

LAPORAN PENELITIAN

**ISOLASI, ELUSIDASI STRUKTUR, DAN UJI AKTIVITAS
ANTIDIABETES FLAVONOID DARI BUAH BOLAI
(*Oroxylum indicum* (L) Kurz)**



UNIVERSITAS NEGERI PADANG	15 November 2000
NAMA	Hadiah
NO. KARTU	K-2
AS. KEMAHASISWAAN	21605/K/2000-2, (P)
NO. KARTU	574.19 ALI - 21

Oleh:

Dra.Hj.Nurhasnah Aliunir, M.Si
(Ketua Tim Peneliti)

Penelitian ini dibiayai oleh :

Proyek DUE-Like Universitas Negeri Padang

Tahun anggaran 1999/2000

Kontrak kerja No. 76/K 12.35/DUE-Like/1999 Tanggal 1 September 1999

UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2000

**ISOLASI, ELUSIDASI STRUKTUR, DAN UJI AKTIVITAS
ANTIDIABETES FLAVONOID DARI BUAH BOLAI
(*Oroxylum indicum* (L).Kurz)**

Personalia Penelitian:

Ketua : Dra.Hj. Nurhasnah Aliunir, M.Si
Anggota : Drs.H. Nazulis Z, M.Si

**UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2000**

ABSTRAK

**Isolasi, elusidasi struktur, dan uji aktivitas antidiabetes flavonoid
dari buah bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.)
Nurhasnah Aliunir, Nazulis Z, Nila Faresi Harda, dan
Kartika Turisiana**

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengelusidasi struktur, dan melakukan uji aktivitas antidiabetes flavonoid yang terkandung dalam buah bolai. Buah bolai oleh masyarakat di sekitar Desa Situmbuk Kelurahan Salimpaung Kecamatan Tanah Datar dipergunakan sebagai obat diabetes, dan sampel penelitian di ambil dari Desa tersebut. Spesimen herbarium tumbuhan ini telah tersimpan di Herbarium Biologi Universitas Andalas Padang dengan nomor koleksi 01-Yeri-AND.

Isolasi dilakukan dengan metoda yang lazim digunakan. Buah yang telah dirajang halus, diekstraksi lebih dulu dengan maserasi dalam pelarut metanol. Selanjutnya diisolasi dengan kolom kromatografi silika gel menggunakan eluen heksana-etil asetat secara kepolaran menaik. Zat padat yang diperoleh dimurnikan dengan rekristalisasi. Elusidasi struktur dilakukan dengan metoda kromatografi kertas, dan metoda spektroskopi ultraviolet dan inframerah. Uji aktivitas antidiabetes dilakukan terhadap flavonoid murni yang diperoleh dan terhadap flavonoid kasar fraksi etil asetat. Metoda uji antidiabetes dilakukan pada hewan percobaan tikus putih Wistar betina (berat badan antara 140 – 170 gram berusia 2,5 bulan), dengan metoda uji toleransi glukosa.

Dari hasil elusidasi struktur untuk senyawa flavonoid yang didapat, diketahui bahwa buah bolai mengandung aglikon flavon dengan nama 5,6,7-trihidroksiflavon (baikalein) berbentuk amorf, warna kuning dengan titik leleh 264,5-265,0^oC, dan glikosida flavon dengan nama 5-7,dihidroksi-6-glukosidaflavon (baikalein 6-glukosida), berbentuk amorf, warna kuning dan titik leleh 225,2-225,6^oC. Hasil pengujian secara statistik menunjukkan bahwa baikalein maupun flavonoid kasar fraksi etil asetat keduanya bersifat antidiabetes.

PENGANTAR

Kegiatan penelitian merupakan bagian dari darma perguruan tinggi, di samping pendidikan dan pengabdian kepada masyarakat. Kegiatan penelitian ini harus dilaksanakan oleh Universitas Negeri Padang yang dikerjakan oleh staf akademiknya ataupun tenaga fungsional lainnya dalam rangka meningkatkan mutu pendidikan, melalui peningkatan mutu staf akademik, baik sebagai dosen maupun peneliti.

Kegiatan penelitian mendukung pengembangan ilmu serta terapannya. Dalam hal ini, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang berusaha mendorong dosen untuk melakukan penelitian sebagai bagian yang tidak terpisahkan dari kegiatan mengajarnya, baik yang secara langsung dibiayai oleh dana Universitas Negeri Padang maupun dana dari sumber lain yang relevan atau bekerja sama dengan instansi terkait. Oleh karena itu, peningkatan mutu tenaga akademik peneliti dan hasil penelitiannya dilakukan sesuai dengan tingkatan serta kewenangan akademik peneliti.

Kami menyambut gembira usaha yang dilakukan peneliti untuk menjawab berbagai permasalahan pendidikan, baik yang bersifat interaksi berbagai faktor yang mempengaruhi praktek kependidikan, penguasaan materi bidang studi, ataupun proses pengajaran dalam kelas yang salah satunya muncul dalam kajian ini. Hasil penelitian seperti ini jelas menambah wawasan dan pemahaman kita tentang proses pendidikan. Walaupun hasil penelitian ini mungkin masih menunjukkan beberapa kelemahan, namun kami yakin hasilnya dapat dipakai sebagai bagian dari upaya peningkatan mutu pendidikan pada umumnya. Kami mengharapkan di masa yang akan datang semakin banyak penelitian yang hasilnya dapat langsung diterapkan dalam peningkatan dan pengembangan teori dan praktek kependidikan.

Hasil penelitian ini telah ditelaah oleh tim pereviu usul dan laporan penelitian Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang, yang dilakukan secara "blind reviewing". Kemudian untuk tujuan diseminasi, hasil penelitian ini telah diseminarkan yang melibatkan dosen/tenaga peneliti Universitas Negeri Padang sesuai dengan fakultas peneliti. Mudah-mudahan penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pada umumnya, dan peningkatan mutu staf akademik Universitas Negeri Padang.

Pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang membantu terlaksananya penelitian ini, terutama kepada pimpinan lembaga terkait yang menjadi objek penelitian, responden yang menjadi sampel penelitian, tim pereviu Lembaga Penelitian dan dosen senior pada setiap fakultas di lingkungan Universitas Negeri Padang yang menjadi pembahas utama dalam seminar penelitian. Secara khusus kami menyampaikan terima kasih kepada proyek Due-Like dan Rektor Universitas Negeri Padang yang telah berkenan memberi bantuan pendanaan bagi penelitian ini. Kami yakin tanpa dedikasi dan kerjasama yang terjalin selama ini, penelitian ini tidak akan dapat diselesaikan sebagaimana yang diharapkan dan semoga kerjasama yang baik ini akan menjadi lebih baik lagi di masa yang akan datang.

Terima kasih.



Padang, Maret 2000
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Negeri Padang,

Kumaidi
Prof. Drs. Kumaidi, MA., Ph.D.
NIP. 130605231

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kami panjatkan kehadiran Allah subhanu wata'ala, karena atas Taufiq dan Hidayah –Nya jua laporan penelitian ini dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Laporan ini ditulis berdasarkan penelitian yang berjudul : ‘Isolasi, Elusidasi Struktur, dan Uji Aktivitas Antidiabetes Flavonoid dari Buah Bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.), dan penelusuran literatur dari berbagai kepustakaan.

Kami menyadari bahwa laporan penelitian yang ditulis ini tidak lepas dari kelemahan maupun kekurangan, oleh sebab itu kami mengharapkan saran-saran dan kritik yang membangun dari pembaca, khususnya para Reviewer DUE-Like Universitas Negeri Padang sehingga bentuk dan isi laporan ini sesuai dengan yang diharapkan.

Keberhasilan penelitian ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, maka pada kesempatan ini kami mengucapkan banyak terima kasih kepada yang terhormat:

1. Bapak Prof. Dr. A. Muri Yusuf, selaku Rektor Universitas Negeri Padang
2. Bapak Kepala Proyek DUE-Like Universitas Negeri Padang beserta seluruh staff yang telah memberikan bantuan dana penelitian.
3. Bapak Drs. H. Idrus Ramli, sebagai Dekan FMIPA Universitas Negeri Padang
4. Bapak Dr. Amri Bakhtiar, M.S, dan Drs. Jufri Aldi M.S, Apt, sebagai mitra kerja yang telah memberikan bantuan dan fasilitas selama kerja penelitian di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas Padang.
5. Bapak reviewer DUE-Like Universitas Negeri Padang, yang telah memberikan saran-saran perbaikan demi kesempurnaan laporan ini.
6. Ibuk Dra. Yustini Maaruf, M.Si sebagai Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.
7. Saudara Nila Faresi Harda dan Kartika Turisiana, sebagai mahasiswa bimbingan yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.
8. Laboran Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.

Akhir kata kami mengharapkan semoga semua bantuan dan fasilitas yang telah diberikan kepada kami mendapat imbalan yang setimpal dari Allah swt, Amin Ya Rabbal Alamin.

Padang, Februari 2000

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman,
ABSTRAK.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB	
I. PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG.....	1
B. PERUMUSAN MASALAH.....	3
C. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. BOTANI TUMBUHAN BOLAI (<i>OROXYLUM INDICUM</i> (L) KURZ.).....	5
B. KANDUNGAN KIMIA TANAMAN BOLAI (<i>OROXYLUM INDICUM</i> (L) KURZ).....	6
C. FLAVONOID.....	7
1. <i>Klasifikasi</i>	7
2. <i>Biosintesis</i>	9
3. <i>Isolasi</i>	11
4. <i>Pemeriksaan Pendahuluan</i>	12
5. <i>Identifikasi Struktur</i>	12
6. <i>Antidiabetes</i>	13
III. METODOLOGI PENELITIAN.....	18
A. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN.....	18
B. ALAT DAN BAHAN.....	18
C. PENGAMBILAN DAN PERSIAPAN SAMPEL.....	18
D. UJI PENDAHULUAN SAMPEL (UJI FLAVONOID).....	19
E. ISOLASI.....	19
F. PEMERIKSAAN PENDAHULUAN SENYAWA HASIL ISOLASI.....	21
1. <i>Pemeriksaan warna, bentuk kristal, dan titik leleh</i>	21
2. <i>Reaksi Warna</i>	21
3. <i>Pemeriksaan Kromatografi</i>	21
G. IDENTIFIKASI STRUKTUR.....	21
1. <i>Hidrolisis</i>	21
2. <i>Metoda Spektroskopi</i>	22

H. UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES	23
1. Prinsip metode:	23
2. Bahan dan Alat	23
3. Prosedur (<i>Wattimena, dkk, 1993:16</i>):	23
4. Evaluasi	24
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A. PEMERIKSAAN PENDAHULUAN	26
B. IDENTIFIKASI STRUKTUR	27
C. UJI ANTIDIABETES	30
V. KESIMPULAN DAN SARAN	32
A. KESIMPULAN	32
B. SARAN.....	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN.....	35

DAFTAR TABEL

Tabel

1	Reaksi warna flavonoid dengan NaOH, H ₂ SO ₄ , dan Mg/HCl	12
2	Data kromatogram KKt-2A flavonoid kasar fraksi etil asetat	26
3	Data kromatogram KKt-1A gula-gula dengan pengem- bang BAA	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar

- 1 Metabolisme karbohidrat pada penderita diabetes 14
- 2 Berbagai keadaan yang mungkin terjadi sebagai akibat pengaruh kadar glukosa dalam darah16

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Distribusi flavonoid pada kromatogram kromatografi kertas dua arah dengan pengembang TBA/HOAc 15% (Markham, 1988, dan Mabry, et al, 1970)..... 35
2. Diagram kerja isolasi flavonoid dari buah bolai 36
3. Kromatogram kromatografi kertas dua arah fraksi etil asetat 38
4. Kromatogram kromatografi kertas dua arah flavonoid B 39
5. Kromatogram kromatografi kertas dua arah flavonoid E 40
6. Spektrum inframerah flavonoid B dan E 41
7. Spektrum ultraviolet flavonoid B 42
8. Spektrum ultraviolet flavonoid hasil hidrolisis44
9. Spektrum ultraviolet flavonoid E46
10. Kadar glukosa darah awal, dan kadar glukosa darah setelah diberi perlakuan untuk keempat kelompok hewan percobaan48
11. Pengujian homogenitas kadar glukosa darah awal (T_0) keempat Kelompok hewan percobaan dengan analisis varian 49
12. Pengujian kadar glukosa darah terhadap pengaruh vehikulum Pada hewan percobaan 50
13. Pengujian penurunan kadar glukosa darah tanpa dan setelah pemberian obat uji maupun insulin untuk keempat hewan per cobaan 51
14. Pengujian kadar glukosa darah akibat pemberia obat uji dan insulin setelah pemberian gluksa 50% untuk keempat kelompok hewan percobaan terhadap waktu penentuan 52

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Sebagai suatu negara yang kaya akan tumbuhan tropis, masyarakat Indonesia semenjak dahulu telah mengenal tumbuhan sebagai obat tradisional. Penggunaan tumbuhan sebagai obat telah dimulai dari adanya praktek-praktek pengobatan yang menggunakan seduhan-seduhan tanaman obat. Sampai dengan pertengahan abad ke 19 tanaman obat adalah satu-satunya bahan yang tersedia dan digunakan untuk mengobati atau mencegah penyakit. Kenyataan ini telah mendorong para ahli kimia untuk mempelajari komponen kimia dari zat yang terdapat dalam tanaman tersebut (Rusydi Djamal, 1995).

Yunazar Manjang (1982) menyatakan bahwa usaha untuk meneliti tumbuhan obat sudah mulai dikembangkan, akan tetapi disamping penelitian ini masih terbatas pada tumbuhan tertentu saja, juga masih sedikit yang dilaporkan tentang komponen kimianya yang aktif maupun mekanisme kerja obat tersebut.

Penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional, jelas berkaitan dengan kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan tersebut terutama zat aktif biologis sebab tanpa adanya suatu senyawa yang bioaktif secara umum tumbuhan tersebut tidak dapat digunakan sebagai obat. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan biasanya merupakan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, dan lain-lain. Survey fitokimia merupakan salah satu pendekatan yang dilakukan ilmuwan untuk mencari tumbuhan yang mengandung zat bioaktif.

Khusus alkaloid tanaman yang ada di Sumatera Barat, Arbain dkk telah berhasil mengisolasi sejumlah senyawa-senyawa murni dari tanaman tersebut, bahkan beberapa diantaranya merupakan senyawa baru. Hasil pemeriksaan bioaktivitas menunjukkan bahwa umumnya tumbuhan obat terbukti benar-benar aktif karena mengandung senyawa kimia yang telah diketahui aktif (Rusydi Djamal, 1995).

Flavonoid adalah salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang juga tersebar secara meluas dalam tumbuhan dan mempunyai berbagai aktivitas biologis.

Cody (1988) menyatakan bahwa flavonoid dapat digunakan sebagai obat karena mempunyai bermacam-macam bioaktivitas seperti untuk obat penyakit pembuluh darah, saluran cerna dan hepatobilier, sebagai antiinflamasi, antimikroba, antidiabetes, antiaritmia, antiviral, antiulcer, antidepresant, antifertilitas, antikanker, diuretik, dan lain-lain.

Tumbuhan bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.) merupakan salah satu tumbuhan yang digunakan oleh sebagian masyarakat untuk pengobatan tradisional, baik daun, kulit batang, maupun buahnya. Menurut informasi yang diperoleh dari salah seorang dukun di Desa Situmbuk Kecamatan Salimpaung Kabupaten Tanah Datar, daun Bolai dapat digunakan antara lain untuk mencegah infeksi, peredam tulang retak dan penurun panas, dan buah Bolai dapat digunakan sebagai obat kusta, diabetes, dan memperlancar peredaran darah (Yeri Madesi, 1998).

Bose dan Bhattacharya telah mengisolasi senyawa flavonoid dari kulit batang tumbuhan bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.), mendapatkan dua jenis senyawa flavonoid yaitu baikalein dan krisin (Harborne, J.B,1967). Alfikri (1990) telah melakukan isolasi flavonoid utama dari daun bolai, dan telah menentukan klas flavonoid dalam daun bolai tersebut yaitu flavon. Yeri Madesi (1998) telah melakukan isolasi flavonoid kasar (flavonoid yang masih tercampur dengan senyawa lainnya) dari buah bolai, tapi belum memisahkan komponen-komponen senyawa flavonoid yang dikandungnya. Hasil penelusuran Chemical Abstract (CA), belum ditemukan adanya hasil penelitian yang telah dilaporkan berkenaan dengan flavonoid yang terdapat dalam buah bolai.

Sebagaimana telah diutarakan sebelumnya, bahwa buah bolai dapat digunakan sebagai obat kusta, diabetes, dan memperlancar peredaran darah. Wattimena, *et al* (1993: :97) menyatakan bahwa naringenin yang adalah suatu senyawa flavonoid merupakan salah satu komponen kimia yang bioaktif, dalam hal ini bersifat antidiabetes.

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti merasa tertarik melakukan suatu penelitian untuk mengisolasi flavonoid dari buah Bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.), mengelusidasi struktur senyawa flavonoid tersebut, dan kemudian melakukan uji aktivitas antidiabetes dari senyawa hasil isolasi itu. Penelitian ini perlu dilakukan dalam menambah bahan baku obat di Sumatera Barat, karena Sumatera Barat merupakan daerah yang kaya dengan floranya. Sebagaimana yang dikatakan oleh Syahriar Harun (1992) bahwa salah satu cara untuk memperoleh bahan baku obat adalah dengan isolasi dari bahan alam. Telah banyak bahan baku obat yang dihasilkan dengan jalan mengisolasinya, sebagai contoh alkaloida kinin yang dipakai untuk obat malaria disekat dari kulit pohon kina, dan alkaloida morfin yang baik untuk menghilangkan rasa sakit diambil dari getah buah tumbuhan opium (*Papaver somniferum*).

B. PERUMUSAN MASALAH

Tumbuhan sebagai obat tak terlepas dari komponen kimia aktif yang dikandungnya, sebab tanpa adanya zat aktif tersebut, dapat dikatakan tumbuhan itu tak dapat digunakan sebagai obat. Menurut Theresia Sita Kusuma (1988), zat kimia aktif adalah dari golongan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid dan saponin. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang mempunyai bermacam-macam aktivitas biologis seperti antikanker, antifertilitas, antidiabetes, dll. Hasil uji kimia pendahuluan terhadap buah bolai ternyata mengandung senyawa flavonoid.

Yang menjadi masalah dalam penelitian ini adalah mengisolasi (menyekat, memisahkan) flavonoid yang dikandung oleh buah bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.), mengidentifikasi / mengelusidasi struktur senyawa-senyawa flavonoid hasil isolasi, dan kemudian menguji aktivitas antidiabetes terhadap senyawa-senyawa flavonoid hasil isolasi tersebut.

Judul penelitian untuk mahasiswa: 1) Isolasi dan elusidasi stuktur flavonoid dari buah bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.), dan 2). Isolasi dan uji aktivitas antidiabetes flavonoid dari buah bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.)

C. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1. Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk: 1). Mengisolasi flavonoid dari buah bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz), 2). Mengelucidasi struktur senyawa-senyawa flavonoid hasil isolasi dan 3). Melakukan uji aktivitas antidiabetes terhadap flavonoid kasar fraksi etil asetat, dan terhadap senyawa flavonoid murni hasil isolasi.

2. Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat: 1).Memberikan sumbangan yang berarti dalam pengembangan IPTEK, dalam hal ini bidang Kimia Organik Bahan Alam umumnya, dan Kimia Flavonoid khususnya. 2).Menambah informasi tentang tumbuhan yang mengandung senyawa bioaktif sebagai bahan baku obat, 3) Dapat melakukan kerjasama penelitian dengan industri terkait seperti industri farmasi, 4). Membantu mahasiswa dalam mempercepat penyelesaian tugas akhir, dan 5) Menunjang mata kuliah Kimia Bahan Alam yang merupakan mata kuliah pilihan pada Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. BOTANI TUMBUHAN BOLAI (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.)

Di Sumatera Barat dikenal dengan nama “Bolai”. Merupakan pohon kecil (diameter batang 10-40 cm), batang licin dengan tinggi 6 – 20 meter, batang berwarna abu-abu dan mempunyai berkas-berkas kedudukan daun, percabangan besar, daun majemuk menjulai pada batang dengan ujung daun mempunyai tangkai panjang (kira-kira 0,5 – 2 meter).

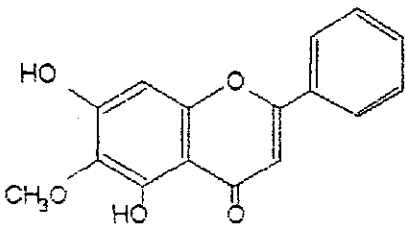
Bunga sangat besar dan berbau busuk, mekar di waktu malam, struktur bunga yang terletak pada ujung batang dengan posisi tegak panjangnya kira-kira 0,25 – 1,5 meter. Mahkota bunga berwarna merah pucat sampai coklat kemerahan dengan warna violet pada bagian luar dan kuning sampai pink pada bagian dalam. Buah panjang menyerupai pedang dengan panjang kira-kira 45–120 cm dan lebar 6–10 cm berwarna hijau kecoklatan di waktu muda dan hitam di waktu tua. Biji sangat banyak dan bersayap dengan panjang sayap 5-9 cm dan lebar 2,5- 4 cm (Van Steenis,1977).

Klasifikasi tumbuhan bolai menurut Lawrence (1951) sebagai berikut:

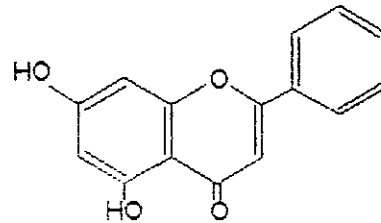
Divisio	: Spermatophyta
Sub Divisio	: Angiospermae
Klass	: Dicotyledone
Sub Klass	: Draly Petale
Ordo	: Cystales
Famili	: Bignoniaceae
Genus	: <i>Oroxylum</i>
Spesies	: <i>Oroxylum indicum</i> (L) Kurz.

B. KANDUNGAN KIMIA TANAMAN BOLAI (*Oroxylum indicum* (L) Kurz)

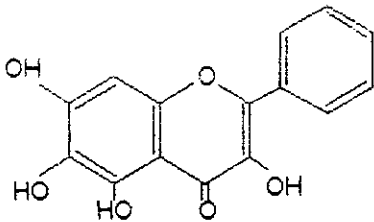
Hasil penelusuran beberapa literatur menunjukkan bahwa kulit kayu *Oroxylum indicum* mengandung Oroxylin-A (5,7-dihidroksi-6-metoksiflavon) (1), Krisin (5,7-dihidroksiflavon)(2), dan Baikalein (5,6,7-trihidroksiflavon)(3), sedangkan biji mengandung Baikalein 6-glukosida (4), dan Oroxylin-A (1) (Harborne, 1967: 44). Harborne, Mabry and Helga Mabry (1974 : 270,412) menyatakan bahwa akar tumbuhan *Oroxylum indicum* (L) Kurz.) mengandung Baikalein (3). Subramanian dan Nair, 1972 (dalam Harborne, et al, 1974) menemukan bahwa daun *Oroxylum indicum* mengandung 5,6,7-trihidroksiflavon 6-glukosida (baikalein 6-glukosida) (4), dan baikalein 6-glukoronida (5). Subramanian dan Nair pada tahun yang sama juga telah menemukan bahwa kulit batang tumbuhan ini mengandung krisin (2).



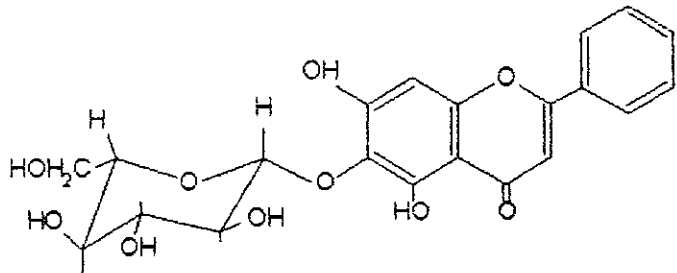
(1)



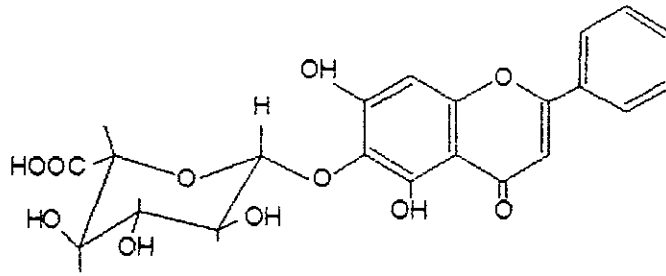
(2)



(3)



(4)



(5)

C. FLAVONOID

Flavonoid (1,3-diarilpropana, $C_6-C_3-C_6$) merupakan senyawa fenol alam yang secara meluas terdapat dalam tumbuhan. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, dan biru dan sebagian zat warna kuning, terdapat dalam semua bagian tumbuhan tinggi seperti bunga, daun, ranting, buah, kulit kayu dan akar. Flavonoid terdapat di alam dalam dua bentuk senyawa, yaitu glikosida dan aglikon. Glikosida, dimana inti flavonoid terikat pada suatu molekul gula, sedangkan pigmen flavonoid yang bebas gula disebut sebagai aglikon (Achmad, 1986).

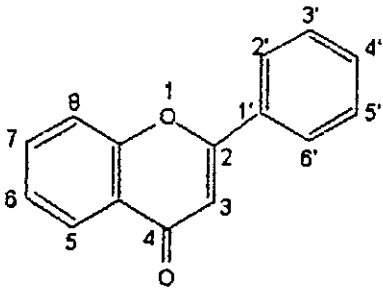
1. Klasifikasi

Senyawa flavonoid didasarkan pada tingkat oksidasi rantai propana pada sistim 1,3-diarilpropana terdiri dari beberapa jenis yaitu flavon, flavonol, antosianidin, dihidrokalkon, kalkon, flavan, katekin, leukoantosianidin, flavanon, flavanonol, biflavonoid, garam flavilum, dan auron. Tiga klas diantaranya terdapat dalam jumlah yang banyak di alam, dan dikatakan sebagai flavonoid mayor, dan yang terdapat dalam jumlah terbatas dikatakan flavonoid minor. Struktur dasar flavonoid mayor flavon (6), flavonol (7), dan antosianidin (8).

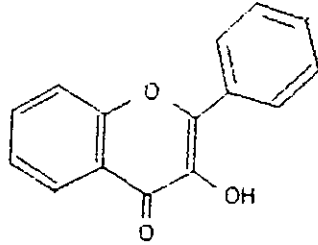
Flavonoid di alam ditemukan dalam bentuk aglikon dan glikosida, tetapi bentuk glikosida lebih banyak dijumpai. Glikosida pigmen flavonoid adalah dimana inti flavonoid terikat pada suatu molekul gula (contoh, kuersetin 3-O-arabinosida (9)), dan aglikon adalah pigmen flavonoid yang bebas gula (contoh, kuersetin (10)).

Glikosilasi gugus hidroksil dari aglikon menghasilkan flavonoid O-glikosida dengan ikatan C-O yang tak tahan asam, (contoh, (9)), dan glikosilasi inti flavonoid menghasilkan flavonoid C-glikosida dengan ikatan C-C yang tahan asam (contoh, (11)). Sebagian besar flavonoid terdapat sebagai flavonoid O-glikosida, dimana satu

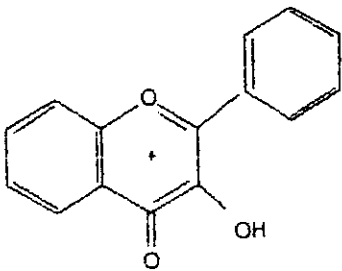
atau lebih gugus hidroksil terikat pada satu atau lebih molekul gula dengan ikatan asetal yang tidak tahan terhadap asam.



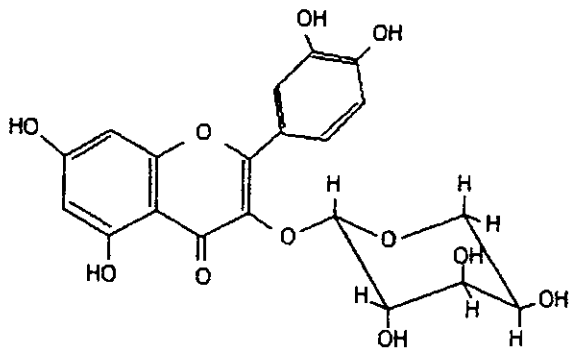
(6)



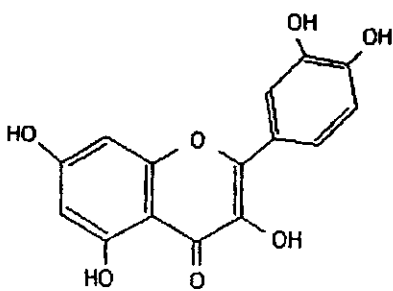
(7)



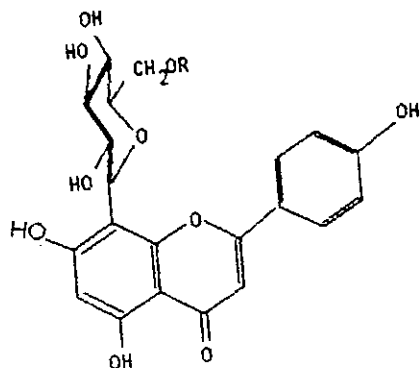
(8)



(9)



(10)

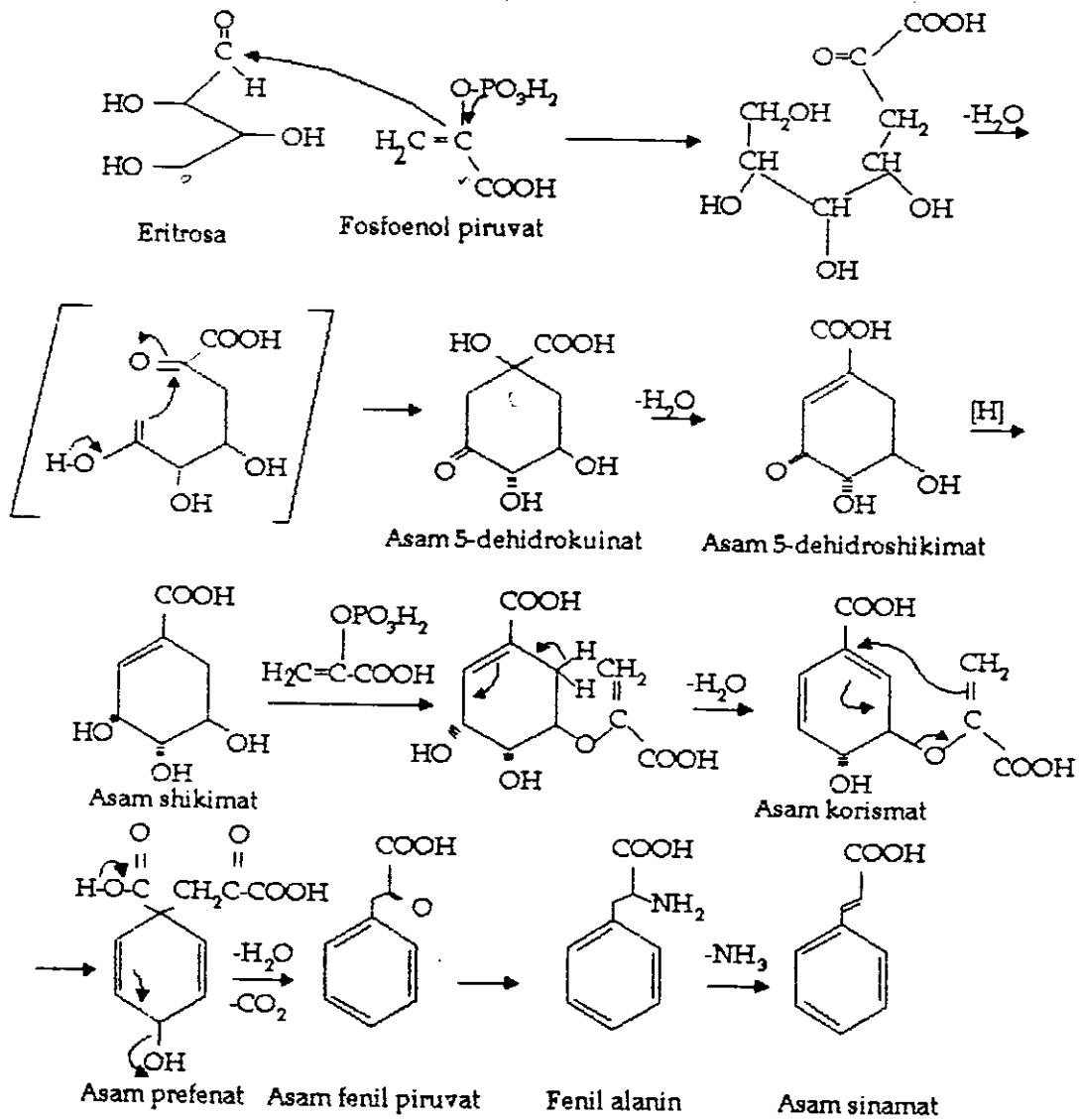


(11)

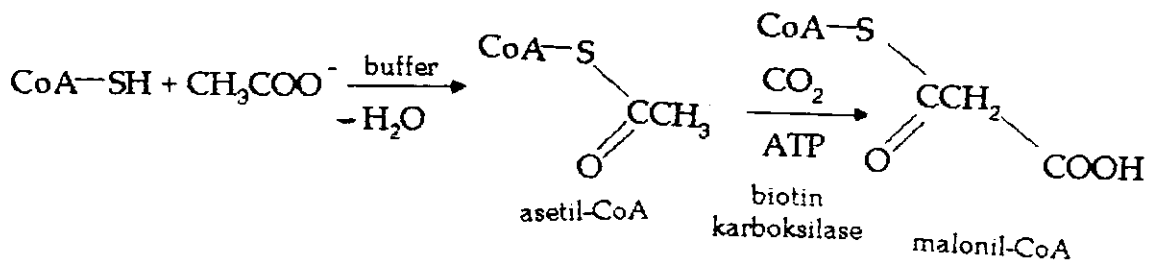
2. Biosintesis

Harborne (1967), berdasarkan penelusuran asetat berlabel, menyatakan bahwa kerangka dasar C_{15} dari flavonoid diturunkan dari dua jalur terpisah, yaitu jalur shikimat dan jalur asetat malonat.

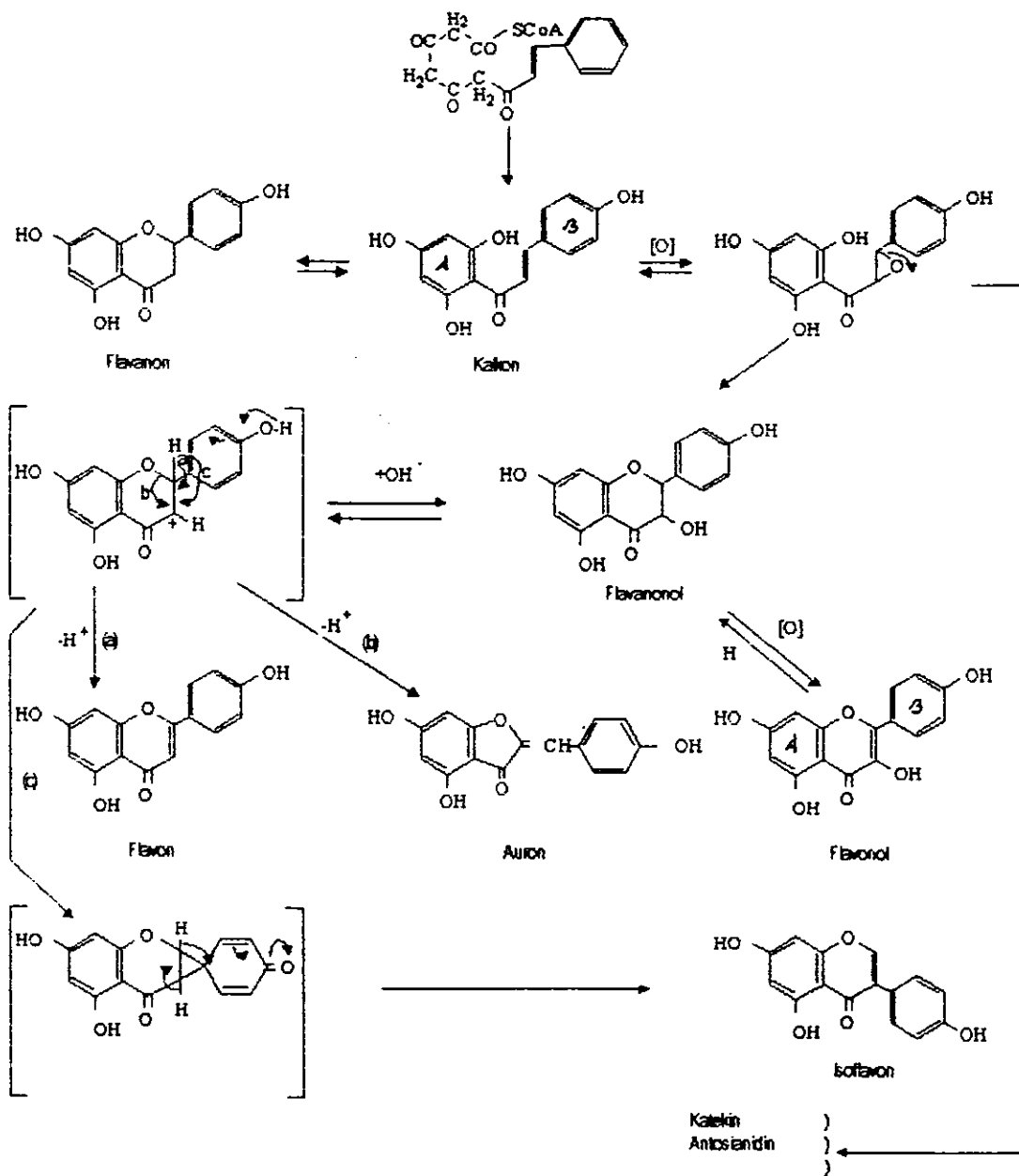
Reaksi jalur shikimat (Achmad, 1986)



Reaksi jalur asetat-malonat (Brown, 1975)



Hubungan biogenetik berbagai jenis flavonoid (Harborne, 1967, dan Achmad, 1986).



3. Isolasi

Flavonoid merupakan senyawa polar, maka pada umumnya dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, air, dan lain-lain. Adanya gula yang terikat pada inti flavonoid (glikosida flavonoid) cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air, dengan demikian campuran pelarut di atas dengan air merupakan pelarut yang baik untuk ekstraksi. Ekstraksi dapat dilakukan secara maserasi atau perkolasi (Markham, 1988).

