

PENGARUH LAMA PRAPERLAKUAN FLAVONOID RUTIN TERHADAP EFEK HIPOGLIKEMIK TOLBUTAMID PADA TIKUS JANTAN YANG DIINDUKSI ALOKSAN

Tanti Azizah Sujono dan EM Sutrisna

Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surarakarta
Jl. A.Yani Tromol Pos 1 Pabelan, Surakarta 57102
Telp. (0271) 717417, Fax. (0271) 715448

ABSTRAK

Rutin, suatu flavonoid yang dikenal sebagai penghambat cytochrome P450 yang berperan dalam metabolisme tolbutamid. Dalam para pasien diabetes, tekanan oksidatif meningkat, sehingga mereka membutuhkan antioksidan dari luar tubuh. Rutin digunakan sebagai suplemen makanan yang mempunyai aktivitas-aktivitas sebagai antioksidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh Rutin terhadap efek hypoglikemik tolbutamid dalam tikus diabetes yang diinduksi dengan aloksan. Lima belas tikus jantan Sprague, berusia 2-3 bulan dan bobot badan 150-250 g yang diinduksi dengan aloksan 150 mg/BB secara intraperitoneal (tikus diabetes), dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing kelompok mengandung 3 tikus. Kelompok I (tikus diabetes control) tanpa perlakuan, kelompok II diberi CMC Na 1%, kelompok III (kelompok positif) diberi suspensi tolbutamid 360 mg/Kg BB, kelompok IV dan V masing-masing diberi praperlakuan Rutin 45 dan 180 mg/Kg BB secara oral satu jam sebelum perlakuan dengan tolbutamid 360 mg/Kg BB. Darah diambil dari vena lateralis ekor pada 60 menit sebelum perlakuan, 30; 60; 120 dan 180 menit setelah perlakuan dengan tolbutamid. Peningkatan data-data AUC_{30-180} dari persentase tingkat glukosa darah dianalisis dengan ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan test LSD pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil-hasil memperlihatkan bahwa pra-perlakuan Rutin dengan dosis 45 dan 180 mg/Kg BB tidak mempengaruhi efek hypoglikemi dari tolbutamid 360 mg/kg BB ($p > 0.05$).

Kata Kunci: Rutin, tolbutamid, efek hypoglikemik, aloksan

ABSTRACT

Rutin, a flavonoid is known as cytochrome P450 inhibitor that play role in tolbutamid metabolism. In diabetic patients, oxidative stress is increased, so they need antioxidant from outside of the body. Rutin use as dietary supplement which has activities as antioxidant. The aim of this study is to know the influence of Rutin againts hipoglycaemic effect of tolbutamid in alloxan-induced diabetic rats. Fifteen male Sprague Dawley rats, aged about 2-3 months and weight 150-250 g which were induced by alloxan 150 mg/kgBW intraperitoneal (diabetic rats), divided into five groups, each group contains 3 rats. Group I (control diabetics) without treatment, group II was given CMC Na 1%, group III (positive control) was given suspension of tolbutamid 360 mg/kgBW, groups IV and V were given pretreatment of Rutin 45 and 180 mg/kgBW orally respectively an hour before treatment of

tolbutamid 360 mg/kgBW. Blood is taken from tail lateralis vein at 60 minute before treatment, 30; 60; 120 and 180 minutes after treatment of tolbutamid. The increased of data AUC_{30-180} from percentage blood glucosa level was analysed by one way Anava and continued by LSD test with level of confident 95%. The results showed that pretreatment of Rutin dose 45 and 180 mg/kgBW were not influenced the hypoglycaemic effect of tolbutamid 360 mg/kgBW ($p > 0,05$)

Keywords: Rutin, tolbutamid, hypoglycaemic effect, alloxan

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus merupakan sekumpulan gejala yang timbul pada seseorang, ditandai dengan kadar glukosa yang melebihi nilai normal (hiperglikemia) akibat tubuh kekurangan insulin baik absolut maupun relatif. Menurut survei yang dilakukan WHO, Indonesia menempati urutan ke-4 dengan jumlah penderita diabetes terbesar di dunia setelah India, Cina, dan Amerika Serikat. Dengan prevalensi 8,6 % dari total penduduk, pada tahun 2025 diperkirakan meningkat menjadi 12,4 juta penderita (Anonim, 2005).

