

## PROFIL DISTRIBUSI INOS DAN KADAR NO PANKREAS TIKUS DIABETES MELITUS HASIL INDUKSI MLD-STZ PASCA PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL TEMUGIRING (*Curcuma heyneana*)

### *Profil iNOS Distribution and NO Concentration Pancreas of Diabetes Mellitus Rats Induced by MLD-STZ Treated with the Temugiring Ethanolic Extract Treatment*

Betti Lukiaty<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>, dan Win Darmanto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>2</sup>Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

<sup>3</sup>Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, Surabaya

E-mail: betti\_lukiati@yahoo.co.id

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menguji pengaruh ekstrak etanol temugiring terhadap distribusi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dan kadar nitrogen oksida (NO) pada pankreas tikus diabetes hasil induksi *multiple low dose-streptozotocin* (MLD-STZ). Tiga macam dosis ekstrak etanol temugiring, yaitu 36, 72, dan 108 mg/kg bobot badan diberikan secara oral untuk terapi tikus diabetes hasil induksi MLD-STZ. Data distribusi iNOS dan kadar NO dianalisis dengan analisis varians jalur tunggal yang dilanjutkan dengan uji Duncan ( $\alpha=0,05$ ). Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak etanol temugiring berpengaruh sangat nyata ( $P<0,01$ ) terhadap penurunan distribusi iNOS dan kadar NO pada pankreas tikus diabetes hasil induksi MLD-STZ. Dosis 72 mg/kg bobot badan ekstrak etanol temugiring merupakan dosis optimal untuk terapi tikus diabetes hasil induksi MLD-STZ. Disimpulkan bahwa ekstrak etanol temugiring dapat menurunkan distribusi iNOS dan kadar NO pankreas tikus penderita diabetes melitus.

Kata kunci: *curcuma heyneana*, diabetes melitus, iNOS, *streptozotocin*, NO

#### ABSTRACT

*Temugiring one of indigineous medicinal plant of Indonesia which does not optimally used yet. In the present research, the water extract from its rhizome can decrease blood glucose and repaire beta insula cells of streptozotocin-induced diabetic rats. The objectives of this research were to examine effect of the temugiring ethanol extract to iNOS distribussion and NO concentration in pancreas of Multiple Low Dose-streptozotocin (MLD-STZ) induced diabetic rats. Three doses of temugiring ethanol extract: 36 , 72, and 108 mg/kg bw were used for therapy diabetic rats by oral within 7 day. Distribution of iNOS and concentration of NO were analyzed the one way ANOVA and continued with Duncan test ( $\alpha=0.05$ ). The result showed that the effect of temugiring ethanol extract to distribution of iNOS and concentration of NO were significant ( $P<0.01$ ). Dose 72 mg/kg bw of ethanolic extract of temugiring is the optimal dose for diabetic rats therapy.*

Key words: *curcuma heyneana*, diabetic , iNOS, *streptozotocin*, NO

#### PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) tipe 1 adalah salah satu penyakit autoimun yang disebabkan kerusakan sel beta pankreas akibat infiltrasi sel mononuklear (Suryohudoyo, 2000). Mekanisme kerusakan sel beta pankreas juga melibatkan aktivitas radikal superoksida ( $O_2^-$ ) dan radikal nitrogen oksida (NO) (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Penyakit DM tipe 1 diindikasikan dengan adanya produksi NO yang tidak normal (Yong dan Jay, 2001), produksi NO dikatalisis oleh enzim *nitric oxide synthase* (NOS) yaitu *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Peningkatan kadar NO dan iNOS dalam suatu jaringan menunjukkan adanya proses peradangan pada jaringan tersebut.