Setelah tumbuhan yang telah dirajang halus ditimbang, dimaserasi dalam dua tahap. Pertama dengan MeOH : H₂O (9:1) dan kedua dengan MeOH : H₂O (1:1). Penyaringan untuk memisahkan ekstrak dari bahan tumbuhan dilakukan dengan cepat menggunakan corong Buchner dan pompa vakum. Kedua ekstrak disatukan dan diuapkan sampai hampir semua metanolnya menguap atau sampai volumenya menjadi sepertiga volume asal. Ekstrak air yang diperoleh dibebaskan dari senyawa yang kepolarannya rendah seperti lemak, terpen, klorofil, dan lain-lain dengan jalan mengekstraksi dengan n-heksana atau klorofil. Ekstraksi harus dilakukan beberapa kali dan kemudian ekstrak disatukan. Lapisan air yang telah diekstraksi dengan pelarut, dan mengandung bagian terbesar flavonoid, lalu diuapkan sampai kering pada tekanan rendah dengan menggunakan penguap putar sehingga diperoleh flavonoid kasar (crude flavonoid) (Markham, 1988).

Untuk melihat jenis-jenis flavonoid yang terkandung dalam crude flavonoid, dilakukan kromatografi kertas dua arah (KKt-2A) dengan pengembang pertama butanol - asam asetat - air (BAA) (4:1:5), dan pengembang kedua asam asetat (HOAc) 15%. Pola penyebaran flavonoid pada kromatogram diperiksa dengan lampu UV 366 nm dan penampak noda uap amonia.

Pemisahan flavonoid dari crude flavonoid dapat dilakukan dengan berbagai macam teknik kromatografi seperti kromatografi kolom (KK), kromatografi lapisan tipis (KLT), dan kromatografi kertas preparatif (KKt preparatif). Jika flavonoid tersedia cukup (4 mg atau lebih), maka cara pemurnian yang paling efektif adalah dengan penghabluran ulang (rekristalisasi), yang bertujuan untuk menghilangkan flavonoid-tambahan lain dan bahan kromatografi yang larut (Harborne, 1994, Markham, 1988, dan Mabry, 1970).

4. Pemeriksaan Pendahuluan

Senyawa flavonoid hasil isolasi lebih dulu diperiksa warna, bentuk (kristal atau amorf), dan titik lelehnya, kemudian ditentukan klas / jenis flavonoidnya dengan :

a. Reaksi warna

Mereaksikan senyawa flavonoid dengan pereaksi-pereaksi tertentu menjadi senyawa berwarna, merupakan suatu cara untuk menentukan jenis flavonoid apakah termasuk flavon, flavonol, atau antosianidin (Finar, 1976: 677). Pereaksi yang digunakan, dan perubahan warna yang diamati untuk flavonoid tersebut, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Reaksi warna flavonoid dengan NaOH, H₂SO₄, dan Mg / HCl

Jenis flavonoid	Larutan NaOH	H ₂ SO ₄ pekat	Mg / HCl
Antosianidin	Biru sampai violet	Orange kekuningan	Merah (pudar-pink)
Flavon	Kuning	Kuning sampai orange	Kuning sampai merah
Flavonol	Kuning sampai orange	Kuning sampai orange	Merah sampai magenta

b. Metoda kromatografi : KKt-2A

Letak dan warna bercak pada kromatogram KKt-2A dibawah lampu UV baik sebelum maupun sesudah diberi penampak noda, merupakan informasi yang sangat bernilai dalam menentukan jenis flavonoid (Markham, 1988 dan Mabry et al, 1970) (Lampiran 1).

5. Identifikasi Struktur

Senyawa flavonoid hasil isolasi diidentifikasi strukturnya dengan cara hidrolisis, kromatografi kertas, dan metoda spektroskopi (IR dan UV-Vis).

a. Hidrolisis

Hidrolisis berguna untuk membantu penentuan struktur flavonoid O-glikosida, karena dengan cara ini ikatan antara aglikon dengan molekul gulanya dapat diputus dengan jalan pengerjaan dengan asam klorida. Gula hasil analisis dianalisis dengan kromatografi kertas dan dibandingkan dengan gula-gula autentik pada kertas yang sama (ko-kromatografi). Aglikon hasil hidrolisis dianalisis dengan kromatografi kertas menggunakan beberapa eluen, dan spektrometer UV-VIS

dengan penambahan pereaksi-pereaksi geser (Markham, 1988 and Mabry et al, 1970).

b. Metoda Spektroskopi

Menurut Markham (1988), spektroskopi serapan ultraviolet dan tampak (UV-Vis), merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid karena dapat mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasinya. Spektrum untuk menentukan jenis flavonoidnya biasanya ditentukan dengan pelarut metanol, sedangkan kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid ditentukan dengan penambahan pereaksi-pereaksi geser seperti larutan natrium metoksida (NaOMe), larutan aluminium klorida (AlCl₃) dalam metanol, larutan asam klorida (HCl), serbuk natrium asetat (NaOAc), dan serbuk asam borat (H₃BO₃) kedalam larutan cuplikan dalam metanol, dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi.

c. Kromatografi Kertas (KKt)

Kromatografi kertas disini bertujuan untuk menentukan harga R_f (retardation factor) dari flavonoid-flavoniod hasil isolasi. Sebagai pengembang digunakan eluen butanol-asam asetat-air (BAA) (4:1:5), dan asam asetat (HOAc) 15%. Noda dilihat dibawah lampu UV 366 nm, dengan penampak noda amonia, dan aluminium klorida (Markham, 1988).

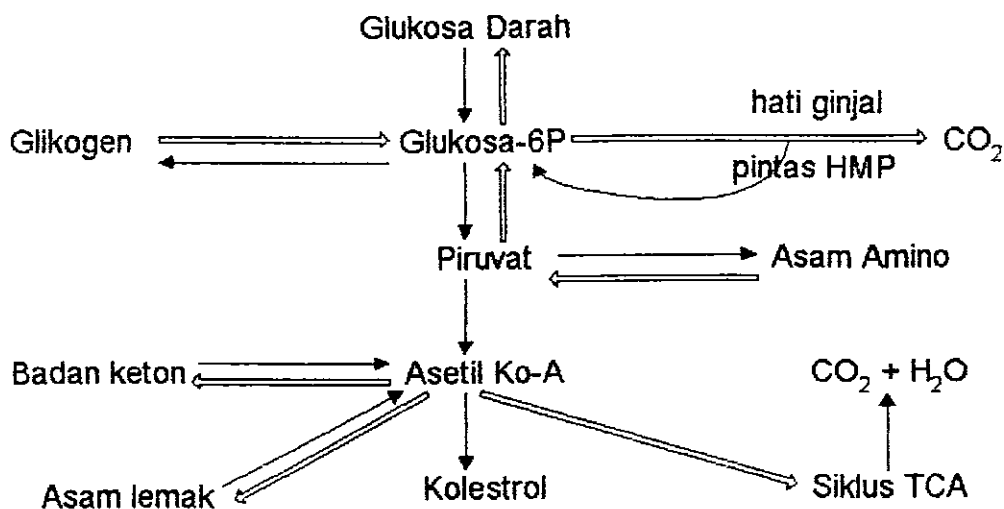
6. Antidiabetes

a. Diabetes melitus

Diabetes melitus adalah salah satu gangguan tubuh berupa kenaikan kadar glukosa di dalam darah (hiperglikemia). Keadaan ini seringkali disertai dengan gejala-gejala kehausan yang sangat, selalu ingin kencing, penurunan berat badan dan dapat mengalami koma sampai kematian bila tidak segera diobati. Namun lebih sering para penderita ini tidak disertai dengan gejala yang berat, bahkan pada beberapa orang justru tidak terlihat gejalanya sama sekali. Menurut Supartondo, dkk (1987) dari sudut penderita yang menyebabkan mereka datang berobat ke dokter dan kemudian didiagnosis sebagai diabetes melitus adalah keluhan kelainan kulit (gatal, bisul-bisul), kelainan ginekologos (keputihan), kesemutan, kelemahan tubuh, luka atau bisul yang tidak sembuh-sembuh, dan

infeksi saluran kemih. Tingginya kadar glukosa dalam darah dan abnormalitas biokimiawi lainnya ini, sebagai akibat dari berkurangnya produksi atau aksi *insulin*, suatu hormon yang berperan untuk mengatur metabolisme glukosa, lemak dan asam amino (Wattimena, 1995:195). Diabetes melitus adalah suatu keadaan yang timbul karena defisiensi insulin relatif maupun absolut. Hiperglikemia timbul karena penyerapan glukosa ke dalam sel terhambat serta metabolismenya diganggu (Gambar 1) (Ganiswara : 1995, 471).

Gambar 1 Metabolisme karbohidrat pada penderita diabetes



Dalam keadaan normal, kira-kira 50% glukosa yang dimakan mengalami metabolisme sempurna menjadi CO_2 dan air, 5% diubah menjadi glikogen dan kira-kira 30-40% diubah menjadi lemak. Pada diabetes melitus semua proses tersebut terganggu, glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel, sehingga energi terutama diperoleh dari metabolisme lemak. Sebenarnya hiperglikemia sendiri relatif tidak berbahaya, kecuali bila hebat sekali hingga darah menjadi hiperosmotik terhadap cairan intrasel.

Pada penderita diabetes melitus, sering didapati kadar kolesterol yang tinggi dalam darah. Hal ini berhubungan erat dengan kenyataan bahwa arteriosklerosis (penebalan pembuluh darah) lebih cepat timbul pada penderita diabetes. Dan juga pada penderita diabetes melitus, defisiensi insulin (hormon yang berperan penting dalam metabolisme karbohidrat, lemak dan protein) menyebabkan hambatan transport asam amino ke dalam sel, serta hambatan inkorporasi asam amino menjadi molekul

protein. Hal ini memperhebat penurunan berat badan penderita diabetes yang tidak diobati. Selain itu juga daya tahan tubuh sangat menurun karena pembentukan zat antibodi ikut terhambat. Hal inilah yang mengakibatkan mudahnya timbul infeksi serta susahny penyembuhan infeksi pada penderita diabetes.

Kebutuhan insulin pada penderita diabetes sangat berbeda-beda, karena banyak sekali faktor yang mempengaruhi kadar glukosa darah. Seorang dewasa yang telah mengalami pankreatektomi (pengangkatan pankreas), membutuhkan kira-kira 30 unit insulin setiap hari untuk mempertahankan metabolisme normal. Kebutuhan insulin berkurang bila penderita banyak melakukan kerja fisik. Penderita diabetes dengan kerja fisik berat harus mendapat asupan kalori yang lebih besar dari biasanya, serta dosis insulin yang lebih rendah. Kebutuhan insulin pada penderita diabetes, pada umumnya berkisar antara 5-150 unit sehari tergantung dari keadaan si penderita.

b. Fisiologi Glukosa Darah

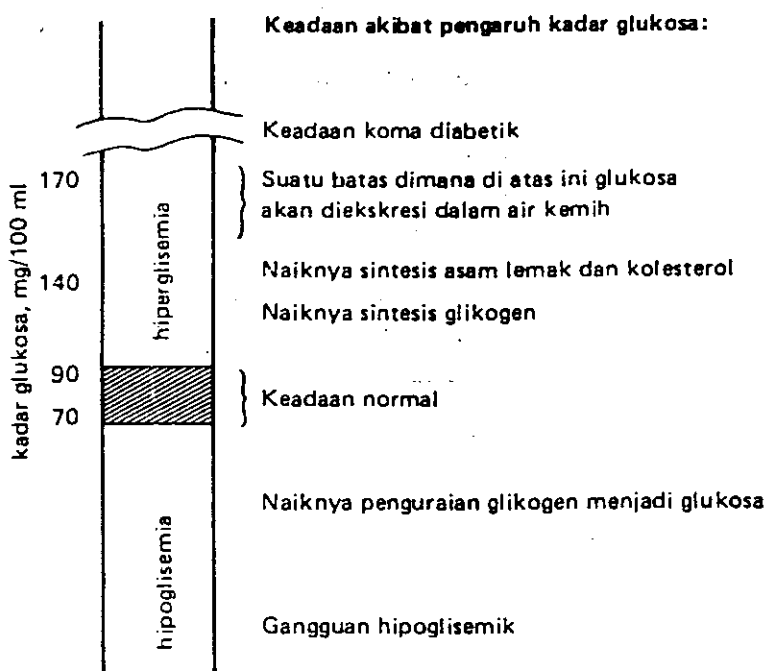
Hampir semua hasil akhir pencernaan karbohidrat dalam saluran pencernaan adalah berupa monosakarida, dan sejauh ini glukosa merupakan hasil yang paling besar. Sebelum ditransport ke hati, dua monosakarida lain yaitu fruktosa dan galaktosa diubah lebih dahulu menjadi glukosa pada saluran pencernaan. Di hati, sisa fruktosa dan galaktosa mengalami fosforilasi dan dikeluarkan dalam bentuk glukosa untuk diangkut ke seluruh tubuh oleh sistem sirkulasi.

Kadar glukosa darah merupakan faktor yang sangat penting untuk kelancaran kerja tubuh. Wirahadikusumah (1985) menyatakan bahwa kadar normal glukosa darah adalah 70–90 mg/100 mL. Keadaan dimana kadar glukosa berada di bawah 70 mg/100 mL disebut *hipoglisemia*, sedangkan di atas 90 mg/100 mL disebut *hiperglisemia* (Gambar 2). Kadar glukosa antara 140 – 170 mg/100 mL disebut kadar *ambang ginjal*, karena pada kadar ini glukosa dieksresikan dalam kemih melalui ginjal. Gejala ini disebut *glikosuria* yaitu keadaan ketidakmampuan ginjal untuk menyerap kembali glukosa yang telah mengalami filtrasi melalui sel tubula.

Ganiswara (1995) menyatakan bahwa kadar glukosa darah normal manusia berkisar antara 80 – 100 mg/dL dalam keadaan post absorpsi. Pada keadaan puasa kadarnya turun sampai sekitar 60 – 70 mg/dL, dan dapat meningkat sampai 120 – 130 mg/dL setelah makan karbohidrat. Dalam keadaan normal, kadar glukosa darah

dikontrol pada batas-batas ini. Pada keadaan tertentu dimana kadar glukosa darah berada di atas batas normal disebut dengan *hiperglikemia*, sedangkan bila kadar glukosa darah di bawah batas-batas normal, disebut dengan *hipoglikemia*. Dikatakan menderita diabetes mellitus bila kadar glukosa darah puasa melebihi 120 mg/dL, atau kadar glukosa darah random lebih besar dari 200 mg/dL.

Keadaan akibat pengaruh kadar glukosa darah:



Gambar 2. Berbagai keadaan yang mungkin terjadi sebagai akibat pengaruh kadar glukosa dalam darah (Wirahadikusumah, 1985:28).

Kadar glukosa darah diatur oleh sistim enzim dan hormon melalui beberapa proses yang berlangsung secara bergantian yang tergantung pada kadar glukosa darah.

c. Antidiabetes (Antihiperglikemia)

Obat antidiabetes dapat dikelompokkan atas dua bagian yaitu antidiabetes oral dan injeksi. Antidiabetik oral dapat dibagi pula menjadi dua bagian yaitu 1) derivat sulfonilurea dan 2) derivat biguanid. Cara kerja kedua golongan obat ini sangat berbeda dimana derivat sulfonilurea bekerja dengan merangsang sekresi insulin di pankreas, sedangkan kerja derivat biguanid tidak bergantung pada fungsi pankreas.

1695/212000-1, (2)
574.19
AGI.
10

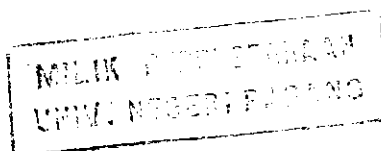
Obat antidiabetes injeksi berupa insulin. Insulin adalah suatu hormon yang merupakan polipeptida dengan berat molekul kira-kira 6.000, yang terdiri dari 51 asam amino. Insulin terdiri atas dua rantai peptida, rantai -A dengan 21 asam amino, dan rantai-B dengan 30 asam amino, dihubungkan oleh dua jembatan disulfida antar rantai.

Insulin berperan penting tidak hanya dalam metabolisme karbohidrat, tetapi juga dalam transport berbagai zat melalui membran sel dalam metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. Karena efek insulin yang luas ini, maka sangatlah sulit untuk menerangkan berbagai efeknya hanya berdasarkan atas satu macam mekanisme kerja saja (Ganiswara, 1995:470).

d. Metode Uji Aktivitas Antidiabetes

Keadaan diabetes dapat diinduksi pada hewan percobaan dengan cara pankreatektomi dan juga secara kimia. Zat-zat kimia sebagai induktor (=diabetogen) dapat digunakan zat-zat kimia seperti aloksan, glukagon, adrenalin, dan lain-lain, yang pada umumnya diberikan secara parenteral. Zat-zat tersebut di atas mampu menginduksi diabetes secara permanen dimana terjadi gejala hiperglikemia. Diabetogen yang lazim digunakan adalah aloksan, karena obat ini cepat menimbulkan hiperglikemia dalam waktu dua sampai tiga hari.

Jenis-jenis hewan percobaan yang digunakan meliputi mencit, tikus atau kelinci. Pemberian antidiabetes dilakukan secara kuratif. Uji antidiabetes dapat dilakukan dengan dua metode, yakni metode uji toleransi glukosa, dan metode uji diabetes aloksan.



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian di laksanakan di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang dan Laboratorium Farmasi FMIPA Universitas Andalas Padang dari bulan September 1999 sampai dengan Maret 2000.

B. ALAT DAN BAHAN

Alat:

Peralatan glass, alat destilasi, corong pisah, penguap putar, kolom kromatografi, oven vakum, bejana kromatografi, botol-botol maserator, lampu Ultraviolet, alat penentuan titik leleh Gallenkamp, spektrometer UV- Vis, dan spektrometer Inframerah Perkin Elmer 735B.

Bahan:

Metanol, n-heksana, etil asetat, n-butanol, silika gel, asam asetat glasial, akuades, plat lapisan tipis, kertas kromatografi Whatman 3MM, glukosa, natrium hidroksida, asam sulfat, serbuk Mg, asam klorida, aluminium klorida, natrium metoksida, natrium asetat, amonia, dan asam borat.

C. PENGAMBILAN DAN PERSIAPAN SAMPEL

Sampel penelitian adalah buah bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.) diambil dari rimba Desa Situmbuk Kecamatan Salimpaung Kabupaten Tanah Datar. Buah tumbuhan ini dibersihkan, kemudian dirajang halus. Identifikasi tumbuhan ini telah dilakukan oleh Yeri Madesi (1998) dan spesimen herbariumnya telah tersimpan di Herbarium Biologi Universitas Andalas (AND) Padang dengan no. koleksi 01-Yeri-AND.

D. UJI PENDAHULUAN SAMPEL (Uji Flavonoid)

Uji flavonoid dilakukan dengan Sianidin/Shinoda test (Syafri, D. 1993). Kirakira 0,5 gram sampel yang telah dirajang halus diekstraksi dengan 5 ml metanol dan dipanaskan selama 5 menit di dalam tabung reaksi, dan disaring. Kedalam filtrat kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan sedikit serbuk magnesium. Bila terjadi perubahan warna menjadi kuning sampai merah menunjukkan sampel mengandung flavonoid.