Banyak studi tentang stres oksidatif, perlakuan dengan antioksidan dan komplikasi diabetes menunjukkan bahwa pada penderita diabetes, stres oksidatifnya meningkat dan hal ini dapat mempercepat perkembangan komplikasinya lewat metabolisme glukosa yang berlebihan dan asam lemak bebas (Scott and King, 2004). Ketidakseimbangan antara nilai stres oksidatif dan level antioksidan pada penderita diabetes karena timbulnya *Reactive Oxygen Species* (ROS) selama glikasi serta oksidasi lipid dan glukosa (Nourooz, *et.al.*, 1997). Untuk mengurangi stres oksidatif pada penderita diabetes, salah satunya dengan penggunaan antioksidan sehingga diharapkan dapat mencegah komplikasi lebih lanjut (Rosen, *et.al.*, 2002).

Flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang mampu menekan radikal bebas (ROS). Rutin merupakan salah satu flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan. Rutin banyak dijumpai dalam berbagai buah dan sayuran misalnya : apel, anggur merah, teh, bawang merah. Rutin menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan dengan menurunkan peroksidasi lipid (MDA) dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan pada tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin (Coskun, *et al.*, 2005)

Terdapat kemungkinan antaraksi pada pemakaian bersama antara Rutin sebagai *dietary supplement* yang beredar di pasaran (berkhasiat antioksidan) dengan tolbutamid (obat antidiabetik oral), karena Rutin mempunyai gugus hidroksi bebas yang dapat berperan dalam proses interaksi dengan sitokrom P450 (Buening *et.al.*, 1981). Dalam penelitian ini tolbutamid digunakan sebagai obat model. Jalur biotransformasi tolbutamid terutama melibatkan enzim sitokrom P450 sub familia 2C8, 2C9 dan 2C19 (Guengerich, 1995; Wester *et.al.*, 1999). Disamping itu tolbutamid dieliminasi oleh organ eliminasi secara lambat/sulit (rasio ekstraksi hepatic rendah EH : 0,02) sehingga cenderung mudah mengalami antaraksi dengan senyawa penginduksi enzim (Shargel and Yu, 2005). Dari penelitian sebelumnya menunjukkan

bahwa Rutin merupakan inhibitor enzim sitokrom P450 (Hu, *et.al*, 2006). Sehingga diperkirakan metabolisme tolbutamid akan dihambat oleh Rutin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh Rutin terhadap penghambatan metabolisme tolbutamid yang yang tercermin pada perubahan kinerja farmakologi (efek hipoglikemik) tolbutamid. Penghambatan metabolisme tolbutamid oleh Rutin kemungkinan dapat memperlama keberadaan tolbutamid dalam bentuk aktifnya, sehingga efek hipoglikemik dari tolbutamid akan meningkat..

METODE PENELITIAN

Subyek uji : tikus jantan galur Sprague Dawley (SD) umur 2-3 bulan dengan berat badan 150-250 gram.

Bahan penelitian: Tolbutamid (Sigma), CMC Na (kualitas farmasetis), Rutin (Fluka), Alloxan monohidrat (Sigma), WFI (*Water for Injection*).

Neraca analitik elektrik, jarum peroral, spuit injeksi 1 ml dan 5 ml (Terumo), peralatan gelas (Pirex), timbangan tikus, Glucose Strip (Nesco^R Multi Check)

Tikus jantan galur Sprague Dawley jantan, umur 2-3 bulan dengan berat 150-250 g, diinjeksi aloksan secara intraperitoneal dengan dosis 150 mg/kgBB, 48 jam setelah induksi dilihat kadar gula darah tikus. Tikus yang kadar gula darahnya diatas 250 mg/dl digunakan untuk penelitian.

Lima belas ekor tikus yang sudah diinduksi aloksan (tikus diabetes), dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, masing-masing terdiri 3 ekor. Subyek uji dipuasakan 12-18 jam terlebih dulu sebelum perlakuan. Adapun pembagian kelompoknya :

I : tikus diabetes tanpa perlakuan

II : tikus diabetes diberi suspensi CMC Na 1 %

III : diberi suspensi tolbutamid dosis 360 mg/kgBB dalam CMC Na 1 % secara oral dosis tunggal.

IV : diberi praperlakuan Rutin dosis 45 mg/kgBB secara oral 1 jam sebelum pemberian tolbutamid 360 mg/kg BB dosis tunggal.

