



UJI *IN-VITRO* EKSTRAK DAUN JARAK MERAH (*Jatropha gossypifolia L.*) SEBAGAI INHIBITOR α -AMILASE

SKRIPSI

Oleh

Mochammad Syehfu Aref Ghozali

NIM 151810301043

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2020



UJI *IN-VITRO* EKSTRAK DAUN JARAK MERAH (*Jatropha gossypifolia L.*) SEBAGAI INHIBITOR α -AMILASE

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

oleh

Mochammad Syehfu Aref Ghozali

NIM 151810301043

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Ayah Siswantonno dan Ibu Solikhati yang telah banyak berjuang, memberikan doa, dukungan, kasih sayang, dan semangat tanpa batas hingga penulis sampai kepada tahap ini.
2. Adik adikku Ahmad Aref Ghozali Baghdad, Putri Rahayu Wilujeng, dan Muhammad Ainur Rahman yang selalu membuat penulis termotivasi hingga mencapai tahap ini.
3. Kakek Wachid dan Bibi Mimik Hidayah yang telah banyak memberikan doa, dorongan, dan semangat kepada penulis.
4. Kelurga besar di Kota Pasuruan yang telah memberikan doa serta semangat.
5. dr. Johan Novian dan Istijab, S.H, M.Hum, M.Pd yang telah memberikan pengarahan dan motivasi kepada penulis.
6. Keluarga besar Ponpes At-Taqwa yang telah banyak memberikan pengalaman dan pembelajaran yang berharga.
7. Bapak/Ibu Guru dan teman teman TK Ponpes At-Taqwa, SDN Warungdowo 1, SMPN 2 Kota Pasuruan, SMAN 1 Kota Pasuruan, serta dosen-dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember yang telah memberikan ilmu, bimbingan, dan pengalaman.
8. Sandi Pradipta, S.Pd, M.Biotek dan Bella Rhea Lavifa Sanjaya, S.Pd, M.Biotek yang telah memberikan bimbingan saat melakukan penelitian.
9. Selvina Rizky Aprilia dan Kamelia Rizqi Fauziah yang telah memberikan pandangan secara umum tentang riset Biokimia kepada penulis.
10. Teman seperjuangan penelitian di Lab N & P CDAST Indras Dwi Anggita, Ratna Kusuma Dewi, Ayu Prastiyani, Rosita Dwi Rahmawati, Nasrul Amaliyatun Naja, Ade Pratama Nurdin yang telah berjuang bersama selama penelitian, serta Sanada Aulia Fanani tim Biokimia komputasi.
11. Sahabat Pandawa Okky R.N.A, Salim Ashar. H, Adi Kurniawan E. dan Moch. Jonny Putra yang telah memberikan banyak motivasi dan semangat.

12. Sahabat Yayuk Sri Wahyuni, Bella Ariwijayanti R, serta sahabat *INBIDEP Family* 2017 yang telah banyak memberikan semangat serta pengalaman suka duka bersama .
13. Teman teman seperjuangan organisasi Pengurus HIMAKI “Zirkonium” periode 2016 dan 2017, Pengurus DPM FMIPA 2018, serta UKM KSR PMI Unit Universitas Jember.
14. Keluarga *Chrypton* 2015 yang telah meluangkan waktu dan berjuang bersama semasa menjadi mahasiswa.
15. Rekan-rekan kerja di SAT Gondang Legi yang telah memberikan banyak pengalaman dan pembelajaran.
16. Serta pihak-pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu penulis dalam melakukan penelitian ini.

MOTTO

*“ Dan hanya kepada Allah hendaknya kamu berharap ”**)*

*“Bersabarlah kamu dan kuatkanlah kesabaranmu dan tetaplah bersiap siaga dan bertaqwalah kepada Allah supaya kamu menang”**)*



^{*}) Q.S Al-Insyirah : 8

^{**}) Q.S Al-Imraan: 200

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Mochammad Syehfu Aref Ghozali

NIM : 151810301043

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “ Uji *In-vitro* Ekstrak Daun Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.) sebagai Inhibitor α -Amilase” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan atau paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember , Januari 2020

Yang menyatakan,

Mochammad Syehfu Aref Ghozali

NIM 151810301043

SKRIPSI

**UJI *IN-VITRO* EKSTRAK DAUN JARAK MERAH (*Jatropha gossypifolia*
L.) SEBAGAI INHIBITOR α -AMILASE**

Oleh

Mochammad Syehfu Aref Ghozali
NIM 151810301043

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Ari Satia N. ,S.F.,GDipSc.,MSc-res.,Ph.D.,Apt

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Uji *In-vitro* Ekstrak Daun Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.) sebagai Inhibitor α -Amilase” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Penegtahuan Alam Universitas Jember pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Penegtahuan Alam Universitas
Jember

Tim penguji,

Ketua

Anggota I

Dr. A. A. Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si.
NIP. 197012251997022001

Ari Satia N, S.F.,GdipSc.,MSc-res.,Ph.D,Apt
NIP. 197807212003121001

Anggota II

Anggota III

Drs. Achmad Sjaifullah., M.Sc, Ph.D
NIP. 195910091986021001

drh.Wuryanti Handayani, S.Si., M.Si
NIP. 196008221985032002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Drs. Achmad Sjaifullah., M.Sc, Ph.D
NIP. 195910091986021001

RINGKASAN

Uji *In-vitro* Ekstrak Daun Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.) sebagai Inhibitor α -Amilase; Mochammad Syehfu Aref Ghozali, 151810301043, 2020; 83 halaman; Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Diabetes Melitus merupakan penyakit mematikan peringkat ketiga di dunia setelah kanker dan kardiovaskular. Indonesia merupakan salah satu negara dari sepuluh negara teratas dengan jumlah penderita diabetes yang terdiagnosis pada rentang usia 20-79 tahun. Pankreatitis akut telah dikonfirmasi dapat meningkatkan aktivitas α -amilase khususnya pada penderita diabetes. Aktivitas α -amilase yang tidak terkontrol menyebabkan kadar gula darah menjadi tinggi atau disebut dengan hiperglikemia. Inhibitor α -amilase saat ini telah dikembangkan sebagai salah satu pendekatan ini yang dilakukan untuk mengontrol diabetes secara terapeutik dengan mengurangi adsorpsi glukosa dalam peredaran darah. Inhibitor sintetik yang banyak digunakan adalah akarbosa, namun inhibitor ini dapat menimbulkan berbagai efek samping gastrointestinal.

Produk alami dari tumbuhan, baik sebagai ekstrak tanaman ataupun senyawa murni memiliki peluang besar untuk penemuan obat baru, karena ketersediaan senyawa kimia di alam yang sangat beragam. Daun *J.gossypifolia* L. merupakan salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai obat tradisional menurut *folklore* masyarakat tengger, sehingga berpotensi sebagai antidiabetik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas inhibisi ekstrak kasar metanol, ekstrak fraksi heksana, ekstrak fraksi diklorometana, dan ekstrak fraksi etil asetat sebagai inhibitor terhadap α -amilase. Inhibitor dari daun *J.gossypifolia* L. yang memiliki aktivitas inhibisi tertinggi dianalisis lebih lanjut secara kinetika untuk mengetahui jenis inhibisi terhadap α -amilase.

Daun *J.gossypifolia* L. berupa 50 gram simplisia di ekstraksi menggunakan metode maserasi selama 12 jam menggunakan pelarut metanol. Ekstrak kasar metanol yang diperoleh sebanyak 1,93 gram dengan rendemen 4,24%. Ekstrak kasar metanol kemudian di fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair

menggunakan heksana, diklorometana, dan etil asetat. Rendemen ekstrak fraksi tertinggi diperoleh pada ekstrak fraksi heksana, diikuti dengan ekstrak fraksi etil asetat dan ekstrak fraksi diklorometana dengan rendemen masing-masing sebesar 31,84% , 20,14% dan 14,57%.

Ekstrak daun *J.gossypifolia* L. dari masing-masing pelarut dilakukan uji inhibisi α -amilase secara *in-vitro* dengan inhibitor standar akarbosa digunakan sebagai pembanding. Analisis uji inhibisi α -amilase dilakukan berdasarkan penurunan konsentrasi produk gula pereduksi maltosa hasil hidrolisis substrat amilum oleh enzim yang dinyatakan dalam persen inhibisi. Persen inhibisi terbesar terhadap α -amilase dimiliki oleh ekstrak fraksi etil asetat sebesar $49,53 \pm 0,27\%$, namun masih lebih kecil dari inhibitor standar akarbosa yaitu sebesar $96,12 \pm 0,90\%$. Persen inhibisi ekstrak kasar metanol, ekstrak fraksi heksana, dan ekstrak diklorometana terhadap α -amilase masing-masing sebesar $19,38 \pm 2,25\%$, $19,38 \pm 2,25\%$, $36,69 \pm 1,57\%$.

Ekstrak fraksi daun *J.gossypifolia* L. yang memiliki kemampuan inhibisi tertinggi terhadap α -amilase dilakukan analisis secara kinetika untuk mengetahui tipe inhibisinya. Kinetika enzim merupakan pendekatan untuk mempelajari mekanisme reaksi katalisis oleh enzim dengan menentukan laju reaksi secara kuantitatif menggunakan persamaan Michaelis-Menten. Parameter kinetika yang digunakan yaitu K_M dan V_{max} . Konsentrasi substrat yang digunakan 0,0625%; 0,125%; 0,25%; 0,5%; dan 1% (w/v), dengan variasi waktu inkubasi 0, 3, 6, 9, 12, 18 menit. Nilai absorbansi yang diperoleh dikonsversi menjadi konsentrasi produk maltosa menggunakan kurva standar maltosa. Konsentrasi produk yang diperoleh dengan variasi konsentrasi waktu diplotkan untuk mendapatkan gradien dari persamaan linernya yang merupakan nilai kecepatan awal (V_0). Plot Lineweaver-Burk yang diperoleh dari pengeplotan antara $1/V_0$ terhadap $1/[S]$ dapat digunakan untuk mengetahui tipe inhibisi enzim dari nilai Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan kecepatan maksimum (V_{max}). Nilai K_M dari kontrol (Tanpa Inhibitor) dan sampel (Dengan Inhibitor) pada penelitian ini diperoleh masing-masing sebesar $49,79 \pm 1,81$ dan $49,79 \pm 1,77$, sedangkan untuk V_{max} diperoleh masing-masing sebesar $2,47 \pm 0,12$ untuk kontrol (Tanpa Inhibitor) dan $3,07 \pm 0,21$ untuk sampel

(Dengan Inhibitor). Nilai tersebut mengindikasikan bahwa tipe penghambatan ekstrak fraksi etil asetat daun *J.gossypifolia L* adalah kompetitif reversibel. Tipe penghambatan kompetitif memberikan perubahan nilai pada konstanta Michaelis-Menten (K_M), tetapi tidak memberikan perubahan secara signifikan terhadap nilai kecepatan maksimum reaksi (V_{max}).



PRAKATA

Alhamdulillah atas segala rahmat dan karunia Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji *In-Vitro* Ekstrak Daun Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.) sebagai Inhibitor α -Amilase”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si.,M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Kepala Laboratorium Nutrasetikal dan Farmasetikal *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember;
4. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ari Satia Nugraha S.F.,GdipSc.,MSc-res.,Ph.D,Apt . selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran, kasih sayang serda doa dan membimbing dengan penuh kesabaran dalam penulisan skripsi ini;
5. Prof. Tri Agus Siswoyo, S.P, M.Agr, Ph.D yang telah banyak memberikan bimbingan, saran, dan masukan pada penelitian ini.
6. Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D selaku Dosen Penguji I dan drh. Wuryanti Handayani, M.Si. selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktu guna menguji dan memberikan kritik dan sarannya demi kesempurnaan skripsi ini;
7. Drs. Siswoyo, MSc, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan saran dan motivasinya;

8. Segenap dosen pengajar dan staf jurusan kimia FMIPA Universitas Jember yang telah memperlancar proses terselesaikannya skripsi ini;
9. Teman seperjuangan penelitian, Indras Dwi Anggita dan Ratna Kusuma Dewi yang telah menemani dari awal penentuan topik sampai terselesaikannya skripsi ini dan Tim Biokimia: Ayu Prastiyani, Rosita Dwi Rahmawati, dan Nasrul Amaliyatun Naja yang telah banyak membantu dalam penelitian saya;
10. Teman seperjuangan kos dan angkatan 2015, terima kasih atas doa, motivasi, keceriaan dan kebersamaan selama ini;
11. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Nutrasetikal dan Farmasetikal terima kasih atas kebersamaan dan solidaritasnya selama di kota perantauan;
12. Adik tingkat semasa kuliah yang selalu memberikan bantuan;
13. Semua pihak yang telah berkontribusi namun tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis berharap, semoga setiap kalimat yang ada dalam skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan bagi pembaca.

Jember, Januari 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iv
LEMBAR PERNYATAAN	v
LEMBAR PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
2.1 Taman Nasional Bromo Tengger Semeru	5
2.2 Jarak Merah (<i>Jatropha gossypifolia L.</i>)	6
2.3 Simplisia.....	8
2.4 Senyawa Metabolit Sekunder	8
2.3.1 Kumarin-Lignoid	10
2.3.2 Diterpen	10
2.3.3 Triterpen.....	11
2.3.4 Alkaloid	12
2.3.5 Flavonoid	12
2.4 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder	14
2.5 Diabetes Melitus	15
2.6 Inhibitor enzim sebagai Antidiabetik.....	17

2.6.1	Enzim yang terlibat dalam Diabetes mellitus tipe 2.	17
2.6.2	Inhibitor enzim dan mekanisme inhibisi enzim.....	18
2.6.3	Kinetika inhibisi enzim dan tipe inhibisi	22
2.7	Spektrofotometri UV-Vis	26
2.8	Prinsip Analisis Inhibisi α-amilase	27
BAB 3. METODE PENELITIAN		29
3.1	Waktu dan Tempat	29
3.2	Alat dan Bahan.....	29
3.3	Rancangan Penelitian	30
3.4	Prosedur Pelaksanaan Penelitian	31
3.4.1	Sampling	31
3.4.2	Pembuatan Simplisia Daun <i>J.gossypifolia L.</i>	31
3.4.3	Penentuan Kadar Air Simplisia Daun <i>J.gossypifolia L.</i>	31
3.4.4	Ekstraksi Simplisia Daun <i>J.gossypifolia L.</i>	32
3.4.5	Pembuatan Kurva Standar Maltosa.....	32
3.4.6	Uji Inhibisi α -amilase oleh Ekstrak Daun <i>J.gossypifolia L.</i>	33
3.4.6	Kinetika Inhibisi α -amilase oleh Ekstrak Fraksi Teraktif dari Daun <i>J.gossypifolia L.</i>	34
4.1	Ekstrak dan Rendemen Ekstrak Daun <i>J. gossypifolia L.</i>	37
4.2	Inhibisi ekstrak daun <i>J.gossypifolia L.</i> terhadap α-amilase	39
4.3	Kinetika Inhibisi Ekstrak Fraksi Etil Asetat daun <i>J.gossypifolia L.</i> ..	42
5.1	Kesimpulan	46
5.2	Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA		47
LAMPIRAN.....		52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia L.*) Seluruh bagian tanaman (a), bagian daun, bunga, dan buah (b) Sumber : (Félix-silva dkk., 2014)..... 6

Gambar 2. 2 Peta persebaran Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia L.*) di dunia.... 7

Gambar 2. 3 Hubungan metabolisme primer dengan biosintesis senyawa metabolit sekunder 9

Gambar 2. 4 Struktur senyawa golongan kumarin-lignoid 10

Gambar 2. 5 Senyawa golongan diterpen 11

Gambar 2. 6 Senyawa golongan alkaloid..... 12

Gambar 2. 7 Senyawa golongan flavonoid 12

Gambar 2. 8 Senyawa golongan glikosida 14

Gambar 2. 9 Mekanisme resistensi insulin pada diabetes tipe 2..... 16

Gambar 2. 10 Mekanisme hidrolisis karbohidrat oleh α -amilase menjadi glukosa dan dekstrin (Aghajari dkk., 2002). 18

Gambar 2. 11 Struktur Akarbosa 19

Gambar 2. 12 Interaksi ikatan hidrogen antara akarbosa dengan sisi aktif enzim (a) isoacarbosa (b) akarviosin-glukosa 20

Gambar 2. 13 Interaksi molekular antara flavonoid glikosida dengan sisi aktif α -amilase (Hua dkk., 2018) 21

Gambar 2. 14 Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi.Sumber: (David L. Nelson; Michael M.Cox, 2004) 22

Gambar 2. 15 Plot Lineweaver-Burk (David L. Nelson; Michael M.Cox, 2004). 24

Gambar 2. 16 Tipe inhibisi enzim secara reversibel 25

Gambar 2. 17 Daerah spektrum radiasi elektromagnetik(Harvey, 2000). 26

Gambar 2. 18 Struktur Amilum 28

Gambar 2. 19 Reaksi reduksi DNS oleh gula pereduksi(Timerman, tanpa tahun)28

Gambar 3. 1 Kurva hasil pengeplotan waktu inkubasi dengan konsentrasi produk.....34

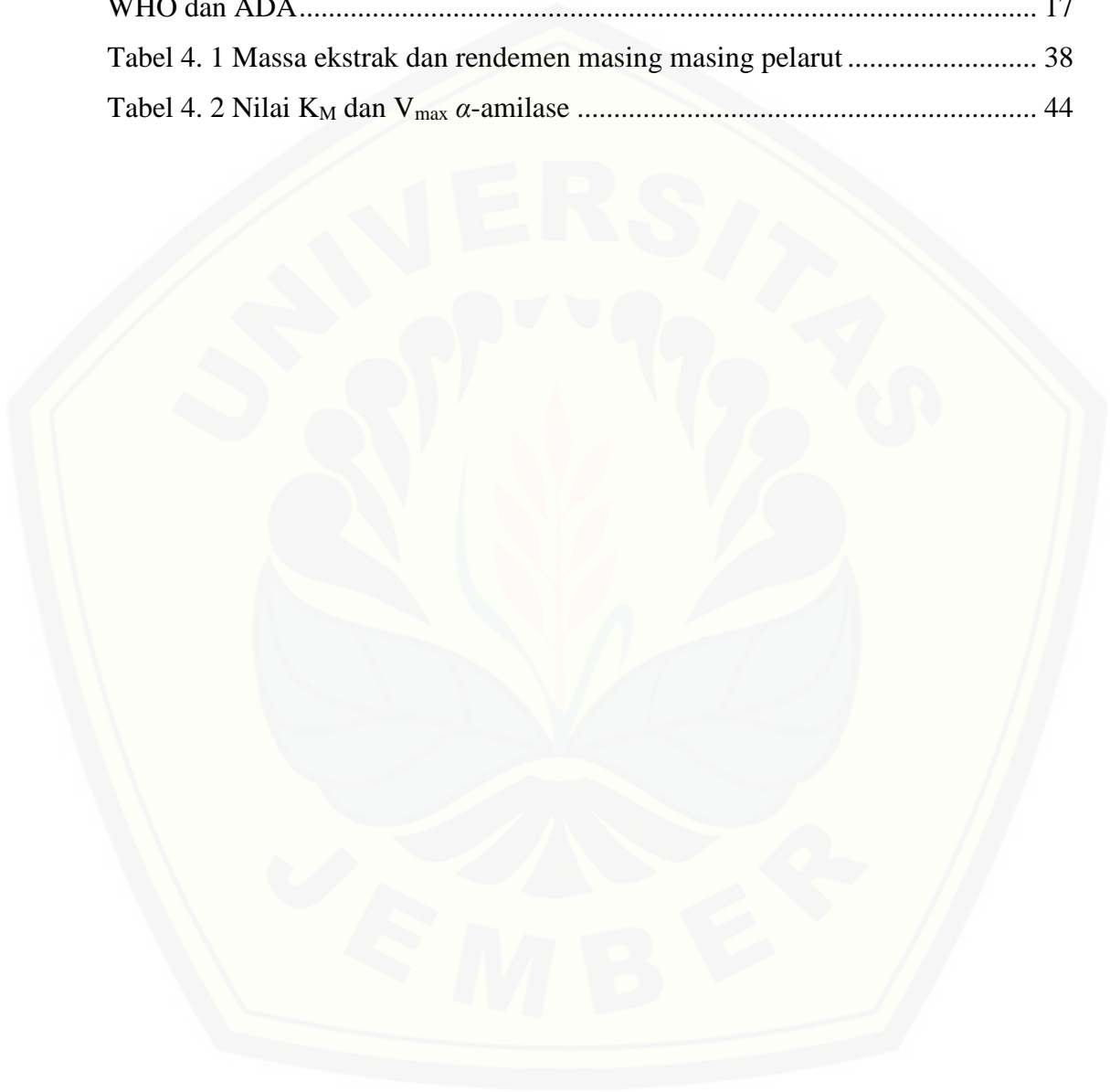
Gambar 4. 1 Grafik persen inhibisi masing-masing ekstrak dan akarbosa.....40

Gambar 4. 2 Plot Lineweaver-Burk α -amilase (a) pengulangan 1 (b) pengulangan
2 (c) pengulangan 3 43
Gambar 4. 3 Spektra FTIR ekstrak fraksi etil asetat daun *J.gossypifolia* L..... 45



DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Konstituen fitokimia utama daun Jarak Merah.....	7
Tabel 2. 2 Klasifikasi glukosa puasa intoleransi untuk diabetes tipe 2 menurut WHO dan ADA.....	17
Tabel 4. 1 Massa ekstrak dan rendemen masing masing pelarut.....	38
Tabel 4. 2 Nilai K_M dan V_{max} α -amilase	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 3. 1 Validasi Tanaman Jarak Merah (<i>Jatropha gossypifolia</i> L).	52
Lampiran 3. 2 Pembuatan Larutan.....	53
Lampiran 3. 3 Kurva Standar Maltosa.....	54
Lampiran 4. 1 Kadar Air Simplisia.....	56
Lampiran 4. 2 Perhitungan Persen Rendemen Ekstrak	56
Lampiran 4. 3 Persen Inhibisi α -amilase	57
Lampiran 4. 4 Kinetika penghambatan ekstrak fraksi teraktif (etil asetat) terhadap α -amilase.....	59
Lampiran 4. 5 Pembuatan dan perhitungan aktivitas α -amilase	82

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus merupakan penyakit mematikan yang menempati peringkat ketiga di dunia setelah kanker dan kardiovaskular (Guo dkk., 2010). Menurut *International Diabetes Federation (IDF)* (2017) jumlah penderita diabetes di Asia Tenggara sebanyak 159 juta pada tahun 2017 dan diperkirakan akan meningkat sebesar 15% pada tahun 2045. Indonesia merupakan salah satu negara dari sepuluh negara teratas dengan jumlah penderita diabetes yang terdiagnosis pada rentang usia 20-79 tahun. Penderita diabetes di Indonesia menempati posisi ke-enam dunia setelah Cina, India, Brazil, USA, dan Meksiko (IDF, 2017). Diabetes Melitus (DM) tipe 2 merupakan penyakit yang terjadi akibat meningkatnya kadar glukosa dalam darah akibat pankreas tidak dapat menghasilkan hormon insulin secara efektif. Insulin berperan dalam mengangkut glukosa dalam darah menuju sel-sel tubuh untuk diubah menjadi energi (IDF, 2017). Pankreatitis akut telah dikonfirmasi dapat meningkatkan aktivitas amilase khususnya pada penderita diabetes. Aktivitas α -amilase yang tidak terkontrol menyebabkan kadar gula darah menjadi tinggi atau disebut dengan hiperglikemia (Abou-Seif dan Youssef, 2004).

