



**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS
INHIBITOR α -AMILASE DARI EKSTRAK METANOL
DAUN KOPI SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh

Putri Khairunnisa

NIM 132210101034

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2017



**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS
INHIBITOR α -AMILASE DARI EKSTRAK METANOL
DAUN KOPI SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

diajukan untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan pendidikan Program Studi Farmasi (S1) dan
mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Putri Khairunnisa

NIM 132210101034

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2017

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Almarhumah Ibunda Syamsiah dan Ayahanda Imam Mahmudi tercinta, yang selalu memberi dukungan dan doa serta semangat kepada penulis.
2. Mas Aris, Mas Indra, Mas Ade, Mbak Desi, Mbak Diena, Mbak Dessy dan keponakan tersayang Zily, Sulthan, Rabbani, dan Naila yang selalu memberi semangat, nasihat dan doa.
3. Bapak dan Ibu guru yang telah membimbing penulis dan memberikan ilmunya sedari penulis mengenyam bangku TK Dharma Wanita UNILA, SD Al-Kautsar Bandar Lampung, SMP Al-Kautsar Bandar Lampung, SMA Al-Kautsar Bandar Lampung dan Fakultas Farmasi Universitas Jember.
4. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember

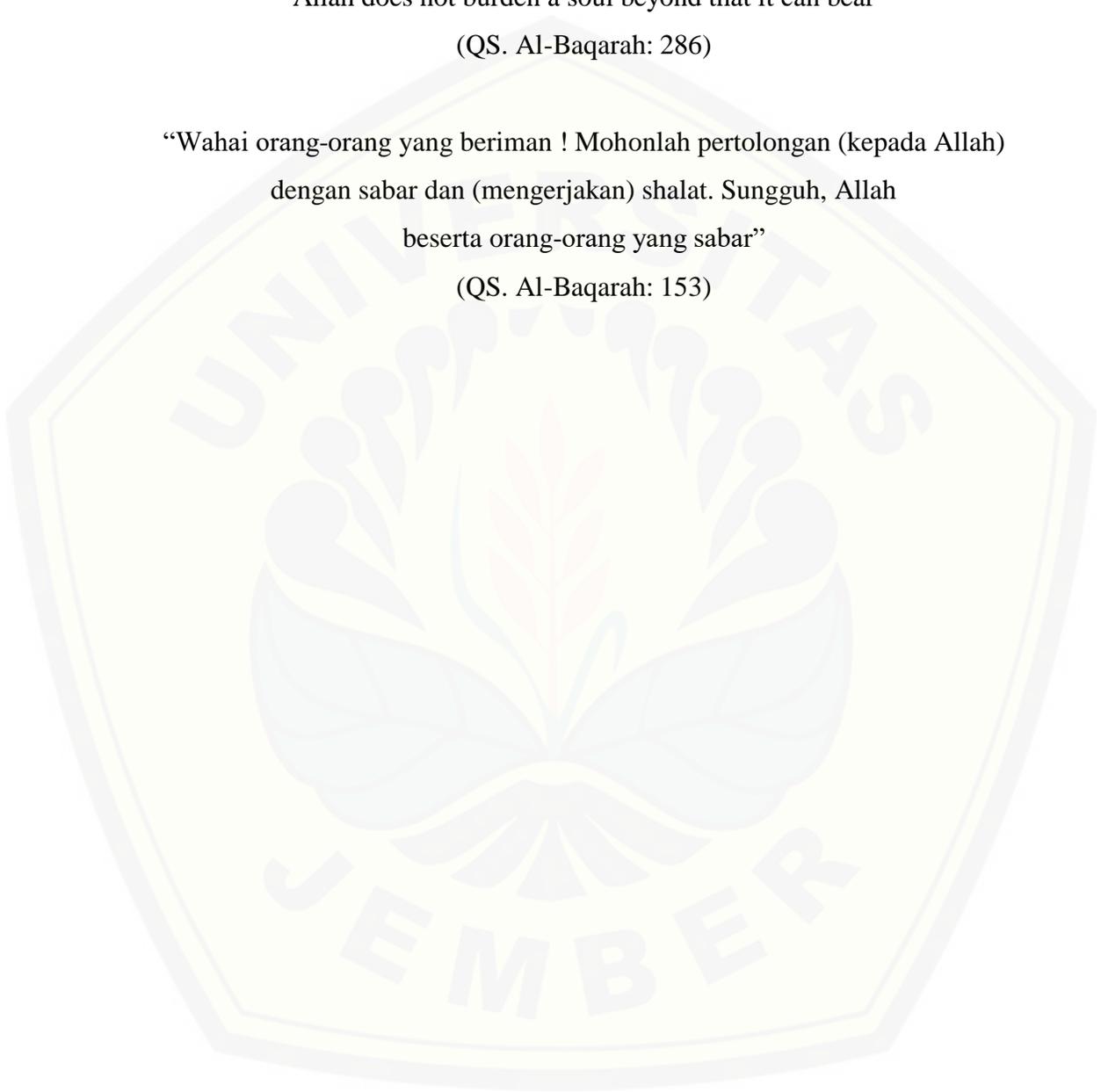
MOTTO

“Allah does not burden a soul beyond that it can bear”

(QS. Al-Baqarah: 286)

“Wahai orang-orang yang beriman ! Mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan (mengerjakan) shalat. Sungguh, Allah beserta orang-orang yang sabar”

(QS. Al-Baqarah: 153)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Putri Khairunnisa

NIM : 132210101034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: “Pengembangan dan Validasi Metode Uji Aktivitas Inhibitor Enzim α -Amilase dari Ekstrak Metanol Daun Kopi secara In Vitro” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, 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 saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 11 Desember 2017

Yang menyatakan,

Putri Khairunnisa

NIM 132210101034

SKRIPSI

PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS

INHIBITOR α -AMILASE DARI EKSTRAK METANOL

DAUN KOPI SECARA IN VITRO

Oleh :

Putri Khairunnisa

NIM 132210101034

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Dwi Koko Pratoko, S.Farm, M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengembangan dan Validasi Metode Uji Aktivitas Inhibitor Enzim α -Amilase dari Ekstrak Metanol Daun Kopi secara In Vitro” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin. 11 Desember 2017

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

Anggota I,

Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP. 197604142002122001

Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.
NIP. 198204062006042001

Anggota II,

Anggota III,

Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198504282009121004

Indah Purnama Sary., S.Si., M.Farm., Apt.
NIP. 198304282008122004

Mengesahkan

Dekan,

Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP.197604142002122001

RINGKASAN

Pengembangan dan Validasi Metode Uji Aktivitas Inhibitor Enzim α -Amilase dari Ekstrak Metanol Daun Kopi secara In Vitro; Putri Khairunnisa; 132210101034; 72 Halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Diabetes Melitus (DM) tipe 2 merupakan tipe diabetes yang lebih umum, lebih banyak penderitanya dibandingkan dengan DM tipe 1. DM tipe 2 mencapai 90% dari kasus keseluruhan DM dan biasanya ditandai dengan adanya resistensi insulin dan defisiensi insulin relatif. Tingginya prevalensi dari diabetes diikuti juga dengan meningkatnya penggunaan obat diabetes oral maupun insulin sebagai terapi farmakologi pada penderita diabetes. Obat anti diabetes oral kebanyakan memberikan efek samping yang tidak diinginkan, maka para ahli mengembangkan sistem pengobatan tradisional untuk DM yang relatif aman dan mudah dalam pembuatannya. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman daun kopi memiliki senyawa yang berperan sebagai agen antidiabetes. Terdapat kandungan beberapa senyawa pada ekstrak metanol daun kopi arabika seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin, sedangkan pada ekstrak metanol daun kopi Arabika dan Robusta memiliki kandungan senyawa asam klorogenat. Beberapa peneliti telah melakukan pengujian hambatan α -amilase dari berbagai macam ekstrak tanaman secara in vitro menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan dari beberapa penelitian tersebut terdapat variasi pada kondisi analisis serta konsentrasi ujinya. Validasi serta pengembangan atau modifikasi perlu dilakukan guna menyesuaikan dengan kondisi laboratorium yang digunakan.

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap mulai dari studi pustaka mengenai ekstrak, optimasi kondisi analisis, validasi metode dan pengujian aktivitas hambatan. Penentuan ekstrak dimulai dengan pengumpulan literatur mengenai aktivitas ekstrak daun kopi muda. Setelah itu dilakukan optimasi kondisi analisis untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis. Selanjutnya dilakukan validasi metode analisis dengan variabel analisa meliputi linieritas, Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi (BD & BK),

selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi. Setelah itu dilakukan uji aktivitas penghambatan α -amilase pada ekstrak daun kopi muda secara in vitro dengan menggunakan metode analisis yang telah diuji validitasnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum metode untuk uji aktivitas ekstrak daun kopi robusta muda dan standar acarbose dengan metode Spektrofotometri UV-Vis yaitu menggunakan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm, waktu inkubasi tahap ketiga yang optimum berada pada menit ke-15, konsentrasi substrat 0,5 mg/mL, konsentrasi enzim 0,5 U/mL, volume DNS 400 μ L (4,38 ppm), dan konsentrasi uji yang digunakan ialah 25 ppm untuk acarbose dan 500 ppm untuk ekstrak daun kopi robusta muda. Uji aktivitas inhibitor enzim α -amilase dari ekstrak daun kopi secara in vitro dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dapat memberikan hasil analisis yang linier dengan koefisien korelasi (r) = 0,9979, V_{xo} = 4,1551% dan X_p = 4,7377 ppm untuk standar acarbose dan koefisien korelasi (r) = 0,997, V_{xo} = 3,0162% dan X_p = 108,3539 ppm untuk daun kopi robusta muda; peka dengan nilai batas deteksi = 4,7377 ppm dan batas kuantitasi = 14,2133 ppm untuk standar acarbose, dan nilai batas deteksi = 108,3539 ppm dan batas kuantitasi = 325,0618 ppm untuk ekstrak daun kopi robusta muda; selektif karena mampu menunjukkan puncak dari produk hasil pemecahan substrat oleh enzim dengan blanko; presisi dengan RSD uji presisi repeatabilitas standar dan sampel berturut-turut adalah sebesar 4,899 % ; 0,394 % . dan RSD uji presisi antara standar acarbose dan sampel berturut-turut adalah sebesar 4,899; 6,502; 4,566 % dan 0,394; 0,377; 0,238 % dan akurat dengan melihat peningkatan kurva sebanding dengan peningkatan persen adisi. Metode yang sudah dinyatakan valid, selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas ekstrak daun kopi arabika muda. Pada daun kopi arabika muda dinyatakan IC_{50} sebesar 286,804 μ g/mL. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode untuk uji aktivitas inhibitor enzim α -amilase dari ekstrak daun kopi secara in vitro ialah valid.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengembangan dan Validasi Metode Uji Aktivitas Inhibitor α -Amilase dari Ekstrak Metanol Daun Kopi Secara In Vitro”. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Dengan terselesaikannya skripsi ini, penulis menyadari dan mengakui bahwa upaya, doa, arahan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak sangat membantu dalam terselesaikannya skripsi ini. Oleh karena itu, dengan sepenuh hati penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari S.Si., M.Farm., Apt. atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Dosen pembimbing akademik, Ibu Lusia Oktora R.K.S, S.Farm., M.Sc., Apt.;
3. Ibu Lestyo Wulandari S.Si., M.Farm., Apt. dan Bapak Dwi Koko Pratoko, S.Farm, M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam membantu dan membimbing penulis hingga akhir penyusunan skripsi ini;
4. Ibu Nia Kristiningrum S.Farm., Apt., M.Farm. dan Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dalam penulisan skripsi ini;
5. Ibu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi yang selalu sabar dalam membantu dan memberikan saran selama penulis melakukan penelitian;
6. Orang tua tercinta Almarhumah Ibunda Syamsiah dan Ayahanda Imam Mahmudi yang selalu memberikan bimbingan moril dan materiil;

7. Kakakku tersayang Mas Aris dan Mbak Desi yang selalu memberikan semangat, perhatian, dan doa kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
8. Kakakku tersayang Mas Indra, Mas Ade, Mbak Dessy, dan Mbak Diena yang selalu memberikan saran kepada penulis dalam menyusun skripsi ini;
9. Sahabatku Sebongkah Upil Ramadhan (Tanjung, Disya, dan Ratna) yang selalu menemani dan memberikan keceriaan selama ini;
10. Partner segala bidang (Nyambek, Cens, Soboh, dan Pretty) yang selalu setia menemani dan memberikan semangat;
11. Orang tua dari Tanjung (Tante Yuli dan Om Iwan) yang selalu memberi perhatian selama penulis menempuh bangku kuliah;
12. Teman-temanku Anak Baik-baik Sayang Ibu (Disya, Mega, Churi, Elsa, Unyil, dan Milly) untuk kehebohan selama ini;
13. Partner bimbinganku Mardiyatul Afifah untuk kerjasama selama penelitian ini serta Chem Squad (Bang Ridlo, Disya, Risput, Elsa, Fiki, Renova, Aini, Leli, Mbak Siti, Riza, Carin, Niken, dan Wahyu);
14. Keluarga keduaku Alumni Kos Khansa (Disya, Imas, Ikek, Riris, Nisa, Retha, Riyana, Dewi, Yasmin, Dini, Iik, Firda, Sirly, Fira, Mbak Ila dan Mbak Nurin);
15. Teman-teman MPA Pring Kuning (Virida, Subhan, Mirza, Diya, Iqbal, Bayu, Istiyam, Riza, Carin, Laily, Mirzatus, Sulfiati, Mbak Pe, Sulfiati, Nadya) atas pengalaman yang luar biasa;
16. Teman-teman seperjuangan Farmasetamol 2013 Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 11 Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN.....	v
SKRIPSI.....	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB. 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Batasan	5
BAB. 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Diabetes Melitus Tipe 2.....	6
2.1.1 Definisi DM Tipe 2 dan Diagnosa	6
2.1.2 Penatalaksanaan Terapi Diabetes Melitus.....	7
2.2 Enzim.....	8

2.2.1	Enzim α -Amilase.....	9
2.2.2	Inhibitor Enzim α -Amilase.....	10
2.3	Tinjauan Tentang Tanaman Kopi	12
2.3.1	Klasifikasi Kopi	12
2.3.2	Morfologi	13
2.3.3	Kandungan Daun Kopi.....	14
2.3.4	Manfaat Daun Kopi.....	15
2.4	Tinjauan Metode Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α-Amilase	16
2.5	Tinjauan Umum Tentang Spektrofotometri UV-Vis	18
2.6	Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis.....	20
2.6.1	Linieritas	20
2.6.2	Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	21
2.6.3	Selektivitas (Spesifisitas)	22
2.6.4	Presisi	22
2.6.5	Akurasi	23
BAB. 3	METODE PENELITIAN.....	26
3.1	Jenis Penelitian	26
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.3	Alat dan Bahan Penelitian	26
3.3.1	Alat Penelitian.....	26
3.3.2	Bahan Penelitian.....	26
3.4	Rancangan Penelitian.....	26
3.4.1	Rancangan Percobaan	26
3.4.2	Alur Penelitian	27
3.5	Prosedur Penelitian	28
3.5.1	Penentuan Sampel	28
3.5.2	Penyiapan Larutan.....	28
3.5.3	Optimasi Kondisi Analisis	29

3.5.4	Validasi Metode	32
3.5.5	Uji Aktivitas Inhibitor α -Amilase pada Sampel.....	34
BAB. 4 HASIL DAN PEMBAHASAN		36
4.1	Optimasi Kondisi Analisis	36
4.1.1	Optimasi Panjang Gelombang.....	36
4.1.2	Optimasi Waktu Inkubasi.....	37
4.1.3	Optimasi Konsentrasi Substrat.....	38
4.1.4	Optimasi Konsentrasi Enzim.....	39
4.1.5	Optimasi Konsentrasi Reagen Pewarna	40
4.1.6	Optimasi Konsentrasi Uji.....	40
4.2	Validasi Metode	42
4.2.1	Linieritas	42
4.2.2	Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	45
4.2.3	Selektivitas/ Spesifisitas.....	46
4.2.4	Presisi	47
4.2.5	Akurasi	49
4.3	Uji Aktivitas Inhibitor α-Amilase pada Sampel	50
BAB 5. PENUTUP.....		52
5.1	Kesimpulan	52
5.2	Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA		53
LAMPIRAN.....	

