triton-X 0,25% selama 1 jam pada suhu ruang, selanjutnya sel dicuci 3 kali dengan PBS. Setelah itu dilakukan inkubasi sel pada antibodi primer, yaitu antibodi primer diencerkan dalam goat serum/FBS/BSA hingga konsentrasi dan volume yang diinginkan. Sel diinkubasi pada antibodi primer pada suhu 4°C selama 12 jam atau pada suhu ruang selama 2 jam, lalu sel dicuci dalam PBS selama 3 x 5 menit.

Tahap selanjutnya adalah inkubasi sel pada antibodi sekunder dengan langkah-langkah: antibodi sekunder berlabel biotin diencerkan dalam PBS sampai konsentrasi dan volume yang diinginkan (1:500 dalam PBS). Sel diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam pada suhu ruang. Sel dicuci dengan PBS selama 3x5 menit kemudian ditetesi dengan SA-HRP 1:500 dalam PBS selama 60 menit. Sel kembali dicuci dengan PBS selama 3x5 menit dan ditetesi dengan DAB (*diamino benzidine*) selama 10 menit dalam ruang gelap. Sel dicuci dengan *aquadest* 3 x 5 menit. Selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan *Mayer's hematoxilen* selama 10 menit. Sel dicuci/ditetesi dengan air kran. Sel dicuci dengan *aquadest* selama 10 menit, kemudian dibiarkan pada suhu kamar.

Tahap selanjutnya adalah *mounting* yaitu *cover glass* diambil dari *plate* kultur. *Cover glass* dibalik dan diletakkan di atas *slide*, sehingga sel yang telah di-imunositokimia tadi berada antara *slide* dan *cover glass*. Setiap slide diberi label. Satu tetes medium *mounting* (*entellan*) dijatuhkan ke atas preparat. *Cover glass* ditutupkan ke atas preparat yang telah diberi *mounting* medium. Selanjutnya diamati dengan mikroskop (18).

Penentuan aktivasi p70S6K1 dan *STAT3* dilakukan dengan cara menghitung prosentase sel pada preparat yang memberikan warna coklat pada bagian sitoplasma atau intinya pada setiap lapang pandang yang dibagi menjadi 4 kuadran. Kemudian diambil rerata dari 5 lapang pandang yang diamati pada setiap preparat.

5. Pengukuran Kadar Gliserofosfat Dehidrogenase (GPDH)

Kit GPDH Assay (AK01) terdiri atas substrat dan *enzyme extraction reagent* yang dilarutkan dalam 200 mL *aquadest*. Satu botol substrat dilarutkan dengan 4,2 mL *aquadest*. Persiapan sampel dimulai dari mengaspikasi medium kultur dan mencuci sel dengan 500 uL PBS. Selanjutnya tambahkan larutan enzim ekstraksi pada tiap sumuran 0,5-1 mL tiap sumur untuk *plate* 24 sumuran. Kemudian dihomogenisasi. Selanjutnya pemeriksaan mengikuti prosedur sebagai berikut: memasukkan 400 uL larutan substrat ke dalam *cuvette* spektrometer dan biarkan pada suhu 25°C atau suhu ruang. Kemudian tambahkan 200 uL sampel pada *cuvette* dan campur dengan baik. Setelah itu diukur pada panjang gelombang 340 nm dan dicatat perubahan absorbansi tiap menit (3-10 menit). Penghitungan aktivitas GPDH mengikuti rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas GPDH (U/mL)} = (\Delta O.D \times 0,6 \times \text{faktor pengencer}) / (6,22 \times 0,2 \times 1)$$

Keterangan :

$\Delta O.D$ = nilai perubahan absorbansi pada 340 nm per menit
 0,6 = total volume (mL) dari bahan yang diperiksa
 6,22 = milimolar koefisien ekstingsi NADH pada 340 nm
 0,2 = volume enzim ekstraksi yang digunakan
 1 = *light path* (cm)

6. Pengamatan Gambaran Mikroskopis Kultur Adiposit

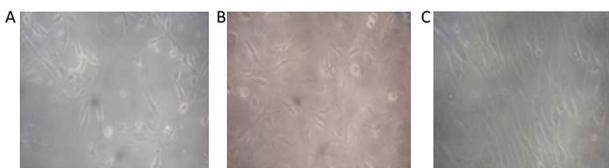
Sel pada masing-masing perlakuan difiksasi dengan 10% formalin. Sel yang ada di *well* dicuci dengan *aquadest* kemudian dikeringkan. Sel ditetesi dengan *propylene glycol* 2 kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan *Oil Red O* selama 7 menit diinkubasi pada suhu 50°C. Jaringan diberi 85% *propylene glycol* selama 3 menit. Sel dicuci dengan *aquadest* kemudian ditetesi *hematoxylin* selama 1 menit. Sel dicuci dengan air dan ditunggu sampai kering. Sel diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400 X (18).