Obat antidiabetes oral kebanyakan memberikan efek samping yang tidak diinginkan sebab dapat menyebabkan resistensi serta kerusakan organ, maka terapi herbal diyakini relatif lebih aman (Studiawan dan Santosa, 2005). Temugiring (*Curcuma heyneana*) adalah tanaman asli Indonesia yang berpotensi sebagai bahan obat tradisional. Dari hasil pemisahan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) diketahui bahwa ekstrak etanol rimpang temugiring mengandung komponen dari golongan terpenoid dan flavonoid, tetapi tidak

mengandung alkaloid. Analisis kuantitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang temugiring mengandung pigmen kurkumin 0,48%. Kurkumin pigmen kuning berpotensi sebagai senyawa antioksidan. Ekstrak etanol rimpang temugiring mempunyai daya antioksidan dengan nilai  $IC_{50} = 47,95 \mu\text{g/ml}$  (Lukiati, 2010; data belum dipublikasikan). Ekstrak air rimpang temugiring 2 g/kg bobot badan yang diberikan secara oral selama 14 hari berhasil menurunkan kadar glukosa darah dan memperbaiki kerusakan sel-sel beta Langerhans pada tikus galur Wistar DM hasil induksi *streptozotocin* (STZ) (Kartini *et al.*, 2007). Ekstraksi untuk bahan alam pada umumnya menggunakan etanol sebagai pelarut, karena etanol mampu melarutkan senyawa organik lebih baik dibandingkan dengan air. Sampai saat ini belum diketahui apakah ekstrak etanol temugiring dapat menjadi alternatif terapi untuk DM. Pada penelitian ini dipelajari manfaat ekstrak etanol temugiring terhadap distribusi iNOS, dan kadar NO pada tikus DM hasil induksi MLD-STZ. Hasil penelitian diharapkan menjadi kajian ilmiah untuk meningkatkan efektivitas tanaman temugiring sebagai tanaman asli Indonesia sebagai bahan untuk pengembangan obat tradisional untuk pencegahan dan pengobatan penyakit DM tipe 1.

## MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Negeri Malang, Laboratorium Fitofarmaka Farmasi Universitas Airlangga, dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Brawijaya. Rimpang temugiring diperoleh dari Balai Materia Medika (BMM) kota Batu. Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan umur 2 bulan dengan bobot badan antara 150-200 g sebagai hewan coba diperoleh dari Universitas Brawijaya. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat sertifikat laik etik No. 61- KEP-UB.

### Ekstraksi Temugiring

Rimpang temugiring dipotong tipis-tipis dikering anginkan kemudian dihaluskan dan diayak sampai diperoleh serbuk kering. Serbuk kering sebanyak 2 kg dimaserasi dengan pelarut etanol 95% selama 24 jam, kemudian disaring. Residu dimaserasi berulang-ulang sampai larutan menjadi jernih. Ekstrak cair dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu kamar. Dosis ekstrak yang digunakan dihitung berdasarkan pemakaian *simplicia* oleh manusia yaitu sebanyak 5-7 g, dan dikonversikan pada tikus dengan cara mengalikan dengan 0,018 (berat tikus 200 g) (Studiawan dan Santosa, 2005). Tiga macam dosis ekstrak yang digunakan pada penelitian ini, yakni 36, 72, dan 108 mg/kg bobot badan.

### Preparasi Tikus DM

Tikus DM diperoleh dengan cara injeksi MLD-STZ (dosis 20 mg/kg bobot badan) secara intraperitoneum selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am *et al.*, 2005), selanjutnya tikus diinkubasi selama 14 hari. Tikus dinyatakan DM jika kadar glukosa darah lebih dari 300 mg/dl (Hussain, 2002).