E. ISOLASI

Sampel segar yang telah dirajang halus sebanyak 4 kg (kadar air 65,6%), dimaserasi dengan metanol destilat (6 lt) selama lima hari pada suhu kamar, dan disaring. Proses ini diulang kedua kalinya dengan pelarut metanol-air (1:1) 5,5 lt sampai senyawa flavonoid pada sampel terekstrak semua, ini ditandai dengan ampas yang memberikan tes negatif terhadap flavonoid. Ekstrak yang diperoleh disatukan, kemudian pelarutnya diuapkan dengan penguap putar sampai berupa cairan kental (700 mL). Tambahkan air panas, saring, dan ekstrak berair ini diekstraksi dengan n-heksana 4 x 450 mL menggunakan corong pisah untuk menghilangkan senyawa-senyawa non-polar seperti klorofil, lemak, steroid, dll. Lapisan air yang mengandung flavonoid diekstraksi dengan etil asetat 4 x 450 mL, sampai lapisan etil asetat memberikan tes sianidin negatif. Fraksi etil asetat disatukan, kemudian diuapkan pelarutnya dengan penguap putar sampai hampir kering, kemudian dikeringkan lebih lanjut dalam oven vakum 100 mbar, 40°C. Diperoleh flavonoid kasar fraksi etil asetat, berupa cairan kental berwarna coklat tua (7,55 gr, 0,55%). Kemudian lapisan berair diekstraksi lagi dengan n-butanol beberapa kali sampai fraksi air memberikan tes sianidin negatif. Fraksi n-butanol juga disatukan dan diuapkan pelarutnya sampai hampir kering, dikeringkan dalam oven vakum 100 mbar, 40°C. Diperoleh flavonoid kasar fraksi n-butanol berupa cairan kental seperti gum warna kehitaman (13,27gr, 0,96%). Untuk lebih jelasnya lihat Lampiran 2.

Sebelum dipisahkan, terhadap kedua flavonoid kasar lebih dulu dilakukan analisis pendahuluan untuk menentukan kandungan jenis flavonoidnya dengan kromatografi

kertas dua arah (KKt-2A) dengan pengembang BAA/HOAc 15%. Bercak dilihat dengan lampu UV 366 nm dan penampak noda uap amonia dan aluminium klorida 5%. Kondisi kolom dimonitoring dengan kromatografi lapisan tipis selulosa dengan eluen metanol 5%, dan KLT silika gel dengan eluen n-heksana-etil asetat (1:1).

Pemisahan flavonoid kasar dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan adsorben silika gel dengan eluen n-heksana – etil asetat dengan meningkatkan kepolaran (step gradient polarity, sgp) (1:1 - 3:7 – 0:10) untuk fraksi etil asetat, dan kromatografi kolom selulosa dengan eluen metanol 5% secara kepolaran meningkat (metanol 5% - air) untuk fraksi n-butanol.

Untuk fraksi etil asetat (3 gr), eluat ditampung dalam vial-vial dengan volume kira-kira 20 mL, masing-masing vial dimonitor dengan kromatografi kertas satu arah dengan pengembang heksana – EtOAc (1:1) secara sgp. Yang mempunyai harga R_f yang sama digabung, diperoleh lima fraksi yaitu fraksi A (vial 1-3), fraksi B (vial 4-13), fraksi C (vial 14-27), fraksi D (vial 28-39), dan fraksi E (vial 44-46). Dan masing-masing fraksi dievaporasi. Fraksi A menghasilkan zat padat liat warna kuning kehijauan, fraksi B menghasilkan zat padat warna kuning, fraksi C dan D masing-masing berupa cairan kental warna merah kecoklatan, dan fraksi E menghasilkan zat padat warna kuning. Masing-masing zat padat (fraksi A, B, dan E) kemudian dimurnikan secara rekristalisasi menggunakan campuran dua pelarut dietil eter / n-heksana. Diperoleh zat padat amorf dari fraksi B, dan E, sedangkan untuk fraksi A masih berupa zat padat liat, dan kemudian di oven vakum 100 mbar, 40⁰C. Karena flavonoid A tetap merupakan zat padat liat, maka tidak dilakukan analisis lanjutan, untuk seterusnya fraksi B disebut sebagai flavonoid B dan fraksi E sebagai flavonoid E. Flavonoid B, dan E ini diuji kemurniannya dengan KKt -1A menggunakan beberapa eluen BAA, HOAc 15%, dan forestal (HOAc – H₂O–HCl pekat = 30:10: 3). Untuk masing-masing flavonoid diukur titik lelehnya.

Untuk fraksi n-butanol (3 gr), eluat ditampung dalam vial-vial dengan volume kira-kira 20 mL, masing-masing vial dimonitor dengan kromatografi kertas satu arah dengan pengembang asam asetat 15%. Yang mempunyai harga R_f yang sama digabung, diperoleh dua fraksi yaitu fraksi A (vial 1-8) dan fraksi B (vial 9-15). Setiap fraksi

dievaporasi, dan kedua fraksi hanya menghasilkan cairan kental seperti gom yang berwarna coklat kemerahan, dan tidak dilanjutkan.

F. PEMERIKSAAN PENDAHULUAN SENYAWA HASIL ISOLASI

1. Pemeriksaan warna, bentuk kristal, dan titik leleh

Senyawa flavonoid B, dan E hasil isolasi ditentukan warna, bentuk (kristal atau amorf), dan titik lelehnya. Titik leleh ditentukan dengan Gallenkamp melting point apparatus.

2. Reaksi Warna

Senyawa hasil isolasi dikerjakan dengan beberapa pereaksi kimia yaitu larutan NaOH 10%, H₂SO₄ pekat, dan Mg/HCl. Reaksi ini akan menghasilkan warna spesifik yang tergantung jenis flavonoidnya. Sedikit flavonoid dilarutkan dalam metanol secukupnya. Ambil kira-kira 1 mL larutan, tambahkan beberapa tetes larutan NaOH 10%, dicatat perubahan warna yang terjadi. Cara yang sama dilakukan terhadap H₂SO₄ pekat. Ambil lagi kira-kira 1 mL larutan, tambahkan beberapa tetes HCl pekat, kemudian bubuhi sedikit serbuk magnesium, di catat perubahan warna yang terjadi.

3. Pemeriksaan Kromatografi

Untuk menentukan jenis/klas senyawa flavonoid hasil isolasi, dilakukan analisis kromatografi kertas dua arah dengan kertas Whatmann 3MM 20 x 20 cm dengan pengembang BAA/HOAc 15%, dan kromatografi kertas satu arah dengan kertas Whatmann 3MM 5 x 18 cm pengembang BAA dan HOAc 15%. Bercak dideteksi dengan lampu UV 366 nm, penampak noda uap amonia, dan larutan aluminium klorida.

G. IDENTIFIKASI STRUKTUR

1. Hidrolisis

Hidrolisis menggunakan asam klorida dengan prosedur sebagai berikut:

Sebanyak 1 mg glikosida flavonoid dilarutkan dalam 5 mL MeOH-HCl 2N(1:1) dalam labu dasar bulat 25 mL dan direfluks selama 60 menit. Diuapkan sampai kering dengan penguap putar. Sisa kering dilarutkan dalam sedikit MeOH-H₂O (1:1), kemudian dimonitor dengan KLT selulosa disamping bahan awal dengan pengembang HOAc 15%

untuk menentukan apakah telah terjadi hidrolisis. Jika harga R_f menjadi kecil berarti hidrolisis telah terjadi. Untuk mengisolasi aglikon dan gula hasil hidrolisis lebih lanjut, maka larutan MeOH-H₂O diuapkan sampai volumenya tinggal setengahnya supaya semua MeOH menguap. Kemudian diekstraksi tiga kali dengan etil asetat, maka aglikon akan berada dalam fraksi etil asetat sedangkan gula dalam fraksi air, dan keduanya dipisahkan untuk dianalisis.

a. Analisis Aglikon

Fraksi etil asetat diuapkan dengan penguap putar sampai kering, dan sisa kering ditambah metanol. Ekstrak metanol ini kemudian dianalisis dengan Kkt-1A pengembang BAA dan HOAc 15%. Selain itu ekstrak metanol tersebut juga dibuat spektrum UV-nya dengan spektrometer UV-VIS dengan penambahan pereaksi geser.

b. Analisis Gula

Fraksi berair hasil hidrolisis dikurangi volumenya dengan penguap putar sampai diperoleh cairan kental. Analisis dilakukan secara ko-kromatografi menggunakan kertas Whatmann 3MM 20 x 20 cm bersama dengan gula autentik arabinosa, glukosa, ksilosa, dan galaktosa sebagai pembanding dengan pengembang BAA. Kertas kromatogram yang telah betul-betul kering disemprot dengan penampak noda anilin hidrogenftalat kemudian dimasukkan oven 100⁰C selama tiga menit. Dihitung harga R_f untuk masing-masing gula dan gula hasil hidrolisis.

2. Metoda Spektroskopi

Spektrum UV-VIS untuk flavonoid hasil isolasi direkam dengan spektrometer UV-Vis Secomam S.1000. Terlebih dulu alat distandadisasi dengan blanko (metanol p.a). Sedikit senyawa flavonoid dilarutkan dalam metanol, larutan diencerkan hingga diperoleh serapan yang cukup baik. Spektrum mula-mula direkam dalam pelarut MeOH, kemudian secara berturut-turut direkam untuk penambahan larutan NaOMe, AlCl₃, AlCl₃/HCl, dan NaOAc, NaOAc/H₃BO₃.

Spektrum inframerah (IR) direkam dengan spektrometer inframerah Perkin Elmer 735B dalam bentuk pelet KBr. Sedikit serbuk senyawa digerus sampai halus dengan kristal KBr di dalam lumpang porselen, kemudian dibuat pelet dengan bantuan alat penekan hidrolis, dengan demikian zat akan terdispersi secara homogen di dalam pelet.

H. UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES

Uji aktivitas antidiabetes flavonoid fraksi etil asetat, dan flavonoid murni hasil hidrolisis dilakukan dengan metoda uji toleransi glukosa.

1. Prinsip metode:

Kepada tikus yang telah dipuaskan selama lebih kurang 20-24 jam, diberikan larutan glukosa per oral setengah jam sesudah pemberian sediaan obat uji. Pada awal percobaan sebelum pemberian obat, dilakukan pengambilan cuplikan darah ekor dari setiap tikus sejumlah 0,2 mL sebagai kadar glukosa darah awal. Pengambilan cuplikan darah ekor diulangi setelah perlakuan pada waktu-waktu tertentu.

2. Bahan dan Alat

Bahan : Sediaan uji, zat pembanding, air suling, larutan glukosa standard, tragakan (bahan pengsuspendensi), dan hewan percobaan tikus putih Wistar betina usia sekitar 2,5 bulan dengan berat badan antara 140 – 170 gram.

Alat : Jarum dan alat suntik 1 mL dan 10 mL, jarum suntik oral, alat pembuka mulut mencit dari logam, tabung-tabung sentrifus mikro, mikropipet 0-10 μ L, kandang dan timbangan tikus, centrifuge HERMLE Z 383 S, Mercko test glukosa, tabung reaksi kecil, perangkat pereaksi glukosa, dan spektrofotometer (spektronik-20).

3. Prosedur (Wattimena, dkk, 1993:16):

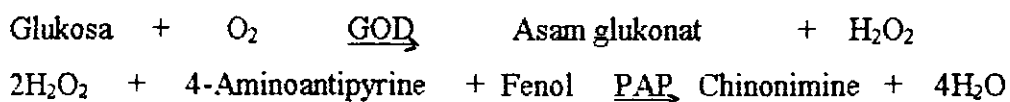
Pada hari percobaan, semua hewan ditimbang dan masing-masing diberi tanda pengenal, lalu ditempatkan ke dalam kotak penahan hewan. Kemudian dilakukan pengambilan darah dari ekor tikus (T_0 = darah awal) sebelum pemberian obat.

Sediaan obat dalam larutan / suspensi tragakan 2% diberikan secara per oral. Satu jam kemudian diambil cuplikan darah ekor (T_1). Kelompok kontrol diberikan vehikulum saja dengan cara pemberian yang sama, dan volume yang sama yaitu 5 mL/kg berat badan. Satu jam kemudian sediaan glukosa 50% diberikan dengan dosis 1gr/kg berat badan kepada semua kelompok. Selesai pemberian oral, dengan segera diambil darah ekor (T_2). Pengambilan darah selanjutnya pada menit-menit ke-90 (T_3), 120 (T_4), dan 150 (T_5). Cuplikan darah ini ditampung dalam tabung-tabung sentrifus mikro, disentrifus selama 10 menit pada putaran 3000 rpm. Supernatan yang jernih (serum) diambil dengan mikropipet, dengan jumlah yang sesuai dengan volume yang

diperlukan. Serum darah dipindahkan ke dalam tabung –tabung kecil, diberi pereaksi untuk menentukan kadar glukosa darah. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan alat Spektronik-20.

Penentuan kadar glukosa darah ini, dilakukan dengan metoda enzymatic colorimetric test, “GOD-PAP”, dengan prinsip sebagai berikut:

Penentuan glukosa setelah dioksidasi enzimatis oleh glukosa oksidase. Indikator kolorimetrik adalah chinonimine, yang diturunkan dari 4-aminoantipyrine dan fenol oleh hidrogen peroksida dibawah aksi katalitik peroksidase.



Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada panjang gelombang 500 nm, temperatur kamar, dan pengukuran melawan reagen blanko. Sebelum dilakukan pengukuran, alat terlebih dulu distandardisasi menggunakan akuades. Volume masing-masing reagen, standard, dan sampel seperti pada tabel di bawah:

	Blanko	Sampel / Standard
Sampel/Standard	-	10 μ l
Reagen	1000 μ l	1000 μ l

Zat-zat dicampur, dikocok, dan diinkubasikan selama 10 menit pada 37°C, kemudian persentase transmittance dibaca pada alat. Pengenceran blanko, standar, dan sample adalah dengan penambahan masing-masing 7 mL larutan NaCl 0,9%.

4. Evaluasi

Rumus untuk perhitungan kadar glukosa darah adalah:

$$\text{Kadar glukosa darah} = \frac{\Delta A_t}{\Delta A_s} \times \text{konsentrasi standard (mg/dL)}$$

Dimana A_t = serapan larutan uji

A_s = serapan larutan baku (larutan glukosa standard)

Konsentrasi standard = 100 mg/dL

Penurunan kadar glukosa darah pada masing-masing kelompok uji diketahui dengan membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil dari kelompok kontrol positif. Semua data dimuat dalam tabel induk (master table) dan dievaluasi secara statistik dengan Analisis variansi (ANOVA), dan Uji-t.

Rumus Analisis Variansi (ANOVA) (John T. Roscoe, 1975: 296-298)

$$F = \frac{MS_b}{MS_w} \quad \text{dimana } df = k - 1, N - k$$

$$MS_w$$

$$SS_b = \sum T_j^2 \frac{T_j^2}{n_j} - \frac{T^2}{N}$$

$$SS_w = \sum \sum X_{ij}^2 - \sum T_j^2 \frac{T_j^2}{n_j}$$

$$SS_t = \sum \sum X_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$$

Dimana SS_b = Jumlah kuadrat antar kelompok

SS_w = Jumlah kuadrat dalam

T = total

SS_t = Jumlah kuadrat total

Rumus untuk Uji-t (John T. Roscoe, hal.219)

$$t = \frac{M_1 - M_2}{S_{M_1 - M_2}} \quad \text{dengan } S_{M_1 - M_2} = \sqrt{\frac{SS_1 - SS_2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

Rumus t-test for two related samples (Roscoe, 1975: 227)

$$t = \frac{\bar{D}}{S_{\bar{D}}} \quad \text{dimana } \bar{D} = M_2 - M_1 \quad \text{dan } D = X_2 - X_1$$

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. PEMERIKSAAN PENDAHULUAN

Kromatogram kromatografi kertas dua arah hasil analisis pendahuluan flavonoid kasar (crude flavonoid) fraksi etil asetat, memberikan tiga noda (Lampiran 3). Data kromatogram seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data kromatogram KKt-2A Flavonoid kasar fraksi etil asetat

Noda No.	Warna bercak Dengan sinar UV	Warna bercak dengan UV/NH ₃	Warna bercak Dengan larutan AlCl ₃
1	Lembayung gelap	Lembayung gelap	Kuning
2	Lembayung gelap	Lembayung gelap	Kuning
3	Lembayung gelap	Lembayung gelap	Kuning

Data di atas menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mengandung tiga senyawa flavonoid. Kalau kita perhatikan letak noda pada kromatogram, dan dibandingkan dengan gambar kromatogram KKt-2A (Lampiran 1), dapat kita katakan bahwa flavonoid kasar fraksi etil asetat mengandung flavon termetilasi (noda 1), aglikon flavon / flavonol (noda 2), dan flavon monoglikosida (noda 3). Karena semuanya berwarna kuning dengan penampak noda larutan aluminium klorida, berarti ketiga jenis flavonoid tersebut menurut Markham (1988), adalah 5-hidroksi flavonoid yaitu mengandung gugus -OH pada C-5.

Hasil uji kemurnian senyawa flavonoid B dan E dengan pengembang BAA, HOAc 15%, dan Forestal masing-masing hanya memberikan satu noda, diduga kedua senyawa telah murni. Flavonoid B (93 mg = 0,23%) berbentuk amorf warna kuning, dan flavonoid E (52 mg = 0,006%) berbentuk amorf warna kuning muda (Persentase dihitung dari berat kering sampel). Flavonoid B meleleh pada 264,5 - 265^oC, dan flavonoid E pada 225,2 - 225,6^oC.

Flavonoid B berdasarkan letak noda pada kromatogram KKt-2A (Lampiran 4) menunjukkan bahwa senyawa ini tergolong aglikon flavon/flavonol, sedangkan flavonoid E berdasarkan letak noda pada KKt-2A nya (Lampiran 5) tergolong monoglikosida flavon / flavonol.

Data KKt-1A flavonoid B berwarna lembayung gelap dibawah sinar UV, tetap lembayung gelap dengan UV/NH₃, berwarna kuning dengan larutan AlCl₃, nilai R_f BAA 0,85 dan HOAc 15% 0,16, sedangkan flavonoid E berwarna lembayung gelap dibawah sinar UV, juga lembayung gelap dengan sinar UV/NH₃, dan kuning dengan AlCl₃, memberikan nilai R_f BAA 0,54 dan HOAc 15% 0,35. Flavonoid hasil hidrolisis dari flavonoid E, berwarna lembayung gelap dengan sinar UV, lembayung gelap pada UV/NH₃, dan kuning dengan larutan AlCl₃, memberikan harga R_f BAA 0,82 dan HOAc 15% 0,17. Nilai R_f dan warna noda flavonoid hasil hidrolisis, bersesuaian dengan nilai R_f dan warna noda flavonoid B.

Flavonoid E setelah dihidrolisis, ternyata memberikan nilai R_f yang lebih kecil (0,18) dibandingkan dengan tanpa hidrolisis (0,35) dengan HOAc 15%. Ini menunjukkan bahwa flavonoid B memang suatu O-glikosida.

Pengujian dengan beberapa pereaksi warna adalah bahwa kedua flavonoid, baik flavonoid B maupun flavonoid E, berwarna kuning dengan larutan NaOH 10%, kuning dengan H₂SO₄ pekat, dan juga kuning dengan Mg/HCl. Kalau kita bandingkan dengan data menurut I.L. Finar (Tabel 1), ini menunjukkan bahwa kedua flavonoid termasuk klas flavon.

Jadi berdasarkan semua hasil uji pendahuluan, dapat dikatakan bahwa senyawa flavonoid B adalah suatu aglikon flavon yang mengandung -OH bebas pada C-5, sedangkan flavonoid E adalah suatu O-monoglikosida flavon yang mengandung -OH bebas pada C-5.