Data dianalisis dengan uji *One Way ANOVA* dengan uji lanjut *Duncan* dan korelasi *Pearson* dengan tingkat kepercayaan 95%.

HASIL

Morfologi Sel

Pada penelitian ini digunakan kultur sel primer preadiposit yang diambil dari lemak *visceral* tikus yakni pada bagian retroperitoneal dan epididimis. Morfologi sel preadiposit yang berhasil dikultur disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kultur sel primer preadiposit

Keterangan: A. Hari pertama; B. Hari kedua; C. Hari keempat telah konfluen 70-80% siap untuk diinduksi diferensiasinya

Pada Gambar 1 terlihat pada hari pertama dan kedua setelah ditanam sel preadiposit mulai memperbanyak diri dan morfologinya menyerupai *fibroblast* yaitu berbentuk

memanjang. Pada hari keempat sel preadiposit telah konfluen dan siap untuk diinduksi diferensiasinya dan diberi perlakuan. Setelah sel dinilai konfluen minimal 70-80% dilanjutkan dengan induksi diferensiasi dan diberi perlakuan untuk masing-masing kelompok. Pertumbuhan sel diamati dengan mikroskop *inverted* pembesaran 400x.

Aktivasi p70S6K1, STAT3 dan Aktivitas enzim GPDH

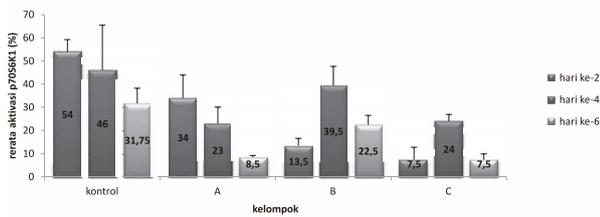
Pengamatan dilakukan pada hari ke-2, ke-4 dan ke-6. Rerata nilai masing-masing parameter pada jam ke-2, ke-4 dan ke-6 disajikan Gambar 2,3, dan 4. Untuk mengetahui normalitas data digunakan uji *Shapiro Wilk* yang menunjukkan bahwa seluruh parameter memiliki nilai signifikansi $>0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa seluruh data terdistribusi normal. Untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok perlakuan pada setiap pengamatan waktu digunakan uji ANOVA satu arah dengan tingkat kemaknaan 95%. Pada pengamatan hari ke-2 diperoleh nilai $p < 0,05$ untuk semua parameter yang berarti terdapat perbedaan bermakna paling tidak pada dua kelompok perlakuan. Demikian juga pada pengamatan hari ke-4 dan hari ke-6 diperoleh nilai $p < 0,05$ untuk seluruh parameter yang berarti ada perbedaan bermakna paling tidak pada dua kelompok perlakuan. Untuk mengetahui pada kelompok manakah terdapat perbedaan tersebut maka dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan* untuk masing-masing parameter.

1. Aktivasi p70S6K1

Gambar 2 menunjukkan pada hari kedua terlihat pada kelompok kontrol menunjukkan aktivasi tertinggi yakni $54,00 \pm 5,23\%$ dan terendah adalah pada kelompok C yang diberi kombinasi *rapamycin* dan inhibitor STAT3 ($7,50 \pm 3,11\%$). Sementara itu pada uji lanjut *Duncan* disimpulkan terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan, kelompok A dengan B dan C. Akan tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok B dengan C.

Pada pengamatan hari ke-4 terlihat bahwa aktivasi p70S6K1 tertinggi ada pada kelompok kontrol ($46,00 \pm 19,41\%$) dan terendah pada kelompok C ($24,00 \pm 2,94\%$). Hasil uji *Duncan* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan A dan C. Sementara itu kelompok B tidak berbeda bermakna dengan kontrol, A dan C. Kelompok A dan C merupakan kelompok yang diberi perlakuan *rapamycin*. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *rapamycin* dapat menekan aktivasi p70S6K1, sedangkan pada kelompok yang hanya diberi inhibitor STAT3 tidak mempengaruhi aktivasi p70S6K1.