DAFTAR GAMBAR

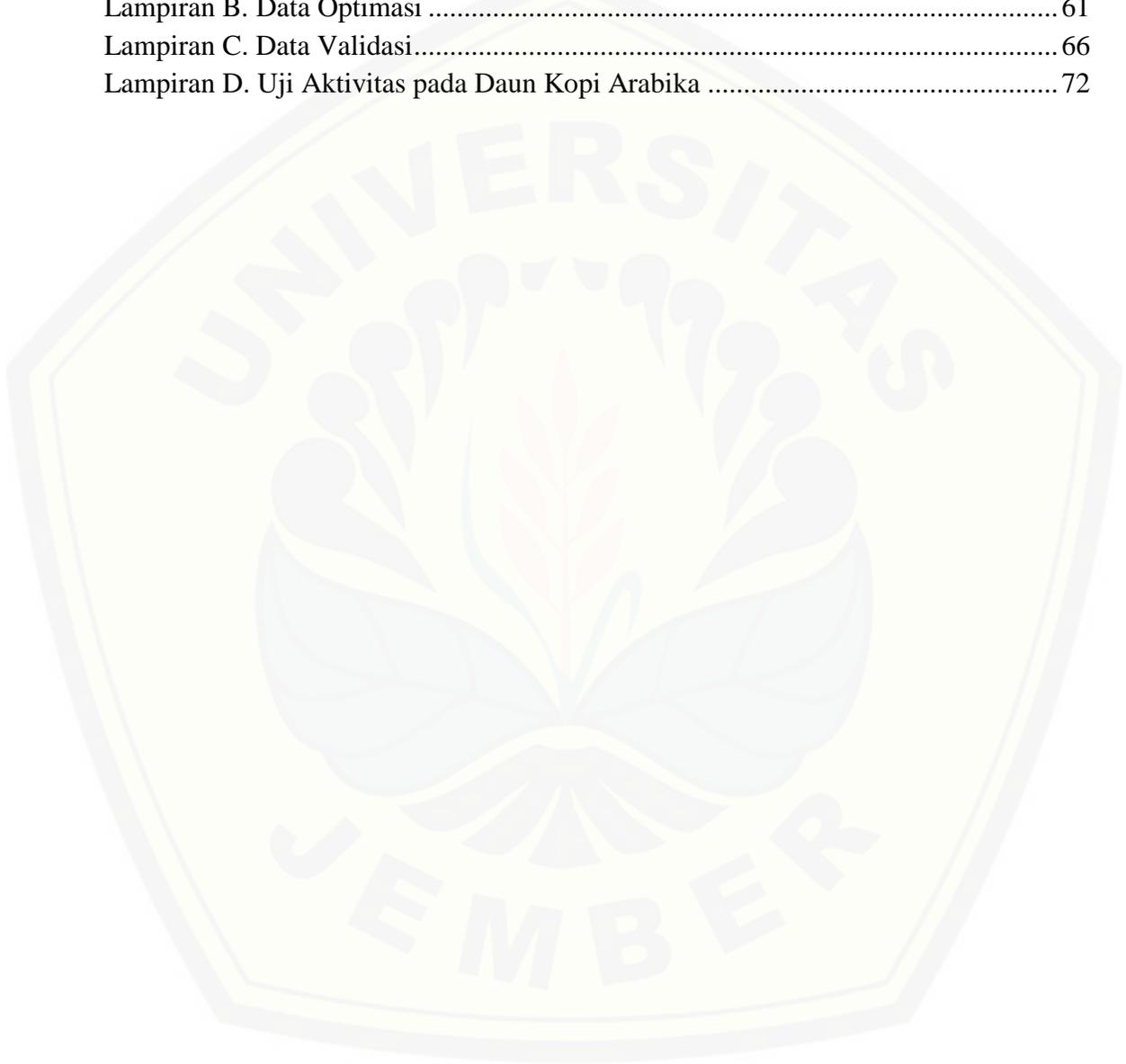
	Halaman
Gambar 2. 1 Struktur α -amilase.....	10
Gambar 2. 2 Struktur kimia acarbose	11
Gambar 2. 3 Tanaman kopi arabika	13
Gambar 2. 4 Tanaman kopi robusta	14
Gambar 2. 5 Tahapan reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS).....	18
Gambar 3. 1 Alur penelitian.....	27
Gambar 4. 1 Panjang gelombang 400-800 nm.....	37
Gambar 4. 2 Optimasi waktu inkubasi.....	38
Gambar 4. 3 Optimasi konsentrasi substrat.....	39
Gambar 4. 4 Optimasi konsentrasi enzim	39
Gambar 4. 5 Optimasi konsentrasi reagen pewarna.....	40
Gambar 4. 6 Kurva linieritas konsentrasi vs %inhibisi standar acarbose	43
Gambar 4. 7 Kurva linieritas konsentrasi vs %inhibisi ekstrak daun kopi robusta.....	44
Gambar 4. 8 Kurva linieritas standar konsentrasi vs %inhibisi pada uji BD dan BK.....	45
Gambar 4. 9 Kurva linieritas sampel konsentrasi vs %inhibisi pada uji BD dan BK.....	46
Gambar 4. 10 Spektra uji selektifitas/ spesifisitas	47
Gambar 4. 11 Profil %adisi vs IC_{50}	50
Gambar 4. 12 Campuran larutan uji aktivitas inhibitor α -amilase.....	50
Gambar 4. 13 Kurva % inhibisi α -amilase ekstrak daun kopi arabika.....	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2. 1 Wilayah Spektrum Radiasi Elektromagnetik (REM).....	20
Tabel 2. 2 Rentang Kesalahan	23
Tabel 2. 3 Persen <i>Recovery</i>	25
Tabel 4. 1 Optimasi Konsentrasi Uji Standar Acarbose dan Ekstrak	41
Tabel 4. 2 Hasil Uji Linieritas Standar Acarbose	42
Tabel 4. 3 Hasil Uji Linieritas Eksrak.....	43
Tabel 4. 4 Hasil Uji Presisi Repeatibilitas Standar Acarbose	48
Tabel 4. 5 Hasil Uji Presisi Repeatibilitas Ekstrak	48
Tabel 4. 6 Hasil Uji Presisi Antara Standar Acarbose	48
Tabel 4. 7 Hasil Uji Presisi Antara Sampel.....	48
Tabel 4. 8 Hasil Uji Akurasi	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Perhitungan Penyiapan Bahan-bahan	58
Lampiran B. Data Optimasi	61
Lampiran C. Data Validasi.....	66
Lampiran D. Uji Aktivitas pada Daun Kopi Arabika	72



BAB. 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes merupakan kondisi kronis yang disebabkan oleh berkurangnya insulin baik relatif atau mutlak (Kimble, 2013). Diabetes Melitus (DM) tipe 2 merupakan tipe diabetes yang lebih umum, lebih banyak penderitanya dibandingkan dengan DM tipe 1. DM tipe 2 mencapai 90% dari kasus keseluruhan DM dan biasanya ditandai dengan adanya resistensi insulin dan defisiensi insulin relatif. Resistensi insulin dimanifestasikan dengan peningkatan lipolisis dan produksi asam lemak bebas, peningkatan produksi glukosa hepatic, dan penurunan serapan glukosa dari otot rangka. Disfungsi sel β pankreas bersifat progresif dan memperburuknya kontrol glukosa darah dari waktu ke waktu. DM tipe 2 terjadi ketika gaya hidup yang memicu diabetes (kalori yang berlebihan, tidak cukup olahraga, dan obesitas) ditumpuk pada genotipe yang rentan (Wells BG *et al.*, 2009).

Menurut *International Diabetes Federation* (2015), Indonesia masuk kedalam 10 besar negara dengan kasus diabetes tertinggi. Pada tahun 2015, Indonesia berada pada urutan ke-7 untuk kasus diabetes tertinggi dengan jumlah 10 juta penduduk. Pada tahun 2040, Indonesia diperkirakan berada pada urutan ke-6 dengan jumlah penderita diabetes mencapai 16,2 juta penduduk. Prevalensi diabetes di Indonesia berdasarkan wawancara tahun 2013 adalah 2,1%. Angka tersebut lebih tinggi dibanding dengan tahun 2007 (1,1%) (Kementerian Kesehatan, 2014).

Tingginya prevalensi dari diabetes diikuti juga dengan meningkatnya penggunaan obat diabetes oral maupun insulin sebagai terapi farmakologi pada penderita diabetes. Obat anti diabetes oral kebanyakan memberikan efek samping yang tidak diinginkan, maka para ahli mengembangkan sistem pengobatan tradisional untuk DM yang relatif aman dan mudah dalam pembuatannya (Hati, Setiawan & Yuliarta, 2013). Indonesia kaya akan tanaman obat tradisional yang secara turun temurun telah digunakan sebagai ramuan obat tradisional dan diharapkan dapat dimanfaatkan dalam pembangunan

kesehatan masyarakat. Kemajuan pengetahuan dan teknologi modern tidak mampu menggeser peranan obat tradisional, bahkan pada saat ini pemerintah pun tengah menggalakkan pengobatan kembali ke alam (*back to nature*) (Wijayakusuma, 1994). *World Health Organization* (WHO) menyebutkan bahwa hingga 65% dari penduduk negara-negara maju telah menggunakan pengobatan tradisional dimana didalamnya termasuk penggunaan obat-obat bahan alam (DEPKES RI, 2007).

Produk herbal telah banyak dipraktekan di seluruh dunia untuk mengatasi diabetes tipe 2 atau *Non-insulin Dependent DM* (NIDDM). Dalam aspek ini, tanaman dapat dipertimbangkan sebagai tambahan diet yang efektif dalam pengelolaan DM dan sumber potensial untuk penemuan agen antidiabetes oral yang aktif (Al-Aboudi & Afifi, 2011). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman daun kopi memiliki senyawa yang berperan sebagai agen antidiabetes. Pada penelitian yang dilakukan oleh Retnaningtyas *et al* (2016) terdapat kandungan beberapa senyawa pada ekstrak metanol daun kopi arabika seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Berdasarkan profil kromatografi dari penelitian tersebut menunjukkan adanya senyawa mangiferin sebesar 3,47%. Kristiningrum dkk (2015) menyebutkan bahwa ekstrak metanol daun kopi arabika dan robusta memiliki kandungan senyawa asam klorogenat.

Menurut Farhaty (2017), salah satu efek farmakologis yang diberikan oleh asam klorogenat ialah sebagai antidiabetes dengan mengatur metabolisme lemak dan glukosa. Asam klorogenat dapat menghambat ekspresi G6Pase, meningkatkan glukosa puasa, toleransi glukosa dan sensitivitas insulin, sedangkan menurut Miura *et al.* (2001) senyawa mangiferin dapat menurunkan kadar glukosa darah dan lemak pada tikus diabetes melalui oral atau injeksi intraperitoneal. Mekanisme efek hipoglikemik yang potensial ini mungkin disebabkan oleh meningkatnya pelepasan insulin dari sel β pankreas.

Penderita diabetes mellitus mengalami kerusakan dalam produksi maupun sistem kerja insulin, sedangkan ini sangat dibutuhkan dalam melakukan regulasi metabolisme karbohidrat. Akibatnya, penderita diabetes mellitus akan mengalami gangguan pada metabolisme karbohidrat (Suriani, 2012). Karbohidrat mulai dicerna sejak makanan

masuk ke dalam mulut, makanan dikunyah dan dipecah menjadi bagian-bagian kecil, sehingga karbohidrat akan diuraikan menjadi molekul yang lebih sederhana dengan bantuan enzim amilase (Oktarlina *et al.*, 2017). Amilase (α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis hidrolisis dari ikatan glikosidik (α -1,4) pada pati dan berbagai oligosakarida lainnya (Heidari *et al.*, 2005). Penghambatan enzim dapat menjadi target potensial dalam pengendalian penyakit dan pengobatan. Enzim α -amilase yang memotong ikatan glikosidik (α -1,4) pada pati akan dihambat kerjanya oleh inhibitor enzim, sehingga pati yang seharusnya terhidrolisis menjadi bentuk yang lebih sederhana dan nantinya akan dicerna oleh usus menjadi terhambat prosesnya. Pengendalian kinetika pencernaan karbohidrat dan penyerapan monosakarida ini bisa menjadi nilai besar dalam menghindari kondisi seperti diabetes dan obesitas (Kim & Nho, 2004).