B. IDENTIFIKASI STRUKTUR

Dengan merujuk kepada serapan inframerah gugus-gugus fungsi yang dikemukakan oleh Pavia, et al (1988), diketahui bahwa flavonoid B memiliki gugus fungsi utama OH pada 3300 cm⁻¹, =C-H aromatik pada 2950 cm⁻¹, C=O keton pada 1600 cm⁻¹, dan C=C aromatik pada 1520 cm⁻¹.

Flavonoid E memiliki gugus-gugus fungsi utama OH pada 3250 cm^{-1} , =C-H aromatik pada 2850 cm^{-1} , dan C=O keton pada 1620 cm^{-1} (Lampiran 6).

Spektrum ultraviolet (UV) senyawa-senyawa flavonoid ditafsirkan dengan berpedoman kepada cara analisis spektrum UV menurut Markham (1988).

Spektrum UV flavonoid B (Lampiran 7) dalam metanol memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 277 nm (pita II) dan 323 nm (pita I). Angka ini terletak dalam range panjang gelombang flavon. Penambahan larutan NaOMe menyebabkan timbulnya pita baru pada 300 nm, berarti ada 7-OH pada cincin A. Penambahan larutan AlCl_3 menyebabkan pergeseran batokromik pita I 50 nm, dan setelah penambahan larutan HCl terjadi pergeseran batokromik 23 nm terhadap spektrum MeOH. Ini menunjukkan adanya orto-di-OH pada cincin A, dan juga ada 5-OH dan oksigenasi pada posisi-6. Penambahan NaOAc menyebabkan pergeseran 5,4 nm pita II, dan dengan penambahan H_3BO_3 terjadi pergeseran batokromik pita I 21 nm, menunjukkan adanya 7-OH dan orto-di-OH pada cincin A (posisi 6,7). Dari semua data tersebut dapat diketahui bahwa flavonoid B adalah flavon yang mempunyai gugus-gugus -OH pada posisi 5,6, dan 7 yaitu aglikon flavon dengan nama 5,6,7-trihidroksiflavon (baikalein) (12). Spektrum ultraviolet flavonoid B ini ternyata juga bersesuaian dengan spektrum ultraviolet baikalein yang dikemukakan oleh Mabry, et al (1970: 77).

Pola spektrum ultraviolet flavonoid hasil hidrolisis dari flavonoid E, dalam metanol (Lampiran 8) bersesuaian pula dengan spektrum flavonoid B, walaupun terdapat perbedaan puncak serapan beberapa nanometer yang mungkin disebabkan kurang murnian flavonoid hasil hidrolisis. Hal ini berarti bahwa sebagai aglikon dari flavonoid E adalah baikalein.

Gula hasil hidrolisis dari flavonoid E, di ko-kromatografi bersamaan dengan gula-gula pembanding ksilosa, arabinosa, glukosa, dan galaktosa dengan pengembang BAA. Data kromatogram Kkt dari gula dapat dilihat pada Tabel 3.

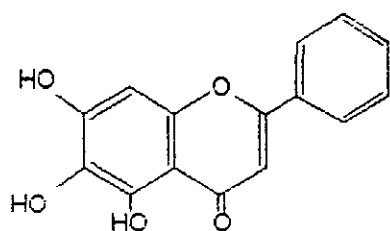
Tabel 3. Data kromatogram gula-gula dengan pengembang BAA

Gula	Warna noda	Nilai R_f
Ksilosa	Coklat kehitaman	0,07
Hasil hidrolisis	Coklat kehitaman	0,11
Glukosa	Coklat kehitaman	0,11
Galaktosa	Coklat kehitaman	0,09

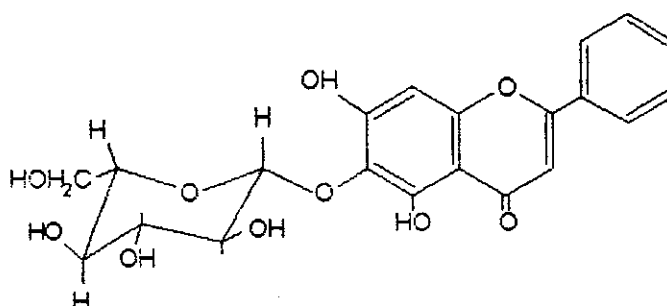
Arabinosa	Lembayung tua	0,15
-----------	---------------	------

Dari data pada tabel 2 dapat diketahui bahwa gula hasil hidrolisis flavonoid E adalah glukosa.

Untuk menentukan posisi molekul gula, dilakukan analisis spektrum UV flavonoid E. Spektrum UV flavonoid E dalam metanol (Lampiran 9), memberikan puncak serapan maksimum pada 280 nm (pita II) dan 313 nm (pita I), ini berarti bahwa flavonoid E adalah suatu senyawa flavon. Penambahan larutan NaOMe menunjukkan terbentuknya pita baru pada kira-kira 310 nm, berarti ada 7-OH. Penambahan larutan AlCl₃ dan HCl menghasilkan puncak serapan pita II maupun pita I seakan-akan berhimpit (masing-masing berturut-turut 291 nm, 292 dan 339, 337 nm), hal ini berarti tidak ada orto-di-OH pada cincin A maupun cincin B. Pergeseran pita II terhadap spektrum MeOH baik oleh penambahan AlCl₃ dan AlCl₃/HCl adalah batokromik 12 nm, menunjukkan ada -OH pada posisi-5 disamping gugus karbonil. Penambahan NaOAc terjadi pergeseran batokromik hanya 5 nm, dan setelah penambahan H₃BO₃ pergeseran hanya kira-kira 10 nm, berarti ada 7-OH, oksigenasi pada 6 atau 8, dan tidak ada orto-di-OH pada cincin A. Jadi hasil analisis menunjukkan bahwa senyawa flavonoid E adalah suatu flavon, mempunyai gugus-gugus hidroksil pada posisi 5, 7, dan oksigenasi pada posisi 6 atau 8. Sedangkan hasil hidrolisis menunjukkan aglikon adalah baikalein, dan molekul gula adalah glukosa, maka kedudukan molekul gula adalah pada posisi-6, dengan demikian **flavonoid E adalah baikalin-6-glukosida (13)**.



(12)



(13)

C. UJI ANTIDIABETES

1. Tabel Induk

Tabel induk (Master Table) untuk kadar glukosa darah keempat kelompok hewan percobaan untuk darah awal (T_0), setelah diberi insulin (zat pembanding), zat uji-1 (Flavonoid murni B), dan zat uji-2 (Flavonoid kasar fraksi etil asetat), dimana kelompok kontrol hanya diberi vehikulum (T_1), dan kadar glukosa darah segera setelah pemberian glukosa 50% (T_2), dan setelah 90, 120, dan 150 menit setelah pemberian larutan glukosa 50% masing-masing berturut-turut T_3 , T_4 dan T_5 , dapat dilihat pada Tabel 4 (Lampiran 10).

2. Pengujian pengaruh vehikulum (zat pembawa obat) terhadap kadar glukosa darah.

Hasil pengujian dengan menggunakan rumus *t-test for two related samples* (Lampiran 11) menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh pemberian vehikulum (zat pembawa) terhadap kadar glukosa darah hewan percobaan pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

3. Pengujian homogenitas kadar glukosa darah awal keempat kelompok hewan percobaan dengan Analisis Varian (ANOVA) (Lampiran 12).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang berarti kadar gula darah awal pada keempat kelompok hewan percobaan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

4. Pengujian penurunan kadar glukosa darah keempat kelompok hewan percobaan setelah pemberian insulin (zat pembanding), obat uji-1, obat uji-2, dan tanpa pemberian obat (kontrol) dengan Analisis Varian (Lampiran 13).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat berarti pada penurunan kadar glukosa darah akibat pemberian obat uji maupun insulin, terhadap kelompok kontrol positif. Dari nilai rata-rata penurunan, dapat diketahui bahwa daya penurunan zat uji-1 (Flavonoid B) lebih tinggi dari zat uji-2 (Fraksi etil asetat).

5. Pengujian penurunan kadar glukosa darah keempat kelompok hewan percobaan akibat pemberian obat uji dan insulin terhadap waktu penentuan, setelah pemberian glukosa 50%, dengan Analisis Varian (Lampiran 14).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang berarti terhadap penurunan kadar glukosa darah akibat pemberian obat uji dan pembanding setelah dinduksi glukosa berdasarkan waktu penentuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Dengan perkataan lain bahwa penurunan kadar glukosa darah akibat pemberian obat uji dan insulin, bertambah dengan bertambahnya waktu.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Buah bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz.) mengandung dua senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat, yaitu Flavonoid B dengan nama 5,6,7-trihidroksiflavin (Baikalein) berbentuk amorf berwarna kuning, titik leleh 264,5 - 265^oC, dan Flavonoid E dengan nama baikalein 6-glukosida berbentuk amorf, berwarna kuning muda dibandingkan baikalein, dan titik leleh 225,2 - 225,6^oC.

Baikalein dan Flavonoid kasar fraksi etil asetat dengan dosis 100 mg/kg berat badan tikus, mempunyai aktivitas antidiabetes. Penurunan kadar glukosa darah bertambah dengan bertambah lamanya waktu penentuan.

B. SARAN

Karena peneliti belum berhasil mengisolasi flavonoid dari fraksi n-butanol, disarankan supaya penelitian ini dapat dilanjutkan untuk mencari adsorbent dan eluen yang tepat untuk mengisolasi flavonoid dari fraksi n-butanol tersebut dan mengelucidasi strukturnya, serta melakukan uji farmakologinya.

Karena Baikalein mempunyai aktivitas antidiabetes, disarankan supaya penelitian ini dapat dilanjutkan untuk mencari metoda isolasi dalam skala besar.

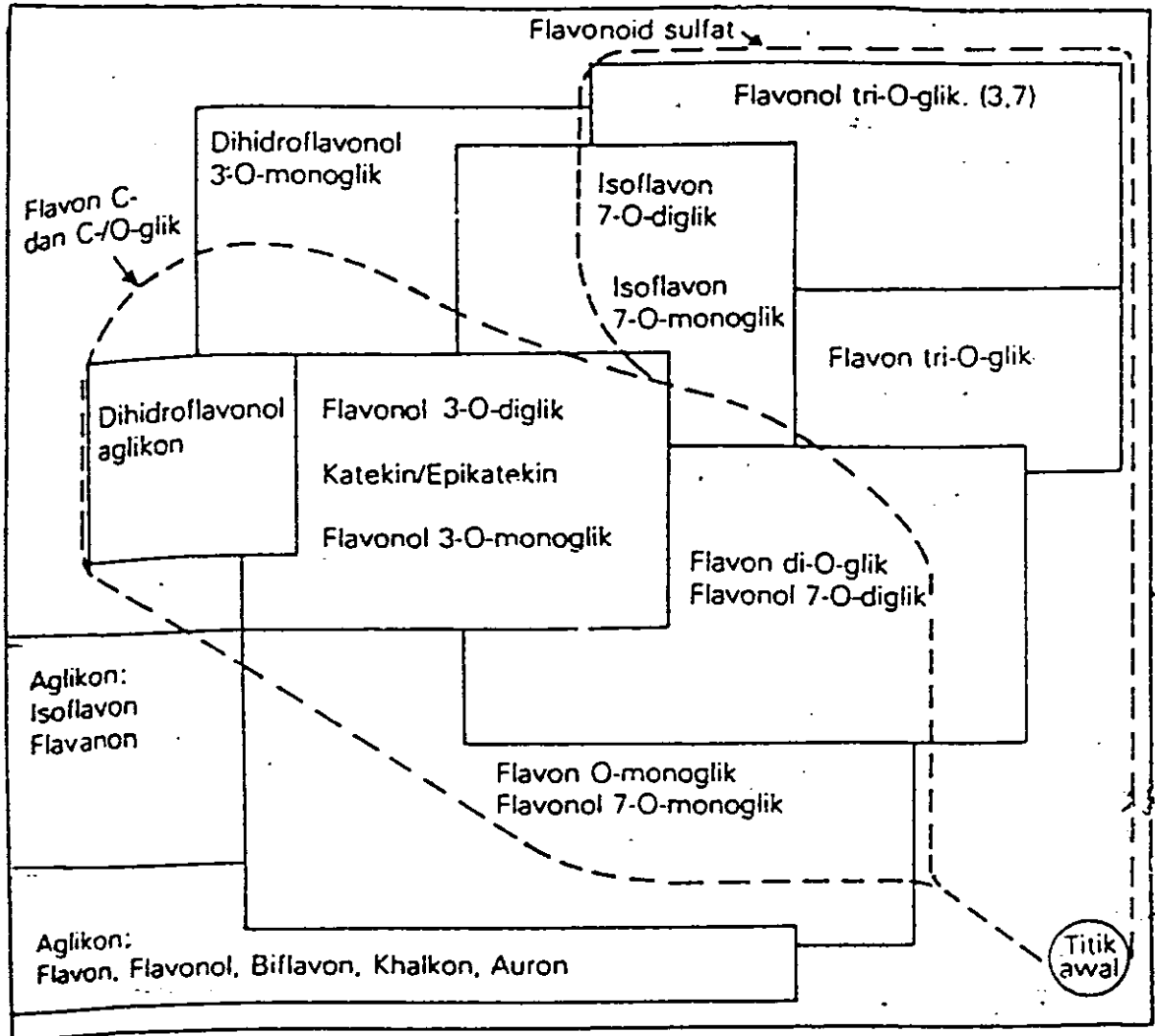
DAFTAR PUSTAKA

- Alfikri. (1990). Isolasi Flavonoid dari Daun Bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz. Tesis. Universitas Andalas. Padang.
- Brown, R.F. (1975). Organic Chemistry. Wodworth Publishing Company Inc. Belmont California
- Corner and Watanabe. (1965). Collection of Tropical Plants. Kyoto-Japan.
- Cody, J, et al. (1988). Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Djamal, Rusjdi. (1995). Pemanfaatan Tumbuhan Sebagai Obat, Penggalian dan Tantangan di Masa Depan. Universitas Andalas. Padang.
- Finar, I.L. (1976). Organic Chemistry. Stereochemistry and Natural Products. Volume Two. Fiftt Edition. The English Language Society and Longman Group Limited. London.
- Ganiswara S.G. (1995). Farmakologi dan Terapi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Harborne, J.B. (1994). The Flavonoids. Advances in Research Since 1986. Chapman and Hall. London.
- Harborne, J.B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press. London and New York.
- Harborne, J.B. (1987). Phytochemical Methods, A Guide to modern Techniques of Plant Analysis, Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Terbitan kedua. Penerbit ITB. Bandung.
- Harun, Sjahriar. (1992). Peningkatan Peranan Bahan baku Obat Indonesia Dalam Industri Farmasi di Indonesia. Universitas Andalas. Padang.
- Mabry, T.J. Markham, K.R, and Thomas, M.B. (1970). The Systematic Identification of Flavonoid, Springer-Verlag. New York.
- Markham, K.R. (1988). Techniques of Flavonoid Identification. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
- Mayes, Peter A. et al. (1987). Biokimia Harper. Edisi 20. Alih bahasa Iyan Darmawan. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Mutschler, Ernst. (1991). Dinamika Obat. Penerbit ITB. Bandung.

- Madesi, Yeri. (1998). Isolasi Flavonoid Kasar dari Buah Bolai (*Oroxylum indicum* (L) Kurz). Skripsi. IKIP Padang. Padang.
- Manjang, Yunazar. (1992). Penentuan Struktur Terpenoid dalam *Alstonia spatulata* BLUME yang Diduga Berkhasiat Sebagai Antidiabetes. Disertasi. ITB Bandung.
- Noerdin, Dasli. (1985). Elusidasi Struktur Senyawa Organik dengan cara Spektroskopi Ultralembayung dan Inframerah. Penerbit Angkasa Bandung. Bandung.
- Pavia, D.L, Lampman, G.M, and Kriz, G.S. (1998). Introduction to Organic Laboratory Techniques. Third Edition. Saunders Golden Sunburst Series. New York.
- Roscoe, John T. (1975). Fundamental Research Statistics for the Behavioral Sciences Second Edition. Holt Rinehart and Winston, Inc. New York.
- Soeparman, dkk (1987). Ilmu Penyakit Dalam . Balai Penerbit FKUL Jakarta.
- Syafril, D. (1993). Metoda Identifikasi Tumbuh-tumbuhan dalam Survey Fitokimia. FMIPA. UNRI. Pekanbaru.
- Wattimena, J.R. (1993). Penapisan farmakologi, Pengujian Fitokimia dan pengujian Klinik. Pengembangan dan pemanfaatan Obat Bahan Alam.
- Wirahadikusumah, Muhammad. (1985). Biokimia: Metabolisme energi, Karbohidrat, dan Lipid. Penerbit ITB. Bandung.

