

Ekstrak Kayumanis (*Cinnamomum burmanii*) Menurunkan Kadar Enzim iNOS Serum dari Tikus Wistar Diabetes

Alfania Novita Putri Perdana¹, Doti Wahyuningsih², Yudi Purnomo³

^{1,2,3} Faculty of medicine, Islamic University of Malang

Abstract

Background. *iNOS* enzyme was secreted by immunocompetent cells during pathogenesis of diseases involving inflammation. The enzyme catalized a reaction resulting in nitric oxide radical (NO^\cdot) in large amount. The radical reacts with superoxide (O_2^-) to yield peroxynitrite (ONOO^-) which are highly reactive and toxic to the tissues. Kayumanis (*C.burmanii*) was considered rich with compounds overcoming *iNOS* secretion. This is the initial study of kayumanis potency in reducing *iNOS* expression. Diabetes is one of many diseases with high level of serum *iNOS* and was choosen for the study.

Purpose. To study kayumanis potency in reducing serum *iNOS* of a diabetic conditions.

Method. 5 groups of rats, each 5, four groups of which were intraperitoneally injected by aloxan at dose of 150 mg/Kg BW to induce hyperglycemia. The another group recieved no treatment. Three groups of diabetic rats were treated with *C. Burmanii* each day at dose of 0.5 ml, 1 ml, and 2 ml respectively for 14 days. The remained diabetic group was untreated. Serum *iNOS* were measured by ELISA. *iNOS* data were statistically analyzed using ANOVA followed by LSD test ($p \leq 0.05$).

Results. *C.burmanii* dose of 1 ml reduced serum *iNOS* of diabetic rats ($p \leq 0.05$). The two other doses of *C.burmanii* did not reduced the enzyme ($p \geq 0.05$).

Conclusion. *C. Burmanii* may have potentation of reducing *iNOS* serum in diabetic condition.

Key words: *iNOS*; *Cinnamomum burmanii*; diabetes; aloxan

Correspondence: dotiwahyuningsih@unisma.ac.id

Acknowledgment: This Study was supported by Faculty of medicine, Islamic University of Malang –Indonesia.

Conflict of interest: The authors declared there is no conflict of interest concerning this study

Pendahuluan

Kejadian beberapa penyakit berhubungan dengan proses radang yang menyebabkan radikal superoksida (O_2^-) dan NO^\cdot meningkat dengan konsekuensi peroksinitrite (ONOO^-) yang terbentuk dari hasil reaksi dua radikal tersebut juga meningkat (1). Dampak fisiologi dan patologi dari peroksinitrit dapat dikenali dari berbagai penyakit seperti; kelainan neurodegeneratif, kardiovaskuler, infeksi, dan diabetes (2). Superoksida dan NO dalam jumlah yang seimbang dengan kebutuhan fisiologi berperan dalam beberapa proses *signaling* (3). Jika dua

radikal ini diproduksi berlebih dalam jaringan karena keadaan patologi, maka terdapat mekanisme untuk mengatasi kelebihan tersebut, seperti *superoxide dismutase* (SOD) akan menetralkan superoksida sedangkan NO akan berubah cepat menjadi nitrat (4). *NO synthase* adalah enzim yang menghasilkan NO dari substrat utama asam amino L-arginine. Senyawa lain yang dibutuhkan adalah oksigen dan NADPH. Terdapat 3 isoform yaitu; NOS I (*neuronal*NOS- nNOS), NOS II (*inducible*NOS-iNOS), dan NOS III (*endothelial* NOS-eNOS). Sebutan-sebutan tersebut merefleksikan jaringan dimana enzim

tersebut utamanya diproduksi (eNOS dan nNOS) atau kecenderungan untuk disintesa sebagai respon terhadap sitokin atau endotoksin (iNOS). Enzim iNOS diekspresi jika terdapat peningkatan sitokin dan merupakan bagian dari mekanisme pertahanan tubuh. Meskipun demikian NO dalam jumlah berlebihan akan menyebabkan kerusakan sel dan memicu proses radang. Sehubungan dengan hal tersebut iNOS sering dihubungkan dengan patogenesis berbagai penyakit yang patofisiologinya melibatkan proses radang seperti; *stroke*, gagal jantung kronis, miokard infark, keganasan, dan kelainan *neuro degenerative* [5], termasuk juga *diabetes mellitus* [6].