Inhibitor menghambat aksi enzim saat terjadi hidrolisis pati sehingga menimbulkan efek yang menguntungkan pada indeks glikemik. Inhibitor ini dapat menghambat pembebasan glukosa dari karbohidrat serta penyerapan glukosa menjadi terlambat, sehingga kadar glukosa darah proprandial menjadi berkurang dan menekan hiperglikemik proprandial (Elmaniar & Muhtadi, 2017). Ekstrak daun kopi diharapkan dapat menunjukkan aktivitas penghambatan pada penghidrolisisan pati oleh α -amilase yang berperan penting dalam mereduksi kondisi hiperglikemia *post prandial*. Beberapa peneliti seperti Subramanian *et al.* (2008), Sumathy *et. al* (2013), dan Yoganandam G *et. al* (2015) telah melakukan pengujian hambatan α -amilase dari berbagai macam ekstrak tanaman secara *in vitro* menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan dari beberapa penelitian tersebut terdapat variasi pada kondisi analisis serta konsentrasi ujinya. Metode pengukuran penghambatan terhadap aktivitas enzim α -amilase merupakan pengembangan dari metode non-baku, sehingga validasi perlu dilakukan agar hasil yang didapatkan dapat dipertanggung jawabkan. Validasi serta pengembangan atau modifikasi perlu dilakukan guna menyesuaikan dengan kondisi laboratorium yang digunakan.

Metode yang dikembangkan harus divalidasi terlebih dahulu untuk menjamin bahwa metode analisa tersebut akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisa (Prabowo *et al.*, 2012). Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Pada penelitian ini, parameter validasi yang diuji meliputi linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifitas, presisi dan akurasi. Metode analisis yang dikembangkan dan divalidasi nantinya diharapkan akan menghasilkan hasil pengujian yang dapat dipertanggung jawabkan.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah dijabarkan, maka dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut.

1. Bagaimanakah kondisi optimum pada uji aktivitas penghambatan ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase dengan metode Spektrofotometri UV-Vis ?
2. Apakah aktivitas penghambatan ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dapat memberikan hasil analisis yang valid yaitu linier, peka, selektif/spesifik, presis dan akurat?
3. Bagaimana aktivitas penghambatan (IC_{50}) ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase ?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjawab rumusan masalah yang ada, yaitu sebagai berikut.

1. Menentukan kondisi optimum pada uji aktivitas penghambatan ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.
2. Menentukan validitas metode yang meliputi parameter kelinieritan, kepekaan, kespesifikan dan keselektifan, keseksamaan serta keakuratan uji

aktivitas penghambatan ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.

3. Mengetahui aktivitas penghambatan (IC_{50}) ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang didapatkan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut.

1. Menghasilkan suatu metode analisis untuk uji aktivitas penghambatan ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.
2. Memberikan informasi mengenai penghambatan aktivitas inhibitor ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase.
3. Menambah pengetahuan mahasiswa tentang optimasi dan validasi metode uji aktivitas penghambatan enzim α -amilase menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

1.5 Batasan

1. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak jadi yang diekstraksi dengan metode ultrasonikasi dan maserasi.
2. Validasi metode yang dilakukan menggunakan daun kopi robusta, sedangkan metode yang telah tervalidasi tersebut digunakan untuk pengujian sampel daun kopi arabika.

BAB. 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus Tipe 2

2.1.1 Definisi DM Tipe 2 dan Diagnosa

Diabetes melitus (DM) merupakan gangguan metabolisme kronis yang disebabkan adanya defisiensi insulin absolut/relatif atau resistensi sel terhadap insulin (Zanatta *et al.*, 2007). Diabetes Melitus ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein yang disebabkan kerusakan sekresi insulin, aksi insulin atau keduanya (WHO, 1999).

DM tipe 2 ditandai dengan resistensi insulin dan defisiensi insulin relatif. Resistensi insulin ditandai dengan peningkatan lipolisis dan produksi asam lemak bebas, peningkatan produksi glukosa hepatic dan penurunan pengambilan glukosa pada otot skeler. Disfungsi sel β mengakibatkan gangguan pada pengontrolan glukosa darah. DM tipe 2 lebih disebabkan karena gaya hidup penderita diabetes (kelebihan kalori, kurangnya olahraga, dan obesitas) dibandingkan pengaruh genetik (Sukandar, 2008).

Diagnosis klinis DM umumnya akan dipikirkan apabila ada keluhan khas DM berupa poliuria, polidipsia, polifagia, dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan penyebabnya. Keluhan lain yang mungkin disampaikan penderita antara lain badan terasa lemah, sering kesemutan, gatal-gatal, mata kabur, disfungsi ereksi pada pria, dan pruritus vulvae pada wanita (Muchid *et al.*, 2005). Kriteria diagnosis DM adalah kadar glukosa puasa ≥ 126 mg/dL atau pada 2 jam setelah makan ≥ 200 mg/dL atau HbA1c $\geq 8\%$. Jika kadar glukosa 2 jam setelah makan > 140 mg/dL tetapi lebih kecil dari 200 mg/dL dinyatakan glukosa toleransi lemah (Sukandar, 2008).

2.1.2 Penatalaksanaan Terapi Diabetes Melitus

Penatalaksanaan terapi diabetes mempunyai tujuan akhir untuk menurunkan morbiditas dan mortalitas DM, yang secara spesifik ditujukan untuk mencapai 2 target utama, yaitu:

1. Menjaga agar kadar glukosa plasma berada dalam kisaran normal
2. Mencegah diabetes (Muchid *et al.*, 2005).

a. Terapi Non Farmakologi

Dalam penatalaksanaan DM, langkah pertama yang harus dilakukan adalah penatalaksanaan tanpa obat. Terapi non farmakologi yang dapat diterapkan antara lain:

1. Diet

Pengaturan diet pada pasien DM dilakukan untuk mengatur jumlah kalori dan karbohidrat yang dikonsumsi setiap hari. Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi seimbang antara karbohidrat, protein, dan lemak (DiPiro *et al.*, 2015).

2. Olahraga

Berolahraga secara teratur mampu menurunkan dan menjaga kadar gula darah agar tetap normal (DiPiro *et al.*, 2015). Olahraga yang disarankan adalah olahraga yang bersifat CRIPE (*Continous, Rhythmical, Interval, Progressive, Endurance Training*) (Muchid *et al.*, 2005). Aerobik merupakan salah satu jenis olahraga yang dapat memperbaiki kerja dari insulin, menurunkan terjadinya penyakit kardiovaskuler, dan mampu menurunkan serta mempertahankan berat badan ideal (DiPiro *et al.*, 2015).

b. Terapi Farmakologi

Terapi farmakologi yang dapat diberikan untuk penyakit DM antarlain terapi insulin dan terapi hipoglikemik oral. Berikut adalah macam-macam terapi diabetes melitus :

1) Terapi Insulin

Insulin mampu menurunkan kadar gula darah dengan menstimulasi pengambilan glukosa perifer dan menghambat produksi glukosa hepatic (Sukandar,

2008). Terapi insulin merupakan terapi yang harus dijalani bagi penderita DM tipe 1. Pada DM tipe 1, sel-sel β langerhans kelenjar pankreas penderita rusak, sehingga tidak dapat memproduksi insulin kembali. Sebagai penggantinya, penderita DM tipe 1 harus memperoleh insulin eksogen untuk membantu agar metabolisme karbohidrat di dalam tubuh dapat berjalan normal (Muchid *et al.*, 2005).

2) Terapi Hipoglikemik Oral

Obat hipoglikemik oral biasanya ditujukan bagi penderita DM tipe 2. Pemilihan obat hipoglikemik oral yang tepat sangat menentukan keberhasilan terapi diabetes. Bergantung pada tingkat keparahan penyakit dan kondisi pasien, farmakoterapi hipoglikemik oral dapat dilakukan dengan menggunakan satu jenis obat atau kombinasi dari dua jenis obat (Muchid *et al.*, 2005). Berdasarkan mekanisme kerjanya, obat-obat hipoglikemik oral dapat dibagi menjadi tiga golongan, yaitu :

- a. Obat-obat yang meningkatkan sekresi insulin meliputi obat hipoglikemik oral golongan sulfonilurea dan glinida (meglitinida dan turunan fenilalanin)
- b. *Sensitizer* insulin (obat-obat yang dapat meningkatkan sensitifitas sel terhadap insulin), meliputi obat-obat hipoglikemik golongan biguanida dan tiazolidindion, yang dapat membantu tubuh untuk memanfaatkan insulin secara lebih efektif.
- c. Penghambatan katabolisme karbohidrat, antara lain penghambatan α -amilase dan α -glukosidase yang bekerja menghambat absorpsi glukosa dan umum digunakan untuk mengendalikan hiperglikemia *post-prandial* (*post-meal-hyperglycemia*). Disebut juga "*pati-blocker*" (Muchid *et al.*, 2005).

2.2 Enzim

Enzim merupakan sekelompok protein yang mengatur dan menjalankan perubahan-perubahan kimia dalam sistem Biologi (Sumardjo, 2009). Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalisator yang mempercepat reaksi dengan menurunkan energi aktivasi. Definisi enzim yang sederhana dan ringkas adalah bahwa enzim merupakan katalis biologis yang mempercepat reaksi kimia tanpa mengubah ekuilibriumnya (Mantsala & Niemi, 2009).

2.2.1 Enzim α -Amilase

α -Amilase merupakan produk utama yang dikeluarkan oleh kelenjar pankreas (5-6%) dan saliva (Sales *et al.*, 2012). Selain itu, enzim α -Amilase juga dapat ditemukan pada mikroorganisme, hewan, tumbuhan, jamur (ascomycetes dan basidiomycetes), dan bakteri (*Bacillus*) (Ompusunggu & Silaban, 2013; Souza & Magalhaes, 2010).

Enzim α -amilase (1,4- α -D-glukan 4-glukanohidrolase, EC 3.2.1.1) ialah endoenzim yang bekerja dengan menghidrolisis pati pada ikatan α -1,4 glukosidik menjadi monosakarida dan disakarida. Enzim α -amilase secara acak akan memutuskan ikatan α -1,4 pada bagian dalam molekul amilosa maupun pada amilopektin (Fogarty, 1983).

Cara kerja α -amilase pada molekul amilosa terjadi melalui dua tahap. Pertama, degradasi yang sangat cepat amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Yang kedua pembentukan glukosa dan maltosa dari amilosa sebagai hasil akhir dan caranya tidak secara acak. Kerja α -amilase pada molekul amilopektin akan menghasilkan glukosa, maltosa dan berbagai α -limit dextrin yaitu oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih residu gula yang semuanya mengandung ikatan α -1,6. Pengukuran hasil degradasi pati atau kadar dekstrin dapat menjadi penentu aktivitas α -amilase (Winarno, 1995).

α -Amilase memiliki struktur tiga dimensi yang mampu mengikat substrat dan, melalui aksi kelompok katalitik yang sangat spesifik akan mempercepat kerusakan pada ikatan glikosidik. α -Amilase manusia merupakan enzim yang mengandung kalsium yang terdiri dari 512 asam amino dalam rantai oligosakarida tunggal dengan berat molekul 57,6 kDa. Protein mengandung 3 domain: A, B, dan C (Gambar 2.1). Domain A adalah bagian yang terbesar pada gambar ditandai warna merah, menyajikan struktur super berbentuk barel khas (β/α). Domain B yang ditandai dengan warna kuning pada gambar merupakan domain yang disisipkan di antara domain A dan C dan terikat pada domain A karena adanya ikatan disulfida. Domain C memiliki struktur lembar yang terhubung ke domain A dengan adanya rantai polipeptida sederhana. Sisi

aktif (pengikat substrat) amilase terletak di celah panjang yang terletak di antara ujung karboksil domain A dan B. Kalsium (Ca^{2+}) terletak di antara domain A dan B dan dapat bertindak dalam menstabilisasi struktur tiga dimensi dan sebagai aktivator alosterik. Beberapa enzim memiliki lebih dari satu bagian aktif untuk mengikat substrat supaya enzim dapat mengikat substrat lain ketika sudah terikat dengan suatu substrat tertentu. Sifat enzim inilah yang disebut sebagai *allosteric* (de Souza & e Magalhaes, 2010).



Gambar 2. 1 Struktur α -amilase.

Domain A ditunjukkan pada warna merah, domain B berwarna kuning dan domain C berwarna ungu. Di pusat katalitik, ion kalsium ditunjukkan pada bola biru dan ion klorida dalam bola kuning. Struktur hijau terikat pada sisi aktif dan permukaan dari sisi pengikat.

2.2.2 Inhibitor Enzim α -Amilase

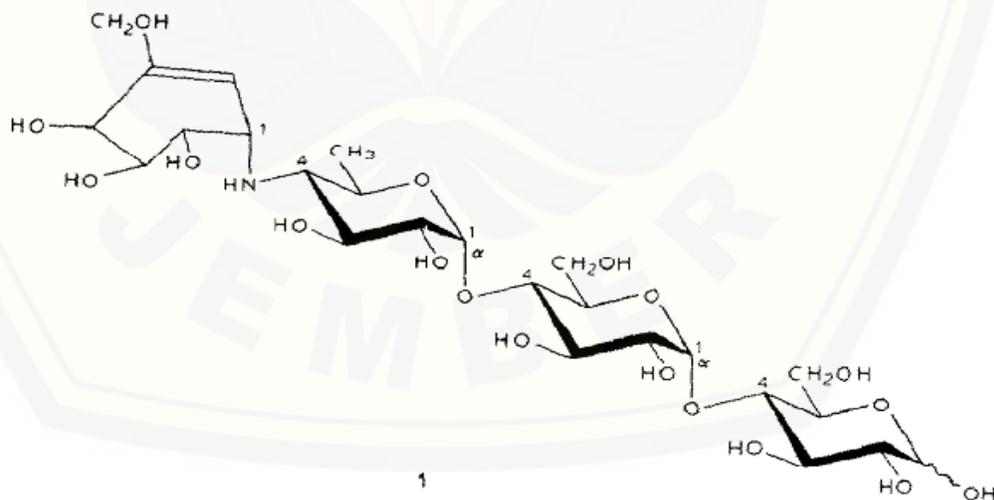
Inhibitor merupakan senyawa yang dapat menghambat aktivitas enzim saat ditambahkan ke dalam reaksi enzim-substrat. Terdapat dua jenis inhibitor, yaitu inhibitor reversibel dan irreversibel. Inhibitor reversibel dapat dengan cepat membentuk kompleks ekuilibrium difusi non-kovalen terkontrol dengan enzim dan kompleks ini dapat terdisosiasi dengan dialisis atau filtrasi gel. Sementara itu, inhibitor irreversibel membentuk ikatan kovalen dengan enzim yang tidak dapat terdisosiasi (Lehninger, 1990).