Pada pengamatan hari ke-6 terlihat bahwa pada semua kelompok menunjukkan penurunan aktivasi p70S6K1 jika dibandingkan dengan pengamatan hari ke-4. Hal ini terjadi karena pada hari ke-6 proses adipogenesis telah mendekati fase akhir. Aktivasi p70S6K1 terendah ada pada kelompok A dan C. Berdasarkan uji *Duncan* disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan. Kelompok A berbeda bermakna dengan kelompok B, sedangkan kelompok B berbeda bermakna dengan kelompok C. Hal ini juga membuktikan bahwa kelompok yang diberi *rapamycin* menunjukkan penurunan aktivasi p70S6K1 yang besar.



Gambar 2. Rerata aktivasi p70S6K1 sel preadiposit setelah perlakuan hari ke-2, ke-4 dan ke-6

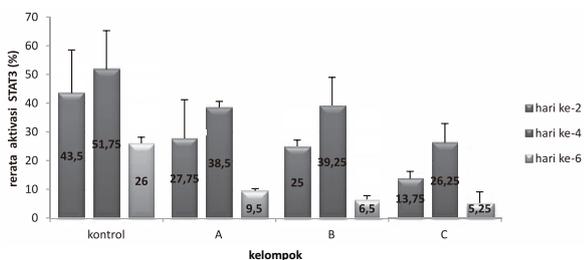
Keterangan:

K: induksi diferensiasi; A: induksi diferensiasi+*rapamycin* 10 nM; B: induksi diferensiasi+inhibitor STAT3 100 μ M; C: induksi diferensiasi+*rapamycin* 10 nM+inhibitor STAT3 100 μ M

2. Aktivasi STAT3

Pada gambar 3 rerata aktivasi STAT3 pada hari ke-2 pengamatan menunjukkan aktivasi tertinggi pada kelompok kontrol (43,50 \pm 15,02) dan terendah pada kelompok C (13,75 \pm 4,78) yaitu kelompok yang diberi kombinasi *rapamycin* dan inhibitor STAT3. Berdasarkan uji lanjut *Duncan* diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok lainnya. Sementara kelompok A, B, dan C tidak berbeda bermakna. Akan tetapi, ada kecenderungan bahwa kelompok C menunjukkan aktivitas terendah. Pada hari ke-2 proses adipogenesis masih masuk tahap awal yang akan berlangsung terus hingga mencapai tahap akhir pada hari ke-8.

Selanjutnya pada pengamatan hari ke-4 aktivasi STAT3 terlihat meningkat jika dibandingkan dengan hari ke-2. Aktivasi tertinggi ditunjukkan oleh kelompok kontrol (51,75 \pm 13,52%) dan terendah di kelompok C (26,25 \pm 6,65%). Berdasarkan uji *Duncan* diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok C dengan kelompok kontrol, A, dan B. Pada hari ke-6 terlihat penurunan aktivasi STAT3 pada seluruh kelompok perlakuan secara bermakna. Aktivasi terendah ditunjukkan oleh kelompok C (5,25 \pm 3,86%). Berdasarkan uji lanjut *Duncan* disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok A, B dan C. Sementara itu kelompok A, B dan C masing-masing tidak berbeda bermakna. Hal ini membuktikan bahwa pemberian *rapamycin* dan inhibitor STAT3 mampu menekan aktivasi STAT3.



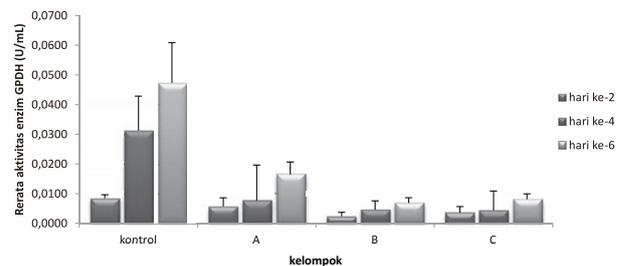
Gambar 3. Rerata aktivasi STAT3 sel preadiposit setelah perlakuan hari ke-2, ke-4 dan ke-6

Keterangan:

K: induksi diferensiasi; A: induksi diferensiasi+*rapamycin* 10 nM; B: induksi diferensiasi+inhibitor STAT3 100 μ M; C: induksi diferensiasi+*rapamycin* 10 nM+inhibitor STAT3 100 μ M