Senyawa metabolit sekunder saat ini telah banyak dikembangkan sebagai agen antidiabetes. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa turunan yang disintesis dari metabolisme primer. Senyawa metabolit sekunder tertentu dari tanaman telah dilaporkan dapat digunakan sebagai sumber agen antidiabetes (Patil dkk., 2011). Senyawa metabolit sekunder dalam tanaman secara umum memiliki kelimpahan yang rendah dalam tanaman dan seringkali kurang dari 1% dari total karbon dalam tanaman. Senyawa ini berkontribusi besar sebagai pertahanan tanaman saat berinteraksi dengan ekosistem. Senyawa metabolit sekunder tanaman diklasifikasikan berdasarkan jalur biosintesisnya terbagi menjadi fenilpropanoid, steroid dan terpenoid, alkaloid, dan poliketida (Dewick, 2002). Senyawa metabolit sekunder tertentu dilaporkan dapat menghambat diabetes (Shafiee dkk., 2018).

Beberapa senyawa metabolit sekunder tersebut dilaporkan bekerja dengan cara menghambat kinerja dari α -amilase (Lo Piparo dkk., 2008).

Inhibisi α -amilase oleh senyawa metabolit sekunder terjadi dengan cara pemberian efek penghambatan sehingga terjadi penundaan hidrolisis karbohidrat. α -amilase memiliki peran dalam menghidrolisis karbohidrat. α -amilase adalah enzim yang mengkatalis pemecahan amilum menjadi dextrin. Penghambatan enzim ini dapat memperlambat penyaluran glukosa ke dalam darah sehingga dapat mengurangi kadar glukosa dalam darah (Kwon dkk., 2006). Inhibitor α -amilase saat ini telah banyak dikembangkan sebagai salah satu agen antidiabetik. Pendekatan ini dilakukan sebagai strategi kontrol diabetes secara terapeutik untuk mengurangi adsorpsi glukosa dalam peredaran darah. Inhibitor sintetik yang banyak digunakan adalah akarbosa, namun inhibitor ini dapat menimbulkan berbagai efek samping (Rosak dan Mertes, 2012), sehingga saat ini banyak terobosan yang dilakukan untuk menemukan inhibitor alami sebagai alternatif untuk terapi diabetes tipe 2. Uji inhibisi dari α -amilase dilakukan secara kinetika untuk mengetahui tipe dari inhibisinya.

Ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari tanaman merupakan langkah pertama pemanfaatan fitokimia untuk mendapatkan senyawa target. Ekstraksi merupakan pemisahan senyawa target dari sumbernya, termasuk senyawa metabolit sekunder atau biokatif dari tumbuhan dengan menggunakan pelarut selektif. Ekstraksi pelarut merupakan prosedur paling umum untuk preparasi ekstrak dari bahan tanaman karena kemudahan penggunaan, efisiensi dan penerapan yang luas. Ekstraksi pelarut dengan berbagai polaritas, waktu ekstraksi, suhu, perbandingan sampel dan pelarut dan sifat fisik dan sifat kimia sampel. Pelarut seperti metanol, etanol, etil asetat, heksana atau kombinasinya telah digunakan untuk ekstraksi metabolit sekunder dari bahan tanaman (Dai dan Mumper, 2010). Maserasi merupakan bagian dari ekstraksi pelarut yang dilakukan dengan cara melakukan perendaman simplisia menggunakan wadah tertutup pada suhu ruang yang disertai dengan penggojogan untuk meningkatkan difusi pelarut pada simplisia (Azmir dkk., 2013).

Tanaman Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia .L*) merupakan tanaman keluarga *Euphorbiaceae* yang digunakan sebagai tanaman obat multiguna dan digunakan dalam pengobatan tradisional untuk berbagai pengobatan penyakit dan terdistribusi luas pada negara tropis, termasuk salah satunya di Indonesia yang terletak di Taman Nasional Bromo Tengger Semeru Provinsi Jawa Timur. Tanaman ini telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Kumar dkk., 2006), antioksidan (Okoh dkk., 2016), antikanker (Falodun dkk., 2012), serta rebusan dari daun tanaman ini menurut *folklore* telah diketahui memberikan efek antihiperlikemia (Olabanji dkk., 2014). Kandungan fitokimia tanaman ini meliputi alkaloid, kumarin, lignoid, flavonoid, fenol, saponin, steroid, tanin, dan terpenoid (Félix-silva dkk., 2014). Berdasarkan kandungan senyawa metabolit sekunder dari tanaman Jarak Merah, tanaman tersebut merupakan tanaman yang berpotensi untuk dilakukan penelitian sebagai agen terapeutik obat tradisional dengan fungsi antidiabetes untuk terapi diabetes tipe 2. Pengujian secara *in-vitro* dilakukan dengan melakukan perbandingan pada ekstrak kasar dan semua ekstrak fraksi pelarut yang berpotensi sebagai antidiabetik, dan juga sebagai inhibitor enzim yang dianalisis secara kinetika enzimatis untuk menentukan tipe inhibisi enzim.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka yang menjadi rumusan masalah percobaan ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh ekstrak kasar metanol dan ekstrak fraksi pelarut (heksana, diklorometana, dan etil asetat) daun Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia .L*) sebagai inhibitor terhadap inhibisi α -amilase?
2. Bagaimana kinetika inhibisi α -amilase dari ekstrak fraksi teraktif sebagai inhibitor α -amilase?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Sampel yang digunakan adalah daun dari Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia .L*) dari lingkungan Taman Nasional Bromo Tengger Semeru.

2. Analisis kinetika inhibisi enzim hanya dilakukan pada ekstrak fraksi yang memiliki aktivitas inhibisi paling tinggi.

1.4 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini antara lain :

1. Mengetahui pengaruh ekstrak kasar metanol dan ekstrak fraksi pelarut (heksana, diklorometana, dan etil asetat) daun Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia .L*) sebagai inhibitor alami.
2. Mengetahui kinetika inhibisi α -amilase dari fraksi teraktif untuk menentukan tipe inhibisi enzim.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu untuk memberikan manfaat :

1. Memberikan informasi kepada peneliti dan masyarakat mengenai potensi Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia .L*) sebagai inhibitor α -amilase ditinjau dari kemampuan dalam menghambat α -amilase.
2. Memberikan informasi kepada peneliti dan masyarakat kinetika dan mekanisme inhibisi α -amilase oleh ekstrak yang paling berpotensi sebagai inhibitor alami.

BAB 2. TINJUAN PUSTAKA

2.1 Taman Nasional Bromo Tengger Semeru

Taman Nasional Bromo Tengger Semeru merupakan taman nasional yang terletak di Jawa Timur tepatnya di wilayah administratif Kabupaten Pasuruan, Probolinggo, Malang, dan Kabupaten Lumajang dengan luas wilayah sekitar 50.276,3 Ha . Taman Nasional Bromo Tengger Semeru ditetapkan sebagai taman nasional berdasarkan Surat Pernyataan Menteri Pertanian Nomor 736/Mentan/X/1982 sejak oktober 1982. Kawasan tersebut ditetapkan sebagai taman nasional karena memiliki potensi kekayaan alam yang besar dan unik dengan keanekaragaman vegetasi khas dataran tinggi basah. Letak Taman Nasional Bromo Tengger Semeru secara geografis terletak pada 7°54'-8°13' LS dan 112°51'-113°04' BT yang terbagi menjadi 5 zonasi yaitu zona inti, zona rimba, zona pemanfaatan intensif, zona pemanfaatan tradisonal dan zona rehabilitasi (Hidayat dan Risna, 2007).

Taman Nasional Bromo Tengger Semeru berdasarkan letak geografisnya memiliki beberapa tipe ekosistem yang terdiri dari sub-montana, montana dan sub-alphin dengan pepohonan besar seperti cemara gunung, jamuju, edelweis, serta berbagai jenis anggrek dan rumput langka (Balai Taman Nasional Bromo Tengger Semeru, 2014). Selain tanaman tersebut di Taman Nasional Bromo Tengger Semeru juga terdapat tanaman-tanaman obat. Menurut Jatibaroto (2011) terdapat 118 jenis tanaman obat yang digunakan untuk menyembuhkan 60 gejala penyakit masyarakat dan beberapa diantaranya seperti tanaman tepung otot (*Stellaria saxatilis*), dringu (*Acorus calamus*), jambu wer (*Prunus persica*), buah cimplukan (*Physalis minima*), sebagai obat tradisional masyarakat Tengger, selain tanaman tersebut Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia L.*) asal Taman Nasional Bromo Tengger Semeru juga merupakan tanaman yang berpotensi digunakan sebagai obat tradisional. Menurut Felix silva (2014) Jarak merah yang mempunyai beberapa manfaat diantaranya yaitu sebagai antikanker, antibakteri, antiseptik , dan antianemia.

2.2 Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.)

Jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) merupakan tanaman semak lebat dengan tinggi sekitar 1,8 m dengan daun menjari 3-5 , memiliki bunga berwarna merah keunguan, buah berwarna hijau dan berbiji kehijauan yang ada didalam buah (Aboaba dkk., 2015). Bentuk tanaman dan morfologi dari tanaman Jarak Merah ditunjukkan oleh Gambar 2.1 berikut

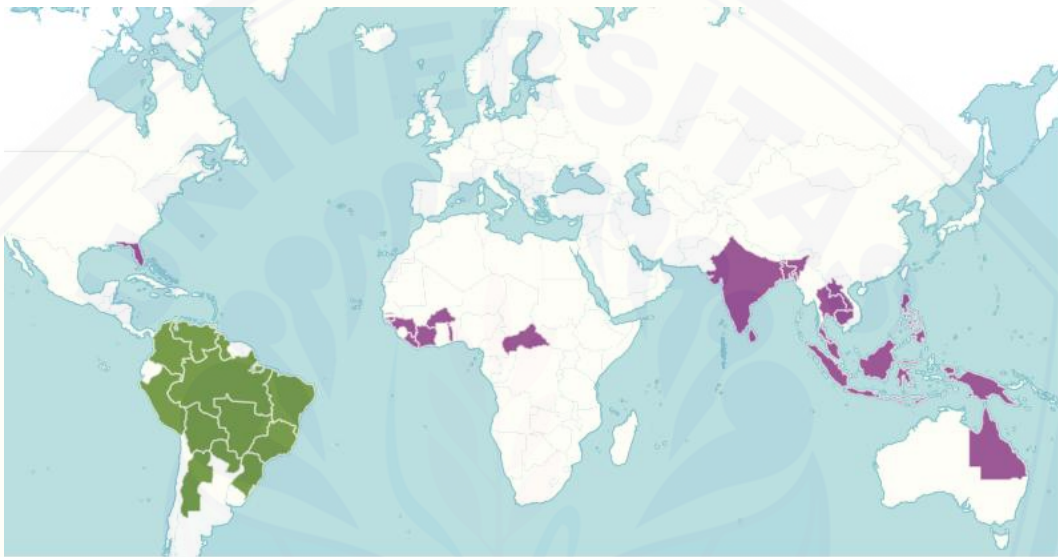


Gambar 2. 1 Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.) Seluruh bagian tanaman (a), bagian daun, bunga, dan buah (b) Sumber : (Félix-silva dkk., 2014)

Menurut Plantamor (2019), taksonomi dari tanaman Jarak Merah yaitu sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magniliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Jatropha</i>
Spesies	: <i>Jatropha gossypifolia</i> L.

Jarak merah terdistribusi pada negara beriklim tropis, subtropis, tropis kering, dan tropis semikering (Félix-silva dkk., 2014). Persebaran Jarak Merah *Jatropha gossypifolia* L. di dunia meliputi Amerika tengah (Argentina, Kolombia, Peru, Brazil, Paraguay, dan Venezuela), sebagian negara di Afrika barat (Gambia, Guinea, Liberia) , India, Laos, Filipina, Borneo, Thailand, Malaysia dan Indonesia. Peta persebaran Jarak Merah di dunia ditunjukkan oleh Gambar 2.2 berikut ini



Gambar 2. 2 Peta persebaran Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.) di dunia
(Dehgan, B.2012)

Jarak merah secara tradisional digunakan sebagai obat demam, gatal, bisul, dan peradangan kulit. Rebusan kulit dari Jarak merah dapat digunakan sebagai obat sakit perut, dan penyakit kelamin (Saishri dkk., 2016). Berdasarkan penelitian Saishri dkk.(2016) pada daun Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.) terdapat golongan senyawa berikut ini :

Tabel 2. 1 Konstituen fitokimia utama daun Jarak Merah

No	Nama Senyawa	Jumlah (mg/kg)
1	Total alkaloid	3.35
2	Total flavonoid	3.60
3	Tanin	0.22
4	Glikosida	0.12

Sumber: (Saishri dkk., 2016).

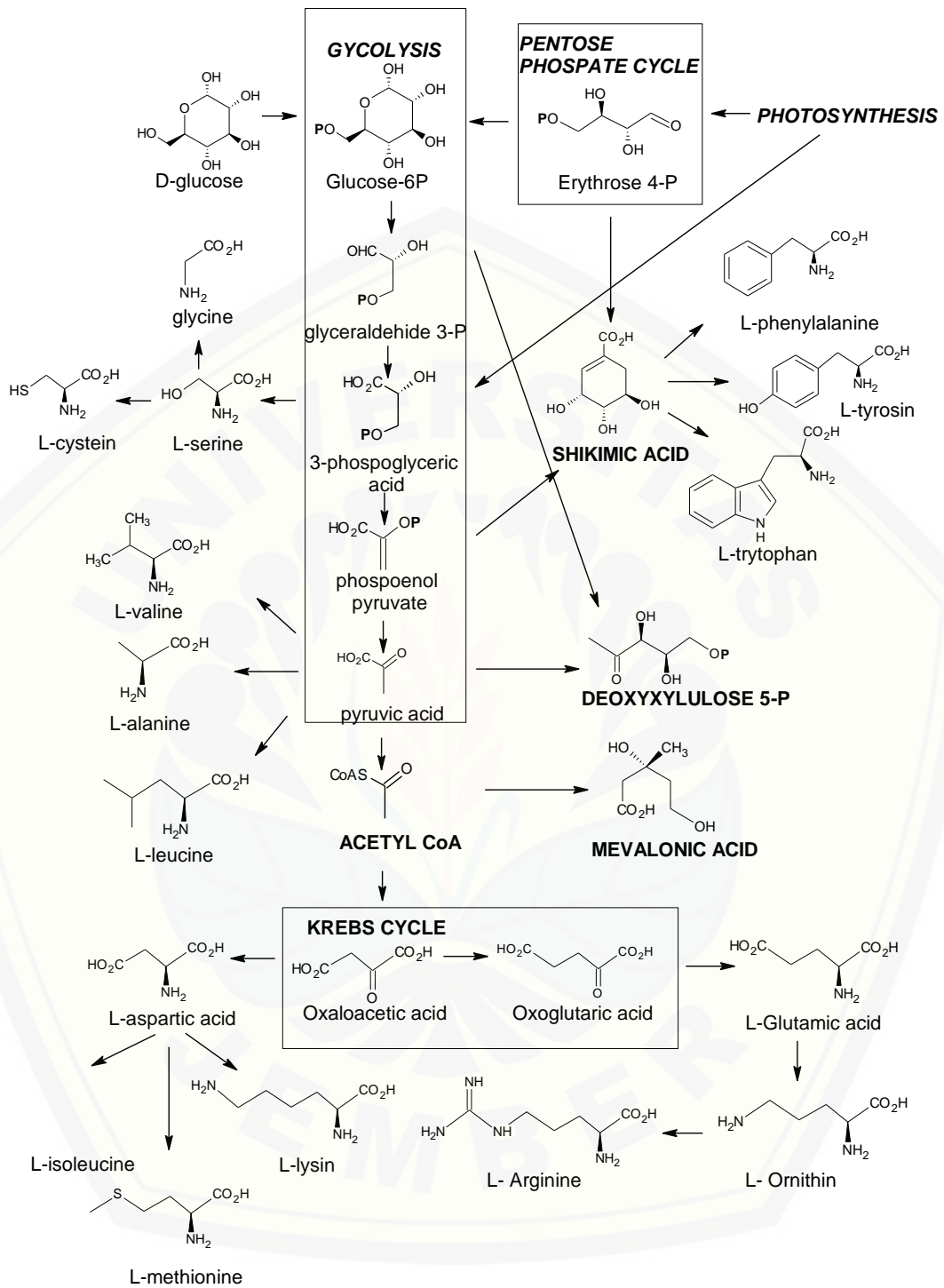
Penelitian yang dilakukan oleh Félix-silva dkk., (2014) telah megkonfirmasi bahwa senyawa metabolit sekunder pada tanaman Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia L.*) meliputi golongan kumarin-lignoid, diterpen, triterpen, alkaloid, flavonoid, dan glikosida.

2.3 Simplisia

Simplisia menurut Departemen Kesehatan RI merupakan bahan alami yang digunakan untuk obat dan belum mengalami proses apapun, kecuali bahan yang telah dikeringkan. Simplisia terbagi menjadi tiga golongan, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman, eksudat tanaman, atau gabungan dari ketiganya. Eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau dengan cara tertentu sengaja dikeluarkan dari selnya. Eksudat tanaman dapat berupa zat-zat atau bahan nabati lainnya dengan cara tertentu dipisahkan atau diisolasi dari tanamannya. Simplisia tanaman obat termasuk dalam simplisia nabati (Hasanah, 2011).

2.4 Senyawa Metabolit Sekunder

Senyawa dalam organisme terbagi menjadi dua kelompok utama, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa turunan dari metabolit primer yang tersebar secara meluas, terutama pada tanaman tingkat tinggi. Pembentukan atau biosintesis senyawa metabolit sekunder dari senyawa metabolit primer pada tumbuhan terdiri dari beberapa jalur meliputi jalur asam shikimat, asetat, mevalonat dan deoksiselulosa fosfat, serta turunan dari asam amino. Hubungan antara biosintesis senyawa metabolit sekunder dengan metabolite primer dijelaskan pada Gambar 2.3.

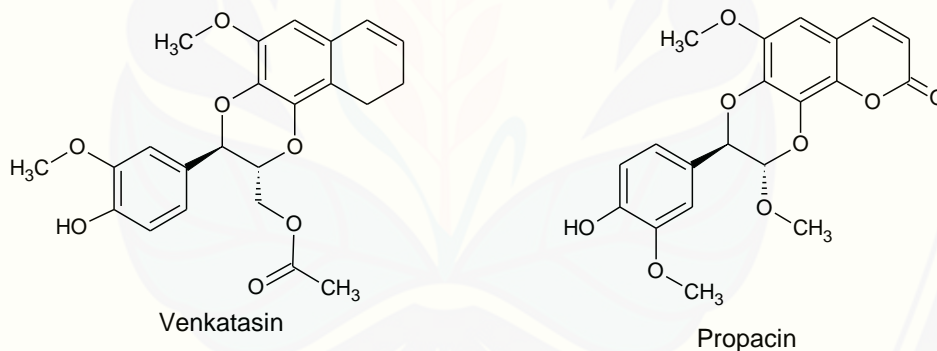


Gambar 2. 3 Hubungan metabolisme primer dengan biosintesis senyawa metabolit sekunder(Dewick, 2002)

Senyawa metabolit sekunder diproduksi oleh tanaman dalam jumlah terbatas dan pada kondisi tertentu, sehingga keberadaannya di alam terbatas dan sering kali kurang dari 1% dari total karbon tanaman. Senyawa tersebut memiliki kontribusi besar terhadap tanaman dengan cara memberikan efek pertahanan pada saat berinteraksi dengan ekosistem (Bourgaud dkk., 2001). Senyawa metabolit sekunder berikut ini merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia L.*)

2.3.1 Kumarin-Lignoid

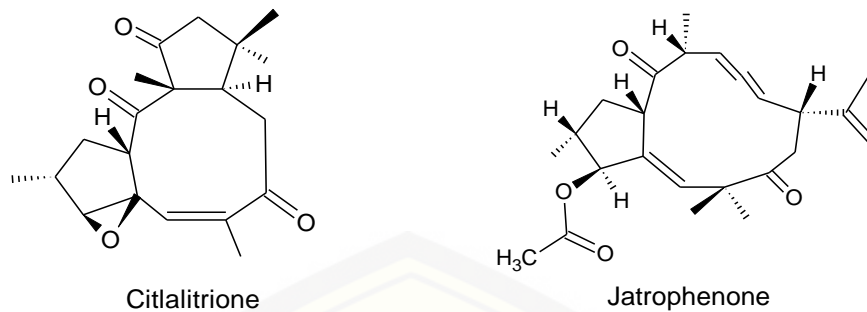
Kumarin-Lignoid merupakan senyawa fenolik yang terbentuk dari struktur kumarin dan lignan. Pada daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia L.*) kumarin-lignoid ditemukan sebagai venkatasin dan propacin. Venkatasin dan propacin merupakan kumarin-lignoid yang dapat ditemukan pada seluruh bagian jarak merah (Das dan Venkataiah, 2001)



Gambar 2. 4 Struktur senyawa golongan kumarin-lignoid

2.3.2 Diterpen

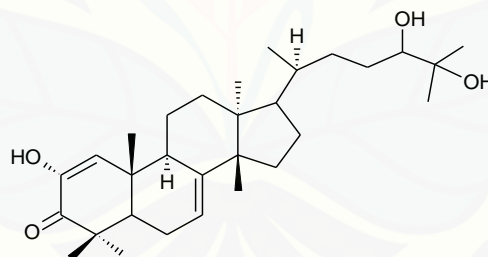
Diterpen merupakan terpenoid C_{20} yang terbentuk dari GGPP (geranylgeranyl diphosphate) yang mengalami penambahan IPP (isopentenil pyrophosphate) (Dewick, 2002). Diterpen pada Jarak merah juga ditemukan pada seluruh bagian tumbuhan termasuk pada daun. Senyawa diterpen tersebut antara lain Citralition dan Jatrophenone (Félix-silva dkk., 2014).



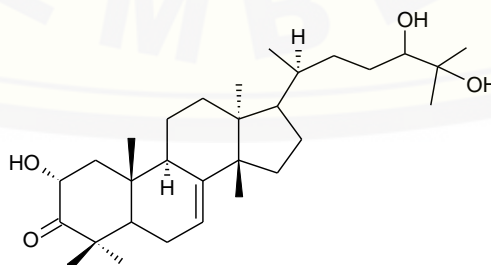
Gambar 2. 5 Senyawa golongan diterpen

2.3.3 Triterpen

Triterpen merupakan terpenoid C_{30} yang strukturnya telah banyak mengalami modifikasi. Triterpen terbentuk melalui senyawa intermediet squalen yang terbentuk dari penggabungan dua molekul farnesyl PP (farnesyl pyrophosphate). Triterpen pada tanaman Jarak Merah terletak secara spesifik pada bagian daun yang terdiri dari $(2\alpha,13\alpha,14\beta,20S)$ -2,24,25-Trihydroxylanost-7-en-3-one dan $(13\alpha,14\beta,20S)$ -2,24,25-Trihydroxylanost-1,7-dien-3-one (Félix-silva dkk., 2014).



$(13\alpha,14\beta,20S)$ -2,24,25-Trihydroxylanosta-1,7-dien-3-one

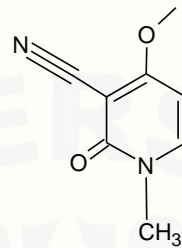


$(2\alpha,13\alpha,14\beta,20S)$ -2,24,25-Trihydroxylanost-7-en-3-one

Gambar 2.5 Senyawa golongan triterpen

2.3.4 Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan senyawa metabolit sekunder yang memiliki kemiripan sifat dengan alkali. Alkaloid pada tanaman berperan sebagai sumber basa karena alkaloid mengandung nitrogen organik yang diturunkan dari asam amino. Kandungan alkaloid yang terdapat pada daun Jarak Merah yang telah dilaporkan yaitu Ricinine (Félix-silva dkk., 2014).