Penghambat amilase juga dikenal sebagai penghambat pati karena mengandung zat yang mencegah pati makanan agar tidak diserap tubuh. Pati adalah karbohidrat

kompleks yang tidak dapat diserap kecuali jika dipecah terlebih dahulu oleh enzim amilase pencernaan dan enzim sekunder lainnya. Inhibitor amilase yang sangat terkonsentrasi telah menunjukkan potensi mengurangi penyerapan karbohidrat pada manusia (Oboh *et al.*, 2012).

Pada penderita DM, penghambatan terhadap enzim yang berperan dalam hidrolisis karbohidrat menyebabkan penghambatan absorpsi glukosa, sehingga dapat menurunkan keadaan hiperglikemia postprandial. Enzim α -amilase dapat dihambat kerjanya oleh obat-obatan golongan inhibitor α -glukosidase (Muchid *et al.*, 2005). Terdapat dua jenis obat yang berasal dari golongan inhibitor α -glukosidase yaitu acarbose dan miglitol (DiPiro *et al.*, 2015).

Menurut Sales *et al.* (2012), acarbose adalah obat yang diketahui dengan baik banyak digunakan untuk pengobatan klinis diabetes melitus, yang merupakan pseudotetrasakarida. Diproduksi melalui fermentasi *Actinoplanes sp.* dan terdiri dari turunan polihidroksilat aminocyclohexena (valienamina) yang terhubung melalui atom nitrogen pada 6-deoxyglucose, yang dengan sendirinya dapat terikat pada bagian α -1,4 maltosa.



Gambar 2. 2 Struktur Kimia Acarbose (Calder & Geddes, 1989)

Acarbose merupakan penghambat kompetitif α -amilase dengan mekanisme penghambatannya disebabkan oleh cincin sikloheksena tak jenuh dan hubungan nitrogen glikosidik yang meniru keadaan transisi untuk pembelahan enzimatik dari ikatan glikosidik. Penggunaan obat ini menimbulkan beberapa efek samping, seperti rasa tidak nyaman pada perut, sering flatulensi, dan terkadang diare (Muchid *et al.*, 2005).

2.3 Tinjauan Tentang Tanaman Kopi

2.3.1 Klasifikasi Kopi

Klasifikasi tanaman kopi (*Coffea* sp.) menurut Rahardjo (2012) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Coffea
Spesies	: <i>Coffea</i> sp. [<i>Coffea arabica</i> L., <i>Coffea canephora</i>]

Tanaman kopi (*Coffea* sp.) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang dikembangkan sejak penjajahan Belanda. Tanaman ini telah menjadi komoditas yang diperhitungkan dalam penguatan devisa negara. Hal ini dapat dilihat dari data produksi, ekspor dan luas areal kopi Indonesia. Produksi kopi Indonesia telah menempati posisi ke-3 dunia dibawah Brazil dan Vietnam (Hartono, 2013).

Tanaman kopi yang berkembang di Indonesia terdiri atas kopi arabika dan robusta. Kedua kopi tersebut memiliki tingkat permintaan yang cukup tinggi dibandingkan jenis kopi lainnya (Hartono, 2013).

2.3.2 Morfologi

Secara alami, tanaman kopi memiliki akar tunggang sehingga menjadikan tanaman kopi tidak mudah rebah. Akar tunggang tersebut hanya dimiliki oleh tanaman kopi yang berasal dari bibit semai atau bibit sambung (okulasi) yang batang bawahnya berasal dari bibit semai. Sementara tanaman kopi yang berasal dari bibit setek, cangkok, atau okulasi yang batang bawahnya berasal dari bibit setek tidak memiliki akar tunggang sehingga relatif mudah rebah (AAK, 1988).



Gambar 2. 3 Tanaman Kopi Arabika (Hulupi & Martini, 2013)

Tanaman kopi arabika (Gambar 2.3) tumbuh rimbun dan membentuk pohon perdu kecil. Tanaman kopi membutuhkan waktu 3 tahun dari saat perkecambahan sampai menjadi tanaman berbunga dan menghasilkan buah kopi. Kopi arabika memiliki percabangan yang lentur serta berdaun tipis. Daun kopi berwarna hijau mengkilap yang tumbuh berpasangan dengan berlawanan arah serta memiliki bentuk daun yang lonjong dengan tulang daun yang tegas (Rahardjo, 2012)



Gambar 2. 4 Tanaman Kopi Robusta (Hulupi & Martini, 2013; Pertiwi, 2015)

Tanaman kopi robusta (Gambar 2.4) mempunyai daun berbentuk bulat telur dengan ujung agak meruncing. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang dan ranting-rantingnya. Permukaan atas daun mengkilat, tepi rata, pangkal tumpul, panjang 5-15 cm; lebar 4,0-6,5 cm ; pertulangan menyirip, tangkai panjang 0,5-1,0 cm ; dan berwarna hijau (Najiyati & Danarti, 2012). Pada umumnya daun kopi robusta lebih besar dari daun kopi arabika (Mutua, 2000).

2.3.3 Kandungan Daun Kopi

Daun kopi hasil pemangkasan biasanya terbuang begitu saja sehingga perlu pemanfaatan lebih lanjut karena selain memiliki kadar tannin yang cukup tinggi, daun kopi juga memiliki rasa yang tak kalah nikmat dari biji kopi. Daun kopi dapat dimanfaatkan sebagai pengganti daun teh dalam pembuatan teh (Hotmaruli dkk., 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Salgado, et.al, 2008 menunjukkan bahwa daun kopi memiliki kandungan total fenol dengan konsentrasi 25-46%. Selain itu, asam klorogenat juga terkandung dalam daun kopi. Kandungan senyawa asam klorogenat pada daun kopi arabika muda sebesar 1,89% dan daun kopi robusta muda sebesar 1,05% (Kristiningrum dkk., 2015).

Daun kopi arabika memiliki kandungan senyawa berupa golongan alkaloid, flavonoid dan fenol termasuk turunan dari asam hidroksisinamat, kafein, klorogenat, kumarin, asam ferulat, dan asam sinapat (Manach C, Scalbert A, Morand C, 2004). Selain itu, daun kopi arabika juga mengandung mangiferin, dan asam feruloylkuinat (Campa *et al.*, 2012). Menurut (Oestreich-Janzen, 2010), daun kopi robusta memiliki kandungan senyawa berupa kafein, trigonelline, dan asam klorogenat. Daun kopi robusta juga memiliki kandungan *hydroxycinnamic acid ester* (HCE) (Campa *et al.*, 2012).

2.3.4 Manfaat Daun Kopi

Efek farmakologis senyawa yang terkandung dalam daun kopi memiliki aktivitas yaitu sebagai : agen antibakteri (Dogasaki *et al.*, 2002), antioksidan (Olthoff dkk., 2001), pengobatan asma (Schwartz dan Weiss, 1992), antihiperlipidemia (Yukawa *et al.*, 2004), pengobatan pankreatitis (Morton *et al.*, 2004), antidiabetes, pencegahan penyakit Parkinson (Higdon & Frei., 2007), hepatoprotektor, antihipertensi, dan antikanker (Farhaty, 2017).

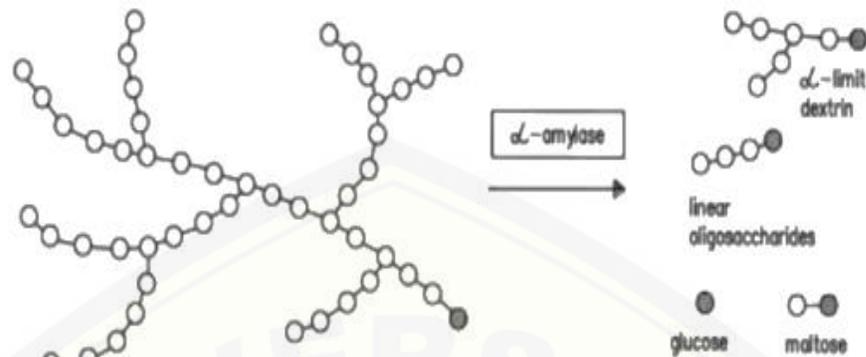
Senyawa dalam daun kopi memiliki efek farmakologi sebagai agen antidiabetes salah satunya dengan mekanisme penghambatan sistem Glukosa-6-Fosfatase oleh asam klorogenat. Hidrolisis glukosa-6-fosfat menjadi glukosa dan fosfat merupakan tahap akhir produksi glukosa, glukoneogenesis dan glikogenolisis. Hidrolisis glukosa-6-fosfat memerlukan fungsi gabungan glukosa-6-fosfatase, protein translokase glukosa-6-fosfat, dan protein translokasi kedua. Asam klorogenat telah terbukti menjadi penghambat kompetitif spesifik dari translokasi glukosa-fosfat dalam mikrosom hati tikus. Sehingga terjadi pengahambatan penyerapan glukosa dalam usus (Higdon & Frei, 2006). Menurut (Setyono dkk., 2017) asam klorogenat juga mampu meningkatkan metabolisme tubuh, meningkatkan oksidasi asam lemak, menurunkan kadar trigliserida di hepar, dan menginhibisi kerja enzim amilase dan lipase pankreas pada intestinal.

2.4 Tinjauan Metode Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase

Beberapa metode pengujian aktivitas penghambatan enzim α -amilase antara lain ialah metode yang digunakan Fuwa (1954), Marshall & Lauda (1975), dan Xiao (2006) dalam mengukur aktivitas enzim α -amilase adalah dengan mengukur warna kompleks yang terbentuk antara iodine dengan pati. Semakin besar aktivitas penghambatan phaseolamin, maka jumlah pati yang terhidrolisis semakin sedikit sehingga kompleks iodine dengan pati yang terbentuk semakin banyak dan menghasilkan warna biru. Warna kompleks tersebut dapat dikuantifikasi dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer (Angela, 2011).

Metode lain yang dapat digunakan adalah pengukuran gula pereduksi yang terbentuk akibat hidrolisis pati oleh enzim α -amilase. Terdapat dua pereaksi yang umum digunakan dalam pengukuran gula pereduksi, yaitu reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) (Fossum & Whitaker, 1974; Lee *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2006) dan *alkaline copper* (Fuwa, 1954; Green III *et al.*, 1989; Roychan & Chaudari, 2001). Kedua pereaksi ini dapat bereaksi dengan gula pereduksi yang terbentuk dan menghasilkan kompleks warna yang juga dapat dikuantifikasi dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer (Angela, 2011).

Pengujian penghambatan enzim α -amilase secara *in vitro* yang umum digunakan ialah dengan menggunakan reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) didasarkan pada penurunan jumlah gula pereduksi hasil reaksi hidrolisis pati terlarut oleh enzim α -amilase dengan adanya senyawa inhibitor. Pati terlarut akan dihidrolisis oleh enzim α -amilase menjadi gula pereduksi oligosakarida yang lebih pendek karena adanya pemutusan ikatan α -D-(1-4) glikosidik. Produk akhir reaksi hidrolisis α -amilase masih berupa campuran oligosakarida, seperti maltosa, maltotriosa, dan oligosakarida bercabang dengan 6-8 unit glukosa yang mengandung ikatan α -1,4 maupun α -1,6 (Sales *et al.*, 2012).



Gambar 2. 5 Mekanisme Hidrolisis Pati oleh Enzim α -Amilase

(Howard, 2015)

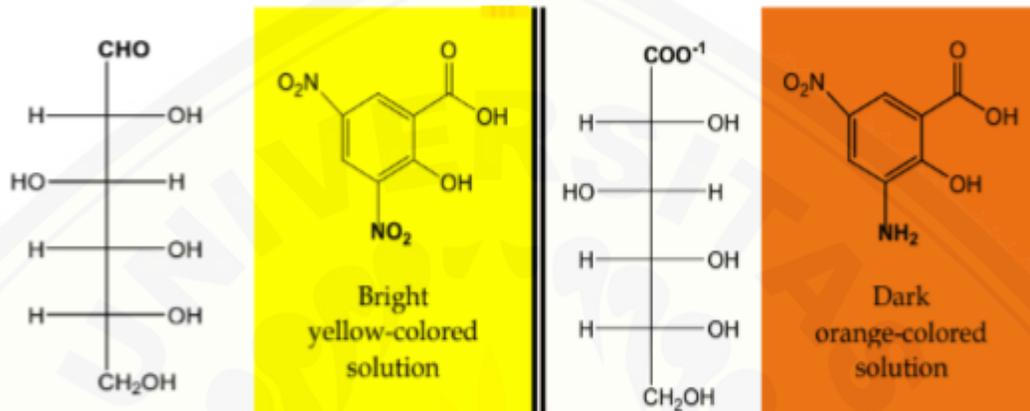
Penelitian yang dilakukan oleh Yoganandam (2011), Sumathy *et al.* (2013), Subramanian *et al.* (2008) memiliki kesamaan yaitu menggunakan reagen DNS, namun pada kondisi analisisnya terdapat perbedaan seperti pada konsentrasi enzim, substrat, inhibitor serta waktu inkubasinya. Untuk menentukan konsentrasi enzim, substrat, inhibitor dan waktu preinkubasi yang optimum dalam metode yang dikembangkan perlu dilakukan percobaan optimasi. Preinkubasi dilakukan pada pH 6.9 karena nilai pH tersebut sesuai dengan nilai pH cairan tubuh.

Penghentian reaksi hidrolisis α -amilase dapat dilakukan dengan proses pemanasan. Pemanasan menyebabkan perubahan konfigurasi dari α -amilase, sehingga aktivitasnya akan hilang. Setelah reaksi dihentikan, konsentrasi produk dari reaksi hidrolisis ditentukan menggunakan reagen pewarna asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Reagen tersebut akan direduksi oleh setiap gula reduksi yang terdapat dalam larutan, sehingga produk campuran tersebut dapat ditentukan konsentrasinya. Senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang dihasilkan dari reaksi tersebut memiliki warna orange gelap dengan panjang gelombang 540 nm. Reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) oleh salah satu gula reduksi yaitu glukosa (Sya'bani, 2017).