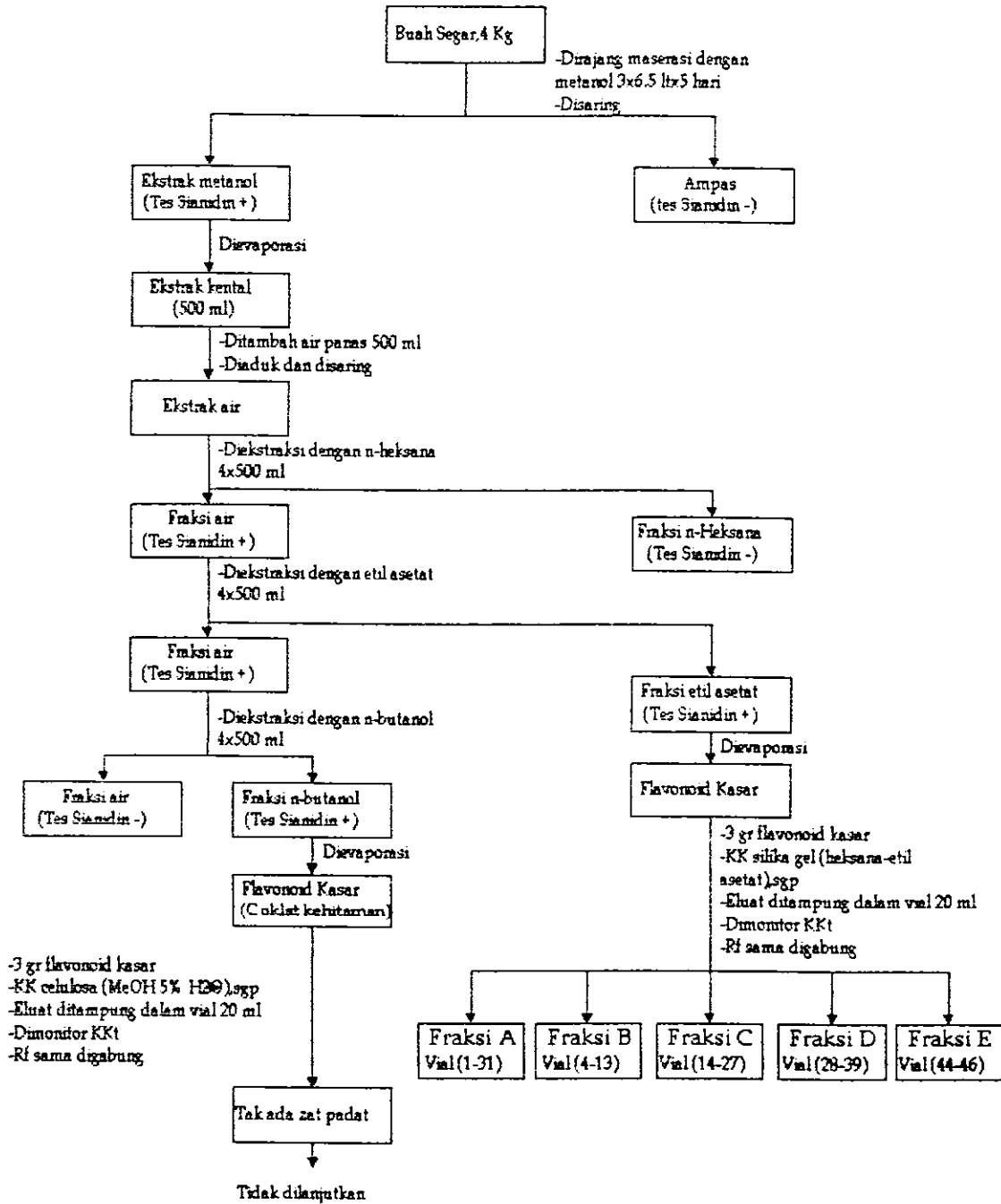
Lampiran 1

Distribusi flavonoid pada kromatogram kromatografi kertas dua arah dengan pengembang TBA/HOAc 15 % (Markham, 1988 dan Mabry *et al*, 1970)

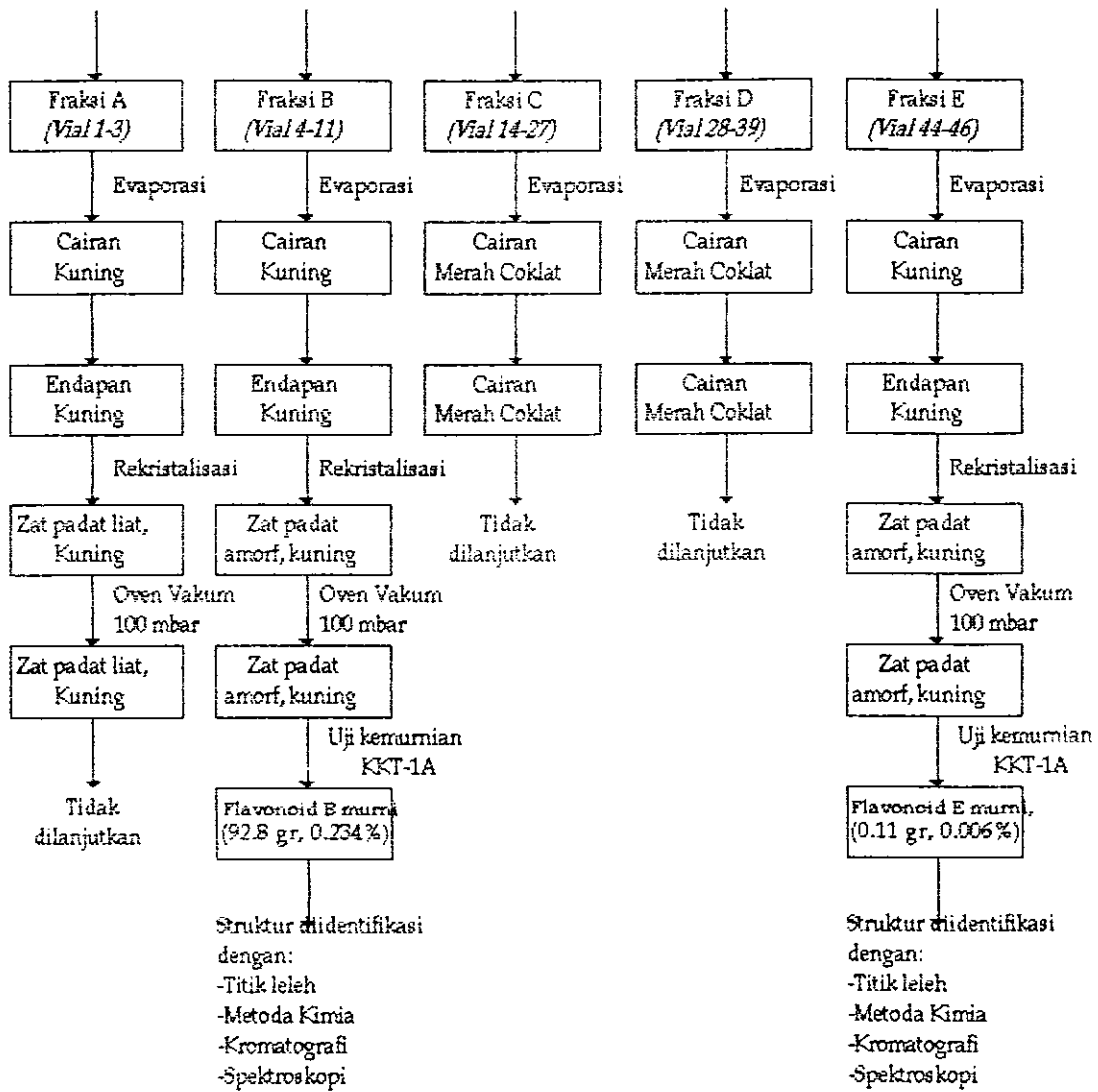


Lampiran 2

Diagram kerja isolasi flavonoid dari buah belai (*Oryxylum indicum* (L).Kurx)

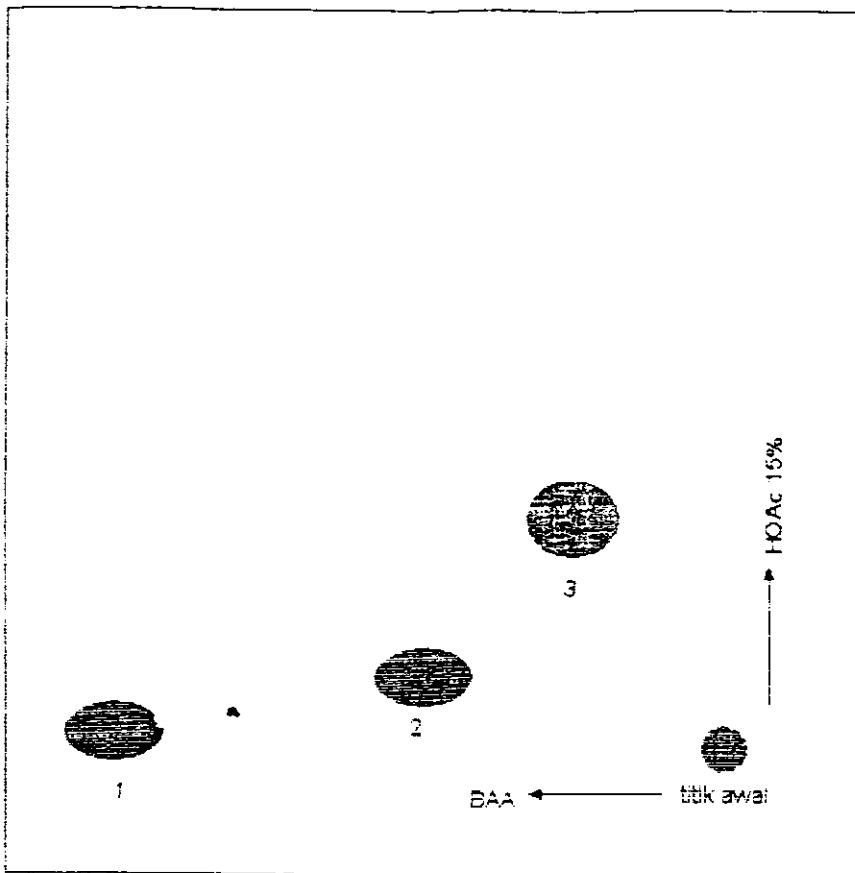


Lampiran 2 (lanjutan)



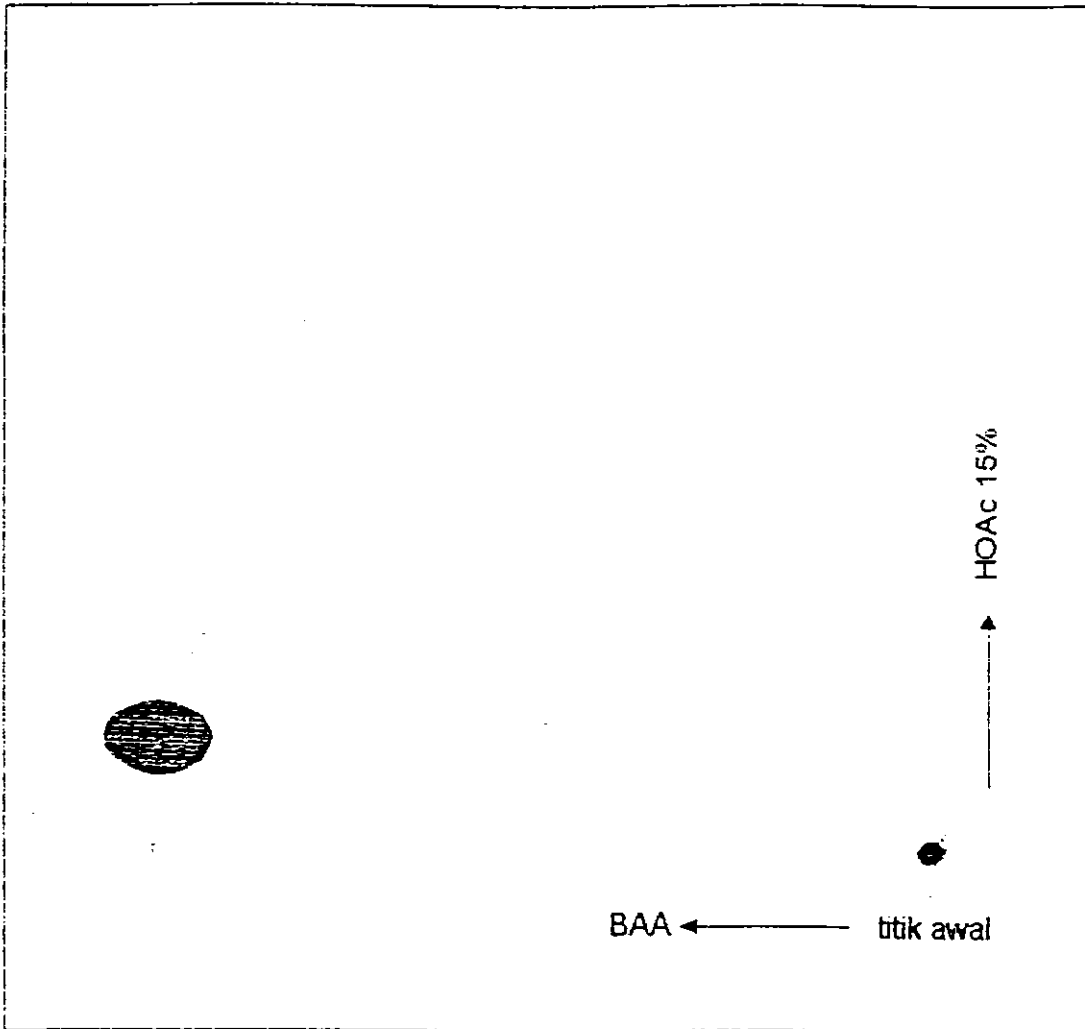
Lampiran 3

Kromatogram kromatografi kertas dua arah fraksi etil asetat



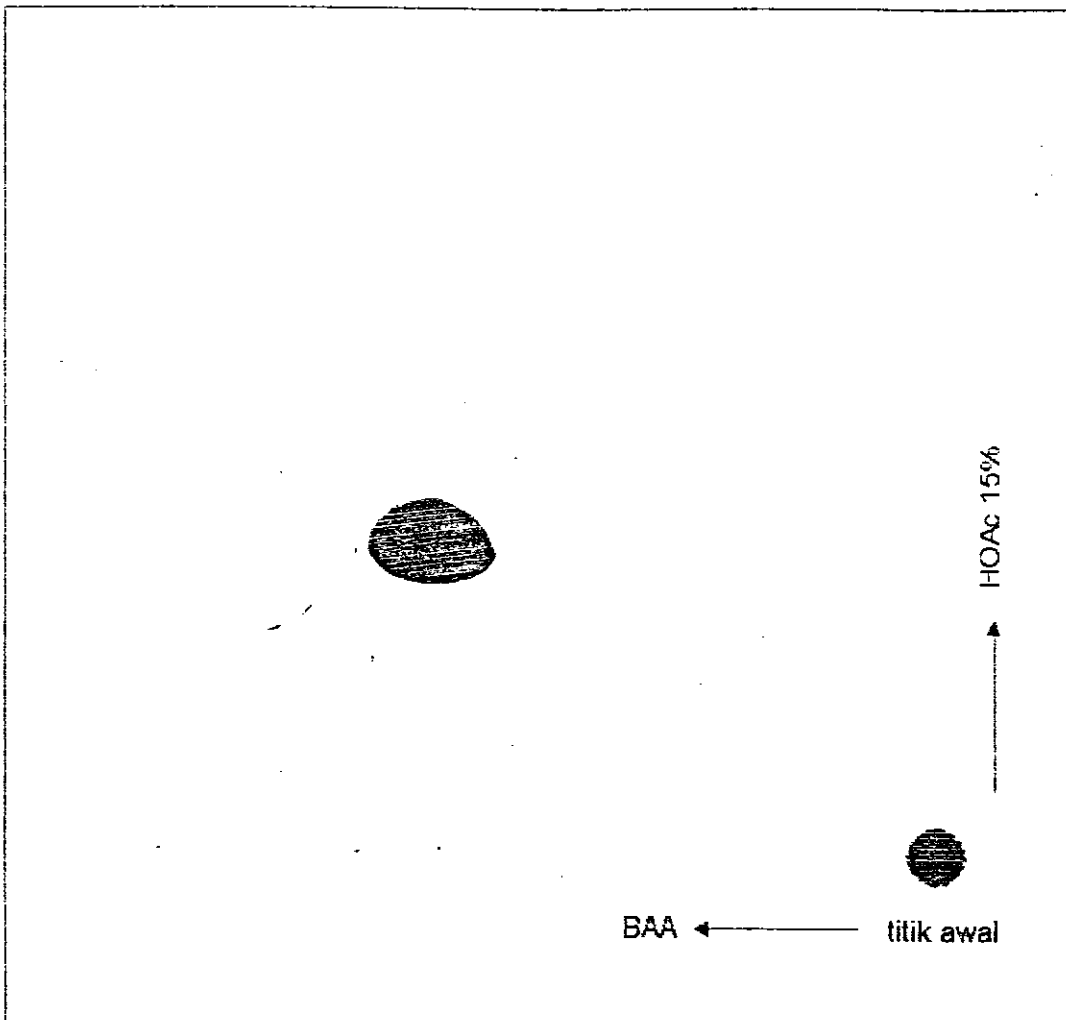
Lampiran .4

Kromatogram kromatografi kertas dua arah flavonoid B



Lampiran 5

Kromatogram kromatografi kertas dua arah flavonoid E



Lampiran 6.