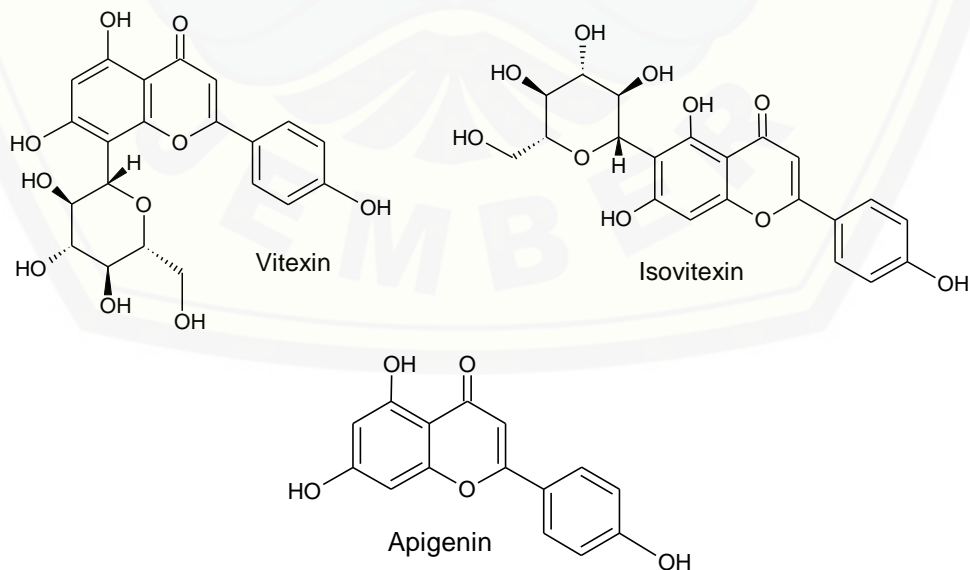


Ricine

Gambar 2. 6 Senyawa golongan alkaloid

2.3.5 Flavonoid

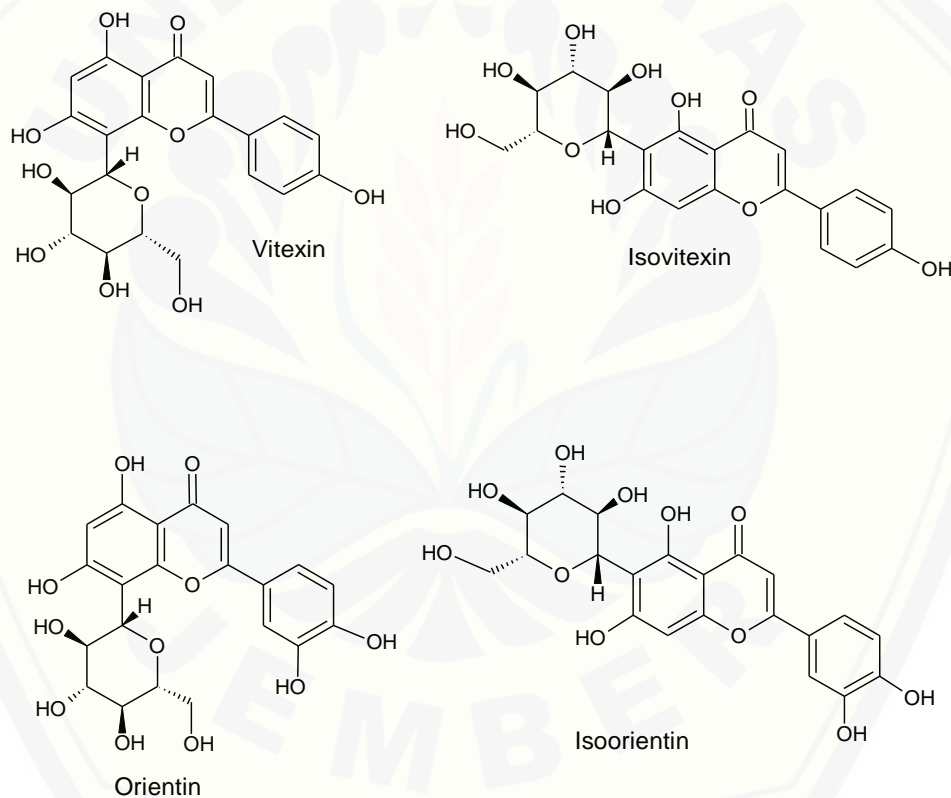
Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdiri dari 15 atom karbon. Flavonoid sebagian besar telah dilaporkan sebagai besar sebagai glikosida dan sebagian lagi sebagai flavonoid aglikon. Senyawa golongan flavonoid yang ditemukan pada daun Jarak Merah meliputi apigenin, vitexin, isovitexin .

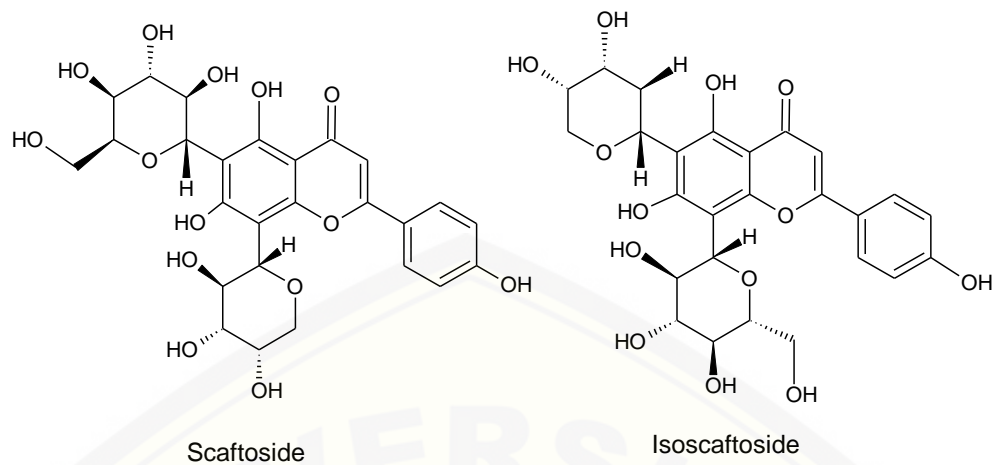


Gambar 2. 7 Senyawa golongan flavonoid

2.3.6 Glikosida

Senyawa metabolit sekunder tanaman ditemukan terikat pada gula disebut sebagai glikosida. Senyawa tersebut terikat dengan gula melalui ikatan glikosidik. Glikosida yang ditemukan pada tanaman dapat berupa kardiak glikosida. Kardiak glikosida ditemukan sangat beracun pada sejumlah tanaman. Kardiak glikosida biasanya terdiri dari aglikon (secara struktural terikat dengan hormon steroid) yang terikat dengan satu atau lebih molekul gula (Akinmoladun dkk., 2014). Daun Jarak Merah mengandung glikosida sebagai flavonoid-glikosida yang terdiri dari vitexin, isovitexin, orientin/isoorientin, dan schaftosida/isoschaftosida (Félix-silva dkk., 2014).





Gambar 2. 8 Senyawa golongan glikosida

2.4 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Tanaman obat saat ini telah menjadi pandangan sumber terapeutik terbesar mengingat kandungan fitokimia yang mengarah untuk pengembangan obat baru. Ekstraksi merupakan pemisahan senyawa aktif pada tanaman menggunakan pelarut selektif. Tujuan dari ekstraksi adalah untuk memisahkan metabolit tanaman yang larut dengan bagian yang tidak larut (residu). *Crude* awal pada metode ini mengandung metabolit tanaman yang kompleks seperti alkaloid, glikosida, fenolik, terpenoid, dan flavonoid (Azwanida, 2015).

Maserasi merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk ekstraksi dari sampel tanaman. Maserasi dilakukan dengan cara merendam bahan tanaman berupa padatan kasar atau bubuk dalam pelarut menggunakan wadah tertutup serta dibiarkan pada suhu kamar minimum 3 hari dan disertai pengadukan. Proses peredaman ini bertujuan untuk melunakkan dan menghancurkan dinding sel tanaman sehingga senyawa fitokimia terlarut dapat terekstrak. (Handa Sukhadev, dkk, 2008). Ekstrak *crude* yang dihasilkan dari proses maserasi umumnya mengandung berbagai campuran senyawa metabolit sekunder. Namun, dalam beberapa kasus tanaman dari keluarga yang sama dengan tanaman sampel dapat dijadikan sebagai literatur untuk memprediksi senyawa yang kemungkinan terkandung pada ekstrak tertentu, sehingga hal tersebut diharapkan dapat membantu pemilihan pelarut yang sesuai untuk proses fraksinasi dalam mengekstrak kelas

senyawa tertentu, seperti saponin, alkaloid, dan fenolik. Produk alami tanaman umumnya di ekstraksi dengan pelarut yang memiliki polaritas semakin meningkat seperti n-heksana, diklorometana, dan etilasetat. (Otsuka, 2006). Ekstrak yang diperoleh dilakukan penimbangan untuk mengetahui persentase rendemen yang berdasarkan persamaan 2.1

$$\text{Persen rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\% \dots \text{Persamaan (2.1)}$$

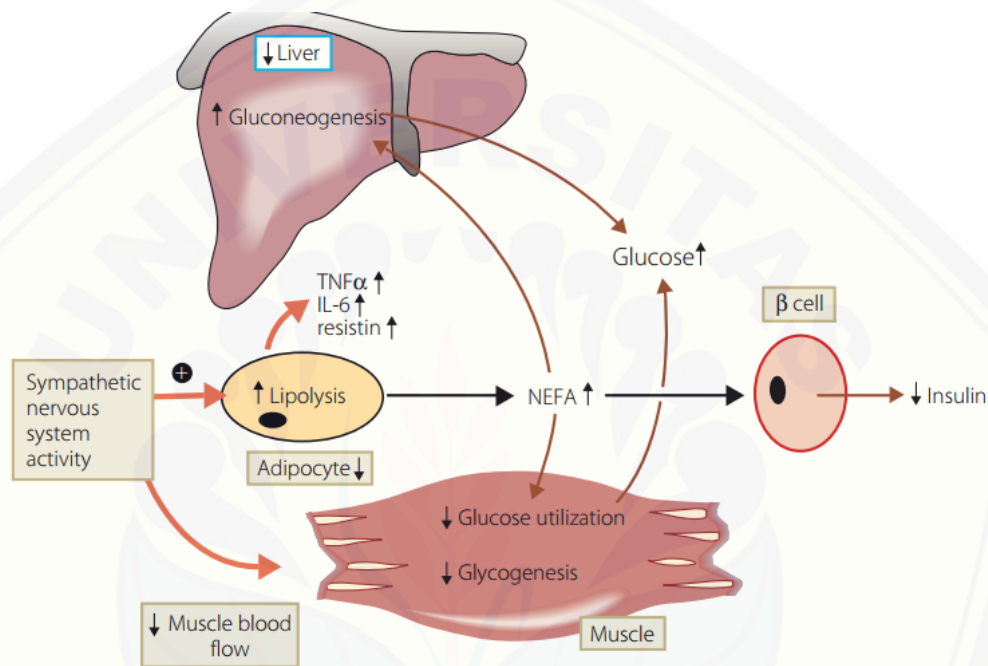
(Sayuti, 2017)

2.5 Diabetes Melitus

Diabetes melitus merupakan suatu kondisi peningkatan kadar glukosa darah secara kronis. Kondisi ini didasari oleh defisiensi hormon insulin (relatif atau tidak ada). Insulin merupakan hormon yang terlibat dalam pengangkutan glukosa darah untuk didistribusikan pada jaringan tubuh, sehingga hormon ini merupakan hormon yang dapat menjaga kestabilan kadar glukosa dalam darah pada kondisi normal. Diabetes melitus terbagi menjadi dua kategori, diabetes melitus tipe 1 adalah tipe diabetes yang diakibatkan oleh kerusakan autoimun dari sel β pulau Langerhans penghasil insulin pada pankreas (defisiensi absolut), sedangkan diabetes tipe 2 terjadi akibat gangguan sekresi insulin dan resistensi insulin (Gambar 2.2) yang seringkali terkait dengan obesitas (defisiensi relatif) (Holt dkk., 2010). Diabetes melitus tipe 2 merupakan tipe diabetes yang paling umum, terhitung sekitar 90% dari keseluruhan kasus diabetes. Pada diabetes tipe 2, hiperglikemia atau tingginya kadar glukosa dalam darah adalah hasil dari produksi insulin yang tidak memadai dan ketidakmampuan tubuh untuk merespon sepenuhnya terhadap insulin atau disebut dengan resistensi insulin. Selama keadaan resistensi insulin jumlah insulin dalam darah menjadi tidak efektif, hal tersebut mendorong untuk peningkatan produksi insulin untuk mengurangi kadar glukosa, namun seiring berjalannya waktu keadaan tersebut dapat menyebabkan terjadinya resistensi insulin yang lebih parah (Diabète, 2017).

Pankreatitis akut telah dikonfirmasi meningkatkan aktivitas α -amilase pada diabetes tipe 2. Aktivitas amilase yang tidak terkontrol dapat menyebabkan

hiperglikemia atau tingginya kadar glukosa dalam darah (Abou-Seif dan Youssef, 2004). Selain α -amilase, enzim yang berperan dalam proses pemecahan karbohidrat adalah α -glukosidase. Kedua enzim tersebut merupakan enzim yang terlibat dalam pencernaan karbohidrat. α -amilase merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis karbohidrat berantai panjang, sedangkan α -glukosidase mengkatalisis pati dan disakarida menjadi glukosa (Nair dkk., 2013).



Gambar 2. 9 Mekanisme resistensi insulin pada diabetes tipe 2. (Holt dkk., 2010).

Diabetes melitus tipe 2 dapat didiagnosis dengan mengidentifikasi hiperglikemia. Hiperglikemia merupakan suatu kondisi tingginya kadar glukosa dalam darah. *World Health Organization (WHO) American Diabetes Association (ADA)* telah menggunakan plasma glukosa puasa 7 mmol/L atau lebih tinggi untuk menentukan diagnosa diabetes tipe 2 (Tabel 2.2)

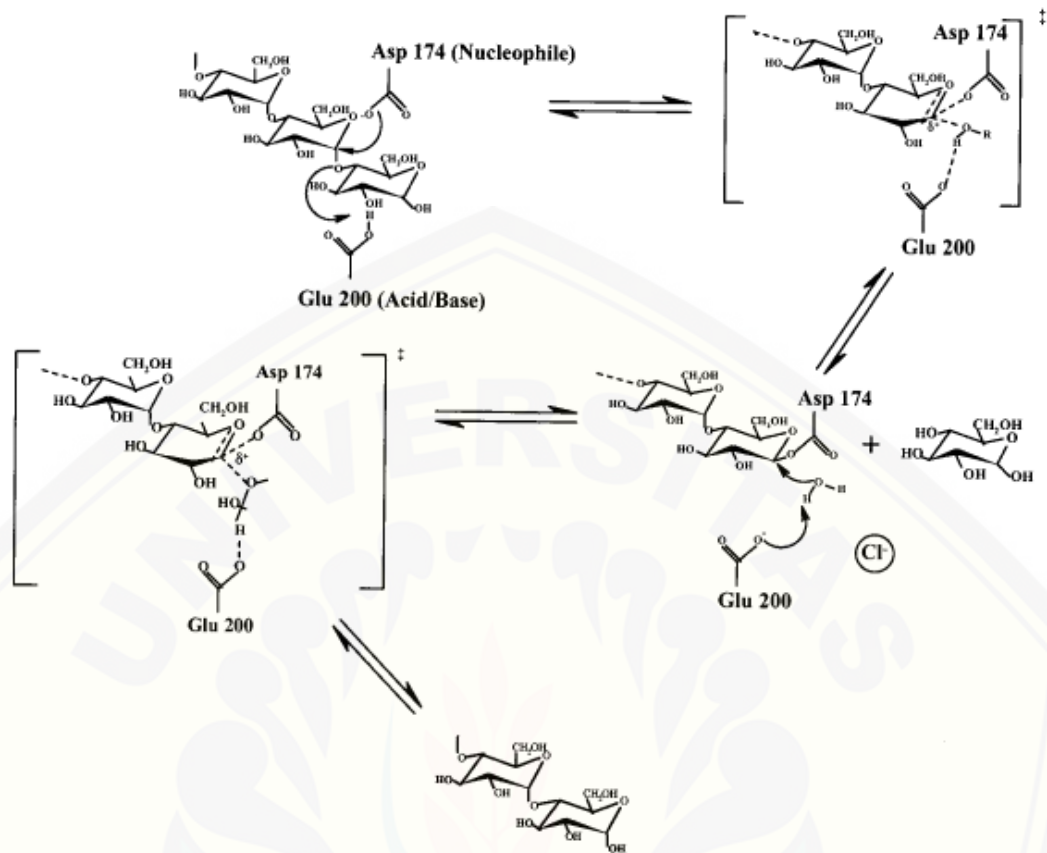
Tabel 2. 2 Klasifikasi glukosa puasa intoleransi untuk diabetes tipe 2 menurut WHO dan ADA(Holt dkk., 2010)

Glukosa darah puasa (mmol/L)	Sampel darah		
	Plasma	Kapiler	Keseluruhan
Normal	<6,1	<5,6	<5,6
Glikemia puasa terganggu	6,1-6,9	5,6-6,0	5,6-6,0
Diabetes	≥7,0	≥6,1	≥6,1
2 Jam glukosa darah			
Normal	<7,8	<7,8	<6,7
Glikemia puasa terganggu	7,8-11,0	7,8-11,0	6,7-9,9
Diabetes	≥11,0	≥11,0	≥10,0

2.6 Inhibitor enzim sebagai Antidiabetik

2.6.1 Enzim yang terlibat dalam Diabetes mellitus tipe 2.

Diabetes melitus tipe 2 merupakan kondisi klinis yang ditandai dengan hiperglikemia. Hal ini terjadi akibat adanya gangguan pada metabolisme karbohidrat karena pankreas tidak menghasilkan cukup insulin atau terjadi resistensi insulin. Enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat antara lain α -amilase (Nair dkk., 2013). α -amilase merupakan enzim yang berperan dalam hidrolisis karbohidrat berantai panjang menjadi glukosa dan dekstrin dengan memutus ikatan α 1,4-glikosil polisakarida (Aghajari dkk., 2002). Mekanisme hidrolisis karbohidrat oleh α -amilase ditunjukkan pada Gambar 2.3

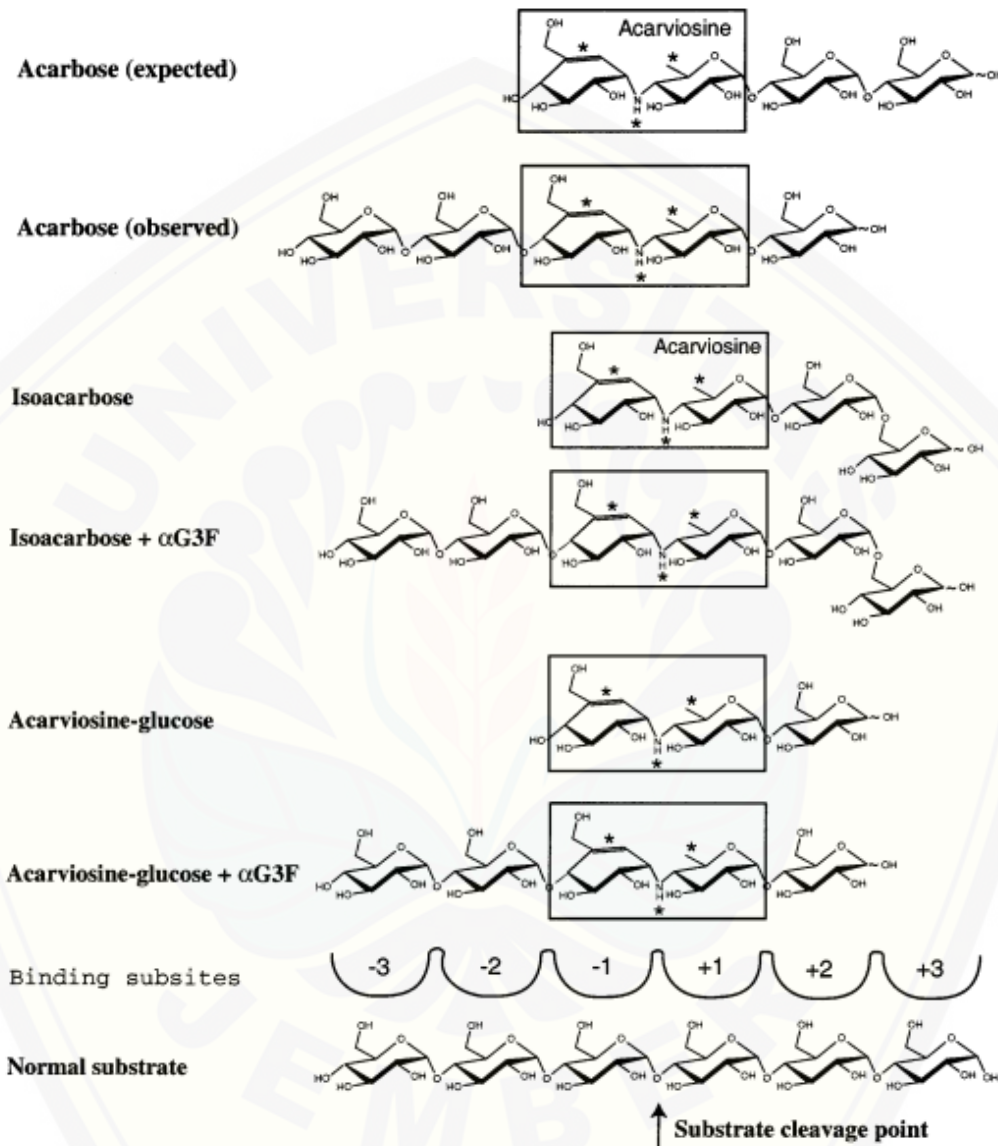


Gambar 2. 10 Mekanisme hidrolisis karbohidrat oleh α -amilase menjadi glukosa dan dekstrin (Aghajari dkk., 2002).