Reaksinya yaitu:



(Timerman, A.P., 2012)



Gambar 2. 6 Tahapan reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

(Timerman, A.P.,2012).

2.5 Tinjauan Umum Tentang Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis UV-Visible merupakan salah satu teknik yang paling sering digunakan dalam analisis farmasi. Spektrofotometri UV-Vis UV-Visible melibatkan pengukuran jumlah ultraviolet atau radiasi visible diserap oleh zat yang terdapat dalam larutan. Instrumen yang mengukur rasio atau fungsi rasio dari intensitas dua berkas cahaya pada wilayah UV hingga cahaya tampak adalah Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (Behera, *et. al.*, 2012).

Spektrofotometri UV-Vis UV-Vis adalah alat yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah UV-Vis (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995).Pembagian wilayah radiasi elektromagnetik ditampilkan pada Tabel 2.1. Jika panjang gelombang yang digunakan adalah gelombang cahaya tampak maka disebut sebagai kolorimetri karena memberikan warna.

Analisis dengan Spektrofotometri UV-Vis UV-Vis selalu melibatkan pembacaan absorban radiasi elektromagnetik oleh molekul atau radiasi elektromagnetik yang diteruskan. Keduanya dikenal sebagai absorban (A) tanpa satuan dan transmittan dengan satuan persen (%T). Apabila suatu radiasi elektromagnetik dikenakan kepada suatu larutan dengan intensitas radiasi semula (I_0) maka sebagian radiasi tersebut akan diteruskan (I_t) dipantulkan (I_r) dan diabsorpsi (I_a) sehingga didapatkan persamaan

$$I_0 = I_t + I_r + I_a \dots \dots \dots (1)$$

Persamaan diatas dengan harga I_r ($\pm 4\%$) dapat diabaikan karena pengerjaan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis UV-Vis dipakai larutan pembanding sehingga persamaan 1 dapat disederhanakan seperti berikut

$$I_0 = I_t + I_a \dots \dots \dots (2)$$

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas serapan yang diteruskan oleh larutan penyerap berbanding lurus dengan tebal dan kadar larutan

$$T = \frac{I_t}{I_0} = \epsilon \cdot c \cdot b \dots \dots \dots (3)$$

$$A = \log \frac{1}{T} = \epsilon \cdot c \cdot b \dots \dots \dots (4)$$

Keterangan :

T : persen transmittan

I_0 : intensitas radiasi yang datang

I_t : intensitas radiasi yang diteruskan

ϵ : absorbansi molar

c : konsentrasi

b : tebal larutan (cm)

A : absorban

Tabel 2. 1 Wilayah Spektrum Radiasi Elektromagnetik (REM)

Wilayah	Panjang gelombang
Ultraviolet jauh	10-200 nm
Ultraviolet dekat	200-400 nm
Visible	400-750 nm
Inframerah dekat	0,75-2,2 μm
Inframerah tengah	2,5-50 μm
Inframerah jauh	50-1000 μm

Sumber : (Behera *et al.*, 2012)

2.6 Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Menurut *United States Pharmacopeia* (USP), ada 8 langkah dalam validasi metode yakni presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantitasi, spesifisitas, linieritas dan rentang, ketangguhan (*ruggednes*), serta ketahanan (*robustness*).

2.6.1 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses menggunakan metode kuadrat terkecil, selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya (Huber, 2007). Untuk pengujian linieritas, direkomendasikan menggunakan 5-10 konsentrasi standar dengan rentang 80-120%, 25-200% atau 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $Y = a + bX$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis, sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y) (Harmita, 2004).

2.6.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas Deteksi (BD) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantitasi. Batas deteksi merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu. Batas Kuantitasi (BK) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Rohman, 2009).

Menurut Harmita (2004), batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat terdeteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan dapat diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi merupakan parameter yang dapat dipengaruhi oleh perubahan kecil dalam sistem analitis (misalnya suhu, kemurnian reagen, efek matriks, kondisi berperan). Parameter ini penting dilakukan oleh laboratorium dalam memvalidasi metode (Riyanto, 2014).

$$Q = \frac{K \times S_b}{S_1}$$

K = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitasi

S_b = simpangan baku respon analitik dari blanko

S_1 = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis $y = a+bx$)

2.6.3 Selektivitas (Spesifisitas)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuan yang hanya dapat mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel mengandung bahan tambahan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan tambahan lainnya (Harmita, 2004). Tujuan dilakukan pengujian ini adalah untuk menunjukkan bahwa suatu metode tidak memberikan respon yang positif terhadap senyawa atau analit lain (McPolin, 2009).

2.6.4 Presisi

Presisi adalah ukuran kedekatan hasil analisis diperoleh dari serangkaian pengukuran ulangan dari ukuran yang sama. Hal ini mencerminkan kesalahan acak yang terjadi dalam sebuah metode (Riyanto, 2014). Menurut ICH (1994), penentuan presisi dapat dilakukan pada 3 kategori yaitu :

a. Repeatabilitas

Repeatabilitas (*Intra-assay precision*) ditunjukkan dengan presisi dibawah kondisi percobaan yang sama meliputi laboratorium, analis serta peralatan yang dilakukan pada waktu yang singkat. Repeatabilitas dapat dinilai dengan pengukuran minimal 9 kali yang mencakup kisaran yang digunakan dalam prosedur analisis (misalnya 3 konsentrasi/3 replikasi) atau dapat dinilai dengan suatu pengukuran sebanyak minimal 6 kali pada 100% dari konsentrasi uji.

b. Presisi Antara

Presisi antara dilakukan pada hari yang berbeda atau oleh analis berbeda atau dilakukan dengan peralatan berbeda namun dalam laboratorium yang sama.

c. Reprodusibilitas

Reprodusibilitas merupakan presisi yang dilakukan pada laboratorium berbeda, untuk menstandarisasi metode (memverifikasi bahwa metode memberikan hasil yang sama dengan menggunakan fasilitas yang berbeda).

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Harmita, 2004). Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada sampel tertera pada Tabel 2.2.

Tabel 2. 2 Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada sampel

Analit pada matrik sampel (%)	Unit	RSD (%)
100	100%	1,3
≥ 10	10%	2,8
≥ 1	1%	2,7
$\geq 0,01$	0,1%	3,7
0,01	100 ppm	5,3
0,001	10 ppm	7,3
0,000.1	1 ppm	11
0,000.01	100 ppb	15
0,000.001	10 ppb	21
0,000.000.1	1 ppb	30

Sumber : (Huber, 2007)

2.6.5 Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Akurasi adalah ukuran

perbedaan antara harapan hasil tes dan nilai referensi yang diterima karena metode sistematis dan kesalahan laboratorium. Akurasi biasanya dinyatakan sebagai persentase. Akurasi dan presisi bersamasama menentukan Total kesalahan analisis (Riyanto, 2014).

Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu:

- a. Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*), yaitu pengukuran sejumlah analit bahan murni yang ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (*placebo*) dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya. Penentuan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80%-120% dari kadar analit yang diperkirakan.
- b. Metode penambahan standar atau pembanding (*standard addition method*), yaitu menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Penambahan analit ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30%-60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{CF - CA}{C * A} \times 100$$

Keterangan :

CF = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

CA = konsentrasi sampel sebenarnya

C*A = konsentrasi analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Rentang nilai *mean recovery* yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel 2.3 dibawah ini.

Tabel 2. 3 Persen *recovery* analit pada konsentrasi yang berbeda

Analit pada matrik sampel (%)	Unit	Rata-rata yang diperoleh (%)
100	100%	98-102
≥ 10	10%	98-102
≥ 1	1%	97-103
$\geq 0,01$	0,1%	95-105
0,01	100 ppm	90-107
0,001	10 ppm	80-110
0,000.1	1 ppm	80-110
0,000.01	100 ppb	80-110
0,000.001	10 ppb	60-115
0,000.000.1	1 ppb	40-120

Sumber : (Huber, 2007)

BAB. 3 METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *True Experimental Laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan Oktober 2016 sampai dengan September 2017.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), mikropipet (Socorex), tip, pH meter (Denver Instrument), *hot plate*, kuvet *disposable*, timbangan analitik digital, batang pengaduk, corong, dan alat-alat gelas.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kopi arabika dan robusta muda, acarbose (Glucobay), enzim α -amilase (dari *porcine*, Sigma-Aldrich), pati (Merck KGaA), asam 3,5-dinitrosalisilat (Sigma-Aldrich), natrium kalium tartrat (Na-K Tartrat), natrium hidroksida (NaOH), natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), dan natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), aquabidest.

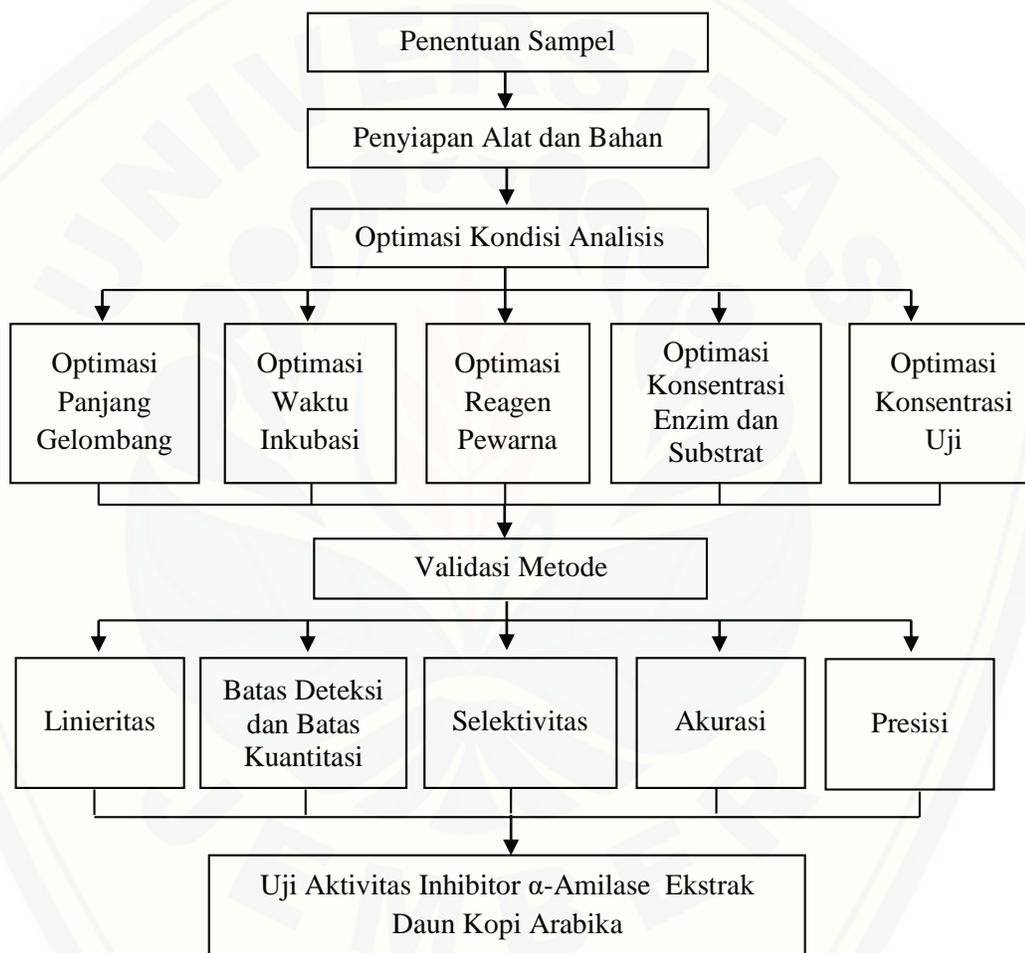
3.4 Rancangan Penelitian

3.4.1 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode dan uji aktivitas penghambatan α -amilase pada ekstrak daun kopi menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu tahap pertama dilakukan optimasi kondisi analisis untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis. Selanjutnya

dilakukan validasi metode analisis dengan variabel analisa meliputi linieritas, Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi (BD & BK), selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi. Setelah metode valid, kemudian dilakukan uji aktivitas penghambatan α -amilase pada ekstrak daun kopi secara in vitro.

3.4.2 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Penentuan Sampel

Sampel yang digunakan ialah ekstrak daun kopi arabika dan robusta muda yang sudah tersedia di laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember dan telah diidentifikasi. Tahap awal dalam proses sampling adalah melakukan studi pustaka terhadap ekstrak daun yang tersedia dan menentukan ekstrak manakah yang akan digunakan. Penentuan sampel dilakukan berdasarkan tujuan peneliti yaitu memvalidasi metode dan menguji aktivitas penghambatan α -amilase secara in vitro. Dari hasil studi pustaka dipilih sampel ekstrak daun kopi arabika dan robusta muda dimana daun kopi robusta digunakan untuk validasi metode dan setelah metode valid, uji aktivitas penghambatan α -amilase diterapkan pada ekstrak daun kopi arabika.

3.5.2 Penyiapan Larutan

Penyiapan larutan pereaksi yang digunakan antara lain :

a. Larutan dapar fosfat pH 6,9

Dibuat dengan mencampurkan 255 mL NaH_2PO_4 0,1 M (6,90 gram dalam 500 mL aquadest) dengan 245 mL Na_2HPO_4 0,1 M (15,84 gram dalam 600 mL aquadest).

b. Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 2M

Larutan NaOH 2 M dibuat dengan menimbang 2 gram NaOH dan dilarutkan dengan aquadest hingga 25 mL dalam labu ukur.

c. Larutan substrat pati 0,5 %

Larutan pati 0,5% dibuat dengan menimbang 0,05 gram pati dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,9 hingga 10 mL dalam labu ukur. Larutan pati dipanaskan sampai larut \pm 5-10 menit.

d. Larutan enzim α -amilase

Pembuatan larutan enzim α -amilase dilakukan dalam ice box agar enzim tetap stabil dan untuk mencegah kerusakan enzim. Langkah pertama dalam pembuatan larutan ini yaitu menimbang enzim sebesar 10 mg dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,9 sampai 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi enzim 10 U/mL.