3. Aktivitas Enzim Glisero-3-fosfodehidrogenase (GPDH)

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran aktivitas enzim GPDH (EC 1-1-1-8) yang merupakan enzim marker dalam proses diferensiasi preadiposit. Aktivitas enzim GPDH diukur mulai hari kedua setelah induksi diferensiasi. Terlihat bahwa rerata aktivitas enzim GPDH pada hari ke-2 masih rendah pada semua kelompok perlakuan. Hal ini terjadi karena pada hari ke-2 masih merupakan fase awal adipogenesis sehingga belum banyak memicu aktivitas enzim GPDH. Pada uji *Duncan* disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok A, namun berbeda dengan kelompok B dan C. Aktivitas enzim GPDH pada hari ke-2 belum dapat dijadikan sebagai acuan terjadinya hambatan oleh *rapamycin* dan inhibitor STAT3 karena masih dalam proses awal adipogenesis. Selanjutnya pada pengamatan hari ke-4 terlihat bahwa rerata aktivitas enzim GPDH mulai meningkat terutama pada kelompok kontrol dengan aktivitas tertinggi (0,0313 \pm 0,0116 U/mL). Sementara pada kelompok lain yang dihambat dengan *rapamycin* dan inhibitor STAT3 atau kombinasinya, aktivitas enzim GPDH hanya meningkat sedikit. Uji *Duncan* menyimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok A, B, dan C, sedangkan dengan kelompok kontrol menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini membuktikan bahwa pemberian *rapamycin* dan inhibitor STAT3 mempengaruhi proses adipogenesis.



Gambar 4. Rerata aktivitas enzim GPDH sel adiposit setelah perlakuan hari ke-2, ke-4 dan ke-6

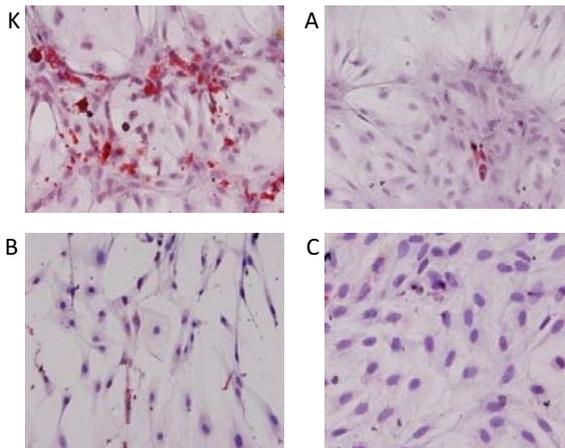
Keterangan:

K: induksi diferensiasi; A: induksi diferensiasi+*rapamycin* 10 nM; B: induksi diferensiasi+inhibitor STAT3 100 μ M; C: induksi diferensiasi+*rapamycin* 10 nM+inhibitor STAT3 100 μ M

Pada pengamatan hari ke-6 aktivitas enzim GPDH pada kelompok kontrol semakin meningkat (0,0474 \pm 0,0136 U/mL) jika dibandingkan dengan hari ke-4. Berdasarkan uji lanjut *Duncan* didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok lainnya, sedangkan untuk kelompok A, B, dan C masing-masing meskipun terdapat peningkatan namun tidak berbeda bermakna. Jika dilihat pada Gambar 9 terlihat adanya kecenderungan kelompok A lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan lainnya. Peningkatan enzim yang terjadi sejak hari keempat menunjukkan bahwa proses maturasi adiposit berjalan dengan baik pada kelompok kontrol. Sementara pada kelompok lain, peningkatan yang terjadi sangat sedikit. Hal ini membuktikan bahwa proses adipogenesis melibatkan faktor-faktor transkripsi mTORC1 dan STAT3 yang pada penelitian ini dihambat kerjanya.

Profil Sel Adiposit Matur

Proses akhir maturitas sel adiposit ditandai dengan perubahan morfologi sel. Sel menjadi *sferik* dan mengakumulasi *droplet lipid*. Pada penelitian ini, perubahan morfologi sel dinilai pada hari keenam yaitu ketika sudah mendekati akhir proses adipogenesis. Pada beberapa penelitian lain, perubahan morfologi sel dinilai pada hari kedelapan. Menurut Kim dan Chen (2004) perubahan morfologi sel dan akumulasi *droplet lipid* mulai terjadi 3-4 hari setelah induksi dan menjadi lengkap diferensiasinya dalam 7-8 hari. Akumulasi droplet lipid dapat dilihat dengan pewarnaan *Oil Red O* (Gambar 5).