Enzim iNOS dilaporkan hampir selalu berperan pada berbagai penyakit. Penelitian pada hewan coba telah banyak dilakukan untuk menemukan inhibitor selektif bagi iNOS sebab inhibitor yang tidak selektif akan juga menghambat 2 jenis NOS lain yang berfungsi amat penting bagi fisiologi tubuh [7].

Sehubungan dengan hal tersebut, ini adalah penelitian awal untuk mempelajari potensi kulit batang kayumanis (*Cinnamomum burmanii*) sebagai inhibitor selektif enzim iNOS. Inhibitor nonspesifik iNOS (L-NMMA) dan inhibitor spesifik (1400W dihydrochloride) dikembangkan untuk terapi Ca mammae [8].

L-N6-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL) menghambat aktivitas iNOS epitel saluran nafas manusia [9].

Metode dan bahan

Disain penelitian *Post test only control group design* dan menggunakan hewan coba tikus wistar jantan, berat 180 – 250 gram, usia 10 – 12 minggu. Terdapat 5 kelompok tikus Wistar masing-masing beranggota 5 ekor. Hewan coba didapat dari dan diadaptasi di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya Malang. Adaptasi selama 14 hari dengan diberi makanan standar dan minum *ad libitum*. 4 kelompok tikus dijadikan tikus diabetes, satu kelompok tanpa perlakuan.

Pembuatan ekstrak air dari kayumanis

Serbuk kayumanis diperoleh dari Balai Materia Medika Malang. 10 g serbuk kayumanis dicampur dengan 100 ml air, dipanaskan dalam *water bath* selama 2 jam pada suhu 60°C. Larutan disaring menggunakan kertas saring, ekstrak yang diperoleh diencerkan dengan air dengan perbandingan 1:10 [10].

Membuat tikus hiperglikemia dan Pengukuran gula darah

Empat kelompok tikus dipuasakan selama 16 - 18 jam dengan tetap minum *ad libitum*. Setelah itu diinjeksi *intraperitoneal* dengan *alloxan monohydrate* 150 mg/kg BB (Sigma - aldrich) yang terlebih dahulu dilarutkan dalam 0,6 ml *normal saline* 0,9%. Enam jam kemudian tikus diinjeksi larutan glukosa 10% (0,5 ml) di bagian peritoneum dan air minum diganti dengan larutan glukosa 5% selama 24 jam. Prosedur ini diperoleh melalui penelitian pendahuluan (data tidak diperlihatkan). Tujuh puluh dua jam setelah injeksi *alloxan monohydrate*, gula darah ekor diukur dengan glukometer. Tikus dinyatakan hiperglikemia jika gula darah > 200 mg/dl [11]. Pemeriksaan gula darah juga dilakukan pada kelompok tikus sehat (tanpa perlakuan).

Pemberian ekstrak kayumanis

Tiga kelompok dari 4 kelompok tikus diabetes diberi ekstrak air kayu manis (hari ke 5 pasca injeksi *aloxan monohydrate*) dengan dosis berbeda yaitu; 0, 5 ml, 1 ml, 2 ml setiap hari selama 14 hari menggunakan sonde lambung. Satu kelompok tikus diabetes tidak mendapat perlakuan.

Pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan iNOS

Semua kelompok tikus dipuasakan selama 12 jam (boleh minum air *ad libitum*) sebelum pengambilan darah, segera setelah puasa selama waktu tersebut tikus dibius dengan *ketamine* 100 mg/kg BB diinjeksikan ke intra

peritoneum [12] ,untuk persiapan pengambilan sampel darah.

Darah diambil dari jantung (5 ml) dengan spuit yang telah diisi EDTA sejumlah 2 – 3 tetes. Darah ditampung dalam tabung *centrifuge* dan disentrifus dengan rpm 3000 selama 10 menit. Serum dipisahkan untuk pemeriksaan iNOS. Pemeriksaan dilakukan dengan metode ELISA, warna yang dihasilkan pada setiap sumur diperiksa menggunakan ELISA *reader* pada λ 450 m.

Hasil

Tabel 1. Rerata kadar iNOS serum dari tikus non diabet, tikus diabet, dan tikus diabet yang menerima ekstrak kayumanis.

NO.	Kelompok	Ulangan	Rerata (IU/ml) ± SD
1	Tikus non diabetes	5	0, 8274 ± 0, 3266 ^a
2	Tikus diabetes	5	1, 8122 ± 0, 2011 ^b
3	Tikus diabetes + kayu manis 0,5 ml	5	1, 6112 ± 0, 9989 ^b
4	Tikus diabetes + kayu manis 1 ml	5	1, 0693 ± 0, 1954 ^a
5	Tikus diabetes + kayu manis 2 ml	5	1, 3475 ± 0, 4363 ^b

Keterangan:

^{a, b} adalah notasi hasil Uji ANOVA dan *Least Significant Difference* (LSD). Rerata yang bernotasi huruf sama menyatakan rerata tersebut saling berbeda tidak bermakna ($p \geq 0.05$), sedangkan rerata yang bernotasi huruf berbeda menyatakan rerata tersebut saling berbeda bermakna ($p \leq 0.05$).