2.6.2 Inhibitor enzim dan mekanisme inhibisi enzim

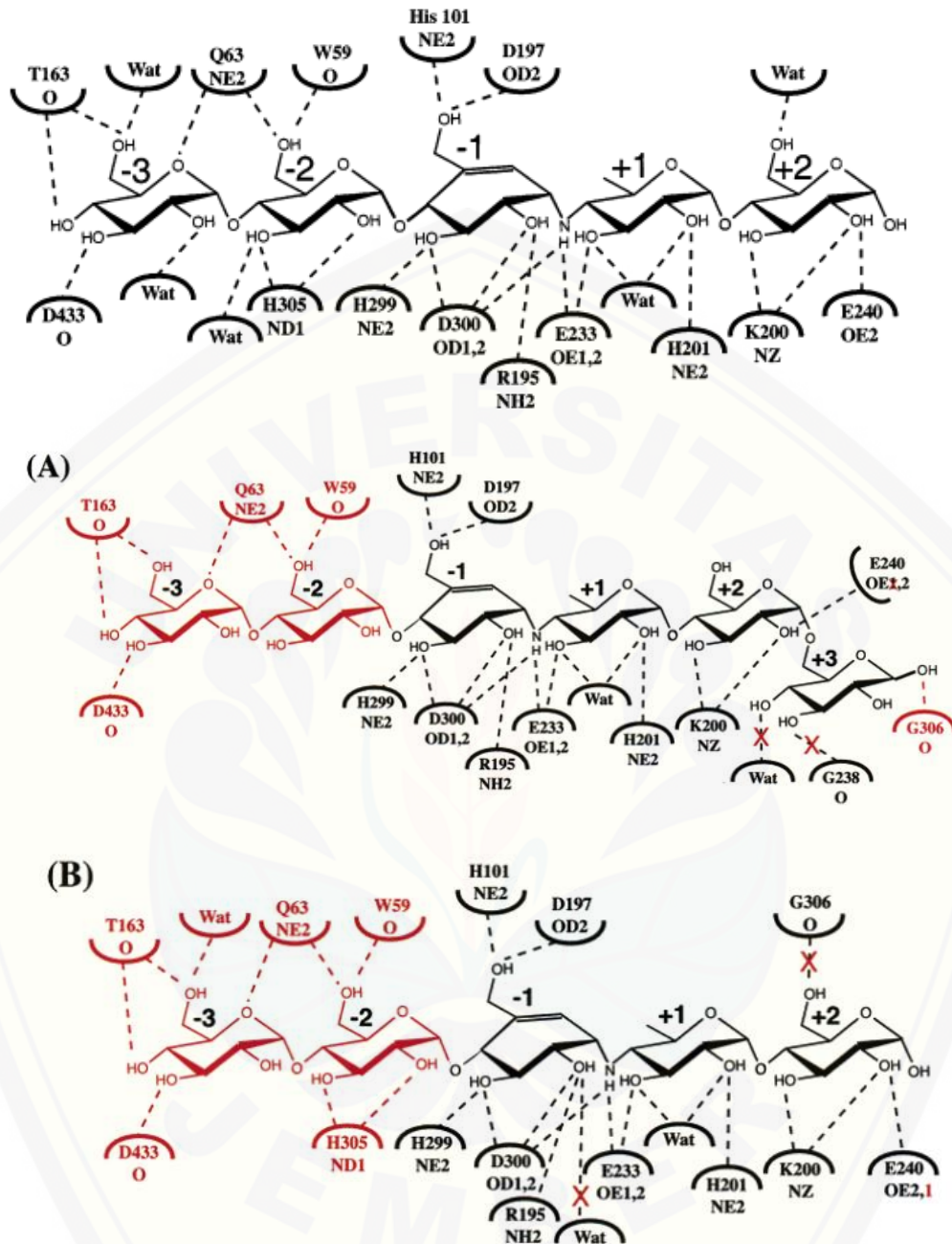
Pendekatan terapeutik untuk diabetes melitus tipe 2 merupakan cara yang efektif untuk mengontrol hiperglikemia. Hal ini dapat dicapai dengan melakukan penghambatan atau inhibisi terhadap enzim penghidrolisis karbohidrat seperti α -amilase dan α -glukosidase. Kedua enzim tersebut memiliki peranan sebagai enzim pencernaan utama yang membantu penyerapan glukosa dalam usus. Inhibitor merupakan agen yang dapat mengambat ataupun menghentikan reaksi enzimatik. Inhibitor α -amilase merupakan target potensial untuk pengembangan pengobatan terapeutik pada diabetes (Nair dkk., 2013). Akarbosa termasuk dalam inhibitor agen antidiabetik oral noninsulinotropik sintetik. Akarbosa selain memainkan peranan dalam penyerapan karbohidrat dalam , tetapi juga berperan secara tidak langsung dalam optimasi metabolisme glukosa, karena berkontribusi terhadap adaptasi

sekresi insulin (Rosak dan Mertes, 2012). Struktur akarbosa ditunjukkan oleh Gambar 2.11 dan mekanisme inhibisi akarbosa melalui interaksi ikatan hidrogen dengan sisi aktif enzim di tunjukkan gambar 2.12 berikut



Gambar 2. 11 Struktur Akarbosa

Sumber: (Li dkk., 2005)



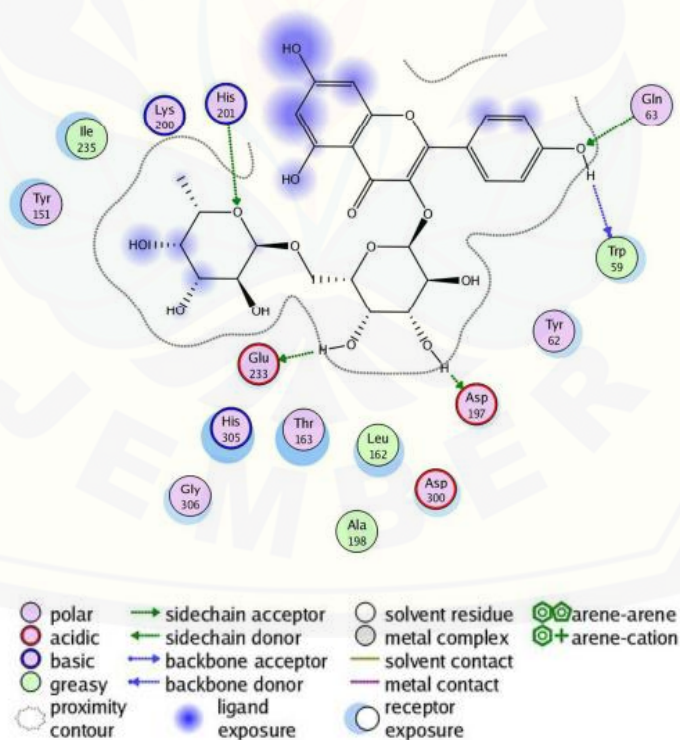
Gambar 2. 12 Interaksi ikatan hidrogen antara akarbosa dengan sisi aktif enzim (a) isoacarbose (b) akarviosin-glukosa

Sumber: (Li dkk., 2005)

Isoakarbose dan akarviosin-glukosa merupakan analog akarbosa yang ditemukan berikatan kuat dengan α -amilase mamalia. Meski akarbosa merupakan inhibitor yang efektif, namun dalam penggunaannya beberapa masalah masih menjadi kontroversi (Li dkk., 2005). Akarbosa dapat memberikan efek jangka panjang

terhadap penurunan aktivitas metabolisme glukosa. Sejumlah besar uji coba terkontrol dan pengawasan lebih dari 20 tahun pengalaman klinis akarbosa belum menunjukkan toksisitas yang signifikan. Namun, efek samping gastrointestinal atau pendarahan saluran cerna dari akarbosa telah menjadi salah satu faktor pembatas untuk pengobatan (Rosak dan Mertes, 2012).

Berdasarkan efek samping dan keterbatasan dari inhibitor sintetik, produk alami dari tumbuhan dapat digunakan untuk pengobatan diabetes. Penelitian yang luas tentang pengembangan bioaktif tumbuhan yang bersifat sebagai inhibitor telah banyak dilakukan dan sedang dikembangkan (Nair dkk., 2013). Pada penelitian yang dilakukan oleh Hua dkk (2018) kandungan flavonoid glikosida dari teh hijau dapat digunakan sebagai inhibitor alami dengan memberikan efek inhibisi terhadap α -amilase. Interaksi antara enzim dengan inhibitor alami senyawa golongan flavonoid glikosida dari teh hijau *Lu'an GuaPian* ditunjukkan oleh Gambar 2.12 berikut ini.

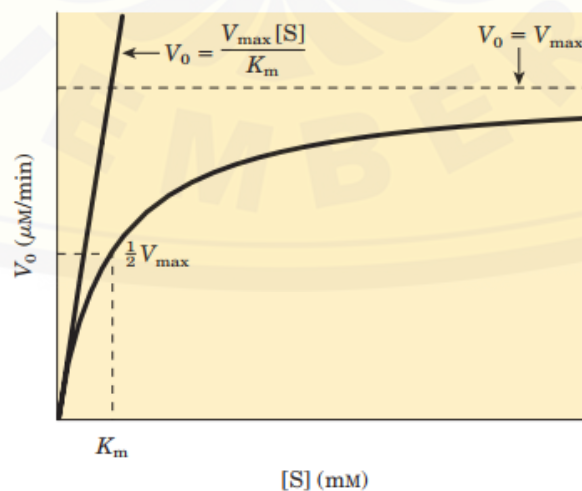


Gambar 2. 13 Interaksi molekular antara flavonoid glikosida dengan sisi aktif α -amilase (Hua dkk., 2018)

Selain kandungan flavonoid dari teh hijau, beberapa senyawa alami dari tanaman yang pernah diteliti dan dapat digunakan sebagai inhibitor alami antara lain senyawa golongan flavonoid seperti quercetin, kaemferol, guijeverin, avicularin, myrecetin, hyperin, dan apigenin dari daun jambu (*Psidium guajava* Linn) (Wang dkk., 2010), senyawa *apigenin-7-O-3-D-glucopyranoside*, *catechin*, *quercetin*, *rutil*, yang diisolasi dari tanaman *Agrimonia eupatoria* (*Rosaceae*), senyawa *vitexin-200-O-rhamnoside*, *200-xylosylvitexin*, *isorhamnetin 3-gentiobioside* dari tanaman *Beta vulgaris* (*Chenopodiaceae*) (Patil dkk., 2011), dan senyawa golongan flavonoid, tanin, serta *ascorbic acid* (Vit C) dari ekstrak daun *Jatropha curcas* L (Nwamarah dkk, 2015).

2.6.3 Kinetika inhibisi enzim dan tipe inhibisi

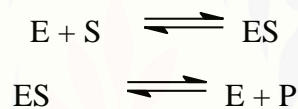
Kinetika enzim merupakan suatu pendekatan yang dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme katalisis oleh enzim disertai dengan penentuan laju reaksi serta perubahannya. Faktor utama yang mempengaruhi laju reaksi katalisis oleh enzim adalah konsentrasi substrat [S], namun hal ini diperumit dengan berubahnya konsentrasi substrat [S] selama jalannya reaksi perubahan substrat menjadi produk. Salah satu pendekatan penyederhaan dalam kinetika adalah mengukur laju awal (V_0) ketika [S] jauh lebih besar dari konsentrasi enzim. Hubungan antara V_0 dan [S] dinyatakan dalam Gambar 2.6



Gambar 2. 14 Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi. Sumber: (David L. Nelson; Michael M.Cox, 2004)

Pada konsentrasi substrat yang lebih tinggi V_0 meningkat dengan jumlah yang lebih kecil sebagai respon dari peningkatan $[S]$ hingga pada suatu titik diperoleh V_0 mendekati kecepatan maksimum, V_{max} . (David L. Nelson; Michael M.Cox, 2004).

Persamaan Michaelis-Menten merupakan dasar dari kinetika inhibisi enzim. Persamaan ini berawal dari postulat Leonor Michaelis dan Maud Menten pada tahun 1913 menyatakan bahwa reaksi enzimatik terbagi menjadi dua tahap. Tahap pertama yaitu reaksi antara enzim $[E]$ dengan substrat $[S]$ menghasilkan intermediet enzim-substrat $[ES]$ berlangsung secara cepat dan reversibel, dan reaksi tahap kedua yaitu penguraian intermediet enzim-substrat $[ES]$ menjadi produk $[P]$ dan enzim bebas $[E]$ berjalan secara lambat dan reversibel. Enzim-substrat $[ES]$ dalam hal ini bertindak sebagai pereaksi pembatas. Persamaan reaksi enzimatik yang dikemukakan oleh Michaelis-Menten yaitu sebagai berikut :



Michaelis-Menten menurunkan persamaan matematis berdasarkan hipotesisnya menggunakan pereaksi pembatas enzim-substrat $[ES]$ sehingga dihasilkan suatu persamaan sebagai berikut :

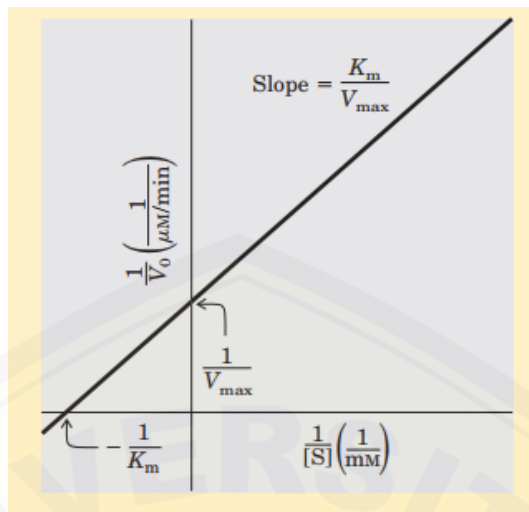
$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Persamaan (2.2)}$$

dengan V_0 = kecepatan awal reaksi, V_{max} = kecepatan maksimum, dan K_M = Konstanta Michaelis-Menten (David L. Nelson; Michael M.Cox, 2004)

Persamaan Michaelis-Menten yang diperoleh dari kurva pada Gambar 2.13 (persamaan 2.2) dapat di transformasi menjadi suatu persamaan yang dapat digunakan untuk mengolah data eksperimen dengan membalik persamaan Michaelis-Menten sehingga dihasilkan suatu persamaan baru yang disebut dengan persamaan Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \quad \text{Persamaan (2.3)}$$

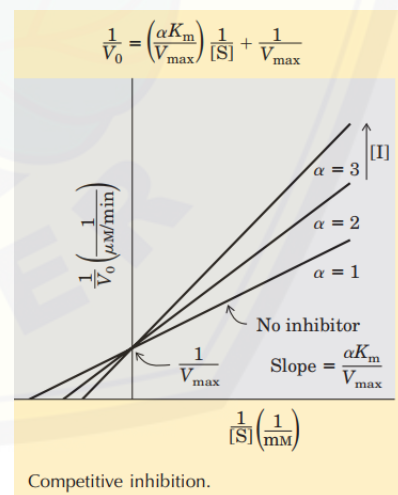
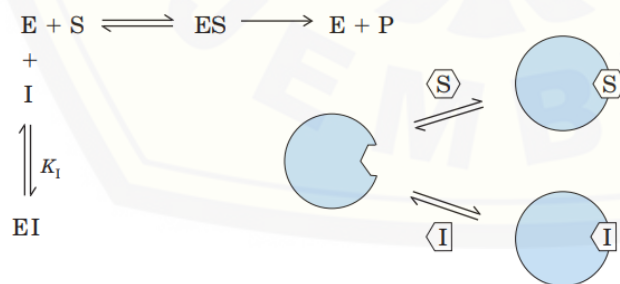
Persamaan Lineweaver-Burk dapat diplotkan menjadi plot Lineweaver-Burk seperti pada Gambar 2.7



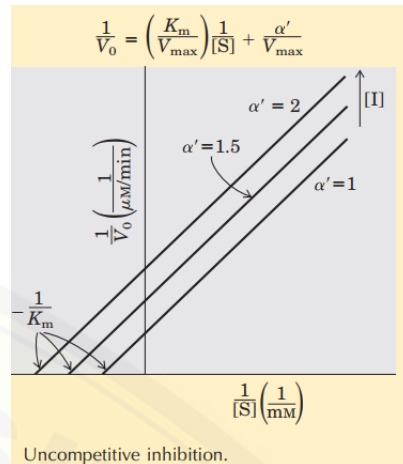
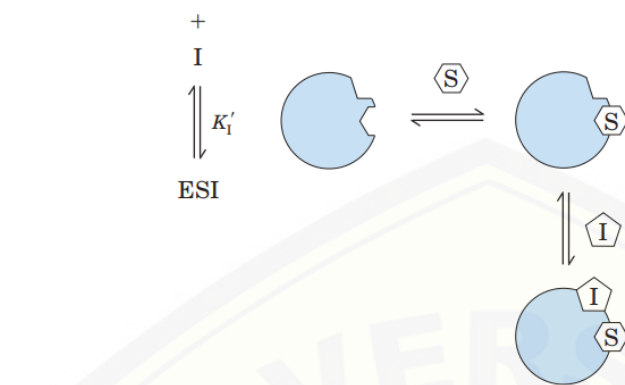
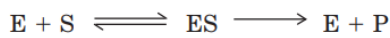
Gambar 2. 15 Plot Lineweaver-Burk (David L. Nelson; Michael M.Cox, 2004).

Plot Lineweaver-Burk dapat digunakan sebagai uji kinetika untuk menentukan mekanisme tipe inhibisi enzim. Mekanisme inhibisi enzim dapat terjadi secara reversibel maupun irreversibel bergantung pada kekuatan interaksi antara residu katalitik enzim dengan inhibitorynya. Tipe inhibisi enzim secara reversibel terbagi menjadi tiga jenis yaitu kompetitif, unkompetitif, dan campuran (nonkompetitif). Gambar 2.8 menunjukkan tipe mekanisme inhibisi enzim yang disertai dengan plot Lineweaver-Burk

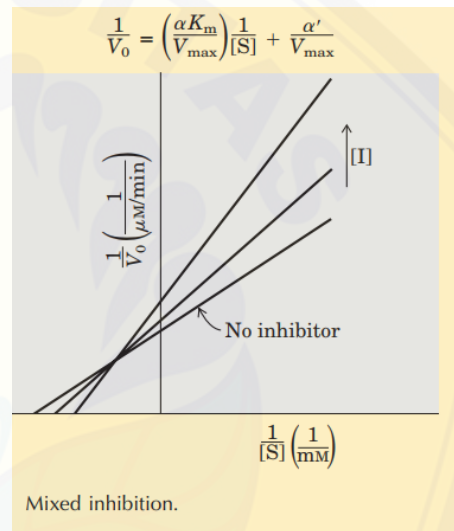
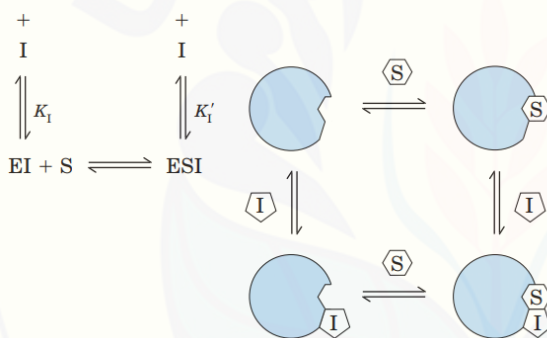
(a) Competitive inhibition



(b) Uncompetitive inhibition



(c) Mixed inhibition



Gambar 2. 16 Tipe inhibisi enzim secara reversibel

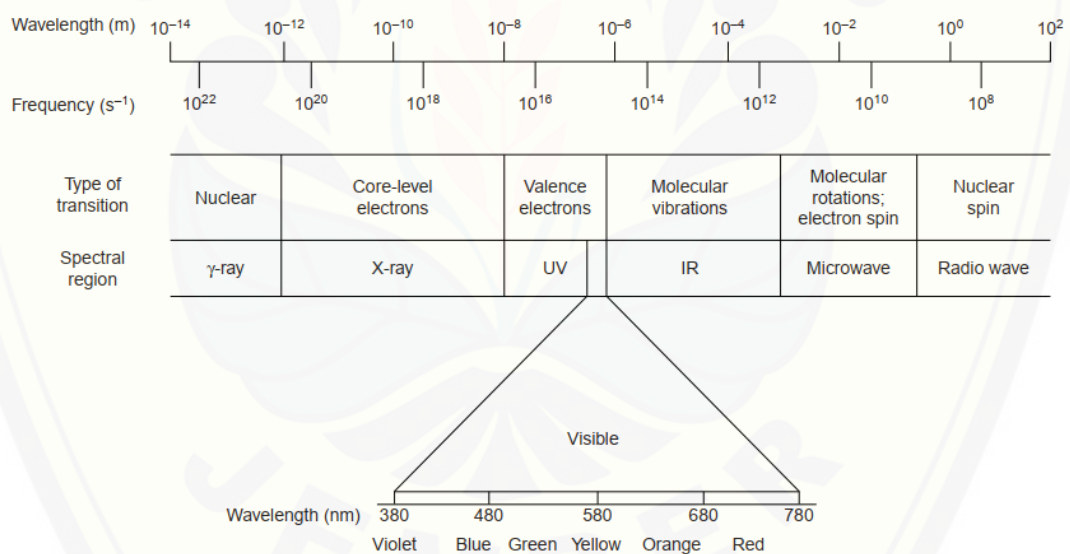
(David L. Nelson; Michael M.Cox, 2004)

Inhibisi kompetitif terjadi apabila inhibitor dan substrat berkompetisi untuk berinteraksi dengan sisi aktif enzim. Inhibitor kompetitif bergabung dengan enzim membentuk kompleks enzim-inhibitor (EI) sehingga menghambat proses terjadinya katalisis. Inhibisi unkompetitif menghambat proses katalisis dengan cara terikat pada sisi aktif yang berbeda dengan substrat. Inhibitor ini dapat terikat pada enzim ketika substrat telah melekat pada sisi aktif enzim, sehingga terbentuk kompleks enzim-substrat-inhibitor (ESI). Inhibisi kompetitif dan unkompetitif dapat terjadi secara bersamaan menghasilkan tipe inhibisi campuran (nonkompetitif), pada tipe penghambatan ini enzim dapat terikat pada sisi aktif enzim tempat substrat melekat

(kompetitif) maupun dengan cara melakukan penghambatan dengan melekat pada sisi aktif yang berbeda dengan substrat setelah substrat terikat pada sisi aktif (unkompetitif) (David L. Nelson; Michael M.Cox, 2004).

2.7 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisa spektroskopi menggunakan sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet (UV) dengan rentang panjang gelombang 190-380 nm dan panjang gelombang sinar tampak (*Visible*) pada panjang gelombang 380-780 nm dengan menggunakan instrumen spektrofotometer. Spektrofotometer sebagai sumber sinar terdiri dari spektrum kontinyu sehingga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif suatu sampel berdasarkan absorpsi spektroskopi. Daerah spektrum sinar pada gelombang elektromagnetik ditunjukkan oleh Gambar 2.9



Gambar 2. 17 Daerah spektrum radiasi elektromagnetik(Harvey, 2000).

Absorpsi spektroskopi terjadi ketika seberkas radiasi elektromagnetik melewati sampel, pada keadaan ini sebagian radiasi ditransmisikan tanpa kehilangan intensitas, tetapi pada frekuensi yang dipilih intensitas dari radiasi dilemahkan. Pada radiasi ultraviolet dan *visible* interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan sampel menyebabkan terjadinya transisi elektronik

menghasilkan perbedaan energi ΔE yang besarnya sama dengan energi radiasi elektromagnetik (Harvey, 2000).

Absorbansi merupakan metode alternatif yang dapat digunakan untuk mengetahui penyerapan suatu radiasi elektromagnetik oleh sampel. Hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi sampel dijelaskan pada persamaan berdasarkan Hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi sesuai persamaan 2.4 berikut

$$A = \epsilon b C \quad \text{Persamaan (2.4)}$$

dengan A= Absorbansi,

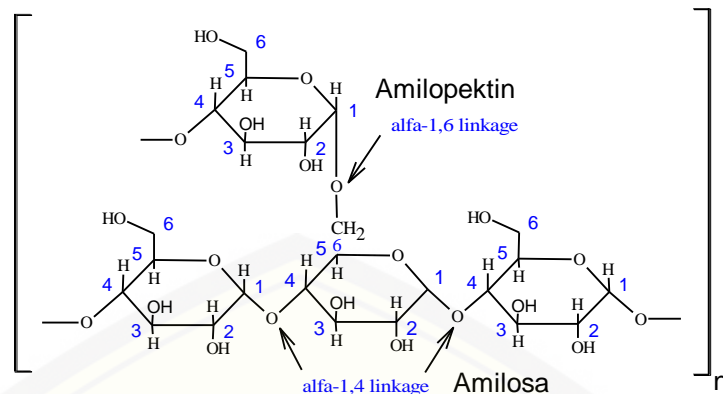
ϵ = Absorbktivitas molar (M⁻¹ cm⁻¹),

C= Konsentrasi larutan (M)

(Harvey, 2000)

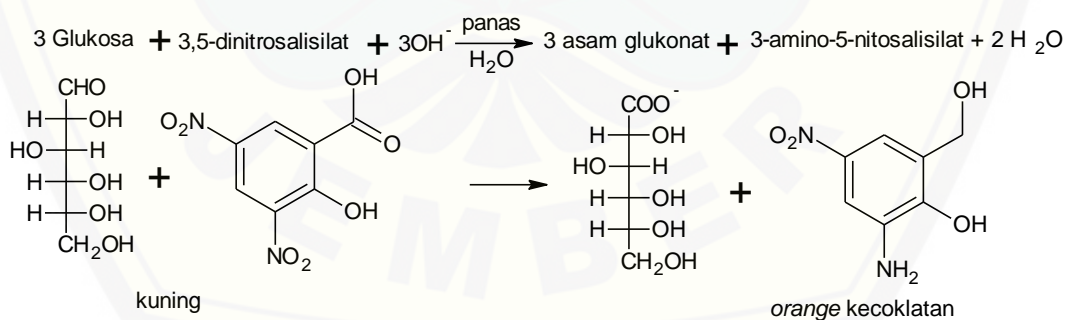
2.8 Prinsip Analisis Inhibisi α -amilase

Amilum atau pati merupakan polisakarida yang terdiri dari amilosa dan amilopektin. Pati umumnya mengandung 20-30% amilosa dan 70-80% amilopektin. Amilosa dan amilopektin adalah gula yang berbeda dalam strukturnya. Amilosa merupakan polimer dari α -D-glukosa dengan ikatan α -1,4 glikosida sedangkan amilopektin merupakan polimer dari α -D-glukosa dengan ikatan α -1,6. Kandungan amilosa dapat memberikan sifat semikristalin pada pati, sedangkan kandungan amilopektin dapat meningkatkan sifat kristal dari pati akibat amilopektin dengan rantai panjang dan sedang dapat membentuk jaringan kristal yang kuat (Cornejo-Ramírez dkk., 2018). Amilum terlarut terhidrolisis oleh α -amilase menjadi oligosakarida yang lebih pendek melalui pemutusan ikatan α -1,4-glikosida. Produk akhir dari hidrolisis pati oleh α -amilase berupa campuran oligosakarida seperti maltotriosa, maltosa, dan oligosakarida bercabang dengan 6-8 unit glukosa yang mengandung ikatan α -1,4 atau α -1,6 yang ditunjukkan pada Gambar 2.17 (de Sales dkk., 2012).