Spektrum Inframerah Flavonoid B dan E

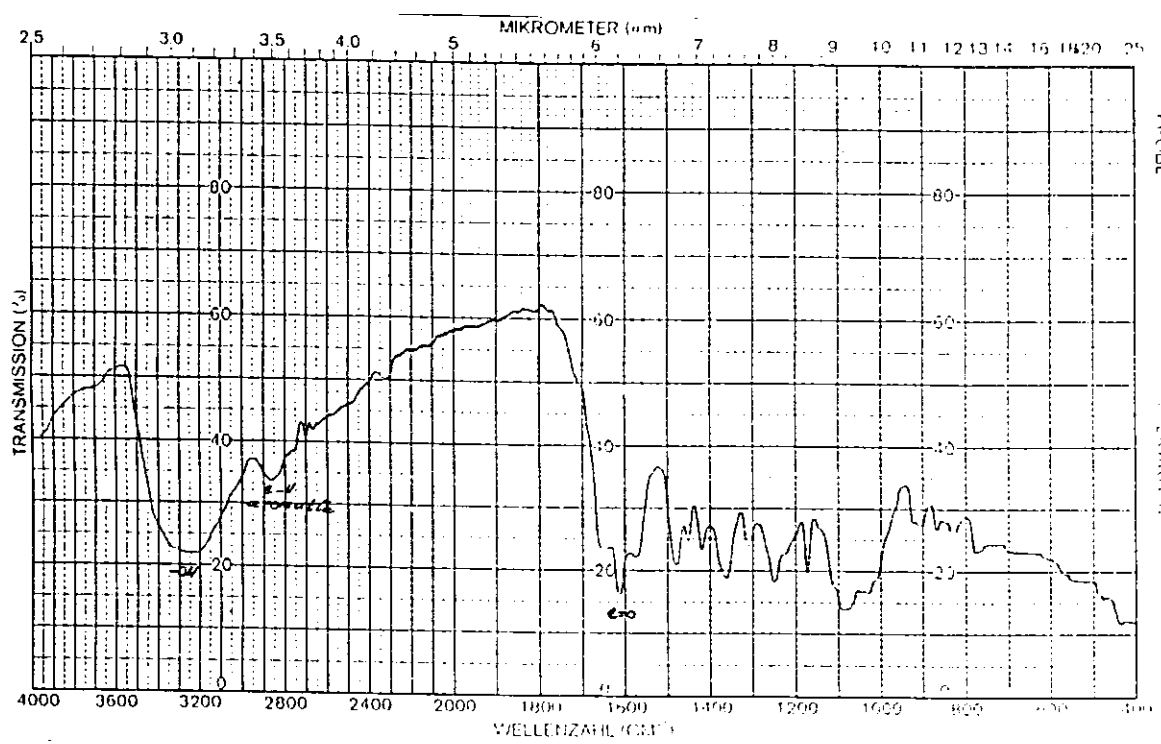
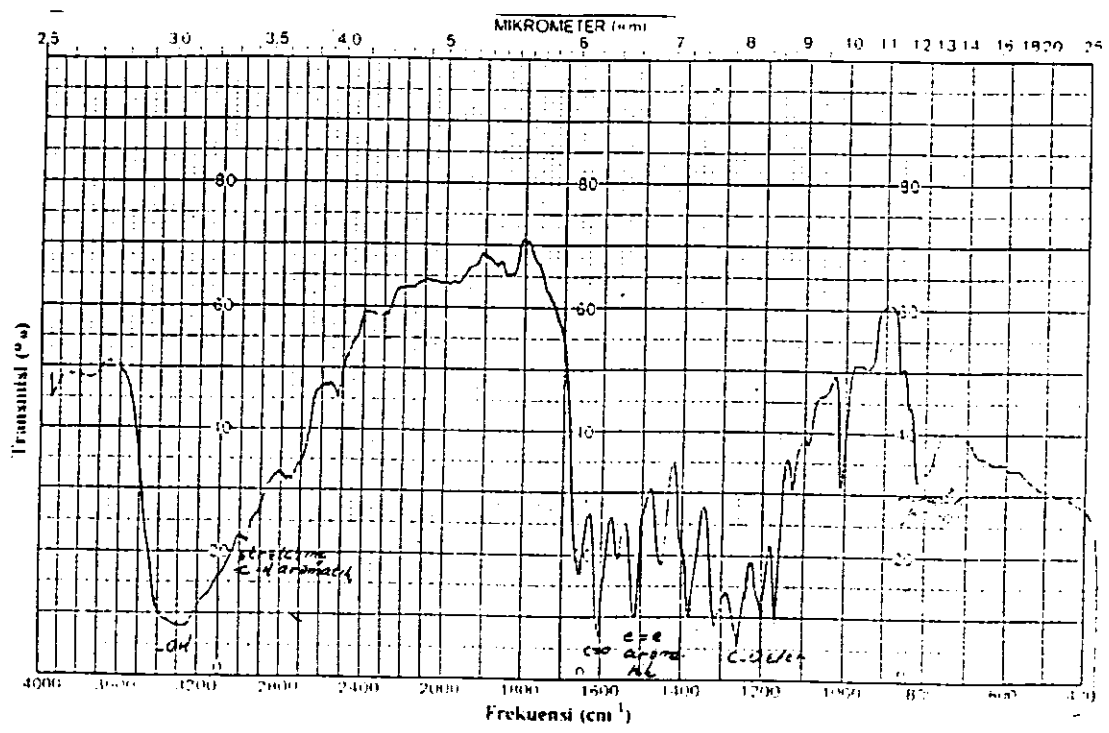
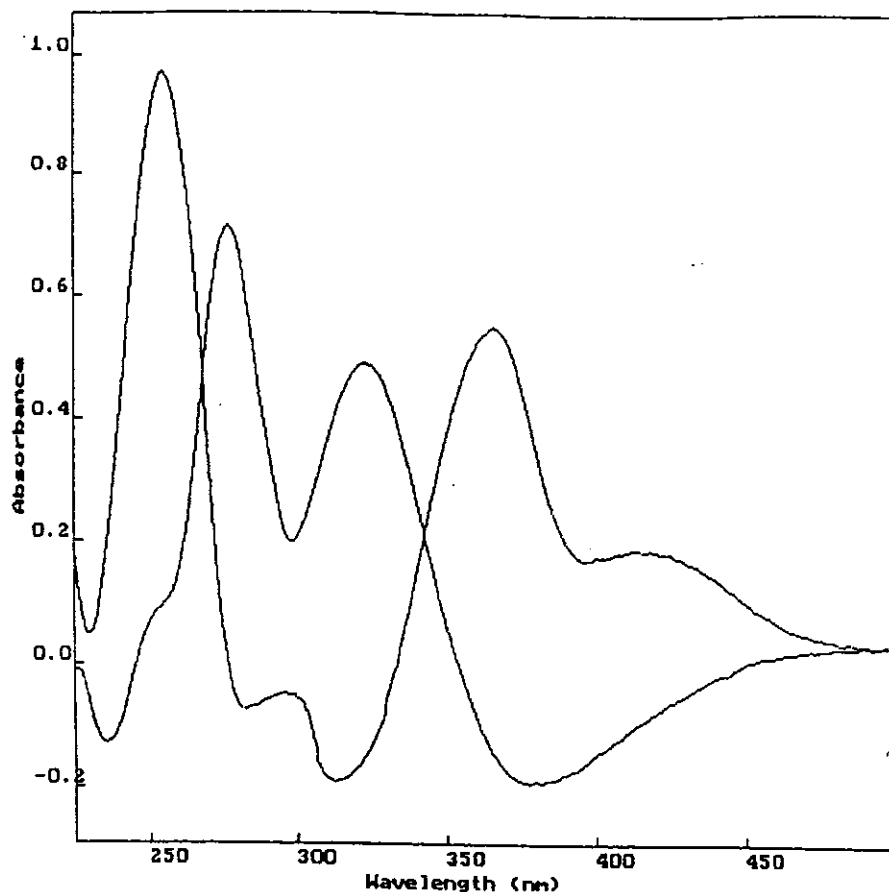
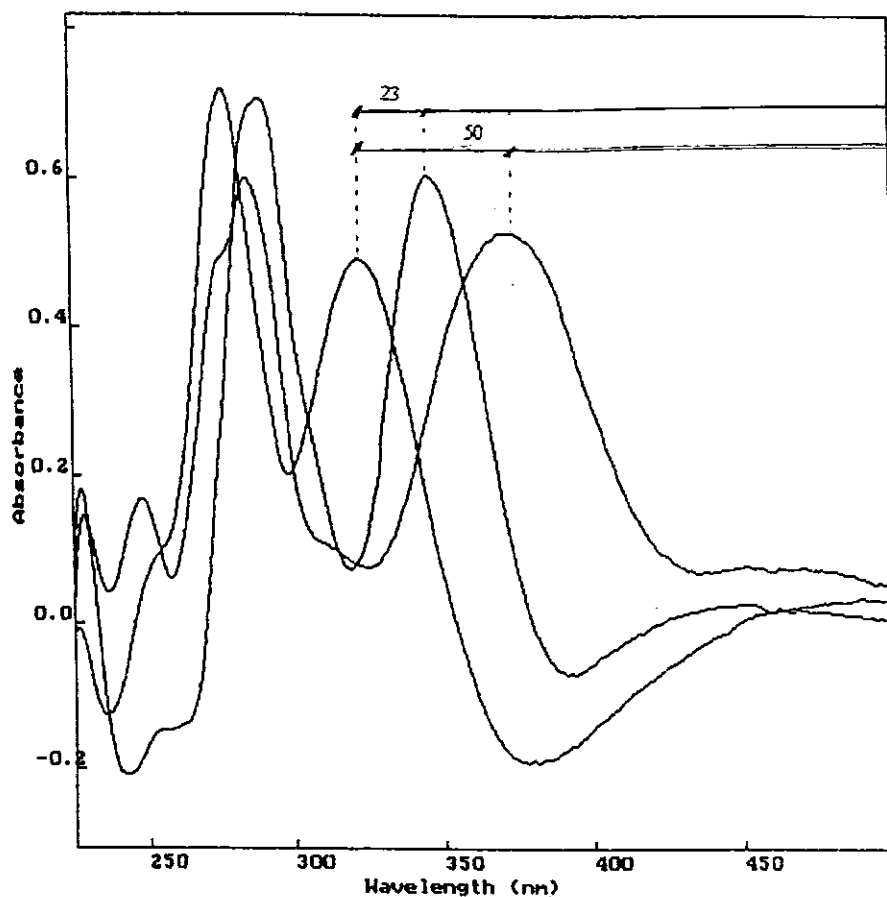


FIGURE 10
SPEKTRUM IR



Peaks of SP13 MeOH
 276.9 Abs = 0.718
 322.5 Abs = 0.493

Peaks of SP14 MeOH + NaOMe
 254.9 Abs = 0.969
 287.9 Abs = -0.051
 366.1 Abs = 0.551
 413.2 Abs = 0.189



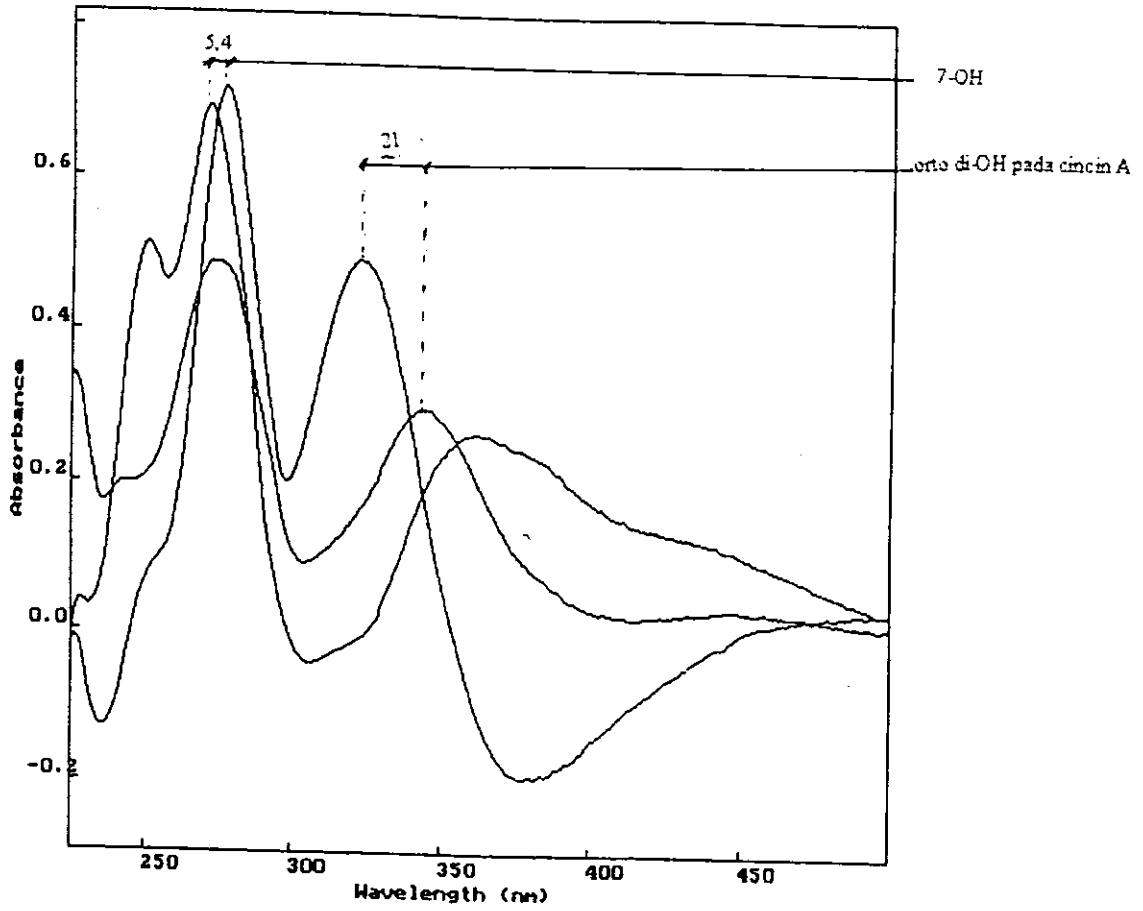
5-OH dengan oksigenasi pada C-6
 orto di-OH pada cincin A

Peaks of SP13 MeOH
 276.9 Abs = 0.718
 322.5 Abs = 0.493

Peaks of SP15 MeOH + AlCl₃
 229.2 Abs = 0.147
 243.1 Abs = 0.170
 295.1 Abs = 0.500
 372.4 Abs = 0.529
 451.3 Abs = 0.079

Peaks of SP15 MeOH + AlCl₃ + HCl
 227.3 Abs = 0.132
 290.3 Abs = 0.705
 345.1 Abs = 0.504
 453.5 Abs = 0.027

Lampiran 7 (Lanjutan)



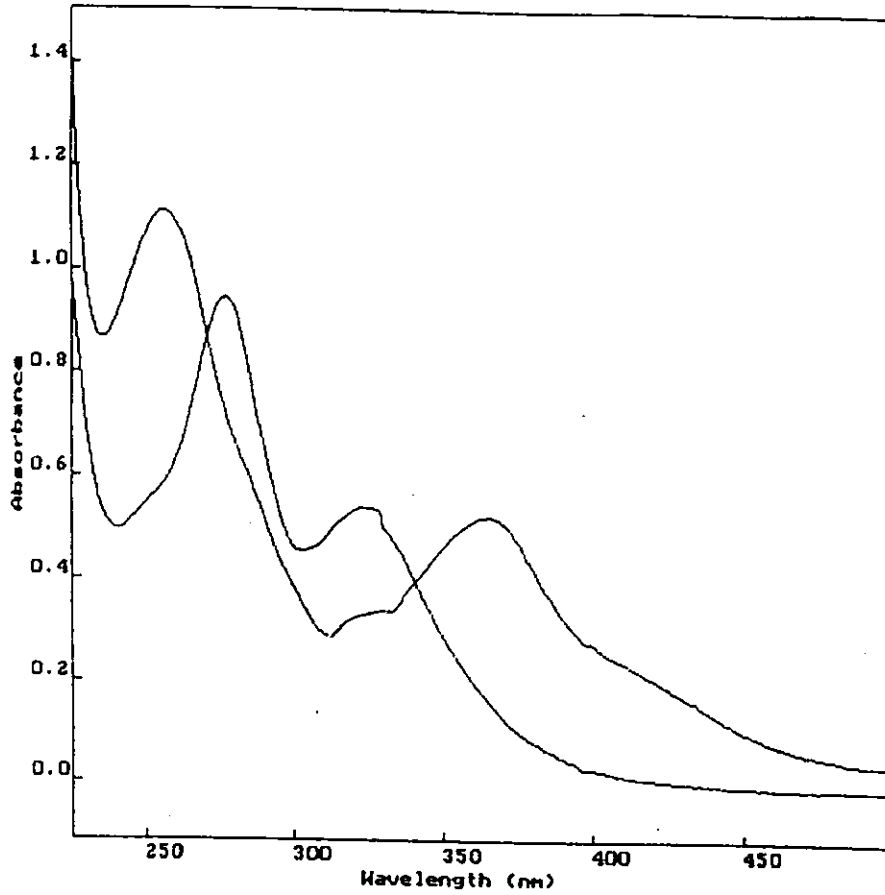
Peaks of SP13 MeOH
 276.9 Abs = 0.718
 322.5 Abs = 0.493

Peaks of SP17 MeOH + NaOAc
 250.8 Abs = 0.511
 271.5 Abs = 0.594
 362.0 Abs = 0.257

Peaks of SP19 MeOH + NaOAc + H₃BO₃
 274.3 Abs = 0.488
 343.5 Abs = 0.293
 447.4 Abs = 0.033

Lampiran 8 :

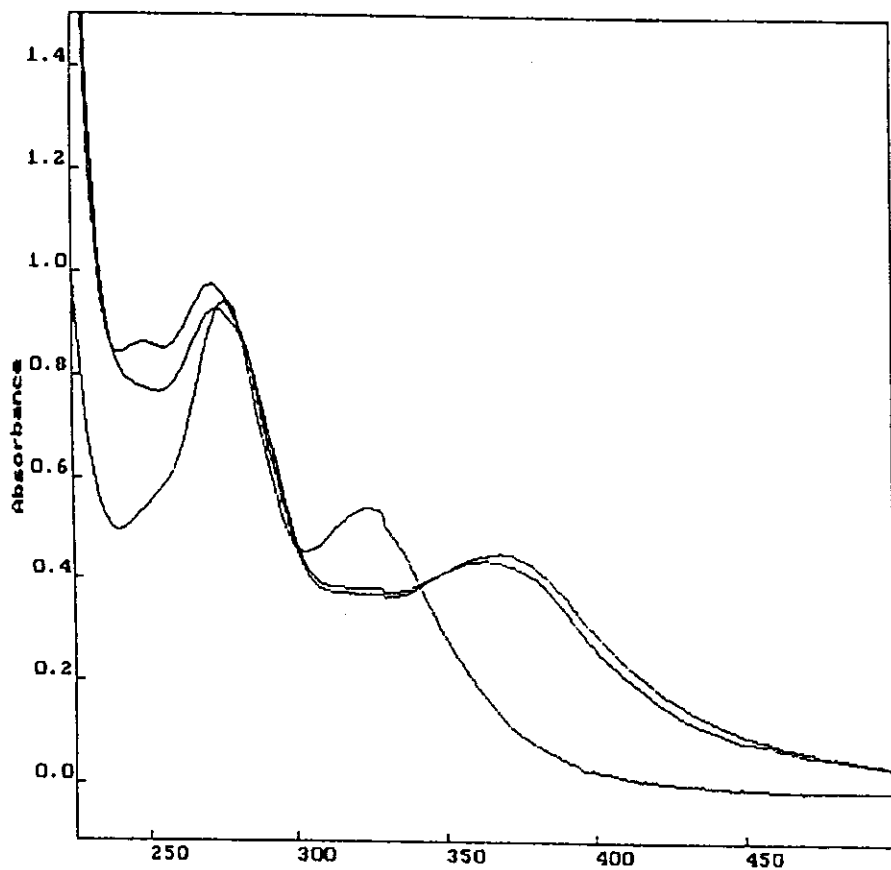
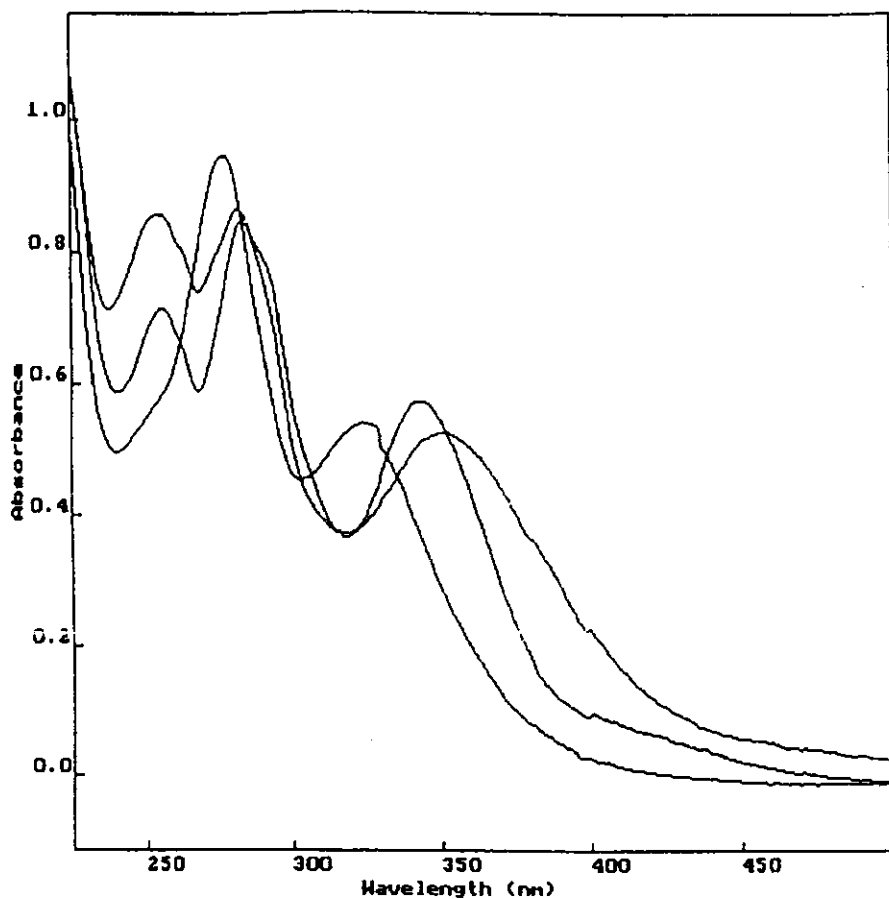
.Spektrum UV Flavonoid Hasil Hidrolisis