### Perlakuan Eksperimen

Tikus sebanyak 30 ekor dibagi dalam lima kelompok masing-masing terdiri atas 6 ekor. Kelompok tikus sehat sebagai kontrol negatif (1), kelompok tikus DM hasil induksi MLD-STZ tanpa diberi ekstrak temugiring sebagai kontrol positif (2), kelompok tikus DM hasil induksi MLD-STZ yang diberi ekstrak temugiring dosis 36 mg/kg bobot badan (3), kelompok tikus DM hasil induksi MLD-STZ yang diberi ekstrak temugiring dosis 72 mg/kg bobot badan (4), dan kelompok tikus DM hasil induksi MLD-STZ yang diberi ekstrak temugiring dosis 108 mg/kg bobot badan (5). Ekstrak temugiring diberikan secara oral selama 7 hari berturut-turut. Tikus diinkubasikan selama tujuh hari, dibedah dan diambil pankreasnya untuk dibuat preparat. Selanjutnya, diamati distribusi iNOS dan kadar NO pada pankreasnya.

### Pengamatan Distribusi iNOS dengan Metode Imunohistokimia

Preparat pankreas dicuci dengan PBS pH 7,4 ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali, diblok dengan 5% FBS yang mengandung 0,25% teilon x-100 selama satu jam.

Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali, diinkubasi dengan antibodi primer *antirat iNOS* semalam pada suhu 4° C, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya, diinkubasi dengan antibodi sekunder *antirabbit biotin* selama satu jam pada suhu ruang. Berikutnya, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali. Ditetesi SA-HRP (*Strep avidin-horse radin peroxidase*) diinkubasi selama 40 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya, ditetesi DAB dan diinkubasi selama 10 menit, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. *counterstaining* menggunakan *Mayer Hemotoxylene* selama 10 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir, dibilas dengan akuades dan dikeringanginkan, preparat *dimounting* dengan *entelan* dan ditutup dengan *cover glass*. Ekspresi iNOS positif apabila terdapat warna coklat pada preparat.

### Uji Nitrogen Oksida

Pankreas digerus dalam kondisi dingin dan ditambahkan *buffer posphat* atau PBS-Tween sebanyak 10x volume. Homogenat disentrifugasi pada 6.000 G selama 15 menit. Supernatan disimpan pada 4° C sedangkan peletnya dibuang. Supernatan digunakan untuk analisa nitrogen oksida. Pada uji ini digunakan dua parameter yakni nitrit dan nitrat *assay*.

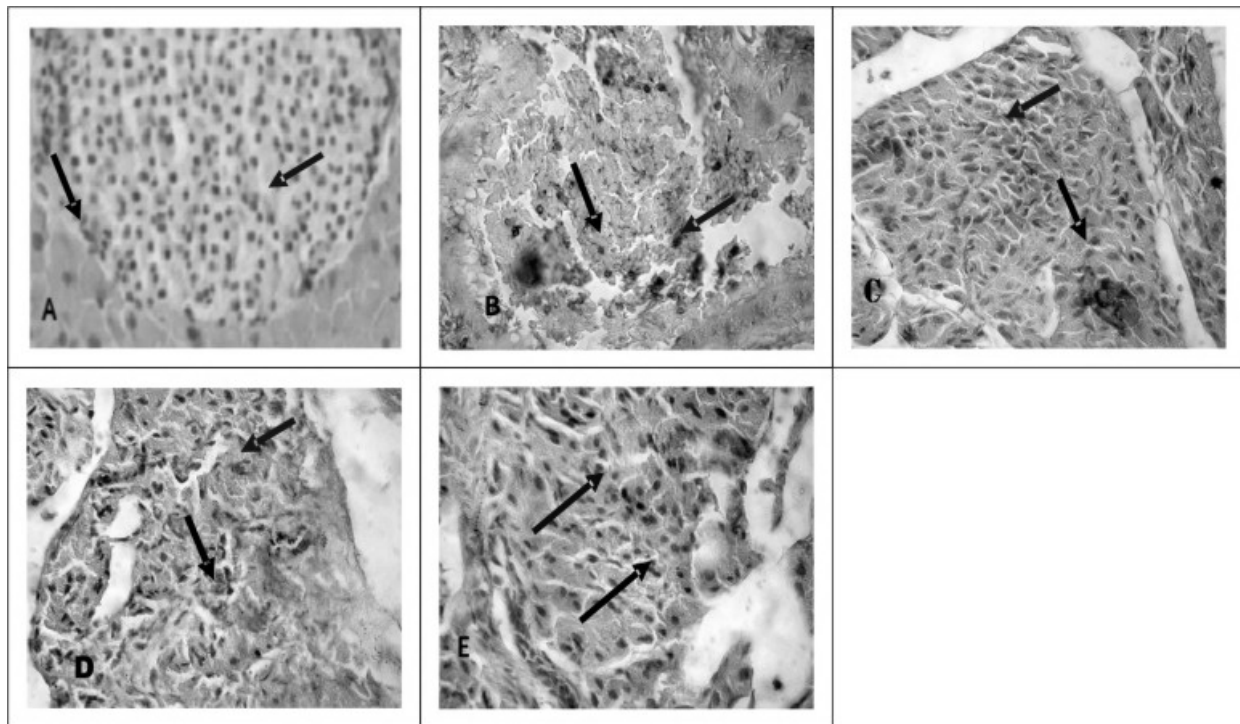
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Profil Distribusi iNOS Tikus DM Hasil Induksi MLD-STZ Pasca Pemberian Ekstrak Etanol Temugiring