V : diberi praperlakuan Rutin dosis 180 mg/kgBB secara oral 1 jam sebelum pemberian tolbutamid 360 mg/kg BB dosis tunggal.

Cuplikan darah diambil dari vena lateralis ekor pada menit ke 60 menit sebelum pemberian tolbutamid (kadar glukosa awal); menit ke : 30; 60; 120; dan 180 setelah pemberian tolbutamid. Penetapan kadar glukosa darah dengan strip glukosa (Nesco^R Multi Check).

Data kadar glukosa darah (mg/dl) dibuat kurva persentase kenaikan konsentrasi glukosa darah vs waktu. Data persentase kenaikan konsentrasi glukosa darah diperoleh dari selisih konsentrasi glukosa darah pada waktu tertentu (Ct) dengan konsentrasi glukosa awal (Co) dibagi dengan Co, dikalikan 100%

Dari data Persentase kenaikan kadar glukosa darah tikus diabetes yang diinduksi aloksan, kemudian dihitung AUC₃₀₋₁₈₀ (*Area Under the Curve*). Kemudian diuji Anava satu jalan dilanjutkan uji LSD dengan taraf kepercayaan 95%.

Persentase daya hipoglikemik (DH) tolbutamid pada setiap perlakuan dapat dihitung dengan menggunakan nilai AUC₃₀₋₁₈₀ perlakuan dan kontrol negatif, dengan rumus :

$$\% \text{ DH} = \frac{(\text{AUC}_{30-180} \text{ KN} - \text{AUC}_{30-180} \text{ P})}{\text{AUC}_{30-180} \text{ KN}} \times 100\%$$

Dimana :

AUC_{30-180}^{KN} : nilai AUC_{30-180} dari kelompok kontrol negatif

AUC_{30-180}^P : nilai AUC_{30-180} dari kelompok perlakuan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini aloksan digunakan sebagai diabetogen untuk menginduksi terjadinya diabetes pada tikus, karena aloksan akan merusak sel-sel penghasil insulin yaitu sel β -pulau Langerhans. Bila terjadi kerusakan seluruh sel β maka akan terjadi diabetes permanen. Tetapi untuk penelitian ini digunakan dosis yang lebih rendah, sehingga hanya merusak sebagian sel β -pulau langerhans.

Berdasarkan hasil orientasi yang dilakukan, induksi aloksan dosis 100 dan 120 mg/kgBB belum mampu menginduksi terjadinya diabetes pada tikus, sedangkan pada dosis 150 mg/kgBB sudah mampu menyebabkan tikus menjadi diabetes (tabel 1), sehingga dosis aloksan yang digunakan untuk menginduksi diabetes adalah 150 mg/kgBB yang diberikan secara intraperitoneal pada tikus jantan galur Sprague Dawley. Tikus yang kadar glukosa darahnya pada hari ke-2 di atas 250 mg/dl digunakan untuk penelitian

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar glukosa darah pada tikus diabetes yang diberi praperlakuan Rutin dosis 45 dan 180 mg/kgBB 60 menit sebelum pemberian tolbutamid relatif tidak berubah (tabel 2 dan 3)

Tabel 1. Data Kadar Glukosa Darah (*Mean* \pm *SD*) mg/dl Akibat Induksi Aloksan pada Beberapa Dosis yang Diberikan Secara Intraperitoneal untuk Menginduksi Diabetes pada Tikus (n=3)

Dosis (mg/kgBB)	Kadar Glukosa Darah Hari ke :				
	0	1	2	3	4
100	92,33 \pm 12,70	103,67 \pm 20,65	103,33 \pm 10,69	96,33 \pm 8,62	78,00 \pm 14,11
120	92,33 \pm 19,50	94,67 \pm 9,02	101,33 \pm 22,81	111,33 \pm 36,35	95,33 \pm 11,15
150	114,00 \pm 8,08	107,00 \pm 226,04	395,00 \pm 198,84	367,00 \pm 168,45	311,00 \pm 187,47