Kemudian dari konsentrasi 10 U/mL di buat konsentrasi enzim 3 U/mL, 2 U/mL, 1,5 U/mL, 1 U/mL, 0,5 U/mL dan 0,1 U/mL dengan pengenceran menggunakan dapar fosfat pH 6,9.

e. Reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Reagen DNS dibuat dengan melarutkan 30 gram kalium natrium tartrat dalam 20 mL NaOH 2 M dan dipanaskan hingga larut. Larutkan 1,095 gram asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dalam aquadest hingga 50 mL dalam labu ukur. Larutan natrium kalium tartrat dan larutan asam 3,5dinitrosalisilat (DNS) dicampurkan dan ditambahkan aquadest ad 100 mL (Sumathy, 2013).

3.5.3 Optimasi Kondisi Analisis

Kondisi analisis yang perlu dioptimasi pada metode ini meliputi optimasi panjang gelombang, waktu inkubasi, konsentrasi reagen pewarna, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, dan konsentrasi uji.

1. Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* panjang gelombang pada spektrofotometer UV-Vis. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang antara 400-800 nm. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi. Campuran reaksi terdiri dari 25 μ l larutan enzim α -amilase, dan ditambah 475 μ l dapar fosfat pH 6,9. Selanjutnya dilakukan pre-inkubasi pada suhu 25⁰C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 μ l substrat pati dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25⁰C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 400 μ l larutan DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, dan kemudian didinginkan. Larutan yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm. Pada blanko, dilakukan tanpa penambahan enzim.

2. Optimasi Waktu Inkubasi

Optimasi waktu inkubasi dilakukan untuk mengetahui waktu yang optimum bagi substrat dan enzim untuk berhenti bereaksi. Pembuatan campuran sesuai dengan yang tertera diatas. Optimasi dilakukan pada saat campuran enzim, substrat ditambahkan dengan DNS. Diamati absorbansinya mulai dari menit ke 0 (setelah penambahan DNS), lalu dilakukan pemanasan dan diamati lagi absorbansinya pada menit ke-5, 10, 15, 20, 25 dan 30. Panjang gelombang yang digunakan untuk pembacaan diperoleh dari hasil optimasi panjang gelombang yaitu 540 nm. Penilaian waktu inkubasi optimum dipilih ketika nilai absorbansi tidak berubah secara signifikan.

3. Optimasi Konsentrasi Enzim dan Substrat

Optimasi konsentrasi substrat dan enzim dilakukan untuk mengetahui berapa konsentrasi optimum substrat yang bereaksi dengan enzim. Optimasi konsentrasi substrat yang digunakan ialah berupa larutan pati dengan konsentrasi yang digunakan 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL, dan 2 mg/mL. Enzim dengan konsentrasi 3 U/mL ditambahkan dengan dapar fosfat dan diinkubasi dengan suhu 25°C selama 10 menit. Lalu ditambahkan substrat dengan berbagai konsentrasi diatas dan diinkubasi kembali pada suhu 25°C selama 10 menit, setelah itu ditambahkan DNS 400 µL dan diinkubasi dalam air mendidih sesuai hasil optimasi waktu inkubasi yaitu 15 menit. Setelah didinginkan, larutan dimasukkan kedalam kuvet untuk diukur absorbansinya dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm sesuai hasil optimasi.

Selanjutnya dilakukan optimasi konsentrasi enzim dengan mencampurkan dapar fosfat pH 6,9 dan larutan enzim α -amilase dengan konsentrasi 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 dan 3 U/mL. Campuran tersebut diinkubasi dengan suhu 25°C selama 10 menit. Penambahan 100 µL pati 0,5% dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian diinkubasi kembali dengan suhu 25°C selama 10 menit. Untuk menentukan total gula pereduksi yang dihasilkan, dilakukan penambahan 400 µL DNS dan dididihkan selama 15 menit, lalu didinginkan. Setelah dingin, larutan dimasukan kedalam kuvet untuk diukur

absorbansinya dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm sesuai hasil optimasi.

4. Optimasi Konsentrasi Reagen Pewarna

Optimasi reagen pewarna dilakukan untuk mengetahui berapa konsentrasi yang diperlukan agar DNS dapat bereaksi dengan gula pereduksi hasil hidrolisis pati dengan enzim α -amilase. Optimasi ini dilakukan dengan menambahkan DNS kedalam campuran enzim dan substrat pati dengan volume DNS yang berbeda, yaitu 200 μ L, 400 μ L, 600 μ L, dan 800 μ L. Campuran dibuat dengan 25 μ l larutan enzim α -amilase 10 U/mL, dan ditambah dapar fosfat pH 6,9. Selanjutnya dilakukan pre-inkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 μ l substrat 0,5% dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan DNS dengan berbagai volume berbeda, kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, dan didinginkan serta diencerkan dengan dapar hingga volume tepat 1 mL. Larutan yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm sesuai hasil optimasi.

5. Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji dilakukan pada standar acarbose dan sampel ekstrak daun kopi robusta. Pemilihan konsentrasi uji pada standar dilakukan dengan pembuatan 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm, 10 ppm, 12,5 ppm, 15 ppm, 17,5 ppm, 20 ppm, 22,5 ppm, 25 ppm, 27,5 ppm, dan 30 ppm. Preparasi larutan standar dilakukan dengan melarutkan acarbose dalam dapar sehingga didapatkan konsentrasi yang akan dioptimasi, sedangkan untuk larutan sampel dibuat dengan cara menimbang sejumlah tertentu sampel kemudian dilarutkan dalam dapar sehingga didapatkan larutan sampel dengan konsentrasi sesuai dengan yang akan dioptimasi.

Dipipet larutan standar atau sampel dan dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan masing-masing larutan enzim, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Selanjutnya ditambahkan pula substrat dan diinkubasi kembali selama 10 menit pada suhu 25°C. Ditambahkan reagen pewarna DNS, dan dipanaskan dalam air mendidih sesuai waktu optimumnya. Kemudian didinginkan dan diamati

absorbansinya pada panjang gelombang hasil optimasi dan ditentukan konsentrasi optimum.

3.5.4 Validasi Metode

Analisis Validasi metode analisis pada uji aktivitas penghambatan α -amilase dari ekstrak daun kopi arabika dengan Spektrofotometri UV-Vis UV-Vis meliputi berbagai parameter yaitu: linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

a. Linieritas

Membuat larutan standar acarbose dan larutan ekstrak daun kopi robusta dalam dapar dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, dan 50 ppm untuk standar acarbose, dan 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, dan 1000 ppm yang masuk kedalam rentang 25-200% dari konsentrasi uji 25 ppm untuk acarbose dan 500 ppm untuk ekstrak daun kopi robusta. Larutan standar dan ekstrak daun kopi robusta dibuat dengan menimbang 5 mg standar acarbose dan 100 mg ekstrak kemudian dilarutkan dengan dapar 10 mL, lalu diencerkan sejumlah tertentu sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan. Larutan masing-masing selanjutnya direaksikan dengan enzim dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Dipipet substrat dan dimasukkan kedalamnya dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Lalu ditambahkan dengan DNS dan dipanaskan selama 15 menit. Diamati absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung nilai parameter linieritas dan rentang dari data hasil *scanning* dengan program validasi. Nilai parameter yang dihitung adalah r mendekati 0,999, X_p lebih kecil dari konsentrasi terkecil dan V_{xo} antara 0-5% (Indrayanto & Yuwono, 2003).

b. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan membuat larutan standar acarbose dan larutan ekstrak daun kopi robusta dalam dapar dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, dan 50 ppm untuk standar acarbose, dan 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm,

700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, dan 1000 ppm untuk ekstrak. Larutan standar dan ekstrak selanjutnya direaksikan dengan enzim dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Dipipet substrat dan dimasukkan kedalamnya dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Lalu ditambahkan dengan DNS dan dipanaskan selama 15 menit. Diamati absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dari data hasil *scanning* dengan program validasi, kemudian ditentukan dilai X_p -nya dimana LOD merupakan nilai X_p dan LOQ adalah $10/3$ dari LOD (Indrayanto & Yuwono, 2003).

c. Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan dengan membandingkan respon standar terhadap respon blanko. Larutan uji dibuat dengan mereaksikan enzim dan dapar fosfat, diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Dipipet substrat dan dimasukkan kedalamnya dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Lalu ditambahkan dengan DNS dan dipanaskan selama 15 menit. Diamati absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Lalu, absorbansi larutan pengujian aktivitas dengan standar uji dan dibandingkan dengan absorbansi larutan blanko yang tidak diberi enzim.

d. Presisi

Parameter presisi yang dilakukan meliputi repeatability dan intermediet precision. Uji presisi dilakukan dengan membuat 6 tingkat konsentrasi antara 80%-180% dari konsentrasi uji hasil optimasi yaitu 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm untuk acarbose dan 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm untuk ekstrak. Kemudian dilakukan preparasi sampel ekstrak daun kopi robusta untuk repeatability dengan menimbang 100 mg ekstrak daun kopi robusta (3x replikasi) dan dilarutkan dalam 10 mL dapar. Larutan standar dan sampel selanjutnya direaksikan dengan enzim dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Dipipet substrat dan dimasukkan kedalamnya dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Lalu ditambahkan dengan DNS dan dipanaskan selama 15 menit. Diamati absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

Prosedur diatas dilakukan sebanyak tiga kali pada tiga hari yang berbeda untuk menentukan *intermediet precision* (presisi antara). Setelah itu, dihitung nilai parameter presisi dari data hasil *scanning* dengan program validasi dan dilakukan perhitungan nilai SD dan RSD dimana nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan (AOAC, 1998).

e. Akurasi

Pengujian parameter akurasi pada penelitian ini menggunakan metode standar adisi. Pengujian akurasi dilakukan dengan dua tahap yaitu pembuatan sampel adisi dengan penambahan standar sebanyak 10%, 20%, 30% dan 40% dari konsentrasi analit dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi dan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan konsentrasi linieritas. Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang 100 mg sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur, kemudian dilarutkan dengan 10 mL dapar (tidak sampai tanda batas). Selanjutnya dilakukan adisi dengan larutan standar dengan konsentrasi 10%, 20%, 30% dan 40% dari konsentrasi analit yang terkandung dalam sejumlah sampel yang ditimbang. Kemudian ditambahkan dapar sampai tanda dan kocok sampai homogen. Masing-masing sampel adisi dibuat sebanyak 3 replikasi. Sampel adisi selanjutnya direaksikan dengan enzim dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Dipipet substrat dan dimasukkan kedalamnya dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Lalu ditambahkan dengan DNS dan dipanaskan selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter akurasi dengan melihat profil kenaikan nilai IC₅₀ dari masing-masing sampel akurasi.

3.5.5 Uji Aktivitas Inhibitor α -Amilase pada Sampel

Pengujian ini dilakukan terhadap kontrol negatif (tanpa larutan sampel atau standar), larutan kontrol positif (dengan larutan acarbose), dan larutan sampel (dengan ekstrak daun kopi arabika). Sebanyak 375 μ L dapar fosfat pH 6,9 dan 25 μ L larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan label kontrol negatif. Sebanyak 100 μ L acarbose dan 25 μ L larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan label

kontrol positif. Sebanyak 100 μ L sampel ekstrak daun kopi arabika dan 25 μ L larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan label sampel (S). Masing-masing campuran larutan dengan label yang berbeda tersebut diinkubasi dalam dengan suhu 25°C selama 10 menit. Setelah dilakukan inkubasi yang pertama, proses selanjutnya dapat dilakukan seperti pada penentuan konsentrasi optimum enzim dan substrat.

Nilai penghambatan enzim α -amilase pada masing-masing ekstrak dihitung dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{K-S}{K} \times 100 \%$$

Keterangan:

K= Absorbansi kontrol negatif

S= Absorbansi sampel / Absorbansi kontrol positif

IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan regresi linier dengan konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Persamaan regresi linier $y=bx+a$ yang diperoleh, digunakan untuk menentukan IC₅₀ dengan persamaan,

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b}$$

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini, dapat ditulis beberapa kesimpulan sebagai berikut.

1. Kondisi optimum uji aktivitas penghambatan ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase dengan metode Spektrofotometri UV-Vis yaitu panjang gelombang 540 nm; waktu inkubasi 15 menit untuk inkubasi ketiga; konsentrasi substrat 0,5 mg/mL; konsentrasi enzim 0,5 U/mL; volume DNS 400 μ l (4,38 ppm); konsentrasi uji 25 ppm untuk acarbose dan 500 ppm untuk ekstrak daun kopi robusta muda.
2. Uji aktivitas penghambatan ekstrak daun kopi terhadap enzim α -amilase dengan metode Spektrofotometri UV-Vis memberikan hasil analisis yang valid yaitu linier, peka, selektif/spesifik, presis dan akurat.
3. Ekstrak daun kopi arabika muda memiliki aktivitas penghambatan enzim α -amilase dengan nilai IC_{50} 286,804 μ g/mL.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pengembangan metode validasi yang lain seperti ketangguhan metode (ruggedness), kekuatan (robustness) maupun uji SST (System Suitability Test) agar metode ini dapat dilakukan kapanpun, dimanapun dan oleh siapapun.

DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1988. *Budidaya Tanaman Kopi*. Yogyakarta : Penerbit Karmisius
- Al-Aboudi, A. dan F. U. Afifi. 2011. Plants used for the treatment of diabetes in Jordan: a review of scientific evidence. *Pharmaceutical Biology*. 49(3):221–239.
- Angela, A. 2011. *Pengembangan Dan Validasi Metode Analisis Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa Amilase Oleh Phaseolamin Dari Ekstrak White Kidney Bean (Phaseolus Vulgaris) Di PT Nutrifood Indonesia*.
- AOAC. 1998. *Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures*. USA : Arlington, Virginia.
- Behera, Siladitya; Ghanty, Subhagit; Ahmad, Fahad; Santra, Saayak; Banerjee, S. 2012. The electrochemical properties of acetaminophen on bare glassy carbon electrode. *UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Department of Quality Paracetamol Tablet Formulation*. 3(6):6.
- Calder, P. C. dan R. Geddes. 1989. Acarbose is a competitive inhibitor of mammalian lysosomal acid α -D-glucosidases. *Carbohydrate Research*. 191(1):71–78.
- Campa, C., L. Mondolot, A. Rakotondravao, L. P. R. Bidel, A. Gargadennec, E. Couturon, P. La Fisca, J. J. Rakotomalala, C. Jay-Allemand, dan A. P. Davis. 2012. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*coffea*) leaves: biological implications and uses. *Annals of Botany*. 110(3):595–613.
- 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*. 2012.
- de Souza, P. M. dan P. de O. e Magalhães. 2010. Application of Microbial α -Amylase in Industry - a Review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010.
- DEPKES RI. 2007. *Kebijakan Obat Tradisional Nasional*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Dogasaki, C., T. Shindo, K. Furuhashi, dan M. Fukuyama. 2002. Identification of

chemical structure of antibacterial components against legionella pneumophila in a coffee beverage. *Yakugaku Zasshi*. 122(7):487–494.