Gambar 2. 18 Struktur Amilum

Reaksi hidrolisis oleh α -amilase dapat dihentikan dengan pemanasan, sebab pemanasan dapat menyebabkan protein dari enzim terdenaturasi sehingga mengubah struktur enzim dan aktivitasnya hilang. Produk reaksi hidrolisis setelah dihentikan, konsentrasi dari produk ditentukan dengan menggunakan reagen pewarna asam dinitrosalisilat (DNS). Reagen DNS akan direduksi oleh setiap gula pereduksi yang terdapat dalam larutan sehingga produk campuran tersebut dapat ditentukan konsentrasinya. Reaksi reduksi DNS oleh gula pereduksi ditunjukkan oleh Gambar 2.8. Senyawa 3-amino-5-nitrosalisilat yang dihasilkan dari reaksi tersebut memiliki warna *orange* kecoklatan dengan panjang gelombang maksimum 540 nm.



Gambar 2. 19 Reaksi reduksi DNS oleh gula pereduksi(Timmerman, tanpa tahun)

Penambahan inhibitor pada reaksi hidrolisis α -amilase akan menurunkan konsentrasi produk yang dihasilkan dari proses hidrolisis.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan bulan April sampai dengan November 2019 di Laboratorium Nutrasetikal dan Farmasetikal *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) dan Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

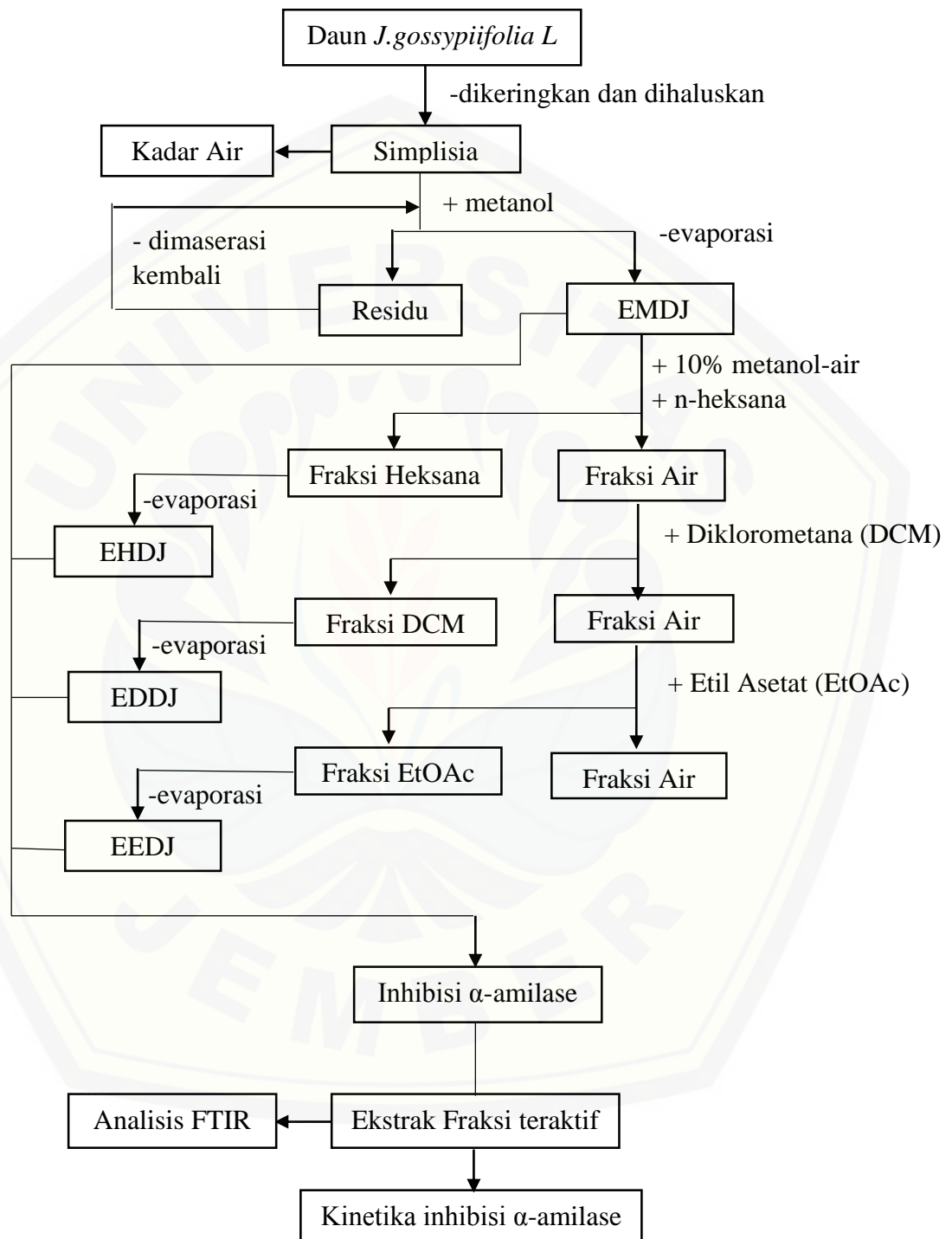
3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri 3 golongan antara lain alat gelas, nongelas, dan instrumen. Peratalatan gelas meliputi erlenmeyer (500 mL, 250 mL, 125 mL) , beaker (250 mL, 500 mL, 1000 mL) ,corong pisah, corong, labu ukur (5mL, 10mL, 25mL, 100mL), gelas ukur (100mL, 50 mL, 10 mL). Peralatan instrumen meliputi blender (Warring Commercial), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2900), oven (Froilabo) , timbangan analitik (Swiss made ES225SMDR), *water bath* (Stuart SBS40) , vortex (Vortex Genie-2), pH meter (Horiba F-51), hotplate *stirrer* (Stuart), *dry block* (Technne Dri-Block DB-2D), *rotary evaporator* (Steroglass Strike 300), dan *digital moisture tester* (Sartorius MA-150), sedangkan peralatan non gelas meliputi mikro pipet 20-200 μ L (Socorex), mikropipet 100-1000 μ L (eppendorf), *aluminium foil* , ayakan 60 mesh ,spatula,gunting, plastik, dan *microtube*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain daun Jarak merah (*Jatropha gossypifolia L*), metanol pa (SmartLab), *n*-heksana (*distilled*), diklorometana (*distilled*), etil asetat (*distilled*), akubiades, α -amilase (Sigma-Aldrich), maltosa (Merck), dimetilsulfoksida (DMSO) (Merck), natrium dihidrogen fosfat monohidrat (Merck), dinatrium hidrogen fosfat (Merck), fenol (Sigma-Aldrich) , natrium hidoksida (Merck), akarbosa (Glucobay), Amilum (Merck), asam 3,5 dinitrosalisilat (Merck), natrium sulfit (Merck), kalium natrium tartarat (Merck), akuabides (MiliQ).

3.3 Rancangan Penelitian



* EMDJ (Ekstrak Kasar Metanol Daun *J.gossypifolia*) , EHDJ (Ekstrak Fraksi Heksana Daun *J.gossypifolia*), EDDJ (Ekstrak Fraksi Diklorometana Daun *J.gossypifolia*), EEDJ (Ekstrak Fraksi Etil Asetat Daun *J.gossypifolia*).

3.4 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sampling

Pengambilan sampel dilakukan di lingkungan Taman Nasional Bromo Tengger Semeru Kabupaten Probolinggo. Peralatan yang digunakan untuk mengambil sampel antara lain, gunting tanaman, pisau dan serta wadah sampel berupa kresek hitam dan karung. Bagian tanaman yang diambil antara seluruh bagian tanaman untuk dilakukan validasi, namun yang digunakan sebagai sampel adalah bagian daun. Sampel kemudian dipisahkan dalam wadah yang telah di label sesuai dengan sampel tanaman. Validasi sampel tanaman dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember ditunjukkan pada Lampiran 3.1.

3.4.2 Pembuatan Simplisia Daun *J.gossypifolia* L.

Daun tanaman *J.gossypifolia* L. di potong-potong kemudian dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung serta dikering anginkan hingga kering. Sampel yang sudah kering kemudian di blender untuk menghaluskan sampel hingga menghasilkan serbuk simplisia dan diseragamkan ukurannya menggunakan ayakan 60 mesh. Sampel yang sudah dihaluskan tersebut di simpan dalam wadah plastik klip untuk digunakan pada proses ekstraksi.

3.4.3 Penentuan Kadar Air Simplisia Daun *J.gossypifolia* L.

Penentuan kadar air simplisia dilakukan pada suhu 105°C dengan menggunakan instrumen *digital moisture tester* (Sartorius MA-150). Simplisia sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam cawan dari instrumen dan instrumen ditutup. Pengukuran kadar air dilakukan secara otomatis oleh instrumen setelah instrumen ditekan *start*, proses pengukuran kadar air oleh instrumen akan terus berjalan hingga pengukuran selesai. Instrumen akan berhenti secara otomatis dan muncul petunjuk *end* apabila pengukuran kadar air telah selesai dan data kadar air dalam sampel akan muncul dalam persen. Pengukuran kadar air simplisia dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

3.4.4 Ekstraksi Simplisia Daun *J.gossypifolia L.*

Ekstraksi simplisia daun *J.gossypifolia L.* dilakukan dengan metode maserasi dilanjutkan dengan fraksinasi pelarut secara bertingkat. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah metanol, sedangkan pelarut yang digunakan untuk fraksinasi berturut-turut adalah heksana, diklorometana, dan etil asetat. Simplisia daun *J.gossypifolia L.* sebanyak 50 gram dimasukkan dalam erlenmeyer 500 mL untuk kemudian ditambahkan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 (w/v). Sampel yang telah ditambahkan pelarut kemudian dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 300 rpm (*rotation per minute*) hingga 24 jam. Sampel kemudian disaring dan ditampung filtratnya dengan wadah dan dilakukan maserasi kembali dengan metanol hingga filtrat yang diperoleh tidak berwarna. Filtrat yang telah tertampung kemudian dievaporasi pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pada 40 °C. Ekstrak yang diperoleh dalam bentuk pasta padat berupa ekstrak kasar metanol disimpan untuk analisis selanjutnya. Ekstrak kasar metanol dengan perbandingan 1:50 (w/v) dilarutkan dalam 10% metanol-air atau 0,5 gram ekstrak kasar metanol dilarutkan dalam 10% metanol-air sebanyak 25 mL, dan dilakukan proses fraksinasi bertingkat secara bertahap menggunakan tiga jenis pelarut dengan *index polarity* berbeda (n-heksana, diklorometana, dan etil asetat) dengan perbandingan 1:1 (v/v). Setiap fraksi pelarut yang diperoleh dari setiap fraksinasi dipisahkan dari fraksi air menggunakan corong pisah. Pelarut pada setiap fraksi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh rendemen masing-masing ekstrak fraksi. Rendemen yang diperoleh dapat ditentukan berdasarkan persamaan 3.1

$$\text{Persen rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak diperoleh (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\% \dots \text{Persamaan (3.1)}$$

3.4.5 Pembuatan Kurva Standar Maltosa

Larutan maltosa standar dibuat dengan stok 4000 µM dengan pelarut buffer fosfat pH 6,9, perhitungan terdapat pada Lampiran 4. Larutan maltosa standar

dibuat dengan variasi konsentrasi 200 μM , 400 μM , 800 μM , 1200 μM , 1600 μM , 2000 μM , dan 2400 μM dari larutan stok, perhitungan pengenceran terdapat pada Lampiran 4. Larutan dari masing-masing variasi konsentrasi diambil sebanyak 160 μL dan dimasukkan kedalam *microtube* yang berbeda, kemudian ditambahkan reagen DNS 80 μL kedalam masing-masing *microtube* dan dipanaskan selama 5 menit. Larutan kemudian diencerkan dengan 720 μL akubides. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm, dengan buffer fosfat pH 6,9 sebagai *blanko*. Nilai masing-masing absorbansi dari variasi konsentrasi dilakukan *plotting* menjadi kurva standar maltosa.

3.4.6 Uji Inhibisi α -amilase oleh Ekstrak Daun *J.gossypifolia L.*

Uji inhibisi α -amilase menggunakan metode (Ratnadewi dkk., 2018) yang telah dimodifikasi. Larutan DMSO 50% (pelarut sampel) dalam buffer fosfat pH 6,9 sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam *microtube* yang berlabel C^+ dan C^- sebagai kontrol. Sebanyak 100 μL ekstrak masing-masing ekstrak (ekstrak kasar metanol daun *J.gossypifolia L.* (EMDJ), ekstrak fraksi heksana daun *J.gossypifolia L.* (EHDJ), ekstrak fraksi diklorometana daun *J.gossypifolia L.* (EDDJ), dan ekstrak fraksi etil asetat daun *J.gossypifolia L.* (EEDJ)) dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dimasukkan ke dalam masing-masing *microtube* yang berbeda dengan label S^+ dan S^- . *Microtube* yang berlabel S^+ dan C^+ ditambahkan 150 μL α -amilase (0,750 U/mL) sedangkan S^- dan C^- ditambahkan 150 μL buffer fosfat pH 6,9. Larutan kemudian divortex dan dipreinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan 250 μL substrat amilum telarut (1% w/v) ke dalam semua *microtube*, dan divortex. Larutan kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Reaksi hidrolisis secara enzimatis dihentikan dengan melakukan pemanasan selama 1 menit pada suhu 100°C. Larutan kemudian diambil sebanyak 160 μL dari masing-masing *microtube* untuk dimasukkan ke *microtube* lain dengan label yang sama. Larutan ditambahkan 80 μL reagen DNS untuk menentukan total gula reduksinya dan dipanaskan selama 5 menit. Larutan kemudian diencerkan dengan 720 μL akubides. Kemudian diukur absorbansinya

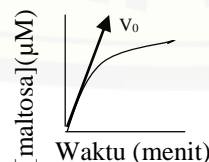
pada panjang gelombang 540 nm, dengan buffer fosfat pH 6,9 sebagai *blanko*. Absorbansi dari hasil pengukuran dikonversi menjadi konsentrasi produk maltosa yang dihasilkan berdasarkan persamaan kurva standar maltosa dari kurva standar maltosa pada metode poin 3.4.4. Akarbosa digunakan sebagai standar inhibitor α -amilase. Persen inhibisi α -amilase oleh masing-masing ekstrak dan akarbosa dihitung dengan persamaan berikut :

$$\text{Persen inhibisi} = \left[\frac{[C^+ - C^-] - [S^+ - S^-]}{[C^+ - C^-]} \right] \times 100\% \quad \dots \text{Persamaan (3.2)}$$

dengan C^+ adalah kontrol (pelarut sampel) dengan enzim, C^- adalah kontrol (pelarut sampel) tanpa enzim, S^+ adalah sampel dengan enzim, S^- adalah sampel tanpa enzim.

3.4.6 Kinetika Inhibisi α -amilase oleh Ekstrak Fraksi Teraktif dari Daun *J.gossypifolia L.*

Kinetika inhibisi α -amilase dilakukan dengan metode poin 3.4.5 dengan variasi konsentrasi substrat amilum dan waktu inkubasi. Konsentrasi substrat amilum yang digunakan adalah 1,0%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,0625% dengan masing masing konsentrasi substrat dilakukan variasi waktu 0;3;6;19;12;dan 18 menit untuk mendapatkan kecepatan awal reaksinya (V_0). Nilai V_0 didapat dengan pengeplotan antara waktu reaksi dan konsentrasi produk (maltosa) yang dihasilkan. Konsentrasi produk dihitung dari persamaan kurva standar maltosa. Gambar 3.1 merupakan bentuk kurva hasil pengeplotan antara waktu dengan waktu inkubasi dan konsentrasi produk yang dihasilkan



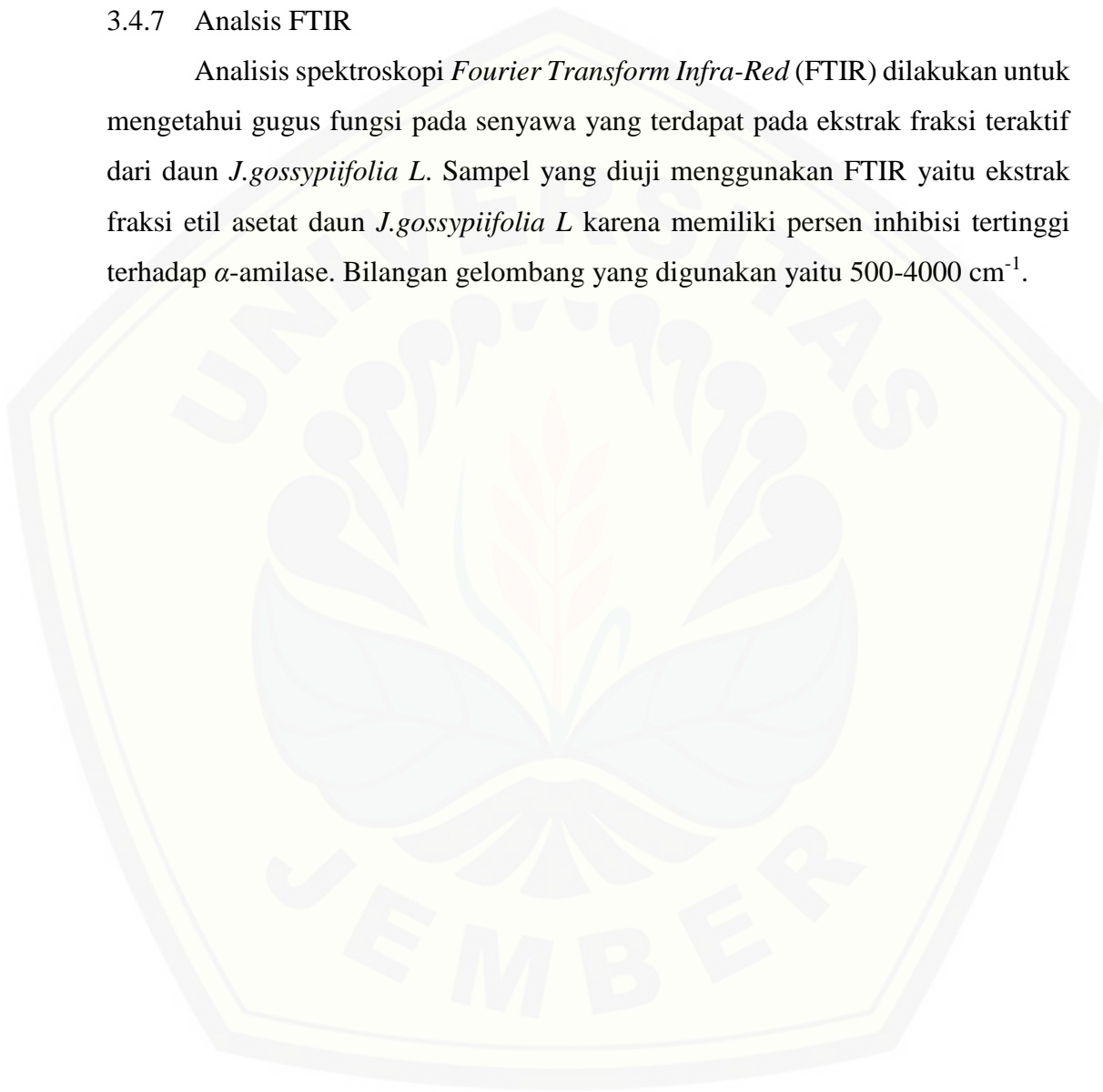
Gambar 3. 1 Kurva hasil pengeplotan waktu inkubasi dengan konsentrasi produk

Nilai V_0 sama dengan nilai kemiringan yang diperoleh dari plot kurva tersebut. Nilai V_0 dari masing masing konsentrasi digunakan untuk membuat plot kurva Lineweaver Burk. Konstanta Michaelis Menten (K_M) dan kecepatan maksimum

(V_{\max}) diperoleh dari persamaan kurva Lineweaver Burk. Menurut David L. Nelson; Michael M.Cox, (2004) plot kurva Lineweaver Burk dibuat dengan mengplotkan $1/[\text{substrat}]$ dengan $1/V_0$.

3.4.7 Analisis FTIR

Analisis spektroskopi *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi pada senyawa yang terdapat pada ekstrak fraksi teraktif dari daun *J.gossypifolia L.* Sampel yang diuji menggunakan FTIR yaitu ekstrak fraksi etil asetat daun *J.gossypifolia L* karena memiliki persen inhibisi tertinggi terhadap α -amilase. Bilangan gelombang yang digunakan yaitu $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak fraksi etil asetat daun *J.gossypiifolia L.* (EEDJ) sebagai inhibitor memiliki pengaruh terbesar dalam menghambat α -amilase dengan persen inhibisi tertinggi dibandingkan ekstrak kasar metanol (EMDJ) , ekstrak fraksi heksana (EHDJ), dan ekstrak fraksi diklorometana (EDDJ). Namun, jika dibandingkan inhibitor standar yaitu akarbosa, kemampuan ekstrak fraksi etil asetat masih lebih rendah.
2. Senyawa aktif pada ekstrak fraksi etil asetat daun *J.gossypiifolia L.* (EEDJ) dari analisis secara kinetika inhibisi enzim, memiliki kemampuan inhibisi α -amilase secara kompetitif reversibel.