Tabel 2. Rerata dan Hasil Uji Kruskal-Walis kadar gula darah pasca injeksi *aloxan monohydrate*

Ha ri	P1 (Non diabet) mg/L	Diabet (mg/L)			
		P2 (Tanpa ekstrak)	P3 (Ekstrak 0, 5 ml)	P4 (Ekstrak 1 ml)	P5 (Ekstrak 2 ml)
4	78,60 ± 0	551,800 ± 96,38	497,800 ± 71,450 ^b	303,400 ± 167,8	486,200 ± 123,88

	8,619 ^a	8 ^b		34 ^b	7 ^b
18	114,400 ± 7,503 ^a	431,400 ± 63,081 ^b	467,000 ± 66,764 ^b	454,000 ± 62,940 ^b	276,200 ± 197,994 ^{a,b}

Keterangan:

^{a, b} adalah notasi hasil Uji Kruskal-Walis. Rerata yang bernotasi huruf sama menyatakan rerata tersebut saling berbeda tidak bermakna ($p \geq 0.05$), sedangkan rerata yang bernotasi huruf berbeda menyatakan rerata tersebut saling berbeda bermakna ($p \leq 0.05$).

Diskusi

Ini adalah penelitian awal untuk mempelajari kemampuan kayu manis sebagai penghambat ekspresi iNOS. Kemampuan ini dipelajari melalui model tikus diabetes karena *alloxan monohydrate*. Model ini memicu ekspresi iNOS dan peningkatan jumlah NO [13], keadaan ini juga terjadi baik pada diabetes tipe 1 maupun diabetes tipe 2 pada manusia [14, 15]. Penelitian ini mempelajari kemampuan kayu manis dalam menurunkan kadar iNOS serum dan kami menemukan dosis ekstrak kayumanis 1 ml/Kg BB yang diberikan per oral setiap hari selama 14 hari menurunkan kadar iNOS serum tikus diabetes karena *alloxan monohydrate*.

Patogenesis diabetes karena *alloxan monohydrate* melibatkan proses radang yang memicu ekspresi iNOS yang akan menghasilkan NO dalam jumlah amat besar [16]. Proses radang menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) salah satu diantaranya adalah superoksida [O₂⁻] yang akan bereaksi dengan NO membentuk peroksinitrite (ONOO⁻) [17].

Ekstrak air kayumanis mengandung senyawa seperti *cinnamic acid, cinnamyl alcohol, eugenol, benzoyl benzoat* [18], (*E*) *cinnamaldehyde*, *polyphenol proanthocyanidins, and (epi)catechin* berkhasiat antibakteri [19], semua senyawa tersebut bersifat antioksidan [20]. Menurunnya kadar iNOS serum dari tikus diabetes pada penelitian ini diduga kuat karena senyawa-senyawa aktif tersebut. Secara

ringkas senyawa aktif dalam kayu manis menghilangkan atau mengurangi faktor pemicu bagi sel –sel radang tertentu untuk menghasilkan iNOS.

Senyawa *methoxyhydroxy-chalcone polymer* (MHCP) suatu senyawa polifenol yang terdapat di kayumanis dilaporkan memiliki sifat *insulin mimetic* dan sebagian besar peneliti menjelaskan kemampuan kayumanis dalam mengatur glukosa darah berdasarkan teori ini [21]. Penurunan kadar glukosa darah mengurangi pembentukan radikal bebas yang nantinya memicu pembentukan *cytokine pro inflammatory* yang akan memicu ekspresi iNOS [22]. Penelitian kami memperlihatkan kadar glukosa darah puasa tidak turun oleh pemberian ekstrak kayumanis dengan dosis yang digunakan ($p \geq 0,05$).