Tikus DM hasil induksi MLD-STZ memperlihatkan peningkatan distribusi iNOS cukup tinggi jika dibandingkan dengan tikus kontrol. Pada tikus DM hasil induksi MLD-STZ yang diberi ekstrak etanol dengan dosis yang berbeda menunjukkan penurunan jumlah sel yang mengekspresikan iNOS seperti yang disajikan pada Tabel 1. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol temugiring berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap penurunan ekspresi iNOS pada tikus DM hasil induksi MLD-STZ. Hasil uji Duncan menunjukkan respons ekstrak etanol temugiring dosis 72 mg/kg bobot badan berbeda dengan dosis 108 mg/kg bobot badan maupun dosis 36 mg/kg bobot badan. Dosis 72 mg/kg bobot badan ekstrak etanol temugiring berhasil menurunkan distribusi iNOS mendekati normal dibandingkan dosis yang lain. Gambar 1 menyajikan gambaran histologi distribusi iNOS pada kelompok tikus perlakuan.

**Tabel 1.** Rerata sel yang mengekspresi iNOS pada pankreas yang diberi ekstrak etanol temugiring

Perlakuan Tikus	Rerata sel yg mengekspresi iNOS
K (Kontrol)	5,33±1,211
T2 (dosis 72 mg/kg bobot badan)	9,33±1,633
T3 (dosis 108 mg/kg bobot badan)	13,83±1,472
T1 (dosis 36 mg/kg bobot badan)	19,17±1,941
S (tikus DM hasil induksi MLD-STZ)	28,00±3,225



**Gambar 1.** Distribusi iNOS pada organ pankreas (A: pankreas tikus kontrol, B: tikus DM hasil induksi MLD-STZ, C: pankreas tikus DM yang diberi ekstrak 36 mg/kg bobot badan, D: pankreas tikus DM yang diberi ekstrak dosis 72 mg/kg bobot badan, E: tikus DM yang diberi ekstrak dosis 108 mg/kg bobot badan, ➔ = sel beta dengan iNOS, ➡ = sel beta tanpa iNOS)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tikus hasil induksi MLD-STZ, jumlah sel yang mengekspresikan iNOS meningkat sangat tinggi dibandingkan dengan tikus kontrol. Peningkatan distribusi iNOS diikuti dengan peningkatan kadar NO yang dipresentasikan dengan peningkatan kadar nitrit dan nitrat sebagai hasil akhir metabolisme NO dalam pankreas. Kelebihan radikal NO menyebabkan kerusakan sel beta pankreas, sebab jika kadar radikal NO meningkat menyebabkan terbentuknya radikal peroksonitrit (ONOO\*) yang sangat toksik terhadap sel beta (Hussain, 2002; Fujikawa, 2004). Kerusakan sel beta menyebabkan produksi dan sekresi insulin terganggu akibatnya kadar glukosa darah dalam darah melebihi normal sehingga terjadi hiperglikemia pada tikus diabetes hasil induksi MLD-STZ.