Gambar 5. Gambaran sel adiposit yang telah matur pada hari ke-6 (pembesaran 400x)

Keterangan:

K: induksi diferensiasi; A: induksi diferensiasi+rapamycin 10 nM; B: induksi diferensiasi+inhibitor STAT3 100 μ M; C: induksi diferensiasi+rapamycin 10 nM+inhibitor STAT3 100 μ M

DISKUSI

Salah satu jalur yang terlibat dalam adipogenesis adalah melalui mTORC1. mTOR adalah suatu *serine/threonin* protein kinase yang berfungsi sebagai sensor nutrisi intraseluler untuk mengontrol sintesis protein, pertumbuhan sel dan metabolisme (12). Ada dua bentuk mTOR yaitu mTORC1 dan mTORC2. mTORC1 diperlukan untuk diferensiasi adiposit. Aktivitas mTORC1 secara signifikan meningkat di hepar, otot dan jaringan adiposa pada hewan coba obes baik oleh karena genetik maupun akibat diet, menunjukkan keterlibatan jalur mTORC1 di perifer terhadap patogenesis obesitas dan gangguan metabolik yang berkaitan dengan obesitas (12). mTORC1 kemudian akan mengaktifkan jalur di bawahnya.

Aktivasi p70S6K1

Protein 70S6 kinase adalah suatu *serin/treonin* kinase yang sensitif insulin, terletak *downstream* dari protein kinase B (PKB), meskipun tidak langsung sebagai substrat PKB. Fosforilasi subunit S6 pada ribosom 40 oleh p70S6K berkorelasi dengan stimulasi mitogenik dan meningkatkan translasi mRNAs dengan *5'-terminal oligopyrimidine tract* (5'-TOP). PKB dapat memfosforilasi mTORC1 dan kemudian mTORC1 meregulasi aktivitas p70S6K (17). mTORC1 memfosforilasi p70S6K1 pada Thr

389, memperkenankan *phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK1) mengikat dan memfosforilasi S6K1 pada Thr229, sehingga mengaktifkan penuh S6K1. S6K1 memicu sintesis protein dan pertumbuhan sel dengan memfosforilasi berbagai substrat, meliputi komponen inisiasi translasi dan atau perangkat elongasi (contoh: protein ribosomal S6, eIF4B dan *eukaryotic elongation factor 2 kinase*) (12).

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran terhadap aktivasi p70S6K1 yang terfosforilasi dengan metode imunositokimia. Pada kelompok yang diberi rapamycin (kelompok A dan C) menunjukkan aktivasi p-p70S6K1 yang lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa rapamycin dengan dosis 10 nM mampu menghambat kerja mTORC1 sehingga mengurangi efektivitasnya terhadap p70S6K1. Rapamycin bekerja menghambat mTORC1 dengan cara membentuk ikatan dengan protein sitosolik 12 kDa yaitu *FK-506-binding protein 12* (FKBP12) dan menghambat aktivitas isomerasinya (20). Akan tetapi FKBP12 bukan merupakan target sitostatik dari rapamycin; melainkan menjadi kofaktor penentu yang diperlukan untuk toksisitas rapamycin (21). Kompleks rapamycin-FKBP12 menghambat jalur mTORC1 dengan secara langsung mengikat mTORC1 pada bagian yang sensitif rapamycin yakni raptor. mTORC1 spesifik memfosforilasi protein S6 kinase ribosomal (S6K) dan 4E-BP pada bagian yang sensitif rapamycin. Delesi S6K1 yaitu substrat fisiologis mTORC1 mengakibatkan defek metabolik yang sangat besar di perifer (12).

Pada penelitian El-Chaar *et al* (17) yang mengukur efek rapamycin terhadap adipogenesis sel 3T3-L1 yang diinduksi insulin dan aktivasi p70S6K1 yang distimulasi insulin diperoleh hasil bahwa rapamycin secara parsial mengurangi diferensiasi yang ditandai dengan pengurangan akumulasi triasilgliserol (46%) dan ekspresi PPAR γ (50%). Sebaliknya rapamycin secara lengkap menghambat aktivasi p70S6K1. Hambatan terhadap aktivasi p70S6K1 secara langsung akan mempengaruhi faktor lain dibawahnya. Protein STAT3 adalah faktor transkripsi yang diduga dipengaruhi oleh p70S6K1 secara langsung. Berdasarkan uji korelasi *Pearson* disimpulkan bahwa terdapat korelasi antara p70S6K1 dengan STAT3 ($r=0,984$; $p=0,000$). Hal ini membuktikan bahwa p70S6K1 memfosforilasi STAT3. Oleh karena p70S6K1 adalah *downstream* dari mTORC1, maka dapat disimpulkan bahwa mTORC1 ikut mengaktifkan STAT3.