Elmaniar, R. dan Muhtadi. 2017. Aktivitas penghambatan enzim alfa-glukosidase oleh ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (ipomoea batatas l.). *The 5th URECOL Proceeding*. (February):745–751.

Farhaty, N. 2017. Tinjauan kimia dan aspek farmakologi senyawa asam klorogenat pada biji kopi: review. *Farmaka*. 14(3):1–19.

Federation., I. D. 2015. *IDF DIABETES ATLAS Seventh Edition 2015*.

Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 117(33):117–135.

Hati, K., M. Setiawan, dan D. Yuliarta. 2013. Pengaruh rebusan daun sirih merah (piper cr ocatum) terhadap penurunan kadar gula darah pada tikus putih yang diinduksi alloxan. 9:59–64.

Heidari et al. 2005. Extraction, Purification, and Inhibitory Effect of Alpha-Amylase Inhibitor from Wheat (*Triticum Aestivum* Var. Zarrin). 2005.

Higdon, J. V dan B. Frei. 2006. Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46(2):101–123.

Hotmaruli, F., T. Siringoringo, Z. Lubis, dan R. J. Nainggolan. 2012. Studi pembuatan teh daun kopi (study of tea making from coffee leaves). *J.Rekayasa Pangan Dan Pert*. I(1):1–5.

Howard, W. 2015. Pengujian aktivitas enzim alfa-amilase. *ResearchGate*. (October 2015)

Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Informa Healthcare , London, UK.

Hulupi, R. dan E. Martini. 2013. Budidaya dan pemeliharaan tanaman kopi di kebun campur. p72.

ICH (International Conference on Harmonisation). 1994. Validation of Analytical Procedure : text and methodology Q2 (R1). European Union, Japan, USA : ICH Expert Working Group.

Indrayanto, G. & Yuwono, M. 2003. Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of

Chromatography. Surabaya : Airlangga University

Kementrian Kesehatan. 2014. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.

Kim, S.-D. dan H. J. Nho. 2004. Isolation and characterization of alpha-glucosidase inhibitor from the fungus ganoderma lucidum. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*. 42(3):223–227.

Kimble, Mary Anne Koda., et al. 2013. *Applied Therapeutics 9th Edition*. 9. *Journal of Chemical Information and Modeling*.

Kiswardianta, R. B. dan W. Solikati. 2014. Pengaruh konsentrasi dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase dari kapang aspergillusniger. *Jurnal LPPM*. 2:19–24.

Kristiningrum, N., Y. Retnaningtyas, dan N. P. Pertiwi. 2015. Validated tlc-densitometry method for determination of chlorogenic acid in coffee leaves extract. *Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences*. 6(1138):1138–1143.

Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. 2004. Bioavailability, polyphenols: food sources and. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79:727–747.

Mantsala, P. dan J. Niemi. 2009. *Enzymes : The Biological Catalysts of Life*. Oxford, United Kingdom: Eolss Publisher Co.Ltd. *ENZYMES: THE BIOLOGICAL CATALYSTS OF LIFE NUTRITION AND DIGESTION*.

Miura, T., H. Ichiki, I. Hashimoto, N. Iwamoto, M. Kato, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, M. Okada, T. Ishida, dan K. Tanigawa. 2001. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 8(2):85–87.

Morton, C., A. L. Klatsky, dan N. Udaltsova. 2004. Smoking, coffee, and pancreatitis. *American Journal of Gastroenterology*. 99(4):731–738.

Muchid, A., F. Umar, M. N. Ginting, C. Basri, R. Wahyuni, R. Helmi, dan S. N. Istiqomah. 2005. Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes mellitus. *Departemen Kesehatan RI*. 1–89.

Najayati, S. & Danarti. 2012. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta : PT. Penebar Swadaya.

- Oboh, G., A. J. Akinyemi, dan A. O. Ademiluyi. 2012. Inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase activities by ethanolic extract of telfairia occidentalis (fluted pumpkin) leaf. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(9):733–738.
- Oestreich-Janzen, S. 2010. *Chemistry of Coffee*. Elsevier Inc. March. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*.
- Oktarlina, R. Z., N. R. Rachmawani, B. Farmakologi, F. Kedokteran, U. Lampung, F. Kedokteran, dan U. Lampung. 2017. Khasiat pemberian buncis (phaseolus vulgaris l .) sebagai terapi alternatif diabetes melitus tipe 2 the. *Majority*. 6(1):71–76.
- Olthof, M. R., P. C. H. Hollman, dan M. B. Katan. 2001. Human nutrition and metabolism chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans 1. *J. Nutr*. 131(September 2000):66–71.
- Pertiwi, N. P. 2015. Validasi metode dan penetapan kadar asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta (coffea canephora) dengan metode klt densitometri. Universitas Jember
- Prabowo, M. H., A. Wibowo, dan L. Fauziyah. 2012. Pengembangan dan validasi metode analisis rifampicin isoniazid-pirazinamid dalam fixed dose combination dengan metode kromatografi lapis tipis-densitometri. 9(2)
- Rahardjo, P. 2012. Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Retnaningtyas, Y., N. Kristiningrum, H. D. Renggani, dan N. P. Narindra. 2016. Karakteristik simplisia dan teh herbal daun kopi arabika (coffea arabica). *Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development*. 46–54.
- Riyanto. 2014. *Validasi & Verifikasi Metode Uji : Sesuai Dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujia Dan Kalibrasi*. Edisi 1. Yogyakarta: Deepublish.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat : Edisi Pertama*. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Schwartz, J. dan S. T. Weiss. 1992. Caffeine intake and asthma symptoms
- Setyono, J., D. A. Nugroho, M. Mustofa, dan S. Saryono. 2017. The effect of orlistat, green coffee bean extract, and its combinations on lipid profile and adiponectin levels. *Jurnal NERS*. 9(1):26.

- Subramanian, R., M. Z. Asmawi, dan A. Sadikun. 2008. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of andrographis paniculata extract and andrographolide. *Acta Biochimica Polonica*. 55(2):391–398.
- Suriani, N. 2012. Gangguan metabolisme karbohidrat pada diabetes melitus. p 1–18.
- Sya'bani, A. A. K. . 2017. *Uji Aktivitas Inhibitor α -Amilase Ekstrak Teh Hitam Dabn Teh Hijau Sebagai Agen Antidiabetes*. Jember: Universitas Jember.
- Timerman, A. P. 2012. The Isolation of Invertase from Bakers Yeast-An Introduction to Protein Purification Strategies. INTECH Open Access Publisher.
- Wells BG; Dipiro JT; Schwinghammer TL; DiPiRo CV. 2009. *Pharmacotherapy Handbook*
- WHO. 1999. *Definition and Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications*
- Winarno, F. G. 1995. *Enzim Pangan*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Wijayakusuma, H. M., dkk. 1994. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia : Jilid II*. Jakarta: Pustaka Kartini.
- Yoganandam, G. P. et. al. 2015. Promising in vitro antidiabetic and antioxidant activities of “aavarai kudineer”- a potent polyherbal siddha formulation. *International Journal of Phytopharmacology*. 2:229–234.
- Yukawa, G. S., M. Mune, H. Otani, Y. Tone, X. M. Liang, H. Iwahashi, dan W. Sakamoto. 2004. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low density lipoproteins and serum lipid levels in humans. 69(1):70–74.
- Zanatta, L., E. de Sousa, L. H. Cazarolli, A. C. Junior, M. G. Pizzolatti, B. Szpoganicz, dan F. R. M. B. Silva. 2007. Effect of crude extract and fractions from vitex megapotamica leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 109(1):151–155.

LAMPIRAN**Lampiran A. Perhitungan Penyiapan Bahan-bahan****1. Larutan Dapar Fosfat pH 6,9**

a) Massa Natrium dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4) 0,1 M

$$\text{Rumus : } M = \frac{\text{Massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{V}$$

$$g = \frac{\text{Massa} \times \text{BM} \times V}{1000}$$

$$g = \frac{0,1 \times 119,98 \times 500}{1000} = 5,99 \text{ g dalam 500 mL akuades.}$$

b) Massa Natrium hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) 0,1 M

$$\text{Rumus : } M = \frac{\text{Massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{V}$$

$$g = \frac{\text{Massa} \times \text{BM} \times V}{1000}$$

$$g = \frac{0,1 \times 141,96 \times 600}{1000} = 8,52 \text{ g dalam 600 mL akuades.}$$

2. Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 2M

Massa natrium hidroksida (NaOH) 2 M

$$\text{Rumus : } M = \frac{\text{Massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{V}$$

$$g = \frac{\text{Massa} \times \text{BM} \times V}{1000}$$

$$g = \frac{2 \times 40 \times 25}{1000} = 2 \text{ g dalam 25 mL akuades.}$$

3. Larutan Substrat Pati 0,5%

Massa pati 0,5%

$$\text{Rumus : } \frac{0,5 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = \frac{X}{10 \text{ mL}}$$

$$x = \frac{0,5 \times 10}{100} = 0,05 \text{ g dalam 10 mL dapar fosfat}$$

4. Larutan Enzim α -Amilase

1 mg enzim mengandung ≥ 10 U

$$\frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 10 \text{ U} = 20 \text{ U/mL (ditimbang 20 mg enzim, dilarutkan dalam dapar 10 mL)}$$

5. Larutan Standar Acarbose

Massa larutan induk standar acarbose 500 ppm

$$\text{Induk : } \frac{5 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 500 \text{ } \mu\text{g/mL (5 mg acarbose dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat)}$$

Pengenceran :

1. $\frac{0,1 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$
2. $\frac{0,2 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$
3. $\frac{0,3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 150 \text{ } \mu\text{g/mL}$
4. $\frac{0,4 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 200 \text{ } \mu\text{g/mL}$
5. $\frac{0,5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 250 \text{ } \mu\text{g/mL}$
6. $\frac{0,6 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 300 \text{ } \mu\text{g/mL}$
7. $\frac{0,7 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 350 \text{ } \mu\text{g/mL}$
8. $\frac{0,8 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 400 \text{ } \mu\text{g/mL}$
9. $\frac{0,9 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 450 \text{ } \mu\text{g/mL}$

6. Larutan Ekstrak Daun Kopi Robusta

Massa ekstrak 10.000 ppm

$$\text{Induk : } \frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL (100 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat)}$$

Pengenceran :

1. $\frac{0,1 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
2. $\frac{0,2 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 2000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
3. $\frac{0,3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 3000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
4. $\frac{0,4 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 4000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
5. $\frac{0,5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 5000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
6. $\frac{0,6 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 6000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
7. $\frac{0,7 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 7000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
8. $\frac{0,8 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 8000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
9. $\frac{0,9 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 9000 \text{ } \mu\text{g/mL}$

7. Larutan Ekstrak Daun Kopi Arabika

Massa ekstrak 10.000 ppm

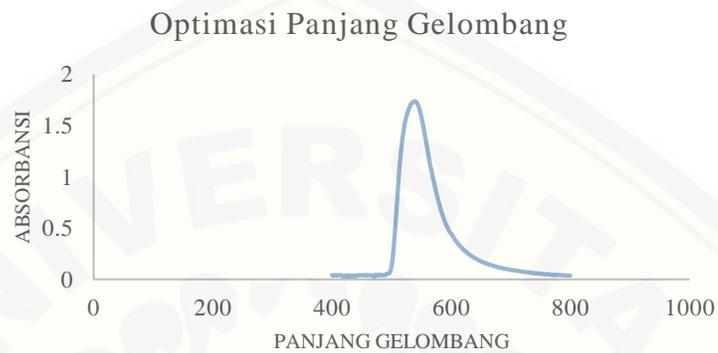
Induk : $\frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (100 mg ekstrak dalam 10 mL dapar fosfat)

Pengenceran :

1. $\frac{0,1 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
2. $\frac{0,2 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 2000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
3. $\frac{0,3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 3000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
4. $\frac{0,4 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 4000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
5. $\frac{0,5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 5000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
6. $\frac{0,6 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 6000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
7. $\frac{0,7 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 7000 \text{ } \mu\text{g/mL}$
8. $\frac{0,8 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 8000 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Lampiran B. Data Optimasi

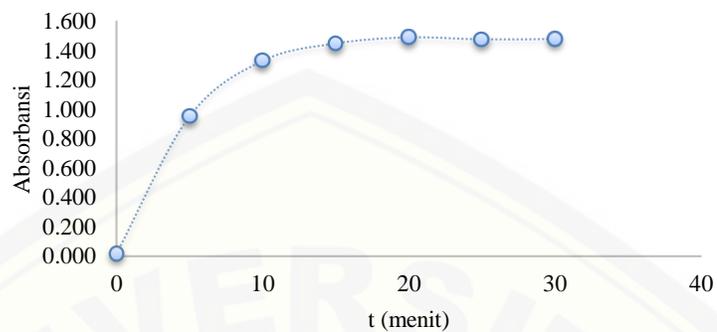
1. Panjang Gelombang



2. Waktu Inkubasi

<i>t</i> (menit)	<i>Replikasi</i>			<i>Rata-rata</i>
	1	2	3	
0	0,012	0,014	0,022	0,016
5	1,046	0,928	0,882	0,952
10	1,414	1,325	1,255	1,331
15	1,494	1,449	1,407	1,450
20	1,536	1,501	1,438	1,492
25	1,509	1,498	1,427	1,478
30	1,17	1,497	1,428	1,481