Banyak penelitian melaporkan keterlibatan radikal NO □ terhadap patogenesis berbagai penyakit diantaranya adalah; *rheumatoid arthritis* dan *systemic lupus erythematosus* [23], *diabetes mellitus* [6], *septic shock* [24], *ulcerative colitive* [25]. Radikal ini pada kondisi patologis dihasilkan utamanya oleh enzim iNOS [5]. Penelitian terdahulu melaporkan pengaruh penghambatan iNOS terhadap perkembangan penyakit. Penghambat iNOS selektif (1400 W) serta penghambat pan-NOS (L-NMMA dan L-NAME) pada penelitian secara in vitro dilaporkan menghambat pertumbuhan dan inisiasi tumor, mengurangi metastase tumor paru, dan meningkatkan *self-renewal* dari sel [8].

Penghambat iNOS yaitu BYK191023 dilaporkan berhasil secara in vitro dan in vivo mengurangi hipertensi pada arteri paru dan aliran darah *visceral* serta memperbaiki gangguan pertukaran gas [26].

Penghambat NOS ada 2 macam penghambat selektif dan penghambat non selektif. Penghambat selektif hanya menghambat iNOS yang diekspresi pada keadaan abnormal sedangkan penghambat nonspesifik akan mengganggu fungsi faal normal tubuh karena akan menghambat pembentukan baik iNOS maupun cNOS yang diperlukan oleh fungsi

faali tubuh [27]. Sehubungan dengan hasil penelitian ini diperlukan penelaahan lebih lanjut mengenai kemampuan kayumanis sebagai penghambat spesifik iNOS maupun sebagai penghambat cNOS. Penelitian kami memperlihatkan dosis 1 ml /Kg BB ekstrak kayumanis menurunkan kadar iNOS serum tikus diabetes sampai pada kadar yang tidak berbeda ($p \geq 0,05$) dengan kadar iNOS serum tikus tanpa perlakuan. Dilaporkan Bei-F. L., et al (2007) menggunakan penghambat iNOS selektif *amino guanidine* untuk tikus yang mengalami transplantasi pankreas, pemberian tersebut menurunkan kadar iNOS jaringan pankreas hewan coba sampai mendekati kadar normal [28]. Sehubungan dengan hasil penelitian tersebut diusulkan untuk mempelajari lebih lanjut mekanisme kayumanis dalam menurunkan kadar iNOS serum. Penjelasan sebelumnya mengenai penurunan kadar iNOS serum berdasarkan pada kenyataan bahwa kayumanis mengandung senyawa-senyawa berkhasiat antioksidan dan secara teori senyawa tersebut akan menyebabkan kadar iNOS serum tikus diabetes turun. Perlu dipelajari apakah penurunan itu juga karena kayu manis merupakan *inhibitor* selektif bagi iNOS atau bahkan *inhibitor* untuk semua jenis NOS.

Dalam penelitian ini dosis ekstrak kayu manis terkecil (0,5 ml/Kg BB) dan dosis terbesar (2 ml/Kg BB) tidak menurunkan kadar iNOS serum tikus diabet. Senyawa antioksidan golongan *anthocyanidins, cinnamic acid*, dan *phenol* dalam jumlah kurang tidak memperlihatkan dampak faali yang diharapkan sedangkan dalam jumlah berlebihan akan menjadi senyawa prooksidan [29]. Penelitian kami menggunakan kulit kayu dari tanaman kayumanis, bagian tanaman ini mengandung senyawa *coumarin, cinnamaldehyde*, dan *styrene* yang telah diketahui bersifat toksik [30].

Kesimpulan

Ekstrak air kayu manis (*C. burmanii*) dosis 1ml/Kg BB menurunkan kadar iNOS serum tikus diabetes karena induksi *aloxan*

monohydrate. Dosis kurang (0,5 ml/kg BB) dan dosis lebih besar (2 ml/kg BB) tidak menurunkan kadar iNOS.