Pada penelitian ini juga dibuktikan bahwa aktivasi p70S6K1 akan menurun seiring dengan waktu terjadinya proses maturitas. Oleh karena p70S6K1 merupakan upstream dari rangkaian proses adipogenesis yang melalui jalur mTORC1, maka pada hari ke-2 aktivasinya tertinggi kemudian semakin menurun pada hari ke-4 dan ke-6. Akan tetapi pada kelompok B, C, D dan E aktivasi p70S6K1 pada hari ke-2 lebih rendah dibandingkan hari ke-4 kemudian menurun lagi hari ke-6. Hal ini diduga pada hari ke-2 masih terjadi adaptasi sel terhadap perubahan media sehingga terjadi perlambatan pada aktivasi p70S6K1.

Aktivasi STAT3

Signal transducers and activator of transcription (STAT) sering pula disebut *signal transduction and transcription protein* meregulasi berbagai aspek pada proses seluler normal yakni pertumbuhan sel, pertahanan hidup sel,

diferensiasi dan fungsi imun. JAKs, Src, dan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dan *platelet-derived growth factor* (PDGF) adalah beberapa aktivator *upstream* potensial dari STATs (22, 23). STAT3 sebagai salah satu anggota utama dari protein memegang peranan penting pada diferensiasi sel dan proliferasinya (23). Pada penelitian-penelitian terdahulu melaporkan bahwa aktivator *upstream* dari STAT3 adalah JAKs dan Src. Tidak banyak yang melaporkan p70S6K1 sebagai salah satu *upstream* dari STAT3.

Pada penelitian ini digunakan inhibitor STAT3 untuk membuktikan keterlibatan jalur ini terhadap proses adipogenesis. Molekul ini bekerja dengan cara menghambat aktivasi, dimerisasi dan translokasi nuklear STAT3. Struktur STAT3 diketahui memiliki domain SH2 yang diperlukan untuk fosforilasi tirosin dan dimerisasinya. STAT3 yang terfosforilasi membentuk homo atau heterodimer melalui interaksi fosfotirosin (pTyr)-SH2 dan kemudian bertranslokasi menuju nukleus (24, 25). Molekul inhibitor STAT3 akan mengikat domain SH2 secara kovalen sehingga domain ini menjadi inaktif karena tidak dapat terfosforilasi.

Pada penelitian ini kelompok yang diberi kombinasi *rapamycin* dan inhibitor STAT3 menunjukkan aktivasi STAT3 yang paling rendah dibandingkan dengan yang hanya diberi inhibitor STAT3 saja atau *rapamycin* saja. Pemberian *rapamycin* dapat menekan aktivasi STAT3 melalui penekanan terhadap mTORC1 yang berlanjut pada penekanan aktivasi p70S6K1. Hal ini terbukti secara statistik dengan uji korelasi Pearson dengan tingkat kepercayaan 95% bahwa terdapat korelasi antara p70S6K1 dengan STAT3 (koefisien korelasi=0,984; $p=0,000$).

Berbeda dengan aktivasi p70S6K1 yang tinggi pada hari ke-2 dan mulai menurun hari ke-4 sampai ke-6, STAT3 menunjukkan aktivasi yang meningkat pada hari ke-4 kemudian menurun lagi pada hari ke-2 secara signifikan. Oleh karena aktivasi p70S6K1 yang telah tinggi sejak hari kedua kemudian terjadi fosforilasi STAT3 secara bertahap, sehingga ketika p70S6K1 menurun di hari ke-4 sebaliknya STAT3 mulai meningkat. Hal ini semakin membuktikan bahwa p70S6K1 merupakan *upstream* dari STAT3.

Penelitian Wang *et al* (26) melaporkan bahwa STAT3 meregulasi diferensiasi adiposit melalui aktivasi PPAR γ . Akan tetapi pada penelitian tersebut tidak diteliti keterlibatan jalur mTORC1. Sementara itu Ma *et al* (27) yang melakukan penelitian terhadap sel *murine embryonic fibroblast* (MEF) Tsc1^{-/-} dan Tsc2^{-/-} serta beberapa tipe *cell line cancer* manusia, menyimpulkan bahwa peningkatan sinyal mTOR berkorelasi secara kuat dengan peningkatan sinyal *Notch* pada sel kanker payudara yang berdiferensiasi buruk. Hiperaktivitas mTOR menyebabkan tumor yang mengalami defisiensi supresor TSC1 dan TSC2 menunjukkan peningkatan sinyal STAT3/p63/*Notch*. Selanjutnya sel yang potensial menjadi tumor dengan sinyal mTOR tidak terkontrol dan dapat

ditekan oleh penghambatan *Notch*. Berbeda dengan dua penelitian tersebut, pada penelitian ini dilakukan analisa terhadap jalur mTORC1 terhadap aktivasi STAT3 dan jalur berikutnya dalam proses adipogenesis.