5.2 Saran

1. Penelitian isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat daun *J.gossypiifolia L.* perlu dilakukan untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam daun *J.gossypiifolia L.* yang berperan sebagai inhibitor α -amilase.
2. Penelitian ekstrak dari daun *J.gossypiifolia L.* sebagai inhibitor enzim perlu dilakukan pada enzim lain, sehingga dapat mengetahui lebih luas potensi daun *J.gossypiifolia L.* sebagai inhibitor alami dari tanaman obat.
3. Penelitian daun *J.gossypiifolia L.* dengan potensinya sebagai antidiabetik perlu dilakukan pengukuran kadar air dari daun *J.gossypiifolia L.* untuk mengetahui berat daun yang dibutuhkan untuk digunakan sebagai simplisia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboaba, S. A., M. A. Adebayo, I. A. Ogunwande, dan T. O. Olayiwola. 2015. Volatile constituents of *Jatropha gossypifolia* L. grown in Nigeria. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 2(4):8–11.
- Abou-Seif, M. A. dan A. A. Youssef. 2004. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*. 346(2):161–170.
- Aghajari, N., G. Feller, C. Gerday, dan R. Haser. 2002. Structural basis of α -amylase activation by chloride. *Protein Science*. 11(6):1435–1441.
- Akinmoladun, A. C., M. T. Olaleye, dan E. O. Farombi. 2014. *Cardiotoxicity and Cardioprotective Effects of African Medicinal Plants*. Elsevier Inc. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*.
- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafour, N. A. N. Norulaini, dan A. K. M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*. 117(4):426–436.
- Azwanida. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 4(3):3–8.
- Baysal, Z., F. Uyar, M. Doğru, dan H. Alkan. 2008. production of extracellular alkaline α -amylase by solid state fermentation with a newly isolated *Bacillus* sp . . *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 38(2):184–190.
- Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi, dan E. Gontier. 2001. Bourgaud 2001-production of plant secondary metabolites a historical perspective.pdf. 161:839–851.
- Carrillo-lópez, L. M., R. M. Soto-hernández, H. A. Zavaleta-mancera, dan A. R. Vilchis-néstor. 2016. Study of the performance of the organic extracts of *Chenopodium ambrosioides* for Ag nanoparticle synthesis. 2016
- Cornejo-Ramírez, Y. I., O. Martínez-Cruz, C. L. Del Toro-Sánchez, F. J. Wong-Corral, J. Borboa-Flores, dan F. J. Cinco-Moroyoqui. 2018. The structural characteristics of starches and their functional properties. *CYTA - Journal of Food*. 16(1):1003–1017.
- Das, B. dan B. Venkataiah. 2001. A minor coumarino-lignoid from. 29(4498):1978–1979.
- David L. Nelson; Michael M.Cox. 2004. *Principle of Biochemistry Fourth Edition*. Edisi 4. Lehninger.

- de Sales, P. M., P. M. de Souza, L. A. Simeoni, P. de O. Magalhães, dan D. Silveira. 2012. α -amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 15(1):141–183.
- Dewick, P. 2002. *Medicinal Natural Products. Focus on Alternative and Complementary Therapies*.
- Falodun, A., Q. Sheng-Xiang, G. Parkinson, dan S. Gibbons. 2012. Isolation and characterization of a new anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 45(10):636–639.
- Félix-silva, J., R. B. Giordani, A. A. Silva-jr, S. M. Zucolotto, dan M. D. F. Fernandes-pedrosa. 2014. A review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014:2–32.
- Gamiotea-Turro, D., N. A. P. Camaforte, A. B. Valerino-Diaz, Y. Ortiz Nuñez, D. Rinaldo, A. L. Dokkedal, J. R. Bosqueiro, dan L. C. Dos Santos. 2018. Qualitative and quantitative analysis of ethanolic extract and phenolic fraction of *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) leaves and their hypoglycemic potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66(6):1419–1427.
- Granados, S., N. Balcázar, A. Guillén, dan F. Echeverri. 2015. Evaluation of the hypoglycemic effects of flavonoids and extracts from *Jatropha gossypifolia* L. *Molecules*. 20(4):6181–6193.
- Gu, C., Z. Liu, X. Yuan, W. Li, Y. Zu, dan Y. Fu. 2017. Preparation of vitexin nanoparticles by combining the antisolvent precipitation and high pressure homogenization approaches followed by lyophilization for dissolution rate enhancement. *Molecules*. 22(11):1–13.
- Guo, L. P., T. F. Jiang, Z. H. Lv, dan Y. H. Wang. 2010. Screening α -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 53(5):1250–1253.
- Handa Sukhadev, Swami; Khanuja, Suman Preet Singh; Longo, Gennaro; Rakesh, D. D. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*
- Harvey, D. 2000. *Modern Analytical Chemistry*
- Hasan, R., O. P. Limited, dan M. B. Science. 2014. In vitro α -amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of ethyl acetate extract of *Mallotus repandus* (Willd.) Muell. stem in rat model. *Journal of Coastal Life Medicine*.

(June)

- Hasanah, Y. 2011. *Budidaya Tanaman Obat Dan Rempah*. Edisi First Edit. Medan: USU-Press.
- Hidayat, S. dan R. A. Risna. 2007. Kajian ekologi tumbuhan obat langka di taman nasional bromo tengger semeru. *Biodiversitas*. 8(13):169–173.
- Holt, R. I. G., C. S. Cockram, A. Flyvbjerg, dan B. J. Goldstein. 2010. *Textbook of Diabetes: Fourth Edition. Textbook of Diabetes: Fourth Edition*.
- Hua, F., P. Zhou, H. Y. Wu, G. X. Chu, Z. W. Xie, dan G. H. Bao. 2018. *Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoid Glycosides from Lu'an GuaPian Tea: Molecular Docking and Interaction Mechanism*. 8. *Food and Function*.
- Internanational Diabetes Federation. 2017. *IDF Diabetes Atlas*. Eight Edition.
- J U, Nwamarah;O, Utitoju; G.T.O, U. 2015. Chemical composition and anti-diabetic properties of jatropha curcas leaves extract on alloxan induced diabetic wistar rats. 14(12):1056–1066.
- Kumar, V. P., N. S. Chauhan, H. Padh, dan M. Rajani. 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 107(2):182–188.
- Kwon, Y., E. Apostolidis, dan K. Shetty. 2006. A -amylase and a -glucosidase for management of. *Journal of Food Biochemistry*. 32(2008):15–31.
- Li, C., A. Begum, S. Numao, H. P. Kwan, S. G. Withers, dan G. D. Brayer. 2005. Acarbose rearrangement mechanism implied by the kinetic and structural analysis of human pancreatic α -amylase in complex with analogues and their elongated counterparts. *Biochemistry*. 44(9):3347–3357.
- Lo Piparo, E., H. Scheib, N. Frei, G. Williamson, M. Grigorov, dan C. J. Chou. 2008. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 51(12):3555–3561.
- Matiz, G. E. dan M. G. De Carvalho. 2011. From luxemburgia octandra flowers. *Chemistry of Natural Compounds*. 46(6):818–820.
- Nair, S. S., V. Kavrekar, dan A. Mishra. 2013. In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*. 3(1):128–132.
- Okoh, S. O., B. C. Iweriebor, O. O. Okoh, U. U. Nwodo, dan A. I. Okoh. 2016. Antibacterial and antioxidant properties of the leaves and stem essential oils

- of *jatropha gossypifolia* l. *BioMed Research International*. 2016
- Olabanji, S. O., A. C. Adebajo, O. R. Omobuwajo, D. Ceccato, M. C. Buoso, dan G. Moschini. 2014. Pixe analysis of some nigerian anti-diabetic medicinal plants (ii). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 318(PART A):187–190.
- Otsuka, H. 2006. *Purification by Solvent Extraction Using Partition Coefficient*. Dalam *Natural Products Isolation*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Patil, Raju, Ravindra Patil, B. Ahirwar, dan D. Ahirwar. 2011. Current status of indian medicinal plants with antidiabetic potential: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(SUPPL. 2):S291–S298.
- Ratnadewi, A. A. I., L. D. Wahyudi, J. Rochman, X. Susilowati, A. S. Nugraha, dan T. A. Siswoyo. 2018. Revealing anti-diabetic potency of medicinal plants of meru betiri national park, jember - indonesia. *Arabian Journal of Chemistry*
- Razali, M., C. Didaskalou, J. F. Kim, M. Babaei, E. Drioli, Y. M. Lee, dan G. Szekely. 2017. Exploring and exploiting the effect of solvent treatment in membrane separations. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 9(12):11279–11289.
- Rosak, C. dan G. Mertes. 2012. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 5:357–367.
- Saishri, R., N. Ravichandran, V. Vadivel, dan P. Brindha. 2016. Pharmacognostic studies on leaf of *jatropha gossypifolia* l. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 7(1):163–173.
- Saleem, H., I. Ahmad, M. Ashraf, M. S. A. Gill, F. Nadeem, M. N. Shahid, dan K. Barkat. 2016. In vitro studies on anti-diabetic and anti-ulcer potentials of *jatropha gossypifolia* (*euphorbiaceae*). 15(January):121–125.
- Sayuti, M. 2017. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi, bagian dan jenis pelarut terhadap rendemen dan aktifitas antioksidan bambu laut (*isis hippuris*). *Tecnology Science and Engineering Journal*. 1(3):166–174.
- Shafiee, F., E. Khoshvishkaie, A. Davoodi, A. Dashti Kalantar, H. Bakhshi Jouybari, dan R. Ataee. 2018. The determination of blood glucose lowering and metabolic effects of *mespilus germanica* l. hydroacetononic extract on streptozocin-induced diabetic balb/c mice. *Medicines*. 5(1):1.
- Sousa, Z. L., F. F. de Oliveira, A. O. da Conceição, L. A. M. Silva, M. H. Rossi, J. da S. Santos, dan J. L. Andrioli. 2012. Biological activities of extracts from *chenopodium ambrosioides lineu* and *kielmeyera neglecta saddi*. *Annals of*

Clinical Microbiology and Antimicrobials. 11:1–7.

Sunarni, T. dan F. Leviana. 2011. Antioxidant-free radical scavenging of some euphorbiaceae herbs. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*. 2(1):146.

Teoh, S. L. dan S. Das. 2018. Phytochemicals and their effective role in the treatment of diabetes mellitus: a short review. *Phytochemistry Reviews*. 17(5):1111–1128.

Timerman, A. P. tanpa tahun. The isolation of invertase from baker ' s yeast – an introduction to protein purification strategies

Uddin, N., M. R. Hasan, M. M. Hossain, A. Sarker, A. H. M. Nazmul Hasan, A. F. M. Mahmudul Islam, M. M. H. Chowdhury, dan M. S. Rana. 2014. In vitro α -amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of methanol extract of citrus macroptera montr. fruit. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(6):473–479.

Wang, H., Y. J. Du, dan H. C. Song. 2010. A-glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*. 123(1):6–13.

Wu, Q., J. Patocka, E. Nepovimova, dan K. Kuca. 2019. *Jatropha gossypifolia* l. and its biologically active metabolites: a mini review. *Journal of Ethnopharmacology*. 234(May 2018):197–203.

Yagnambhatla, Aparna; Kaur, Gagandeep; Ali, Zehra; Yagnambhatla, Rajendra; Galipelly, Sunitha; AshokKumarTIwari; K.Banerjee, Sanjay; Manohar.A, D. 2014. Antidiabetic effect of potential indian medicinal plants: a target specific in-vitro study. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 9(4):36–40.

Zhang, Q., J. Zheng, A. Shevade, L. Zhang, S. H. Gehrke, G. S. Heffelfinger, dan S. Jiang. 2002. Transport diffusion of liquid water and methanol through membranes. *Journal of Chemical Physics*. 117(2):808–818.

tanpa tahun. Plant Info. <http://plantamor.com/species/info/jatropha/gossypifolia> [Diakses pada March 14, 2019].

LAMPIRAN

Lampiran 3. 1 Validasi Tanaman Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L).

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAMAN

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 29/PL.17.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Jember No: 4161/UN.25.1.9/PI/2019 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Moh. Sychfu Arief Gozali
NIM : 151810301043
Jur/Fak/PT : Fakultas MIPA/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom/Regnum: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Euphorbiales; Famili: Euphorbiaceae; Genus: Jatropha; Spesies: Jatropha gossypifolia, L

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 16 Oktober 2019

Ket. Laboratorium Tanaman


Puji Lili Hastuti, MP
NIP. 195808201987032001

Lampiran 3. 2 Pembuatan Larutan

3.2.1 Larutan Buffer Fosfat 0,02M pH 6,9

Larutan Buffer Fosfat pH 6,9 sebanyak 100 mL dibuat dengan mencampurkan beberapa bahan berikut :

1. Na_2HPO_4 (dinatrium hidrogen fosfat) dengan berat molekul 141,96 g/mol sebanyak 0,28392 gram
2. NaH_2PO_4 (natrium dihidrogen fosfat) dengan berat molekul 137,99 g/mol sebanyak 0,27598 gram

Masing-masing bahan tersebut dilarutkan menggunakan akuabides hingga 100 mL menggunakan labu ukur. Larutan Na_2HPO_4 diambil sebanyak 55 mL dan ditambahkan dengan larutan NaH_2PO_4 45 mL, kemudian dilakukan pengenceran hingga 200 mL.

3.2.1 Larutan Amilum 1%.

Amilum terlarut dengan konsentrasi 1% dibuat dengan melarutkan padatan amilum 0,25 gram yang telah ditambahkan 250 μL DMSO menggunakan buffer fosfat pH 6,9 sebanyak 25 mL yang disertai pengadukan dan pemanasan pada 70°C hingga homogen. Amilum terlarut kemudian didinginkan pada suhu ruang, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan buffer fosfat pH 6,9 hingga tanda batas.

3.2.2 Larutan Ekstrak dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Larutan ekstrak dibuat dengan melarutkan masing-masing 0,001 gram atau 1 mg ekstrak kasar metanol, ekstrak fraksi heksana, ekstrak fraksi diklorometana, dan ekstrak fraksi etil asetat kedalam 50% DMSO dalam buffer sebanyak 2mL. Masing-masing larutan divortex hingga larut, dan diperoleh masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

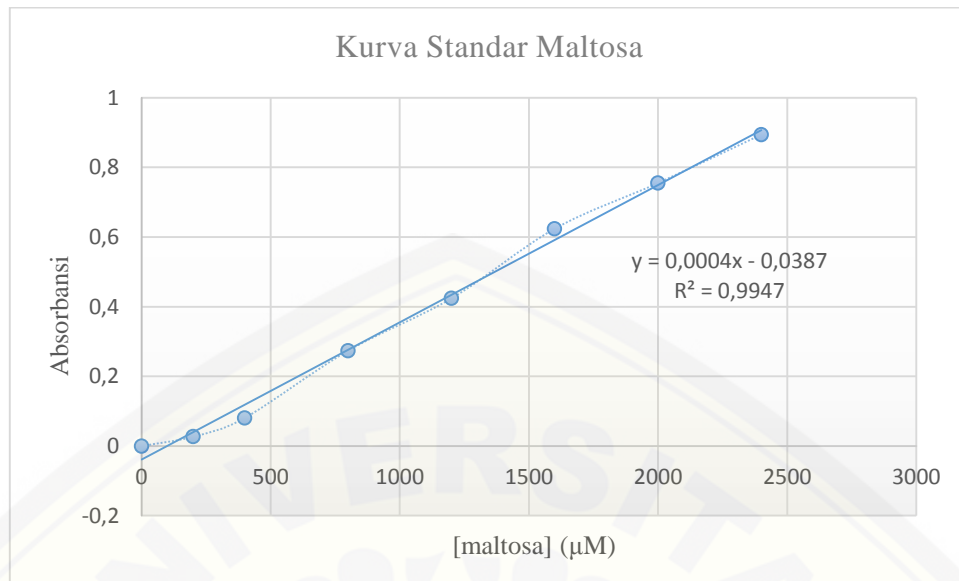
3.2.3 Larutan Standar Maltosa

Larutan standar maltosa dengan variasi konsentrasi dibuat dari larutan stok maltosa 4000 μM . Larutan stok dibuat dengan melarutkan 0,00685 g maltosa kedalam 5 mL buffer fosfat pH 6,9 hingga tanda batas menggunakan labu ukur 5 mL. Larutan stok

maltosa yang dimiliki kemudian dilakukan pengenceran dengan variasi konsentrasi 200 μM , 400 μM , 800 μM , 1200 μM , 1600 μM , 2000 μM , 2400 μM .

Lampiran 3. 3 Kurva Standar Maltosa

[Maltosa](μM)	Abs	$\bar{\text{Abs}}$	$\bar{\text{Abs}}_0$
0	0,025 0,023 0,025	0,024	0
200	0,053 0,052 0,048	0,051	0,027
400	0,107 0,100 0,109	0,105	0,081
800	0,296 0,299 0,300	0,298	0,274
1200	0,437 0,450 0,457	0,448	0,424
1600	0,643 0,650 0,651	0,648	0,624
2000	0,775 0,780 0,782	0,779	0,755
2400	0,912 0,921 0,922	0,918	0,894



Lampiran 4. 1 Kadar Air Simplisia

Pengukuran kadar air simplisia dilakukan dengan menggunakan instrumen *digital moisture tester* (Sartorius MA 150)

Pengulangan	Kadar Air (%)	Rata rata	SD
1	9,23	9,07	±0,20
2	9,14		
3	8,84		

Lampiran 4. 2 Perhitungan Persen Rendemen Ekstrak

Massa kandungan air pada simplisia = massa simplisia × kadar air

$$= 50,00 \text{ g} \times 9,07\%$$

$$= 4,535 \text{ g}$$

Massa kering simplisia = massa simplisia – massa kandungan air

$$= 50,00 \text{ g} - 4,535 \text{ g}$$

$$= 45,47 \text{ g}$$

% rendemen ekstrak metanol

$$= \frac{\text{massa ekstrak yang diperoleh}}{\text{massa simplisia kering}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,93 \text{ g}}{45,47 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 4,24 \%$$

Massa simplisia	Massa ekstrak	% Rendemen
50,00 g	1,930 g	4,24 %

Massa ekstrak kasar metanol yang digunakan = 0,5031 g

Fraksi pelarut	Massa ekstrak (g)	Rendemen (%)
Ekstrak fraksi heksana	0,160	31,84
Ekstrak fraksi diklorometana	0,050	14,57
Ekstrak fraksi etil asetat	0,059	20,14

$$\begin{aligned}
 \% \text{ rendemen ekstrak fraksi heksana} &= \frac{\text{massa ekstrak fraksi heksana}}{\text{massa ekstrak metanol}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,160 \text{ g}}{0,503 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 31,84\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Massa ekstrak metanol} - \text{massa ekstrak f.heksana} &= 0,503 \text{ g} - 0,160 \text{ g} \\
 &= 0,343 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ rendemen ekstrak fraksi diklorometana} &= \frac{\text{massa ekstrak f.diklorometana}}{\text{massa ekstrak metanol} - \text{f.heksana}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,050 \text{ g}}{0,343 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 14,57\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Massa ekstrak metanol;f.heksana} - \text{massa f.diklorometana} &= 0,343 \text{ g} - 0,050 \text{ g} \\
 &= 0,293 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ rendemen ekstrak fraksi etil asetat} &= \frac{\text{massa f.etil asetat}}{\text{massa ekstrak metanol;f.heksana} - \text{f.dcm}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,059 \text{ g}}{0,293 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 20,14\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. 3 Persen Inhibisi α -amilase

- C⁺ = Absorbansi kontrol (pelarut sampel) dengan penambahan enzim
- C⁻ = Absorbansi kontrol (pelarut sampel) tanpa penambahan enzim
- S⁺ = Absorbansi sampel dengan penambahan enzim
- S⁻ = Absorbansi sampel tanpa penambahan enzim
- [C⁺] = Konsentrasi produk maltosa kontrol (pelarut sampel) dengan penambahan enzim hasil konversi dari absorbansi berdasarkan kurva standar maltosa
- [C⁻] = Konsentrasi produk maltosa kontrol (pelarut sampel) tanpa penambahan enzim hasil konversi dari absorbansi berdasarkan kurva standar maltosa
- [S⁺] = Konsentrasi produk maltosa sampel dengan penambahan enzim hasil konversi dari absorbansi berdasarkan kurva standar maltosa
- [S⁻] = Konsentrasi produk maltosa sampel tanpa penambahan enzim hasil konversi dari absorbansi berdasarkan kurva standar maltosa

$[\bar{C}]$ = Konsentrasi produk maltosa kontrol rata-rata

$[C]$ = Selisih dari kontrol dengan enzim dengan kontrol tanpa enzim

$[S]$ = Selisih dari sampel dengan enzim dengan sampel tanpa enzim

$$S = [S^+] - [S^-]$$

$$C = [C^+] - [C^-]$$

$$\% \text{ Penghambatan} = \left[\frac{C-S}{C} \right] \times 100\%$$

Absorbansi		Konsentrasi Maltosa (μM)							
C^+	C^-	$[C^+]$	$[C^-]$	$[C]$	$[\bar{C}]$				
0,513	0,136	1379,3	436,8	942,5	967,5				
0,512	0,121	1376,8	399,3	977,5					
0,513	0,120	1379,3	396,8	982,5					

Absorbansi		Konsentrasi Maltosa (μM)							
Sampel	S^+	S^-	$[S^+]$	$[S^-]$	$[S]$	$[\bar{C}]$	$[\bar{C}]-[S]$	%Penghambatan	
EMDJ	0,509	0,187	1369,3	564,3	805,0	967,5	162,5	16,80	
	0,492	0,184	1326,8	556,8	770,0	967,5	197,5	20,41	19,38 \pm 2,25
	0,484	0,178	1306,8	541,8	765,0	967,5	202,5	20,93	
EHDJ	0,447	0,136	1214,3	436,8	777,5	967,5	190,0	19,64	
	0,452	0,140	1226,8	446,8	780,0	967,5	187,5	19,38	19,38 \pm 0,26
	0,454	0,141	1231,8	449,3	782,5	967,5	185,0	19,12	
EDDJ	0,457	0,208	1239,3	616,8	622,5	967,5	345,0	35,66	
	0,460	0,212	1246,8	626,8	620,0	967,5	347,5	35,92	36,69 \pm 1,57
	0,462	0,224	1251,8	656,8	595,0	967,5	372,5	38,50	
EEDJ	0,487	0,284	1314,3	806,8	507,5	967,5	460,0	47,55	
	0,496	0,300	1336,8	846,8	490,0	967,5	477,5	49,35	49,53 \pm 2,07
	0,495	0,308	1334,3	866,8	467,5	967,5	500,0	51,68	
Akarbosa	0,153	0,142	479,3	451,8	27,5	967,5	940,0	97,16	
	0,160	0,143	496,8	454,3	42,5	967,5	925,0	95,61	96,12 \pm 0,90
	0,163	0,146	504,3	461,8	42,5	967,5	925,0	95,61	

* EMDJ (Ekstrak Kasar Metanol Daun *J.gossypifolia*) , EHDJ (Ekstrak Fraksi Heksana Daun *J.gossypifolia*), EDDJ (Ekstrak Fraksi Diklorometana Daun *J.gossypifolia*), EEDJ (Ekstrak Fraksi Etil Asetat Daun *J.gossypifolia*).