Distribusi iNOS meningkat pada tikus DM hasil induksi MLD-STZ, hal ini menunjukkan terjadi peradangan pada pankreas. Keberadaan iNOS pada suatu jaringan menunjukkan terjadi proses peradangan pada jaringan tersebut, sebab banyak sel merespons proses peradangan dengan mengekspresikan iNOS (Davis *et al.*, 2002). Ketersediaan iNOS pada suatu jaringan dapat meningkatkan kadar radikal NO endogen pada jaringan tersebut, sebab iNOS merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan radikal NO (Pautz *et al.*, 2010).

**Kadar NO Tikus DM hasil Induksi MLD-STZ Pasca Pemberian Ekstrak Etanol Temugiring**

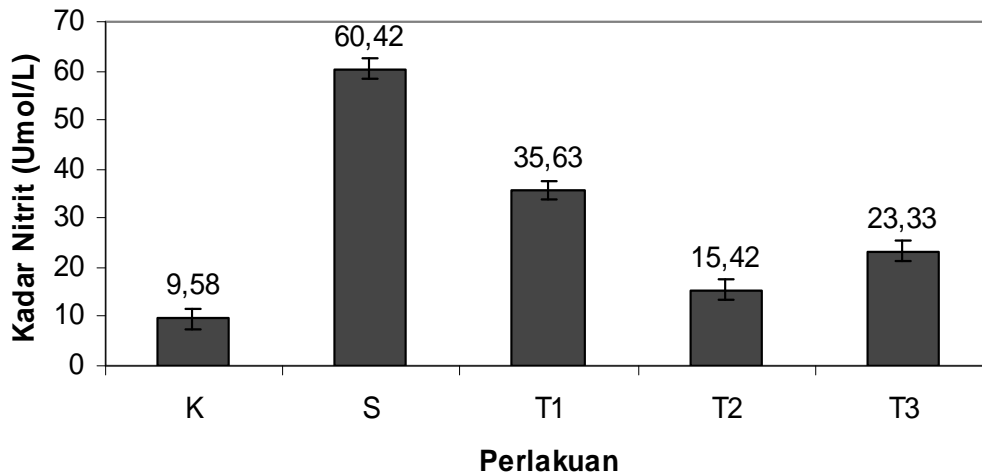
Dalam jaringan pankreas peningkatan kadar NO dipresentasikan dengan peningkatan kadar nitrit dan

nitrat yang merupakan hasil akhir metabolisme NO. Kadar nitrit pada tikus DM hasil induksi MLD-STZ meningkat kurang lebih tujuh kali, sedangkan kadar nitrat meningkat sembilan kali dari kadar nitrit dan nitrat tikus kontrol seperti yang disajikan pada Tabel 2. Tikus DM hasil induksi MLD-STZ yang diberi ekstrak etanol temugiring dengan dosis yang berbeda menunjukkan penurunan kadar nitrit maupun nitrat pada pankreas. Perbedaan kadar nitrit dan nitrat pada tikus kontrol, DM hasil induksi MLD-STZ, dan tikus DM hasil induksi MLD-STZ yang diberi ekstrak temugiring disajikan pada Gambar 2 dan 3.