Aktivitas Enzim GPDH dan Gambaran Mikroskopis Adiposit Matur

Gliserol fosfodehidrogenase (GPDH) merupakan enzim kunci yang mengontrol kecepatan sintesis lipogenik di dalam sel, terutama pada saat periode diferensiasi adiposit. GPDH sebagai enzim kunci mereduksi dihidroksiaseton fosfat menjadi gliserol-3-fosfat untuk selanjutnya bergabung dengan asam lemak dan membentuk triasilgliserol dengan menggunakan NADH sebagai sumber elektron. Asam lemak dan triasilgliserol kemudian disatukan dalam *droplet lipid*. Semakin tinggi aktivitas GPDH semakin banyak *droplet lipid* yang dihasilkan. Penghambatan aktivitas GPDH mempengaruhi lipogenesis dan menyebabkan menurunnya sintesis asam lemak *de novo*. Penelitian terdahulu yang mempelajari efek CLAs pada diferensiasi sel 3T3 menemukan ada korelasi positif antara aktivitas GPDH dan asam lemak seluler terutama MUFA C16:1 dan C18:1 (28).

Pada penelitian ini, oleh karena terjadi penghambatan pada jalur *upstream* dari proses adipogenesis yaitu dengan menghambat molekul mTORC1 dan STAT3 maka dampaknya adalah terjadi penghambatan pada jalur dibawahnya. Oleh karena aktivitas GPDH terhambat, maka proses maturasi menjadi terhambat. Hal ini terlihat setelah hari ke-6, kelompok sel yang diberi *rapamycin* dan inhibitor STAT3 serta gabungan keduanya memperlihatkan peningkatan aktivitas GPDH yang lebih rendah secara berturut-turut dibandingkan dengan kontrol. Hal ini didukung dengan gambaran morfologis sel adiposit yang diberi pewarnaan *Oil Red O*. Pada kelompok kontrol (K) terlihat lebih banyak sel yang menyerap *Oil Red O* karena lebih banyak mengandung droplet lipid dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hasil uji korelasi antara STAT3 dan aktivitas enzim menunjukkan terdapat hubungan positif kuat yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa pengaktifan STAT3 akan mengaktifkan gen-gen dibawahnya sampai pada gen enzim GPDH.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan antara pengaktifan p70S6K1 oleh mTORC1 dengan pengaktifan STAT3 dan terdapat hubungan antara pengaktifan STAT3 dengan aktivitas enzim GPDH. Penghambatan mTORC1 oleh *rapamycin* dapat mencegah proses adipogenesis melalui jalur STAT3 yang berarti bahwa mTORC1 meregulasi proses adipogenesis melalui pengaktifan p70S6K1, STAT3 dan enzim GPDH secara berturut-turut. Penelitian ini dapat dikembangkan dengan mencari bahan-bahan alam yang bekerja menyerupai *rapamycin* dan inhibitor STAT3 sehingga dapat dipergunakan sebagai terapi dan pencegahan obesitas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dewan S and Wilding JP. *Obesity and Type-2 Diabetes in the Elderly*. Gerontology. 2003; 49(3): 137-145.
2. WHO. *Obesity and Overweight*. (Online) 2006. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/>
3. Kemenkes RI. *Hasil Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta: Badan Pengembangan dan Penelitian Kesehatan; 2010.
4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Laporan*

en/ [diakses tanggal 23 Juli 2009].