Daftar pustaka

- Schulz, E.; Jansen, T.; Wenzel, P.; Daiber, A.; Munzel, T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid. Redox. Signal.* 2008; 10:1115-1126
- Stadler, K. Peroxynitrite-Driven Mechanisms in Diabetes and Insulin Resistance – the Latest Advances. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18: 280-290
- Ignarro, L.J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci. Rep.* 1999; 19: 51-71.
- Joshi, M.S.; Ferguson, T.B., Jr.; Han, T.H.; Hyduke, D.R.; Liao, J.C.; Rassaf, T.; Bryan, N.; Feelisch, M.; Lancaster, J.R., Jr. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 2002; 99: 10341-10346.
- Pál Pacher, Joseph S. Beckman, And Lucas Liaudet. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 315–424.
- Trachtman, H., Futterweit, S., Pine, E. Chronic diabetic nephropathy: role of inducible nitric oxide synthase. *Pediatr Nephrol* 2002; 17:20–29.
- Lassen H. L., Helle Klingenberg Iversen H. K., and Olesen J. A dose–response study of nitric oxide synthase inhibition in different vascular beds in man. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 499–505
DOI 10.1007/s00228-003-0662-7
- Granados-Principal, S., Yi Liu, Guevara M.L., Blanco, E., Choi D.S., Wei Qia. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research* 2015; 17:25. DOI 10.1186/s13058-015-0527-x
- Hansel, T.T., Kharitonov, S.A., Donnelly, L.E., Erin, E.M., Currie, M.G., Moore, W.M. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics¹. *The Faseb Journal* 2003; Vol. 17 July: 1298-1305
- Kannapan, S., Jayaraman, T., Rajasekar, P., Ravichandran, M.K., Anurada, C.V. Cinnamon bark extract Improved glucose Metabolism and Lipid profile in the fructose-fed rat. *Singapore Med J* 2006; 47(10) : 858
- Etuk, E.U., Muhammed, B.J. Evidence base analysis of chemical method of induction of diabetes mellitus in experimental rats. *International Journal research pharmacological science* 2010; 1(2):139-142
- The Institutional Animal Care And Use Committee (IACUC). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals at UCSF.* © 2014 The Regents of the University of California. All rights reserved. Page Date: September 17, 2010
- de Oliveira Garcia F.A., Rebouças J. F., Balbino T. Q., da Silva T.G., de Carvalho-Júnior C. H. R., Cerqueira G. S. Pentoxifylline reduces the inflammatory process in diabetic rats: relationship with decreases of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Inflammation* 2015; 12:33. DOI 10.1186/s12950-015-0080-5
- Adela R., Nethi S.K., Pankaj K., Bagul P.K, Barui A. K., Mattapally S., Kuncha M., Patra C.R., Reddy P. N. C., Banerjee S. K. Hyperglycaemia Enhances Nitric Oxide Production in Diabetes: A Study from South Indian Patients. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0125270 April 20, 2015.
- Eizirik, Decio L; Darville, Martine I. (Beta)-cell apoptosis and defense mechanisms: Lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: ProQuest Nursing & Allied Health Source pg. S64.
- Rohilla A., and Ali S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2012; Vol. 3 (2): 819-823.
- Manea A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res* 2010; 342:325–339 DOI 10.1007/s00441-010-1060-y

18. BfR Health Assessment No. 044/2006. High daily intakes of cinnamon: Health risk cannot be ruled out. 18 August 2006.
19. Bin Shan, Yi-Z.C., Brooks J.D., Corke H. Antibacterial properties and Major bioactive Components of Cinnamon Stick (*Cinnamomum Burmanii*): Activity against Food Borne Pathogenic Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55: 5484-5490
20. Cheng-H. Y., Rong-X. L., and Li-Y. C., Antioxidant Activity of Various Parts of *Cinnamomum cassia* Extracted with Different Extraction Methods. *Molecules* 2012; 17: 7294-7304; doi:10.3390/molecules17067294
21. Hoehn A.N., and Stockert A.L. The Effects of *Cinnamomum Cassia* on Blood Glucose Values are Greater than those of Dietary Changes Alone. *Nutrition and Metabolic Insights* 2012;5 77-83
22. Alan C. Tinker A. C. and Wallace A. V. Selective Inhibitors of Inducible Nitric Oxide Synthase: Potential Agents for the Treatment of Inflammatory Diseases? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2006, 6, 77-92
23. Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Érsek B, Buzás E and Perl A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 2010; 12:210
24. Chandra A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber LD, Traber DL. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. *Clinics* 2006;61(1):71-6.
25. Kolios G., Valatas V., and Ward S.G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 2004 113 427-437
26. Stahl W., Matejovic M., and Radermacher P. Inhibition Of Nitric Oxide Synthase During Sepsis: Revival Because Of Isoform Selectivity? *Shock* 2010; Vol. 34, No. 3: pp. 321Y322. 2
27. Rees D.D., Palmer R.M.J., Schulz R., Hodson H.F., and Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol* 1990; 101: 746-752
28. Bai-F. L., Yong-F. L., Ying C., Ke-Z. Z., Tie-M. L., Ning Z. Protective effect of inducible nitric oxide synthase inhibitor on pancreas transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2007 December 7; 13(45): 6066-6071
29. Fukumoto L. R. and Mazza G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3597-3604
30. Ballin N.Z. and Sørensen A.T. Coumarin content in cinnamon containing food products on the Danish market. *Food Control* 2014; 38: 198e203