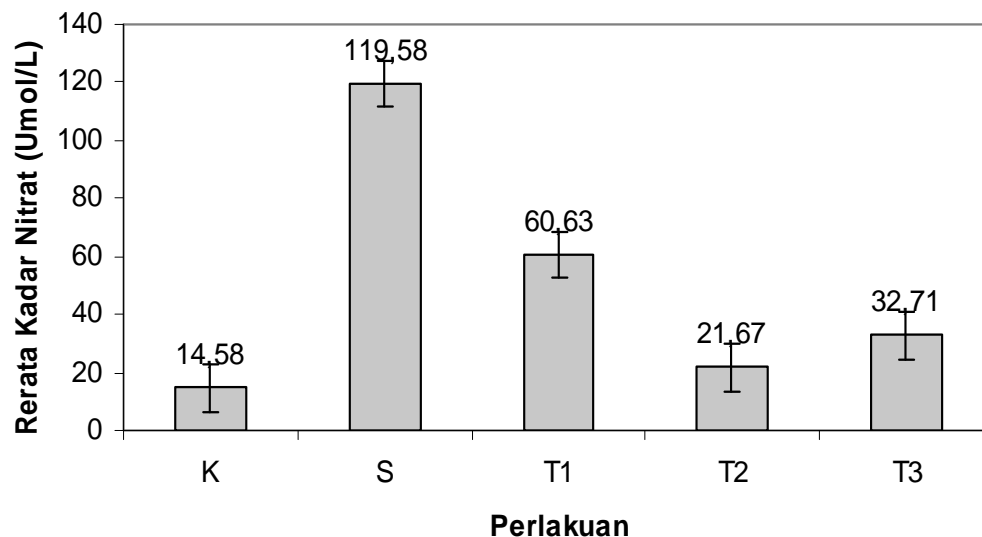
**Tabel 2.** Kadar nitrit dan nitrat organ pankreas yang diberi ekstrak etanol temugiring

Perlakuan Tikus	Rerata kadar nitrit (µmol/l)	Rerata kadar nitrat (µmol/l)
K (Kontrol)	9,583±2,041	14,588±2,700
T2 (72 mg/kg bobot badan)	15,417±2,189	21,667±1,514
T3 (dosis 108 mg/kg bobot badan)	333±2,548	32,708±3,483
T1 (dosis 36 mg/kg bobot badan)	35,625±2,054	60,625±3,036
S (tikus DM hasil induksi MLD-STZ)	60,417±3,227	119,583±3,227

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ekstrak etanol temugiring berpengaruh secara nyata (P<0,01) terhadap penurunan kadar nitrit dan nitrat pada pankreas tikus DM hasil induksi MLD-STZ. Hasil uji Duncan pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa respons ekstrak etanol temugiring dosis 72 mg/kg bobot badan terhadap penurunan kadar nitrit dan nitrat berbeda dengan dosis 108 dan 36 mg/kg bobot



**Gambar 2.** Kadar nitrit pankreas (K: pankreas tikus kontrol, S: tikus DM hasil induksi MLD-STZ, T1: pankreas tikus DM yang diberi ekstrak 36 mg/kg bobot badan, T2: pankreas tikus DM yang diberi ekstrak dosis 72 mg/kg bobot badan, T3: tikus DM yang diberi ekstrak dosis 108 mg/kg bobot badan)



**Gambar 3.** Kadar nitrat pankreas (K: pankreas tikus kontrol, S: tikus DM hasil induksi MLD-STZ, T1: pankreas tikus DM yang diberi ekstrak 36 mg/kg bobot badan, T2: pankreas tikus DM yang diberi ekstrak dosis 72 mg/kg bobot badan, T3: tikus DM yang diberi ekstrak dosis 108 mg/kg bobot badan)

badan. Ekstrak dosis 72 mg/kg bobot badan dapat menurunkan kadar nitrit dan nitrat paling besar dibandingkan dosis yang lain.