Peaks of SP3 MeOH :
277.3 Abs = 0.944
324.0 Abs = 0.540

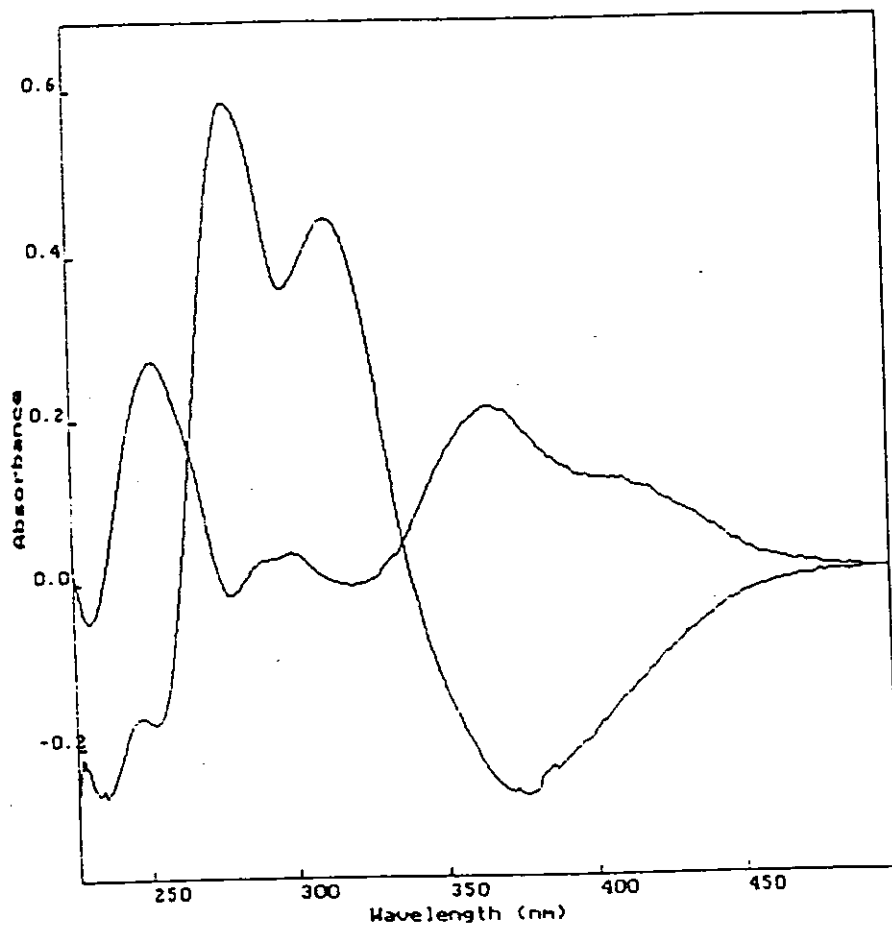
Peaks of SP5 MeOH + NaOMe
256.8 Abs = 1.112
355.3 Abs = 0.523

Lampiran 8 (Lanjutan)



Lampiran 9

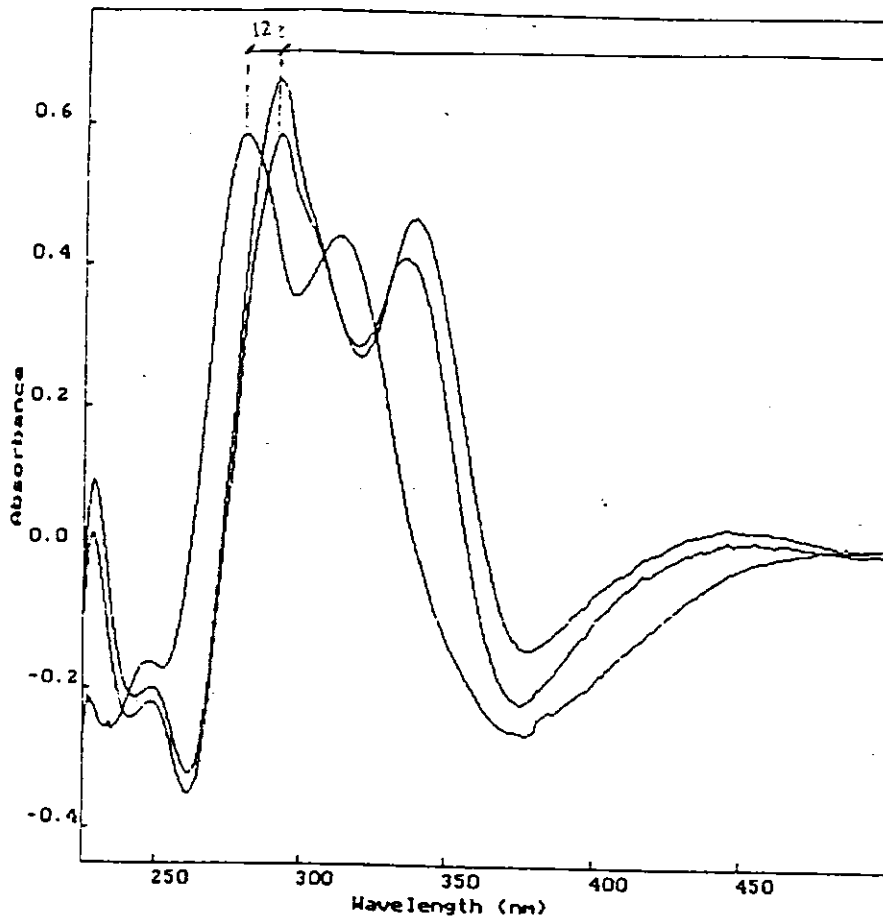
Spektrum ultraviolet flavonoid E



Peaks of SP22 MeOH
226.9 Abs = -0.209
280.1 Abs = 0.583
313.2 Abs = 0.441

Peaks of SP25 MeOH + NaOMe
252.9 Abs = 0.272
299.9 Abs = 0.036
365.9 Abs = 0.214

Lampiran 9 (Lanjutan)

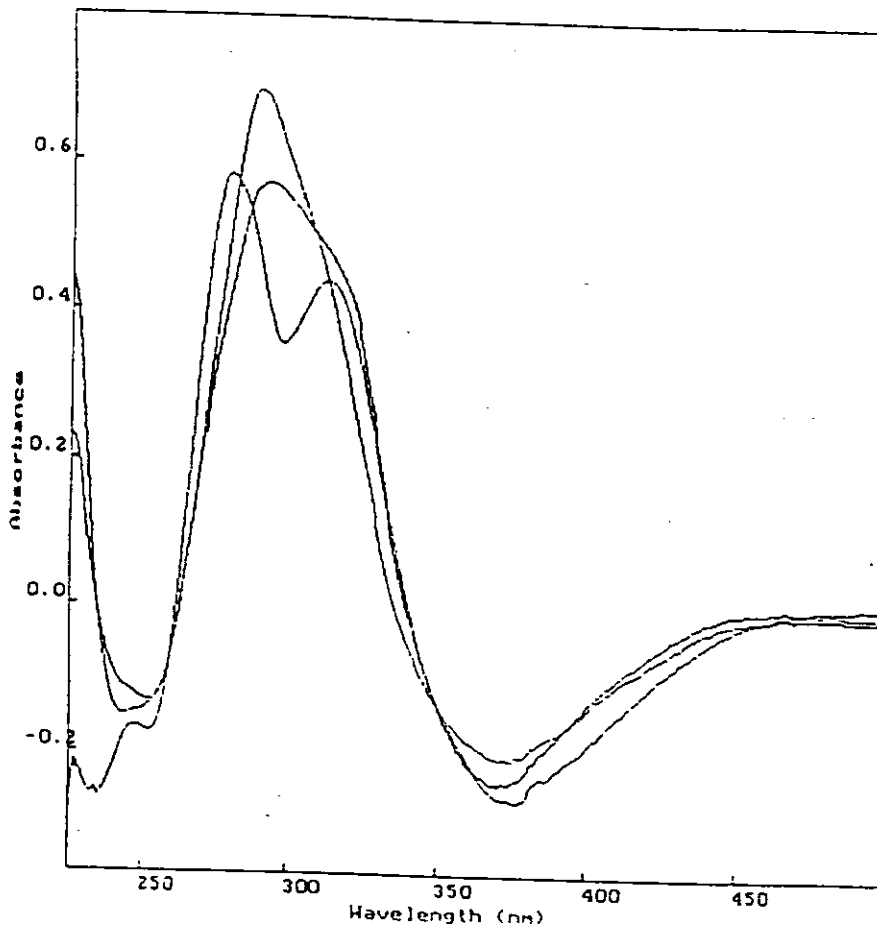


ada OH pada C-5

Peaks of SP22 MeOH	
226.9	Abs = -0.209
280.1	Abs = 0.583
313.2	Abs = 0.441

Peaks of SP25 MeOH + AlCl ₃	
233.4	Abs = 0.094
248.7	Abs = -0.200
291.3	Abs = 0.661
337.4	Abs = 0.468
412.6	Abs = 0.037

Peaks of SP27 MeOH + AlCl ₃ + HCl	
233.1	Abs = 0.021
248.5	Abs = -0.219
292.3	Abs = 0.582
335.5	Abs = 0.412
445.0	Abs = 0.018



Peaks of SP22 MeOH	
226.9	Abs = -0.209
280.1	Abs = 0.583
313.2	Abs = 0.441

Peaks of SP28 MeOH + NaOAc	
285.1	Abs = 0.383

Peaks of SP29 MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	
290.3	Abs = 0.696

Lampiran 10

Kadar Glukosa Darah Awal, dan Kadar Glukosa Darah Setelah Diberi Perlakuan
Untuk Keempat Kelompok Hewan Percobaan

Kelompok	K a d a r G l u k o s a D a r a h (m g / d L)									
	T ₀	T ₁	Penurunan-1	T ₂	T ₃ (90')	Penurunan-2	T ₄ (120')	Penurunan-3	T ₅ (150')	Penurunan-4
Kontrol (+)	42,65	42,65	0,00	54,48	52,59	1,89	51,60	2,88	50,70	3,78
	40,92	41,80	0,88	52,59	51,60	0,99	50,70	1,89	49,79	2,80
	44,38	45,26	0,88	57,40	54,48	2,92	53,12	4,28	52,59	4,81
	34,32	35,52	0,20	44,38	43,50	0,88	42,65	1,73	41,80	2,58
	44,38	45,26	0,88	55,46	53,12	2,34	52,59	2,87	51,60	3,86
Rata-rata	41,33	42,10	0,59	52,86	51,06	1,80	50,13	2,73	49,30	3,52
Pembeding	35,95	26,55	9,40	52,59	46,17	6,42	45,26	7,33	42,65	9,94
	34,32	25,08	9,24	54,48	43,50	10,98	42,65	11,83	41,80	12,68
	37,58	30,51	7,07	53,52	47,04	6,48	46,17	7,35	43,50	10,02
	44,38	32,71	11,67	54,52	50,70	3,82	46,17	8,35	44,38	10,14
	45,26	29,61	15,65	52,59	48,86	3,73	46,92	5,67	44,38	8,21
Rata-rata	39,50	28,89	10,61	53,54	47,25	6,29	45,43	8,11	42,83	10,20
Obat Uji - 1	37,58	33,51	4,07	51,60	46,17	5,43	42,65	8,95	41,80	9,80
	52,59	44,38	8,21	59,39	55,46	3,93	53,52	5,87	53,12	6,27
	59,39	50,70	8,69	66,64	63,48	3,16	60,40	6,24	60,40	6,24
	34,32	26,55	7,77	41,80	36,75	5,05	35,94	5,86	34,32	7,48
	58,41	46,92	11,49	66,64	61,41	5,23	60,40	6,24	59,39	7,25
Rata-rata	48,46	40,41	8,05	57,21	52,65	4,56	50,58	6,63	49,81	7,41
Obat Uji - 2	40,94	34,32	6,62	51,60	47,96	3,64	45,26	6,34	44,38	7,22
	40,94	37,78	3,16	52,59	47,04	5,55	44,38	8,21	43,50	9,09
	37,58	33,51	4,07	47,96	43,50	4,46	42,65	5,31	39,23	8,73
	42,65	35,12	7,53	51,60	45,26	6,34	44,38	7,22	44,38	0,00
	41,80	35,94	5,86	53,52	48,86	4,66	46,92	6,60	45,26	8,32
Rata-rata	40,78	35,34	5,37	51,45	46,52	4,92	44,72	6,74	43,35	6,67

Keterangan: Obat Uji-1 adalah Flavonoid B (murni) dengan nama Baicalein, dan Obat Uji-2 adalah Flavonoid Kasar Fraksi Etil Asetat

Lampiran 11

Pengujian Statistik

Pengujian Kadar Glukosa Darah Terhadap Pengaruh Vehikulum (Zat Pembawa Obat) Pada Hewan Percobaan

Rumus: The t-test for two related samples,

$$S_{\bar{d}} = \sqrt{\frac{\sum d^2}{N(N-1)}}, \text{ dimana } \sum d^2 = \sum (D - \bar{D})^2 = \sum D^2 - \frac{(\sum D)^2}{N}, \bar{D} = M_2 - M_1, \text{ dan } D = X_2 - X_1$$

$$t = \frac{\bar{D}}{S_{\bar{d}}} = \frac{M_2 - M_1}{S_{\bar{d}}}$$

Berdasarkan data pada tabel 8 untuk kelompok kontrol, diperoleh $\bar{D} = 42,10 - 41,33 = 0,77$ dan $S_{\bar{d}} = 0,4330$, sehingga diperoleh $t = \frac{0,77}{0,4330} = 1,77$

Harga t tabel dengan $df = 4$, pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) adalah 2,776.

Dengan demikian harga t-hitung lebih kecil dari t-tabel, hal ini berarti bahwa tidak ada pengaruh pemberian vehikulum terhadap kadar glukosa darah hewan percobaan.

Lampiran 12

Pengujian Statistik
Pengujian Homogenitas Kadar Glukosa Darah Awal (T₀) Keempat Kelompok
Hewan Percobaan Dengan Analisis Varian

Rumus : Roscoe (1975: 296 -- 298)

Kadar glukosa darah masing-masing kelompok tercantum pada Lampiran 8, kolom T₀

$$\sum \sum X^2 = 8610,50 + 7900,57 + 12294,73 + 8330,68 = 37.136,48$$

$$\sum \frac{T_j^2}{n_j} = \frac{(206,65)^2}{5} + \frac{(197,49)^2}{5} + \frac{(242,29)^2}{5} + \frac{(203,91)^2}{5} = 36.398,051$$

$$\frac{T^2}{N} = \frac{(\sum \sum X)^2}{N} = \frac{(850,34)^2}{20} = 36.153,906$$

$$SS_b = 36.398,051 - 36.153,906 = 244,145$$

$$MS_b = \frac{SS_b}{3} = \frac{244,145}{3} = 81,382$$

$$SS_w = 37.136 - 36.398,051 = 738,434$$

$$MS_w = \frac{SS_w}{16} = \frac{738,434}{16} = 46,152$$

Tabel kesimpulan untuk ANOVA :

Sumber Variansi	d _f	Jumlah kuadrat	Mean kuadrat
Antar kelompok	3	244,145	81,382
Dalam kelompok	16	738,433	46,152
Total	19	982,578	

$$F = \frac{81,382}{46,152} = 1,76 \quad F_{(3,16)} = 3,24$$

Ternyata F hitung < F tabel, berarti tidak ada perbedaan yang berarti kadar glukosa darah awal pada keempat kelompok hewan percobaan pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Lampiran 13

Pengujian Statistik

Pengujian Penurunan Kadar Glukosa Darah Tanpa (Kontrol) dan Setelah Pemberian Obat Uji Maupun Insulin (Zat pembanding) untuk Keempat Hewan Percobaan dengan ANOVA

Rumus : Roscoe (1975 : 296 – 298)

Besarnya penurunan kadar glukosa darah untuk keempat kelompok hewan percobaan tercantum pada Lampiran 8, kolom Penurunan-1.

$$\Sigma \Sigma X = 123,34 \quad \Sigma \Sigma X^2 = 1120,491$$

$$\Sigma \frac{T_j^2}{n_j} = \frac{(2,84)^2}{5} + \frac{(53,03)^2}{5} + \frac{(40,23)^2}{5} + \frac{(27,24)^2}{5} = 1.036,143$$

$$\frac{T^2}{N} = \frac{(\Sigma \Sigma X)^2}{N} = \frac{(123,34)^2}{20} = 760,638$$

$$SS_b = 1.036,143 - 760,638 = 275,506$$

$$MS_b = \frac{SS_b}{3} = \frac{275,506}{3} = 91,835$$

$$SS_w = 1.120,491 - 1.036,143 = 84,347$$

$$MS_w = \frac{SS_w}{16} = \frac{84,347}{16} = 5,272$$

Tabel kesimpulan untuk ANOVA :

Sumber Variansi	df	Jumlah kuadrat	Mean kuadrat
Antar kelompok	3	275,506	91,835
Dalam kelompok	16	84,347	5,272
Total	19	359,853	

$$F = \frac{91,835}{5,272} = 17,42$$

$$F_{(3,16)} = 3,24$$

Ternyata F hitung jauh lebih besar dari F tabel, berarti terdapat perbedaan yang sangat berarti kadar glukosa darah akibat pemberian obat uji dan insulin terhadap kelompok kontrol positif pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Lampiran 14

Pengujian Statistik

Pengujian Penurunan Kadar Glukosa Darah Akibat Pemberian Obat Uji dan Insulin Setelah Pemberian Larutan Glukosa 50% Keempat Kelompok Hewan Percobaan Terhadap Waktu Penentuan

Rumus ANOVA : Roscoe (1975 : 296-298)

Besarnya penurunan kadar glukosa darah keempat hewan percobaan tercantum pada Lampiran 10, kolom Penurunan-2 (90 menit), Penurunan-3 (120 menit), dan Penurunan-4 (150 menit).

	$X_{i,1}$	$X_{i,2}$	$X_{i,3}$	$X_{i,4}$
$\sum X_{1i}, 90'$	8,82	31,43	22,6	24,65
$\sum X_{2i}, 120'$	13,65	40,53	33,16	33,69
$\sum X_{3i}, 150'$	17,83	50,59	37,04	33,36
$\bar{X}_{1,90'}$	1,80	6,27	4,52	4,93
$\bar{X}_{2,120'}$	2,73	8,11	6,63	6,74
$\bar{X}_{3,150'}$	3,52	10,19	7,41	6,67
$\sum X_{1,90'}^2$	18,20	232,27	106,24	125,85
$\sum X_{2,120}^2$	41,41	349,57	226,77	231,63
$\sum X_{3,150}^2$	66,82	530,21	282,80	280,19
S_{90}^2	0,8179	2,9455	1,0107	1,0404
S_{120}^2	1,0186	2,2932	1,3093	1,0753
S_{150}^2	0,8998	1,5980	1,4501	3,7952

Keterangan:

- $X_{i,1}$ = Kelompok kontrol
- $X_{i,2}$ = Kelompok pembanding
- $X_{i,3}$ = Kelompok obat uji-1 (Flavonoid B)
- $X_{i,4}$ = Kelompok obat uji-2 (Fraksi etil Asetat)

$$\sum \sum X_{ijk}^2 = 18,20 + 232,27 + 106,24 + 125,85 + 41,41 + 349,57 + 226,77 + 231,63 + 66,82 + 530,21 + 282,80 + 280,19 = 2.491,98$$

$$\begin{aligned} \sum \frac{T_{ij}^2}{n_{ij}} &= \frac{(8,82)^2 + (31,43)^2 + (22,6)^2 + (24,65)^2 + (13,65)^2 + (40,53)^2 + (33,16)^2 + (33,69)^2 + (17,83)^2 + (50,99)^2 + (37,04)^2 + (33,36)^2}{5} \\ &= 2.311,153 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{T^2}{N} &= \frac{(\sum \sum X)^2}{N} = \frac{(8,82 + 31,43 + 22,6 + 24,65 + 13,65 + 40,53 + 33,16 + 33,69 + 17,83 + 50,99 + 37,04 + 33,36)^2}{60} \\ &= 2.015,50 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum \frac{T_{.j}^2}{n_{.j}} &= \frac{(40,3)^2 + (112,95)^2 + (92,8)^2 + (91,7)^2}{15} \\ &= 2.250,768 \end{aligned}$$

$$\sum \frac{T_{.i}^2}{n_{.i}} = \frac{(87,5)^2 + (121,03)^2 + (139,22)^2}{20} = 2.084,336$$

$$SS_{cell} = 2.330,073 - 2.015,501 = 314,572$$

$$SS_c = 2.250,768 - 2.015,501 = 235,267$$

$$SS_r = 2.084,335 - 2.015,501 = 68,835$$

$$SS_w = SS_r - SS_{cell} = 2.491,982 - 2.015,501 = 161,908$$