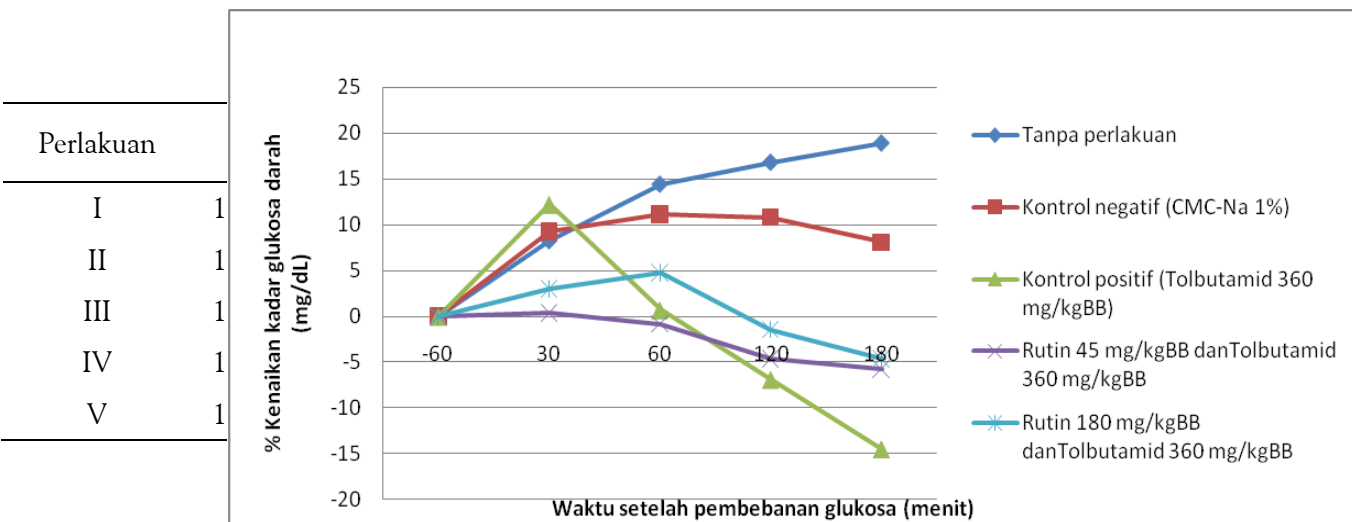
Tabel 2. Kadar Glukosa Darah Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan (*Mean* \pm *SD*) mg/dl Setelah Pemberian CMC Na, Tolbutamid dan Rutin.

Keterangan : awal : 60 menit sebelum tolbutamid

Tabel 3. Data Persentase Kenaikan Kadar Glukosa Darah Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan (Mean \pm SD) % Setelah Pemberian CMC Na, Tolbutamid dan Rutin

Keterangan :

- I. tikus diabetes
- II. CMC Na 1%
- III. Tolbutamid 360 mg/kgBB (kontrol positif)
- IV. Rutin 45 mg/kgBB dan Tolbutamid 360 mg/kgBB
- V. Rutin 180 mg/kgBB dan Tolbutamid 360 mg/kgBB



Keterangan : tanda minus (-60) menunjukkan 60 menit sebelum perlakuan

Gambar 1. Kurva Persentase Kenaikan Kadar Glukosa Darah Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan Setelah Diberi Perlakuan CMC Na, Tolbutamid dan Rutin

Tabel 4. Data AUC_{30-180} Dan % Daya Hipoglikemik Pada Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan Setelah Pemberian Tolbutamid dan Rutin

Perlakuan	AUC_{30-180}	% Daya hipoglikemik
Tikus diabetes	17429,50 ± 1234,45	-
CMC-Na 1 %	16543,55 ± 693,95	5,08 ± 3,98
Tolbutamid 360 mg/kgBB	14369,75 ± 93,36	17,56 ± 0,53
Interaksi Rutin 45 mg/kgBB dan Tolbutamid 360 mg/kgBB	14436,40 ± 1633,76	17,17 ± 9,37
Interaksi Rutin 180 mg/kgBB dan Tolbutamid 360 mg/kgBB	15045,90 ± 2590,12	13,68 ± 14,86

Hasil uji Anava satu jalan data AUC_{30-180} menunjukkan bahwa ada per-bedaan pada berbagai macam kelompok perlakuan. Kemu-

dian dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui pasangan AUC kelompok perlakuan yang mana saja yang berbeda (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil Uji LSD Data AUC_{30-180} Antar Kelompok Perlakuan dengan Taraf Kepercayaan 95%.