Kadar NO dalam pankreas tikus DM menurun setelah diberi ekstrak etanol temugiring. Hal ini disebabkan kandungan senyawa aktif dalam ekstrak etanol terutama senyawa flavonoid dan kurkumin yang berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Vermeris dan Nicholson (2006) sebagai senyawa polifenol, flavonoid dan kurkumin dapat menangkap radikal bebas. Gugus hidroksil pada cincin aromatis senyawa flavonoid dan kurkumin mendonasikan atom H pada radikal bebas, dan terbentuk radikal fenoksil flavonoid maupun kurkumin. Radikal baru yang terbentuk kemudian mengalami stabilisasi resonansi oleh sistem ikatan rangkap terkonjugasi sehingga radikal tersebut bersifat kurang reaktif. Adanya aktivitas antioksidan dalam

ekstrak temugiring dapat mencegah terjadinya kelebihan radikal bebas baik NO, superoksida, maupun radikal hidroksil.

Distribusi iNOS pada tikus DM hasil induksi MLD-STZ menurun setelah diberi ekstrak etanol temugiring. Hal ini disebabkan dalam ekstrak temugiring juga terkandung senyawa terpenoid terutama *sesquiterpen*. Cho *et al.* (2009) berhasil mengisolasi senyawa *zedoarondiol* suatu *sesquiterpen* laktone dalam ekstrak temugiring dan, senyawa tersebut terbukti dapat menghambat sintesis iNOS dengan cara menekan ekspresi mRNA iNOS. Dengan terhambatnya sintesis iNOS produksi NO terhambat sehingga kadar NO dalam pankreas kembali normal.

Pemberian ekstrak temugiring pada tikus DM hasil induksi MLD-STZ dapat menurunkan ekspresi iNOS dan kadar NO pada sel beta pankreas.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian disertasi yang dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Tahun Anggaran 2009. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen Dikti dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga.

### DAFTAR PUSTAKA

- A 172 astrocytoma cells. *Alcoholism Clin. Experiment. Res.* 26(9):1404-1411
- Fujikawa, G., K. Omada K, S. Muto, and N. Fujida. 2004. Spironolakton prevent early renal injury in streptozotocin induce diabetic rats. *Kidney International* 66:1493-1502.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1999. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press. Oxford.
- Hussain, H.E.M. 2002. Reverse of diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats using tradisional Indian anti diabetic plan *Azadirachta indica* (L). *Indian J. Clin. Biochem.* 17:115-123.
- Kartini, E., Lukiati, B., dan Hidayati, S. 2007. Rekayasa Biosintetik Terpenoid dari Kultur Kalus *Curcuma heyneana* Val & van Zijp, Terobosan Perbaikan Metabolisme Glukosa dan Insulin. **Laporan Penelitian**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Muhammadiyah. Malang
- Pautz, A., J. Art, S. Hahn, S. Nowag, C. Voccs, and H. Kleinert. 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23:75-93.
- Studiawan, H. dan M.H. Santosa. 2005. Uji aktivitas penurunan kadar glukosa darah ekstrak daun *Eugenia polyantha* pada mencit yang diinduksi aloksan. *Media Kedokteran Hewan* 21:62-65
- Suryohudoyo, P. 2000. **Oksidan, Anti-Oksidan dan Radikal. Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler**. CV Infomedika. Jakarta.
- Yong, X. and L.Z. Jay. 2001. **Nitric oxide and inflammation: Superoxide Anion Release from Inducible Nitric Oxide Synthase**. Birkhauser Verlag Basel. Switzerland.
- Aulanni'am, D.W. Soeatmadji, F. Fatchiyah, dan B.S. Sumitro. 2005. Detection of GAD 65 auto antibodies of type 1 diabetes using GAD 65-abs reagen produce from bovine brain tissue. *Medical Journal of Indonesia* 14:197-205.
- Cho, W., J.W. Nam, H.J. Kang, T. Windono, and K.T. Lee, 2009. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibitin of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF-kappaB pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Immunopharmacol.* 9:1049-1057.
- Davis, R.L., J. Dertien, and P.J. Syapin. 2002. Etanol induce modulation of inducible nitric oxide synthase activity in human