- Hasil Riset Kesehatan Dasar Nasional*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan; 2008.
5. Stein CJ and Colditz. *The Epidemic of Obesity*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2004; 89(6): 2522-2525.
 6. De Simone G, Di Fiore A, and Supuran CT. *Are Carbonic Anhydrase Inhibitors Suitable for Obtaining Antiobesity Drugs?* Current Pharmaceutical Design. 2008; 14(7): 655-660.
 7. Jang EH, Moon JS, Ko JH, et al. *Novel Black Soy Peptides with Antiobesity Effects: Activation of Leptin-Like Signaling and AMP-Activated Protein Kinase*. International Journal of Obesity. 2008; 32(7): 1161-1170.
 8. Musri MM, Gomis R, and Parrizas M. *Chromatin and Chromatin-Modifying Proteins in Adipogenesis*. Biochemistry and Cell Biology. 2007; 85(4): 397-410.
 9. Au WS, Payne VA, O'rahilly S, and Rochford JJ. *The NR4A Family of Orphan Nuclear Receptors are Not Required for Adipogenesis*. International Journal of Obesity. 2008; 32: 388-392
 10. Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, and Lane MD. *Role of CREB in Transcriptional Regulation of CCAAT/Enhancer-Binding Protein B Gene During Adipogenesis*. The Journal Biological Chemistry. 2004; 279(6): 4471-4478.
 11. Bacquer O, Petroulakis E, Paglialunga S, et al. *Elevated Sensitivity to Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice Lacking 4E-BP1 dan 4E-BP2*. Journal of Clinical Investigation. 2007; 117(2): 387-396.
 12. Rui L. *A Link Between Protein Translation and Body Weight*. The Journal of Clinical Investigation. 2007; 117(2): 310-313.
 13. Hwang M, Perez CA, Moretti L, and Lu B. *The mTOR Signaling Network: Insights from its Role During Embryonic Development*. Current Medicinal Chemistry. 2008; 15(12): 1192-1208.
 14. Kahn BB and Myers MG Jr. *mTOR Tells the Brain that the Body is Hungry*. Nature Medicine. 2006; 12(6): 615-617.
 15. Dann SG, Selveraj A, and Thomas G. *Mtor Complex1-S6K1 Signaling: At the Crossroads of Obesity, Diabetes and Cancer*. Trends in Molecular Medicine. 2007; 13(6): 252-259.
 16. Rosner M and Hengstschlager M. *Cytoplasmic and Nuclear Distribution of the Protein Complexes mTORC1 and mTORC2: Rapamycin Triggers Dephosphorylation and Delocalization of the mTORC2 Component Rictor and sin1*. Human Molecular Genetics. 2008; 17(19): 2934-2948.
 17. El-Chaar D, Gagnon A, and Sorisky A. *Inhibition of Insulin Signaling and Adipogenesis by Rapamycin: Effect on Phosphorylation of P70 S6 Kinase Vs Eif4e-BP1*. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders. 2004; 28(2): 191-198.
 18. Kim JE and Chen J. *Regulation of Peroxisome Proliferation-Activated Receptor-Gamma Activity by Mammalian Target of Rapamycin and Amino Acids in Adipogenesis*. Diabetes. 2004; 53(11): 2748-2756.
 19. Indra MR, Hernowati TE, Satuman, dan Widodo E. *Kultur Adiposit dan Pemeriksaan Adipositokin*. Malang: Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya; 2010.
 20. Liu L, Li F, Cardelli JA, Martin KA, Blenis J, and Huang S. *Rapamycin Inhibits Cell Motility by Suppression of mTOR-Mediated S6K1 and 4E-BP1 Pathways*. Oncogene. 2006; 25(53): 7029-7040.
 21. De Virgilio C and Loewith R. *Cell Growth Control: Little Eukaryotes Make Big Contributions*. Oncogene. 2006; 25(48): 6392-6415.
 22. Garcia R, Bowman TL, Niu G, et al. *Constitutive Activation of Stat3 by the Src and JAK Tyrosine Kinases Participates in Growth Regulation of Human Breast Carcinoma Cells*. Oncogene. 2001; 20(20): 2499-2513.
 23. Chen C-L, Hsieh F-C, Lieblein JC, et al. *Stat3 Activation in Human Endometrial and Cervical Cancers*. British Journal of Cancer. 2007; 96(4): 591-599.
 24. Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, and Berg T. *Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization*. Chemistry and Biology. 2006; 13(11): 1235-1242.
 25. Deng J, Grande F, and Neamati N. *Small Molecule Inhibitors of Stat3 Signaling Pathway*. Current Cancer Drug Targets. 2007; 7(1): 91-107.
 26. Wang D, Zhou Y, Lei W, et al. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Regulates Adipocyte Differentiation Via Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ)*. Biology of Cell. 2009; 102(1): 1-12.
 27. Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, et al. *Mammalian Target of Regulates Murine and Human Sell Differentiation through STAT3/P63/Jagged/Notch Cascade*. Journal of Clinical Investigation. 2010; 120(10): 103-114.
 28. He ML, Wang Y, You JS, Mir PS, and McAllister TA. *Effect of Seaweed Extract on Fatty Acid Accumulation and Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase Activity in 3T3-L1-Adipocytes*. Journal of Lipid Research. 2009; 44(2): 125-132.