Kelompok	p	Keterangan
I-II	0,489	Berbeda tidak bermakna
I-III	0,032	Berbeda bermakna
I-IV	0,036	Berbeda bermakna
I-V	0,082	Berbeda tidak bermakna
II-III	0,108	Berbeda tidak bermakna
II-IV	0,118	Berbeda tidak bermakna
II-V	0,252	Berbeda tidak bermakna
III-IV	0,958	Berbeda tidak bermakna
III-V	0,595	Berbeda tidak bermakna
IV-V	0,632	Berbeda tidak bermakna

Keterangan :

$p < 0,05$ (berbeda bermakna)

$p > 0,05$ (berbeda tidak bermakna)

I. tikus diabetes

II. CMC Na 1%

III. Tolbutamid 360 mg/kgBB

IV. Rutin 45 mg/kgBB dan Tolbutamid 360 mg/kgBB

V. Rutin 180 mg/kgBB dan Tolbutamid 360 mg/kgBB

Enzim sitokrom P450 sub familia 2C9 merupakan enzim yang sangat penting untuk metabolisme berbagai obat, misalnya: fluoksetin, losartan, fenitoin, tolbutamid, torsemide, S-warfarin dan sejumlah obat-obat antiinflamasi non steroid (NSAID) (Miners and Birkett, 1998). Rutin merupakan suatu inhibitor sitokrom P450 (Hu, *et.al*, 2006).

Dalam penelitian ini, tolbutamid digunakan sebagai obat model yang metabolismenya lewat sitokrom P450 sub familia 2C8, 2C9 (Guengerich, 1995; Wester *et.al.*, 1999). Metabolisme tolbutamid dapat dipengaruhi oleh senyawa penghinibisi enzim seperti Rutin. Penelitian ini diharapkan akan menambah khasanah ilmu pengetahuan yaitu apakah pemberian Rutin yang mempunyai berbagai aktivitas farmakologi misalnya sebagai antioksidan (Coskun, *et al.*, 2005) bisa meningkatkan efek dari obat-obat yang metabolismenya lewat sitokrom P450, sehingga apabila diberikan secara bersama-sama apakah diperlukan penyesuaian dosis.

Rutin merupakan salah satu flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan. Rutin banyak dijumpai dalam berbagai buah dan sayuran misalnya : apel, anggur merah, teh, bawang merah. Terdapat kemungkinan antaraksi pada pemakaian bersama antara Rutin sebagai *dietary supplement* (berkhasiat antioksidan) dengan obat yang metabolismenya lewat sitokrom P450, misalnya tolbutamid (obat antidiabetik oral). Hal ini dikarenakan pada penderita diabetes umumnya stres oksidatifnya tinggi sehingga untuk mencegah terjadinya komplikasi perlu diberikan antioksidan. Rutin dikenal sebagai inhibitor sitokrom P450 sehingga apabila diberikan bersama-sama dengan tolbutamid dapat mempengaruhi metabolisme tolbutamid, karena metabolisme tolbutamid

melibatkan enzim sitokrom P450. Penelitian ini untuk meneliti apakah ada peningkatan efek hipoglikemik tolbutamid akibat praperlakuan Rutin yang merupakan suatu inhibitor enzim sitokrom P450.

Dari hasil uji LSD menunjukkan bahwa praperlakuan Rutin (dosis 45 dan 180 mg/kgBB) yang diberikan 1 jam sebelum pemberian tolbutamid, tidak mempengaruhi efek hipoglikemik tolbutamid ($p > 0,05$). Peningkatan efek hipoglikemik dari tolbutamid akibat praperlakuan Rutin tidak terlihat dalam penelitian ini, hal mungkin dikarenakan dosis aloksan sebesar 150 mg/kgBB yang digunakan untuk menginduksi diabetes sudah menyebabkan kerusakan pankreas yang permanen (yang ditandai dengan kematian beberapa tikus sekitar 5 hari setelah diinjeksi aloksan), sehingga diabetes yang terjadi tidak bisa dikurangi dengan pemberian obat hipoglikemik oral (tolbutamid), ini terlihat dari persentase daya hipoglikemik tolbutamid dosis 360 mg/kgBB hanya kecil ($17,56 \pm 0,53$)%, dengan demikian pengaruh senyawa penghinibisi enzim kurang bisa terlihat efeknya..