Lampiran 4. 4 Kinetika penghambatan ekstrak fraksi teraktif (etil asetat) terhadap α -amilase

$[C]_0$ = nilai dikurangi [C] pada waktu ke 0 menit

$[S]_0$ = nilai dikurangi [S] pada waktu ke 0 menit

4.4.1 Nilai V_0

Nilai V_0 diperoleh dari hasil pengeplotan konsentrasi produk maltosa dengan variasi waktu inkubasi.

$$y = mx + c$$

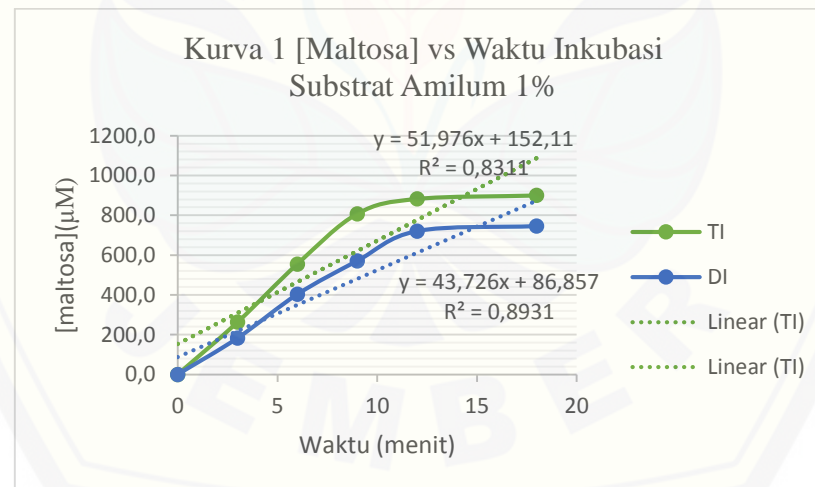
$$m = V_0$$

$$V_0 \rightarrow \mu M/\text{menit}$$

Kinetika 1

Konsentrasi Amilum 1%

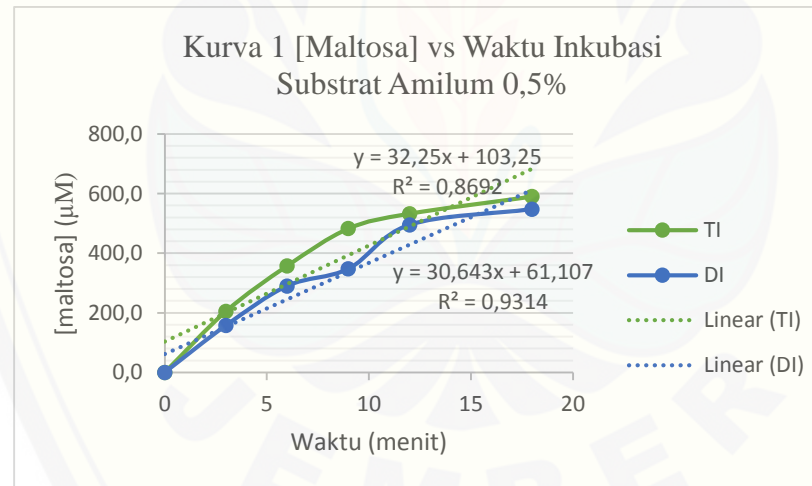
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,451	0,112	0,379	0,180	1224,3	376,8	1044,3	546,8	847,5	497,5	0,0	0,0
3	0,558	0,114	0,442	0,170	1491,8	381,8	1201,8	521,8	1110,0	680,0	262,5	182,5
6	0,684	0,123	0,529	0,169	1806,8	404,3	1419,3	519,3	1402,5	900,0	555,0	402,5
9	0,790	0,128	0,612	0,185	2071,8	416,8	1626,8	559,3	1655,0	1067,5	807,5	570,0
12	0,822	0,130	0,676	0,189	2151,8	421,8	1786,8	569,3	1730,0	1217,5	882,5	720,0
18	0,836	0,137	0,687	0,190	2186,8	439,3	1814,3	571,8	1747,5	1242,5	900,0	745,0



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi Amilum 0,5%

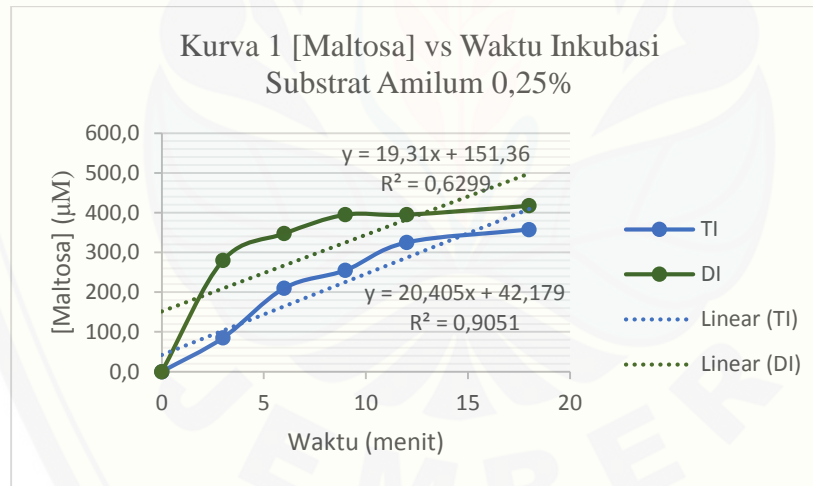
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,559	0,027	0,502	0,069	1494,3	164,3	1351,8	269,3	1330,0	1082,5	0,0	0,0
3	0,654	0,040	0,562	0,066	1731,8	196,8	1501,8	261,8	1535,0	1240,0	205,0	157,5
6	0,709	0,034	0,621	0,072	1869,3	181,8	1649,3	276,8	1687,5	1372,5	357,5	290,0
9	0,766	0,041	0,645	0,073	2011,8	199,3	1709,3	279,3	1812,5	1430,0	482,5	347,5
12	0,784	0,039	0,704	0,073	2056,8	194,3	1856,8	279,3	1862,5	1577,5	532,5	495,0
18	0,802	0,034	0,720	0,068	2101,8	181,8	1896,8	266,8	1920,0	1630,0	590,0	547,5



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi Amilum 0,25%

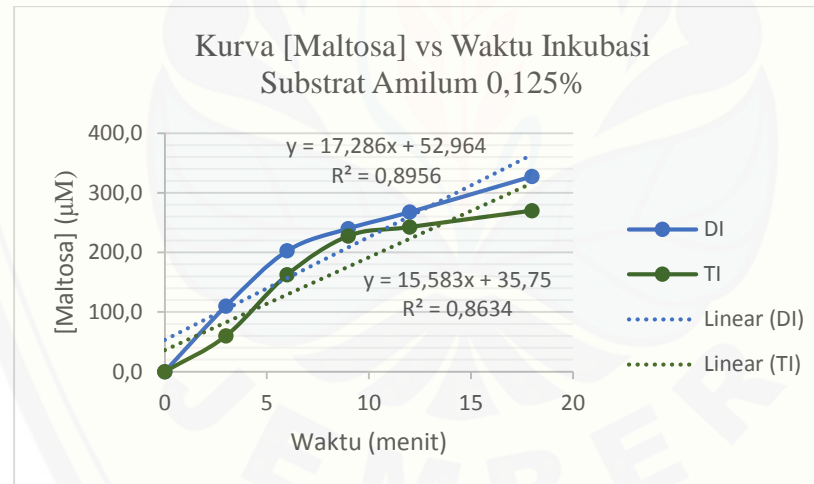
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,450	0,030	0,433	0,038	1221,8	171,8	1179,3	191,8	1050,0	987,5	0,0	0,0
3	0,485	0,031	0,547	0,040	1309,3	174,3	1464,3	196,8	1135,0	1267,5	85,0	280,0
6	0,535	0,031	0,574	0,040	1434,3	174,3	1531,8	196,8	1260,0	1335,0	210,0	347,5
9	0,552	0,030	0,587	0,034	1476,8	171,8	1564,3	181,8	1305,0	1382,5	255,0	395,0
12	0,580	0,030	0,598	0,045	1546,8	171,8	1591,8	209,3	1375,0	1382,5	325,0	395,0
18	0,593	0,030	0,602	0,040	1579,3	171,8	1601,8	196,8	1407,5	1405,0	357,5	417,5



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi Amilum 0,125%

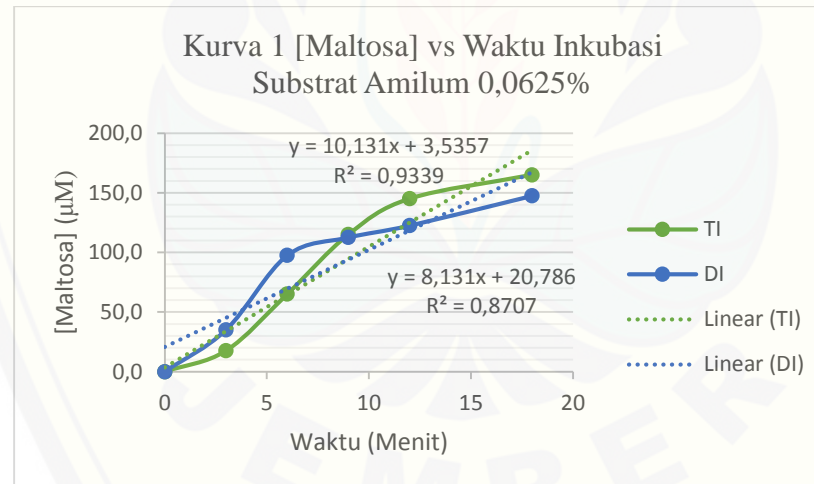
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,154	0,025	0,179	0,035	481,8	159,3	544,3	184,3	322,5	360,0	0,0	0,0
3	0,202	0,029	0,204	0,036	601,8	169,3	606,8	186,8	432,5	420,0	110,0	60,0
6	0,235	0,025	0,244	0,035	684,3	159,3	706,8	184,3	525,0	522,5	202,5	162,5
9	0,256	0,031	0,277	0,042	736,8	174,3	789,3	201,8	562,5	587,5	240,0	227,5
12	0,262	0,026	0,276	0,035	751,8	161,8	786,8	184,3	590,0	602,5	267,5	242,5
18	0,285	0,025	0,287	0,035	809,3	159,3	814,3	184,3	650,0	630,0	327,5	270,0



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi Amilum 0,0625%

Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,075	0,025	0,102	0,037	284,3	159,3	351,8	189,3	125,0	162,5	0,0	0,0
3	0,083	0,026	0,116	0,037	304,3	161,8	386,8	189,3	142,5	197,5	17,5	35,0
6	0,103	0,027	0,138	0,034	354,3	164,3	441,8	181,8	190,0	260,0	65,0	97,5
9	0,121	0,025	0,146	0,036	399,3	159,3	461,8	186,8	240,0	275,0	115,0	112,5
12	0,134	0,026	0,150	0,036	431,8	161,8	471,8	186,8	270,0	285,0	145,0	122,5
18	0,140	0,024	0,156	0,032	446,8	156,8	486,8	176,8	290,0	310,0	165,0	147,5



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

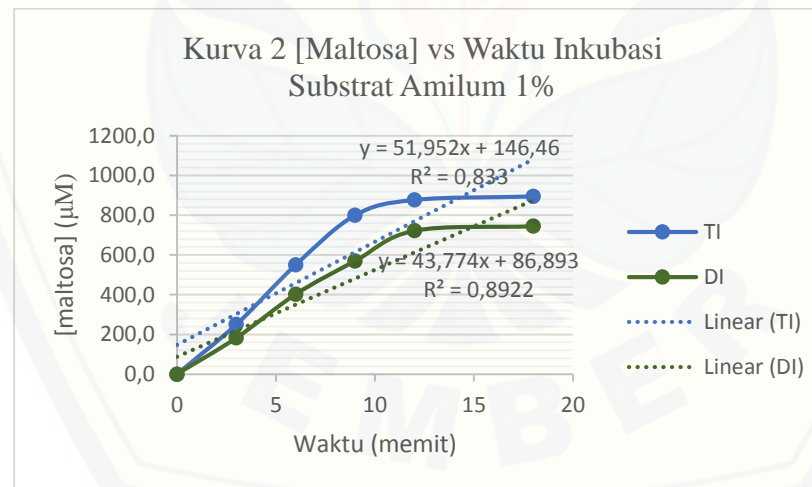
Nilai V_0 kinetika 1

[PT] (%)	[PT] (mg/mL)	TI ($y=mx+c$)	DI ($y=mx+c$)	TI (V_0)	DI (V_0)
0,0625	0,625	$y = 10,131x + 3,5357, R^2 = 0,9339$	$y = 8,131x + 20,786, R^2 = 0,8707$	10,131	8,131
0,125	1,25	$y = 17,286x + 52,964, R^2 = 0,8956$	$y = 15,583x + 35,75, R^2 = 0,8634$	17,286	15,583
0,25	2,50	$y = 20,405x + 42,179, R^2 = 0,9051$	$y = 19,31x + 151,36, R^2 = 0,6299$	20,405	19,310
0,5	5	$y = 32,25x + 103,25, R^2 = 0,8692$	$y = 30,643x + 61,107, R^2 = 0,9314$	36,250	30,643
1	10	$y = 51,976x + 152,11, R^2 = 0,8311$	$y = 43,726x + 86,857, R^2 = 0,8931$	51,976	43,726

Kinetika 2

Konsentrasi 1%

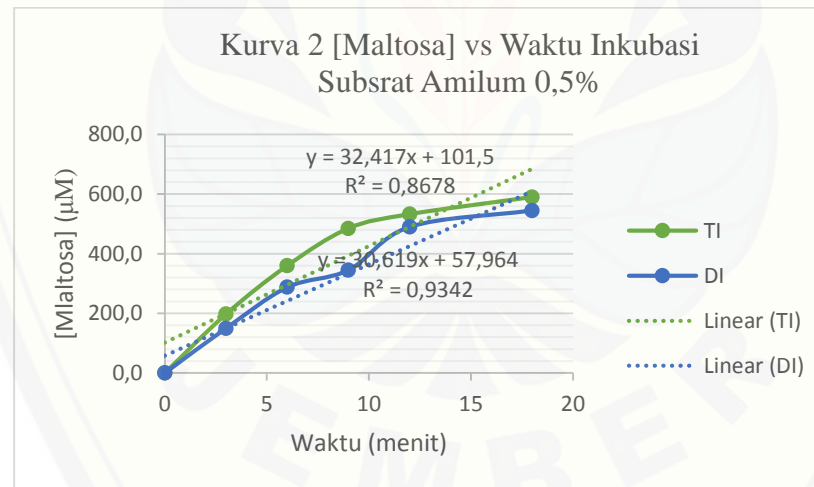
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,453	0,112	0,380	0,181	1229,3	376,8	1046,8	549,3	852,5	497,5	0,0	0,0
3	0,558	0,117	0,443	0,171	1491,8	389,3	1204,3	524,3	1102,5	680,0	250,0	182,5
6	0,685	0,124	0,530	0,170	1809,3	406,8	1421,8	521,8	1402,5	900,0	550,0	402,5
9	0,790	0,129	0,613	0,186	2071,8	419,3	1629,3	561,8	1652,5	1067,5	800,0	570,0
12	0,824	0,132	0,678	0,190	2156,8	426,8	1791,8	571,8	1730,0	1220,0	877,5	722,5
18	0,837	0,138	0,688	0,191	2189,3	441,8	1816,8	574,3	1747,5	1242,5	895,0	745,0



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi Amilum 0,5%

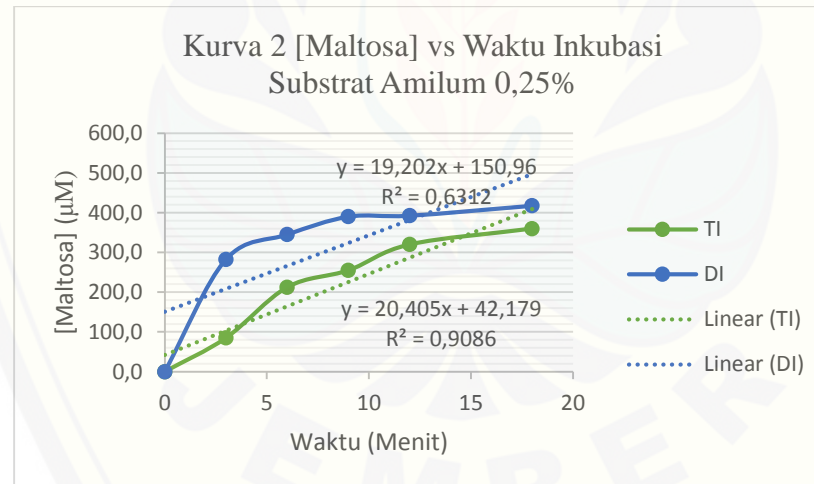
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,560	0,028	0,504	0,069	1496,8	166,8	1356,8	269,3	1330,0	1087,5	0,0	0,0
3	0,655	0,044	0,562	0,067	1734,3	206,8	1501,8	264,3	1527,5	1237,5	197,5	150,0
6	0,711	0,035	0,623	0,073	1874,3	184,3	1654,3	279,3	1690,0	1375,0	360,0	287,5
9	0,768	0,042	0,646	0,073	2016,8	201,8	1711,8	279,3	1815,0	1432,5	485,0	345,0
12	0,785	0,040	0,705	0,074	2059,3	196,8	1859,3	281,8	1862,5	1577,5	532,5	490,0
18	0,804	0,036	0,723	0,070	2106,8	186,8	1904,3	271,8	1920,0	1632,5	590,0	545,0



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi 0,25%

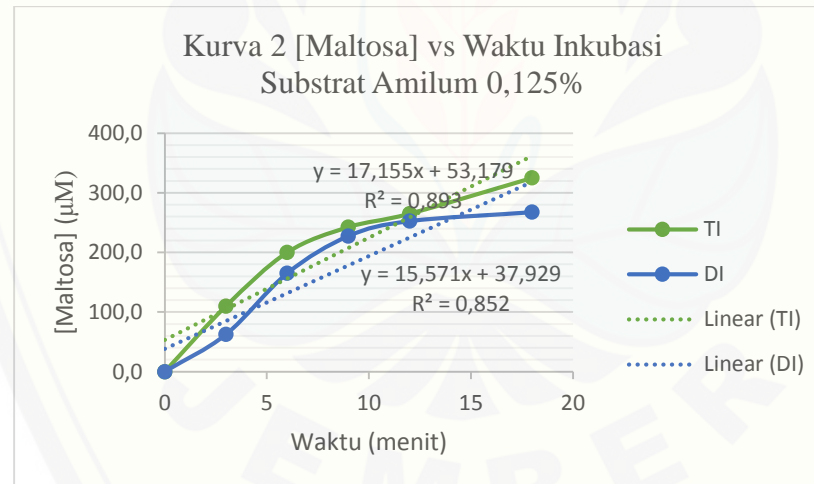
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,450	0,030	0,435	0,039	1221,8	171,8	1184,3	194,3	1050,0	990,0	0,0	0,0
3	0,485	0,031	0,550	0,041	1309,3	174,3	1471,8	199,3	1135,0	1272,5	85,0	282,5
6	0,536	0,031	0,574	0,040	1436,8	174,3	1531,8	196,8	1262,5	1335,0	212,5	345,0
9	0,552	0,030	0,588	0,036	1476,8	171,8	1566,8	186,8	1305,0	1380,0	255,0	390,0
12	0,580	0,032	0,598	0,045	1546,8	176,8	1591,8	209,3	1370,0	1382,5	320,0	392,5
18	0,594	0,030	0,603	0,040	1581,8	171,8	1604,3	196,8	1410,0	1407,5	360,0	417,5



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi 0,125%

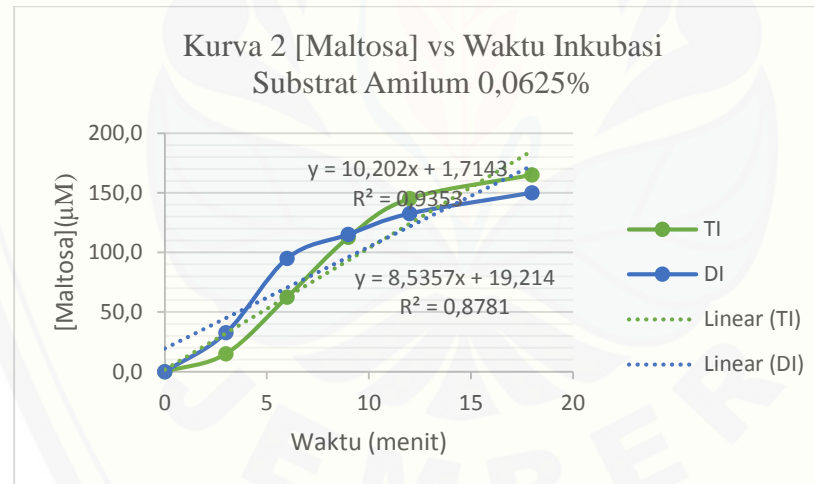
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,155	0,025	0,180	0,037	484,3	159,3	546,8	189,3	325,0	357,5	0,0	0,0
3	0,203	0,029	0,205	0,037	604,3	169,3	609,3	189,3	435,0	420,0	110,0	62,5
6	0,236	0,026	0,245	0,036	686,8	161,8	709,3	186,8	525,0	522,5	200,0	165,0
9	0,258	0,031	0,277	0,043	741,8	174,3	789,3	204,3	567,5	585,0	242,5	227,5
12	0,262	0,026	0,279	0,035	751,8	161,8	794,3	184,3	590,0	610,0	265,0	252,5
18	0,286	0,026	0,287	0,037	811,8	161,8	814,3	189,3	650,0	625,0	325,0	267,5



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi Amilum 0,0625%

Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,075	0,025	0,103	0,037	284,3	159,3	354,3	189,3	125,0	165,0	0,0	0,0
3	0,083	0,027	0,117	0,038	304,3	164,3	389,3	191,8	140,0	197,5	15,0	32,5
6	0,102	0,027	0,138	0,034	351,8	164,3	441,8	181,8	187,5	260,0	62,5	95,0
9	0,121	0,026	0,148	0,036	399,3	161,8	466,8	186,8	237,5	280,0	112,5	115,0
12	0,134	0,026	0,156	0,037	431,8	161,8	486,8	189,3	270,0	297,5	145,0	132,5
18	0,140	0,024	0,159	0,033	446,8	156,8	494,3	179,3	290,0	315,0	165,0	150,0



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

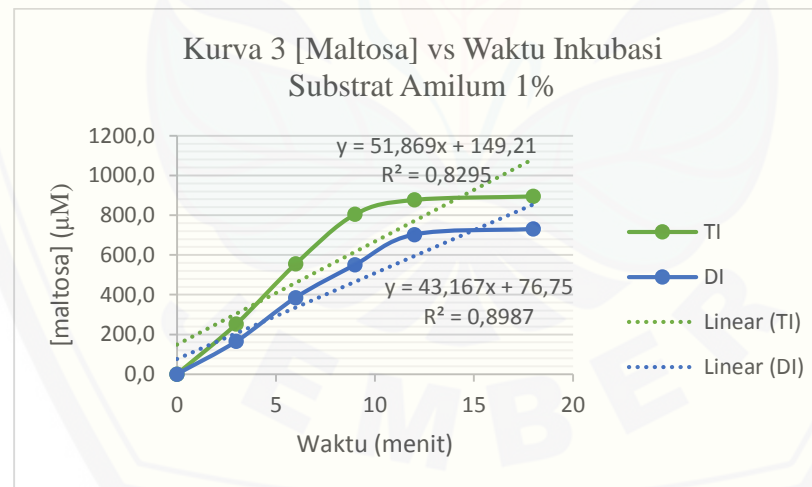
Nilai V_0 kinetika 2

[PT] (%)	[PT] (mg/mL)	TI (y=mx+c)	DI (y=mx+c)	TI (V_0)	DI (V_0)
0,0625	0,625	$y = 10,202x + 1,7143$, $R^2 = 0,9353$	$y = 8,5357x + 19,214$, $R^2 = 0,8781$	10,202	8,536
0,125	1,25	$y = 17,155x + 53,179$, $R^2 = 0,893$	$y = 15,571x + 37,929$, $R^2 = 0,852$	17,155	15,571
0,25	2,50	$y = 20,405x + 42,179$, $R^2 = 0,9086$	$y = 19,202x + 150,96$, $R^2 = 0,6312$	20,405	19,202
0,5	5	$y = 32,417x + 101,5$, $R^2 = 0,8678$	$y = 30,619x + 57,964$, $R^2 = 0,9342$	32,417	30,619
1	10	$y = 51,952x + 146,46$, $R^2 = 0,833$	$y = 43,774x + 86,893$, $R^2 = 0,8922$	51,952	43,774