Dari hasil penelitian Sergio, *et. al*, (2000), tikus diabetes yang diinduksi aloksan 120 mg/kgBB secara intraperitoneal (ip), pada hari kedua setelah induksi aloksan kadar glukosa darahnya sudah meningkat (diabetes) dan puncaknya pada hari ke-5, dan kadar glukosa darahnya akan kembali normal pada hari ke-20. Aloksan dosis rendah digunakan untuk menginduksi terjadinya diabetes karena menyebabkan kerusakan parsial massa sel β , karena kekurangan insulin yang ringan tanpa ketosis dan juga resistansi insulin (Alder, 1998; Park, 1995). Dosis aloksan di bawah 150 mg/kgBB yang diberikan secara intraperitoneal sudah cukup untuk menginduksi diabetes pada tikus (Katsumata, *et.al*, 1992).

Pada penelitian ini, dosis aloksan yang digunakan untuk menginduksi diabetes perlu diturunkan (agar terjadi diabetes parsial), selain itu pemberian Rutin dosis tunggal yang diberikan secara oral mungkin belum mampu menghambat enzim sitokrom P450 karena kalau diberikan secara oral (absorpsi relatif lama) sehingga praperlakuan Rutin belum mampu menduduki tempat aksi dari enzim sitokrom P450 yang akan memetabolisme tolbutamid, sehingga efek inhibisi belum bisa terlihat. Untuk penelitian selanjutnya disarankan praperlakuan Rutin diberikan dengan cara intraperitoneal atau bila secara oral sebaiknya diberikan dengan dosis berulang.

SIMPULAN

Praperlakuan Rutin dosis 45 dan 180 mg/kgBB dosis tunggal tidak meningkatkan efek hipoglikemik dari tolbutamid dosis 360 mg/kgBB.

UCAPAN TERIMA KASIH

1. Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah membiayai penelitian ini.
2. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada Rina, S.Farm, Apt, Pak Zaenal, Pak Wiyono yang telah banyak membantu selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alder, M., 1998, Evidence for Direct Action of Alloxan to Induce Insulin Resistance at the Cellular level. *Diabetologia*, 41, 1327-1336.
- Anonim, 2005, <http://www.depkes.go.id>, Jumlah Penderita Diabetes Indonesia Ranking ke-4 di Dunia, DepKes RI, Jakarta, diakses tanggal 17 April 2008
- Buening, G.K., Chanh, R.L., Huang, M.T., Fortner, J.G., Wood, A.W., and Conney, A.H., 1981, Activation and Inhibition of Benzo (a) piren and Aflatoxin B, Metabolisme in Human Liver Microsomes, *Drug Metab. Drug Dispos*, 22, 4.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., and Oter, S., 2005, Rutin, a Flavonoid Antioxidant, Prevent and Protects Streptozotocin Induced Oxidative Stress and Beta Cell Damage in Rat Pancreas, *Pharmacol Res*, 51 (2) : 117-123
- Guengerich, F.P., 1995, Cytochrome P450 of Human Liver, Classification and Activity Profiles of the Major Enzym, in Pacific GM and Fracchia GN (Eds), *Advances in Drug Metabolism in Man*, 179-232, European Commission Direktorat Market and International for Research, Luxemburg.
- Hu, Oliver, Y., Wang, H., Hsiong, Cheng-huei, Pao, Li-heng, 2006, Cytochrome P450 2C9 inhibitors, United States Patent 200600069042, www.freepatentsonline.com di akses tanggal 28 Agustus 2008.
- Katsumata, K., Katsumata, K., Jr., and Katsumata, Y., 1992, Protective Effect of Diltiazem Hydrochloride on the Occurrence of Alloxan or Streptozotocin Induced Diabetes in Rats, *Horm. Metab. Res*, 24 : 508-510.

- Knecht, P., et al., 1997, Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms, *Am. J. Epidemiol*, 146 : 223
- Miners, J.O., and Birkett, D.J., 1998, Cytochrome P450 2C9 : an Enzyme of Major Importance in Human Drug Metabolism, *Br J Clin Pharmacol*, 45 (6) : 525-538.
- Park, B.H., 1995, Protective Mechanism of Glucose against Alloxan Induced Pancreatic β -cell Damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 210, 1-6.
- Rosen, P., Tritschler, H.J., and Packer, L., 2002, Vascular Complications in Diabetes : Mechanisms and the Influence of Antioxidants, 511-524, in *Handbook of Antioxidants*, second edition Revised and Expanded, edited by Enrique Cadenas and Lester Packer, New York.
- Sergio, I.A., Cristina, R.M., Jorge E, Ana, C.P., Miguel, A.P., and Alfredo, F.V., 2000, Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes : Comparison of the Two Models in Rats, *Acta Histochem. Cytochem*, 33 (3), 201-208.