Kinetika 3

Konsentrasi Amilum 1%

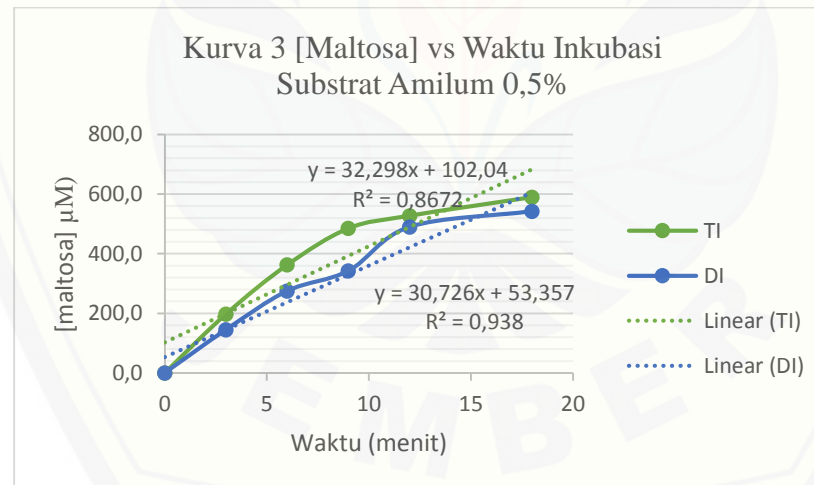
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,454	0,114	0,389	0,182	1231,8	381,8	1069,3	551,8	850,0	517,5	0,0	0,0
3	0,559	0,118	0,445	0,172	1494,3	391,8	1209,3	526,8	1102,5	682,5	252,5	165,0
6	0,686	0,124	0,532	0,171	1811,8	406,8	1426,8	524,3	1405,0	902,5	555,0	385,0
9	0,791	0,129	0,614	0,187	2074,3	419,3	1631,8	564,3	1655,0	1067,5	805,0	550,0
12	0,826	0,135	0,679	0,191	2161,8	434,3	1794,3	574,3	1727,5	1220,0	877,5	702,5
18	0,839	0,141	0,690	0,191	2194,3	449,3	1821,8	574,3	1745,0	1247,5	895,0	730,0



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi Amilum 0,5%

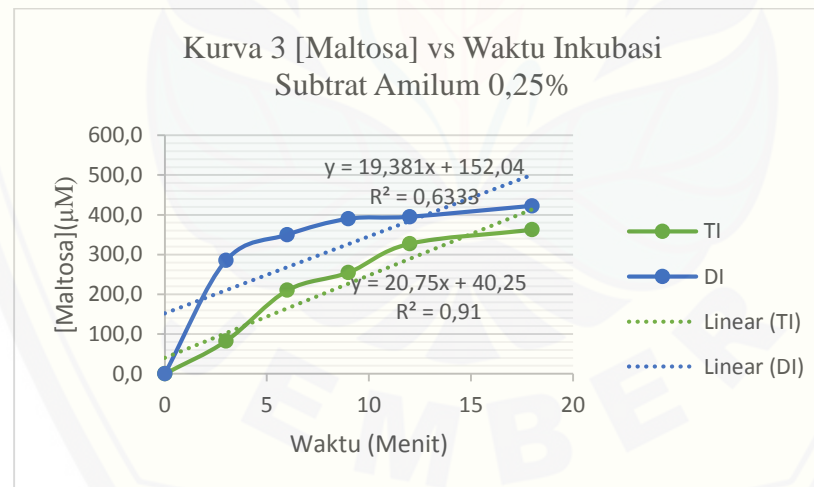
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,562	0,029	0,506	0,070	1501,8	169,3	1361,8	271,8	1332,5	1090,0	0,0	0,0
3	0,657	0,045	0,563	0,069	1739,3	209,3	1504,3	269,3	1530,0	1235,0	197,5	145,0
6	0,713	0,035	0,623	0,077	1879,3	184,3	1654,3	289,3	1695,0	1365,0	362,5	275,0
9	0,769	0,042	0,648	0,075	2019,3	201,8	1716,8	284,3	1817,5	1432,5	485,0	342,5
12	0,784	0,040	0,708	0,076	2056,8	196,8	1866,8	286,8	1860,0	1580,0	527,5	490,0
18	0,806	0,037	0,725	0,072	2111,8	189,3	1909,3	276,8	1922,5	1632,5	590,0	542,5



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi 0,25%

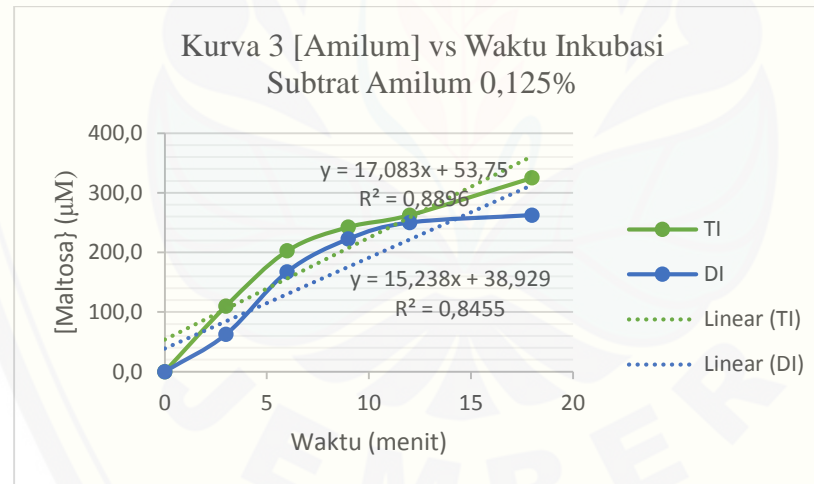
Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,451	0,031	0,435	0,040	1224,3	174,3	1184,3	196,8	1050,0	987,5	0,0	0,0
3	0,487	0,034	0,551	0,042	1314,3	181,8	1474,3	201,8	1132,5	1272,5	82,5	285,0
6	0,538	0,034	0,575	0,040	1441,8	181,8	1534,3	196,8	1260,0	1337,5	210,0	350,0
9	0,553	0,031	0,588	0,037	1479,3	174,3	1566,8	189,3	1305,0	1377,5	255,0	390,0
12	0,584	0,033	0,599	0,046	1556,8	179,3	1594,3	211,8	1377,5	1382,5	327,5	395,0
18	0,595	0,030	0,604	0,040	1584,3	171,8	1606,8	196,8	1412,5	1410,0	362,5	422,5



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi 0,125%

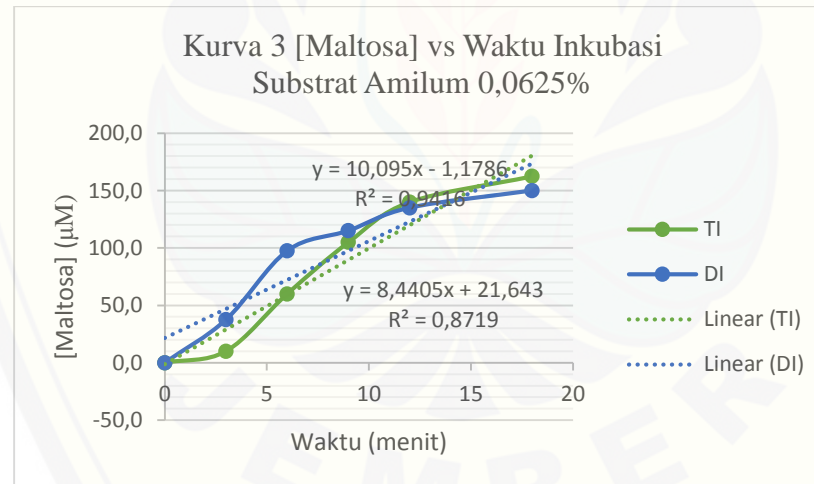
Waktu (menit)	C+	C-	S+	S-	[C+] (μM)	[C-] (μM)	[S+] (μM)	[S-] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C]0 (μM)	[S]0 (μM)
0	0,158	0,027	0,182	0,038	491,8	164,3	551,8	191,8	327,5	360,0	0,0	0,0
3	0,205	0,030	0,206	0,037	609,3	171,8	611,8	189,3	437,5	422,5	110,0	62,5
6	0,238	0,026	0,247	0,036	691,8	161,8	714,3	186,8	530,0	527,5	202,5	167,5
9	0,259	0,031	0,277	0,044	744,3	174,3	789,3	206,8	570,0	582,5	242,5	222,5
12	0,263	0,027	0,279	0,035	754,3	164,3	794,3	184,3	590,0	610,0	262,5	250,0
18	0,288	0,027	0,287	0,038	816,8	164,3	814,3	191,8	652,5	622,5	325,0	262,5



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Konsentrasi 0,0625%

Waktu (menit)	C ⁺	C ⁻	S ⁺	S ⁻	[C ⁺] (μM)	[C ⁻] (μM)	[S ⁺] (μM)	[S ⁻] (μM)	[C] (μM)	[S] (μM)	[C] ₀ (μM)	[S] ₀ (μM)
0	0,079	0,026	0,103	0,038	294,3	161,8	354,3	191,8	132,5	162,5	0,0	0,0
3	0,085	0,028	0,117	0,037	309,3	166,8	389,3	189,3	142,5	200,0	10,0	37,5
6	0,105	0,028	0,140	0,036	359,3	166,8	446,8	186,8	192,5	260,0	60,0	97,5
9	0,122	0,027	0,149	0,038	401,8	164,3	469,3	191,8	237,5	277,5	105,0	115,0
12	0,136	0,027	0,157	0,038	436,8	164,3	489,3	191,8	272,5	297,5	140,0	135,0
18	0,142	0,024	0,159	0,034	451,8	156,8	494,3	181,8	295,0	312,5	162,5	150,0



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Nilai V_0 kinetika 3

[PT] (%)	[PT] (mg/mL)	TI ($y=mx+c$)	DI ($y=mx+c$)	TI (V_0)	DI (V_0)
0,0625	0,625	$y = 10,095x - 1,1786$, $R^2 = 0,9416$	$y = 8,4405x + 21,643$, $R^2 = 0,8719$	10,095	8,441
0,125	1,25	$y = 17,083x + 53,75$, $R^2 = 0,8896$	$y = 15,238x + 38,929$, $R^2 = 0,8455$	17,083	15,238
0,25	2,50	$y = 20,75x + 40,25$, $R^2 = 0,91$	$y = 19,381x + 152,04$, $R^2 = 0,6333$	20,750	19,381
0,5	5	$y = 32,298x + 102,04$, $R^2 = 0,8672$	$y = 30,726x + 53,357$, $R^2 = 0,938$	32,298	30,726
1	10	$y = 51,869x + 149,21$, $R^2 = 0,8295$	$y = 43,167x + 76,75$, $R^2 = 0,8987$	52,560	43,167

4.4.2 Nilai Km dan Vmax

Nilai Km dan Vmax diperoleh melalui plot Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

$$y = mx + c$$

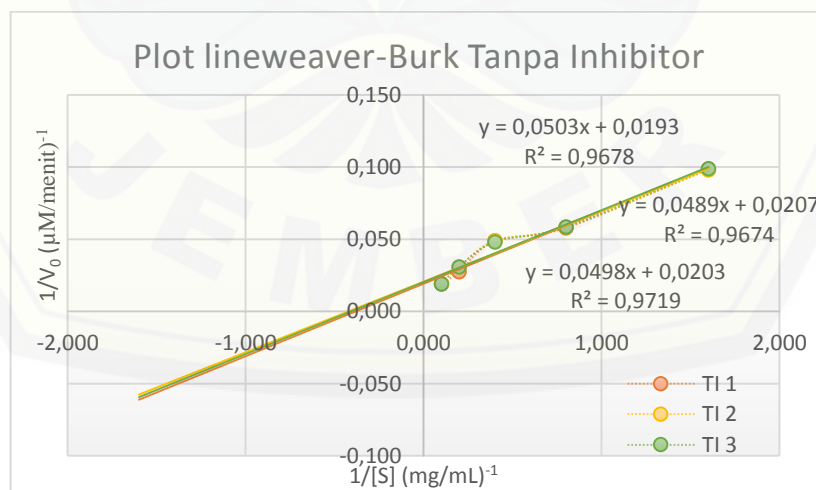
$$V_{max} = \frac{1}{c}$$

Vmax → μM/menit

Km = m × Vmax → mg/mL

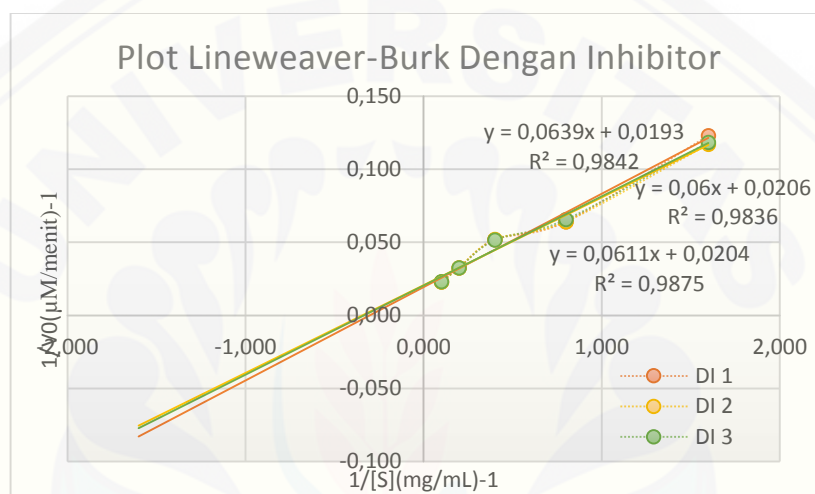
Plot Lineweaver-Burk tanpa inhibitor.

[PT] (mg/mL)	TI(V ₀)(μM/menit)			1/[PT] (mg/mL) ⁻¹	TI(1/V ₀) (μM/menit) ⁻¹		
	1	2	3		1	2	3
0,625	10,131	10,202	10,095	1,600	0,099	0,098	0,099
1,25	17,286	17,155	17,083	0,800	0,058	0,058	0,059
2,5	20,405	20,405	20,750	0,400	0,049	0,049	0,048
5	36,250	32,417	32,298	0,200	0,028	0,031	0,031
10	51,976	51,952	52,560	0,100	0,019	0,019	0,019



Plot Lineweaver-Burk dengan inhibitor.

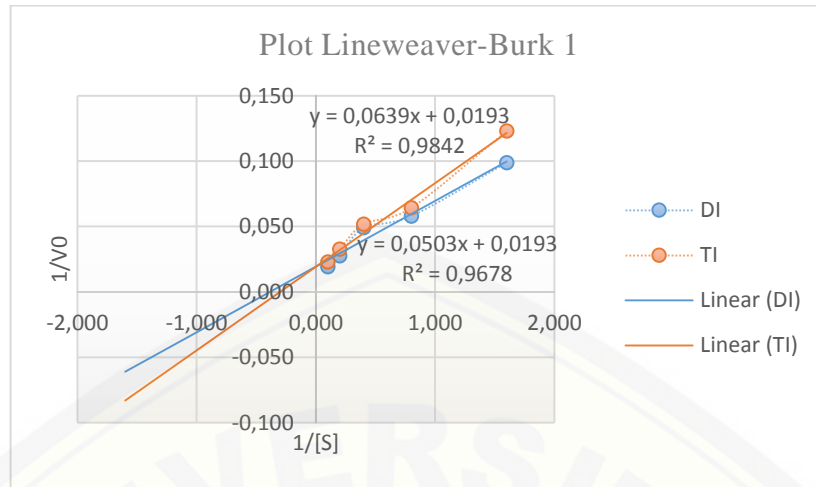
[PT] (mg/mL)	DI(V ₀)			1/[PT] (mg/mL) ⁻¹	DI (1/V ₀)		
	1	2	3		1	2	3
0,625	8,131	8,536	8,441	1,600	0,123	0,117	0,118
1,25	15,583	15,571	15,238	0,800	0,064	0,064	0,066
2,5	19,310	19,202	19,381	0,400	0,052	0,052	0,052
5	30,643	30,619	30,726	0,200	0,033	0,033	0,033
10	43,726	43,774	43,167	0,100	0,023	0,023	0,023



Plot Lineweaver-Burk penggabungan dari masing masing plot tanpa inhibitor dan dengan plot dengan inhibitor digunakan untuk mengetahui tipe inhibisi α -amilase dan mengetahui nilai K_M dan V_{max} .

Plot Lineweaver-Burk 1

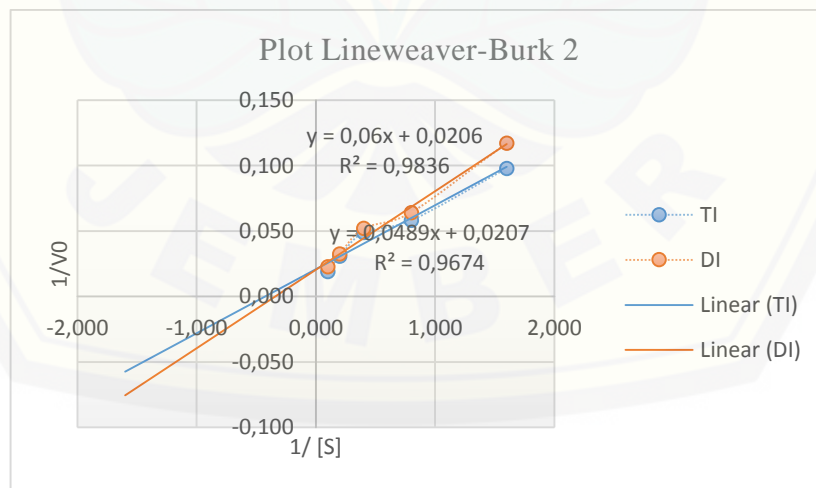
[PT] (mg/mL)	TI (V ₀)	DI (V ₀)	1/[PT] (mg/mL)	TI (1/V ₀)	DI(1/V ₀)
0,625	10,131	8,131	1,600	0,099	0,123
1,25	17,286	15,583	0,800	0,058	0,064
2,50	20,405	19,310	0,400	0,049	0,052
5	36,250	30,643	0,200	0,028	0,033
10	51,976	43,726	0,100	0,019	0,023



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Plot Lineweaver-Burk 2

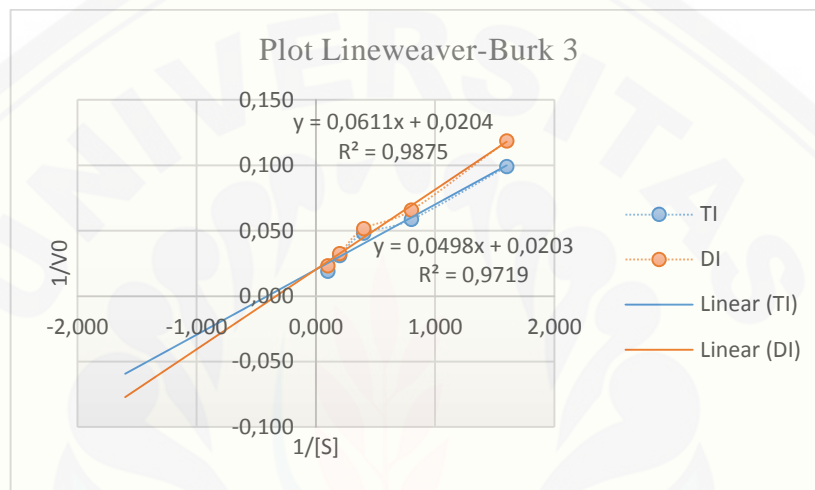
[PT] (mg/mL)	TI (V ₀)	DI (V ₀)	1/[PT](mg/mL)	TI (1/V ₀)	DI(1/V ₀)
0,625	10,202	8,536	1,600	0,098	0,117
1,25	17,155	15,571	0,800	0,058	0,064
2,50	20,405	19,202	0,400	0,049	0,052
5	32,417	30,619	0,200	0,031	0,033
10	51,952	43,774	0,100	0,019	0,023



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Plot Lineweaver-Burk 3

[PT] (mg/mL)	TI (V0)	DI (V0)	1/[PT] (mg/mL)	TI (1/V0)	DI(1/V0)
0,625	10,095	8,441	1,600	0,099	0,118
1,25	17,083	15,238	0,800	0,059	0,066
2,50	20,750	19,381	0,400	0,048	0,052
5	32,298	30,726	0,200	0,031	0,033
10	52,560	43,167	0,100	0,019	0,023



*DI : Dengan Inhibitor , TI : Tanpa Inhibitor

Nilai Km dan Vmax α -amilse

Enzim	Lineweaver-Burk		Vmax (μ M/menit)		Km (mg/mL)	
	TI	DI	TI	DI	TI	DI
α -amilse	$y = 0,0503x + 0,0193$, $R^2 = 0,9678$	$y = 0,0639x + 0,0193$, $R^2 = 0,9842$	51,81	51,81	2,61	3,31
	$y = 0,0489x + 0,0207$, $R^2 = 0,9674$	$y = 0,06x + 0,0206$, $R^2 = 0,9836$	48,31	48,54	2,36	2,91
	$y = 0,0498x + 0,0203$, $R^2 = 0,9719$	$y = 0,0611x + 0,0204$, $R^2 = 0,9875$	49,26	49,02	2,45	3,00
	Rata rata		49,79	49,79	2,47	3,07
	SD		$\pm 1,81$	$\pm 1,77$	$\pm 0,12$	$\pm 0,21$

Lampiran 4. 5 Pembuatan dan perhitungan aktivitas α -amilase

4.5.1 Pembuatan Larutan α -amilase.

Satuan U (unit) padatan α -amilase dalam penelitian ini didefinisikan sebagai 1 mg maltosa yang dihasilkan dari hidrolisis amilum dalam waktu 3 menit pada pH 6,9 dan suhu 20°C

$$\begin{aligned} [\text{enzim}] &= 21,6 \text{ U/mg padatan} \\ &= \frac{21,6 \text{ mg maltosa} / 3 \text{ menit}}{\text{mg padatan}} \\ &= \frac{7,2 \text{ mg maltosa} / \text{menit}}{\text{mg padatan}} \end{aligned}$$

Konversi satuan mg ke μmol

$$\begin{aligned} &= \frac{7,2 \cdot 10^{-3} \text{ g maltosa} / \text{menit}}{342,3 \text{ g/mol} \cdot \text{mg padatan}} \\ &= \frac{0,021 \cdot 10^{-3} \text{ mol maltosa} / \text{menit}}{\text{mg padatan}} \times 10^6 \mu\text{mol} / \text{mol} \\ &= \frac{21,0 \mu\text{mol} / \text{menit}}{\text{mg padatan}} \\ &= 21,0 \text{ U/mg padatan} \end{aligned}$$

4.5.2 Pembuatan α -amilase 0,7 U/mL

$$\begin{aligned} [0,5 \text{ mg padatan enzim}] &= \frac{0,5 \text{ mg} \times 21,0 \text{ U}}{1 \text{ mg}} \\ &= 10,5 \text{ U} \end{aligned}$$

0,5 mg padatan enzim dilarutkan dalam 2 mL buffer fosfat 0,02 M pH 6,9

$$\frac{10,5 \text{ U}}{2 \text{ mL}} = 5,25 \text{ U/mL}$$

Pengenceran:

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 5,25 \text{ U/mL} \cdot V_1 &= 0,7 \text{ U/mL} \cdot 2000 \mu\text{L} \\ V_1 &= 266,7 \mu\text{L} \end{aligned}$$

4.5.3 Perhitungan aktivitas α -amilase

$$[C^+] - [C^-] = 967,5 \mu\text{M}$$

Konversi satuan μM ke g/mL

$$\begin{aligned}
 967,5 \mu\text{M} &= 967,5 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \\
 &= \text{molar maltosa} \times \text{Mr maltosa} \\
 &= 967,5 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times 342,3 \text{ g/mol} \\
 &= 0,331 \text{ g/L} \\
 &= 0,331 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas enzim} &= \frac{\text{konsentrasi produk} \times FP \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{enzim}}}}{\text{Mr maltosa} \times \text{waktu inkubasi}} \\
 &= \frac{(0,331 \text{ mg/mL} \times 10^{-3} \text{ g/mg}) \times \frac{160 \mu\text{L}}{55 \mu\text{L}} \times \frac{960 \mu\text{L}}{240 \mu\text{L}}}{342,3 \text{ g/mol} \times 15 \text{ menit}} \\
 &= \frac{3,851 \times 10^{-3} \text{ g/mL}}{342,3 \text{ g/mol} \times 15 \text{ menit}} \\
 &= 7,501 \times 10^{-7} \text{ mol/mL} \cdot \text{menit} \\
 &= 7,501 \times 10^{-7} \text{ mol/mL} \cdot \text{menit} \times 10^{-6} \mu\text{mol/mol} \\
 &= 0,750 \mu\text{mol}/\text{menit} \cdot \text{mL} \\
 &= 0,750 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$