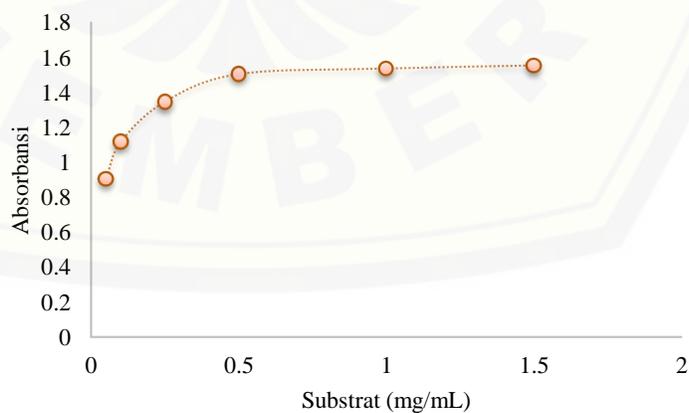
Optimasi Waktu Inkubasi



3. Konsentrasi Substrat

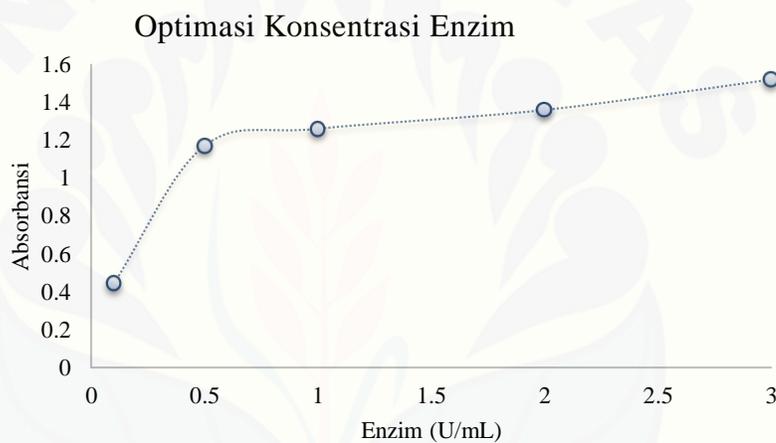
Substrat (mg/mL)	Replikasi			Rata-rata
	1	2	3	
1.5	1,553	1,553	1,558	1,555
1	1,535	1,541	1,535	1,537
0.5	1,491	1,523	1,502	1,505
0.25	1,351	1,347	1,343	1,347
0.1	1,136	1,075	1,139	1,117
0.05	0,881	0,879	0,955	0,905

Optimasi Konsentrasi Substrat



4. Konsentrasi Enzim

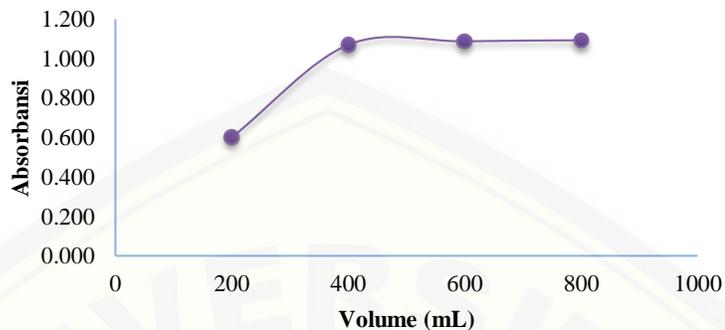
<i>Enzim (U/mL)</i>	<i>Replikasi</i>			<i>Rata-rata</i>
	1	2	3	
0.1	0,465	0,438	0,430	0,444
0.5	1,114	1,191	1,210	1,172
1	1,275	1,260	1,252	1,262
2	1,398	1,345	1,342	1,362
3	1,539	1,529	1,501	1,523



5. Volume DNS

<i>Volume DNS</i>	<i>Replikasi</i>			<i>Rata-rata</i>
	1	2	3	
200	0,548	0,644	0,607	0,600
400	1,046	1,068	1,095	1,070
600	1,075	1,08	1,108	1,088
800	1,087	1,098	1,094	1,093

Optimasi Konsentrasi Reagen Pewarna



6. Konsentrasi Uji

	KONSENTRASI (ppm)	S1-S0			K1-K0		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
STANDAR ACARBOSE	5	0,886	0,876	0,862	1,208	1,105	1,067
	10	0,824	0,804	0,731	1,208	1,105	1,067
	12,5	0,795	0,767	0,665	1,208	1,105	1,067
	15	0,746	0,724	0,617	1,208	1,105	1,067
	17,5	0,686	0,692	0,598	1,208	1,105	1,067
	20	0,632	0,619	0,565	1,208	1,105	1,067
	22,5	0,558	0,569	0,526	1,208	1,105	1,067
	25	0,55	0,53	0,475	1,208	1,105	1,067
	27,5	0,531	0,507	0,456	1,208	1,105	1,067
	30	0,45	0,448	0,392	1,208	1,105	1,067
EKSTRAK DAUN KOPI ROBUSTA	100	0,973	0,867	0,983	1,086	1,034	1,121
	200	0,893	0,779	0,905	1,086	1,034	1,121
	300	0,824	0,648	0,819	1,086	1,034	1,121
	400	0,635	0,619	0,723	1,086	1,034	1,121
	500	0,512	0,537	0,606	1,086	1,034	1,121
	600	0,486	0,474	0,51	1,086	1,034	1,121
	700	0,373	0,321	0,326	1,086	1,034	1,121
	800	0,21	0,205	0,198	1,086	1,034	1,121

K1-K0 = abs kontrol negatif - abs blanko

S1-S0 = abs sampel/control positif – abs blanko

%INHIBISI			RATA2 INHIBISI (%)	SD	IC50			RATA2 IC50	
R1	R2	R3			R1	R2	R3		
26,656	20,724	19,213	22,197	3,934					
31,788	27,240	31,490	30,173	2,544					
34,189	30,588	37,676	34,151	3,544					
38,245	34,480	42,174	38,300	3,848					
43,212	37,376	43,955	41,514	3,603					
47,682	43,982	47,048	46,237	1,979	21,958	24,267	21,704	2,643	
53,808	48,507	50,703	51,006	2,664					
54,470	52,036	55,483	53,996	1,771					
56,043	54,118	57,263	55,808	1,586					
62,748	59,457	63,261	61,822	2,064					
								SD	1,142
								CV	6,238
10.405	16,151	12,310	12,955	2,927					
17.772	24,662	19,269	20,567	3,624					
24.125	37,331	26,940	29,465	6,955					
41.529	40,135	35,504	39,056	3,154	515,072	493,638	515,155	506,785	
52.855	48,066	45,941	48,954	3,541					
55.249	54,159	54,505	54,637	0,557					
65.654	68,956	70,919	68,509	2,661					
80.663	80,174	82,337	81,058	1,134					
								SD	12,399
								CV	2,447

Lampiran C. Data Validasi

1. Linieritas

a. Linieritas Standar Acarbose

Konsentrasi (ppm)	Abs Uji	Abs Kontrol (-)	%Inhibisi
5,122	0,821	1,035	20,676
10,245	0,737	1,035	28,792
15,366	0,626	1,035	39,517
20,489	0,536	1,035	48,213
25,612	0,482	1,035	53,430
30,734	0,41	1,035	60,386
40,978	0,222	1,035	78,551
46,101	0,158	1,035	84,734

Persamaan Regresi Linier :

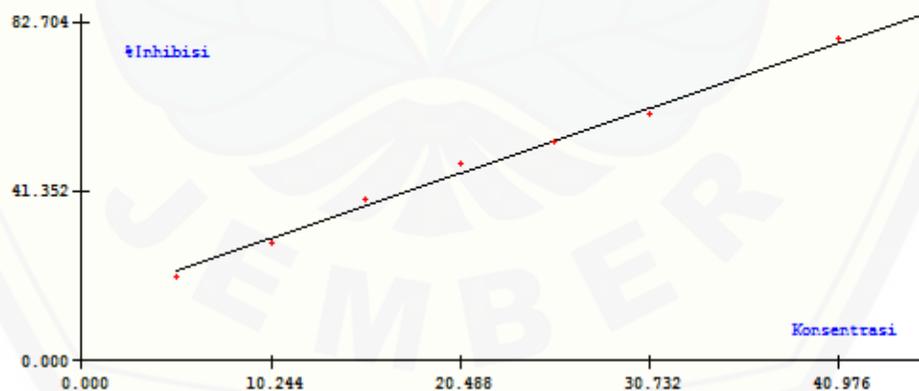
$$y = 13,9398 + 1,5555x$$

$$r = 0,9979$$

$$V_{x0} = 4,1551\%$$

$$X_p = 4,7377$$

LINIERITAS



Persamaan Regresi Linier :

$$y = 13,9398 + 1,5555x$$

$$r = 0,9979$$

$$V_{x0} = 4,1551\%$$

b. Linieritas Eksrak Daun kopi robusta

Konsentrasi (ppm)	Abs Uji	Abs Kontrol (-)	%Inhibisi
300,720	0,653	1,045	37,512
400,960	0,573	1,045	45,167
501,260	0,496	1,045	52,536
601,440	0,448	1,045	57,129
701,680	0,356	1,045	65,933
801,920	0,254	1,045	75,694
902,160	0,196	1,045	81,244

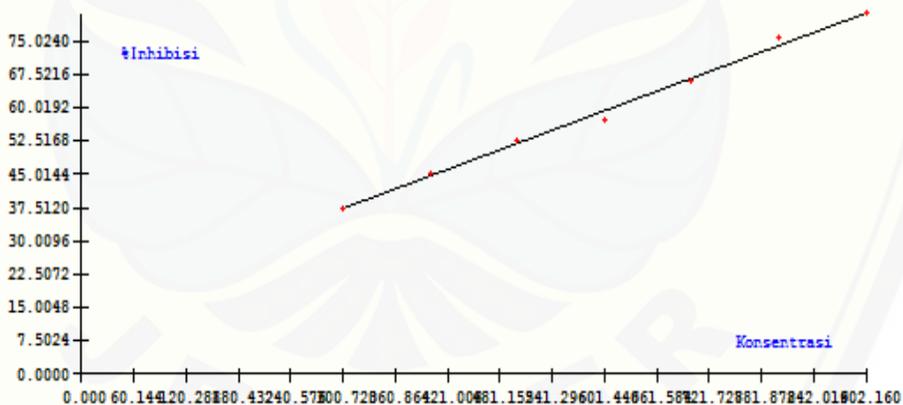
Persamaan Regresi Linier :

$$y = 15,2475 + 0,0732x$$

$$r = 0,9970$$

$$V_{x0} = 3,0162\%$$

$$X_p = 108,3539$$

LINIERITAS

c.

Persamaan Regresi Linier :

$$y = 15,2475 + 0,0732x$$

$$r = 0,9970$$

$$V_{x0} = 3,0162\%$$

2. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

a. BD dan BK Standar Acarbose

Konsentrasi (ppm)	Abs Uji	Abs Kontrol (-)	%Inhibisi
5,122	0,821	1,035	20,676
10,245	0,737	1,035	28,792
15,366	0,626	1,035	39,517
20,489	0,536	1,035	48,213
25,612	0,482	1,035	53,430
30,734	0,41	1,035	60,386
40,978	0,222	1,035	78,551
46,101	0,158	1,035	84,734

Persamaan Regresi Linier :

$$Y = 13,8813 + 1,5588X$$

$$r = 0,9979$$

$$V_{xo} = 4,1551\%$$

$$X_p = 4,7377$$

$$DL = 4,7377$$

$$QL = 14,2133$$

b. BD dan BK Ekstrak Daun kopi robusta

Konsentrasi (ppm)	Abs Uji	Abs Kontrol (-)	%Inhibisi
300,720	0,653	1,045	37,512
400,960	0,573	1,045	45,167
501,260	0,496	1,045	52,536
601,440	0,448	1,045	57,129
701,680	0,356	1,045	65,933
801,920	0,254	1,045	75,694
902,160	0,196	1,045	81,244

Persamaan Regresi Linier :

$$y = 15,2475 + 0,0732x$$

$$r = 0,9970$$

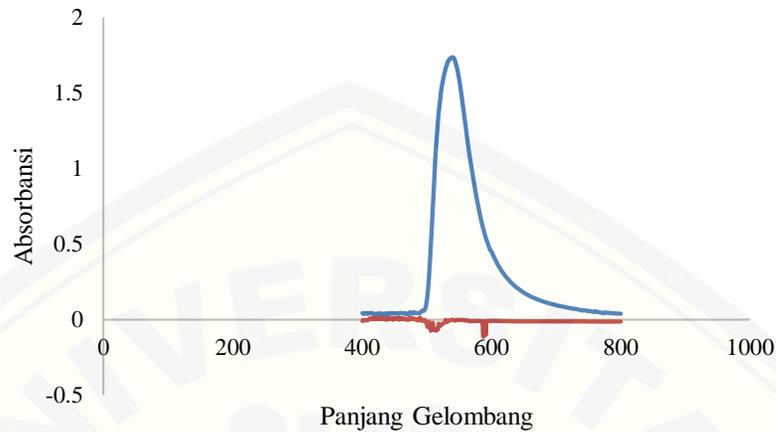
$$V_{xo} = 3,0162\%$$

$$X_p = 108,3539$$

$$DL = 108,3539$$

$$QL = 325,0618$$

3. Selektivitas/Spesifisitas



4. Presisi

a. Presisi Repeatibilitas Standar Acarbose

%INHIBISI						IC ₅₀	SD	CV
20 ppm	25 ppm	30 ppm	35 ppm	40 ppm	45 ppm			
41,546	53,816	60,193	65,217	71,304	84,541	24,891	1,084	4,899
48,659	53,831	60,728	64,464	78,736	84,866	22,784		
48,184	53,484	60,550	64,573	69,676	76,938	23,399		
Rata-rata						22,125		

b. Presisi Repeatibilitas Ekstrak Daun kopi robusta

%INHIBISI						IC ₅₀	SD	CV
400 ppm	500 ppm	600 ppm	700 ppm	800 ppm	900 ppm			
45,167	52,536	57,129	65,933	75,694	81,244	474,777	1,876	0,394
44,023	53,131	56,641	66,983	75,142	81,120	478,489		
43,829	53,158	58,017	67,541	73,469	82,119	476,163		
Rata-rata						476,483		

c. Presisi Antara Standar Acarbose

Hari Ke-	%INHIBISI						IC ₅₀	SD	CV
	20 ppm	25 ppm	30 ppm	35 ppm	40 ppm	45 ppm			
1	46,127	53,712	60,491	64,751	73,273	82,150	22,125	1,084	4,899
2	42,840	52,622	61,086	71,481	75,468	81,018	23,936	1,556	6,502
3	42,927	51,684	59,645	68,677	77,342	85,701	24,728	1,129	4,566

d. Presisi Antara Sampel

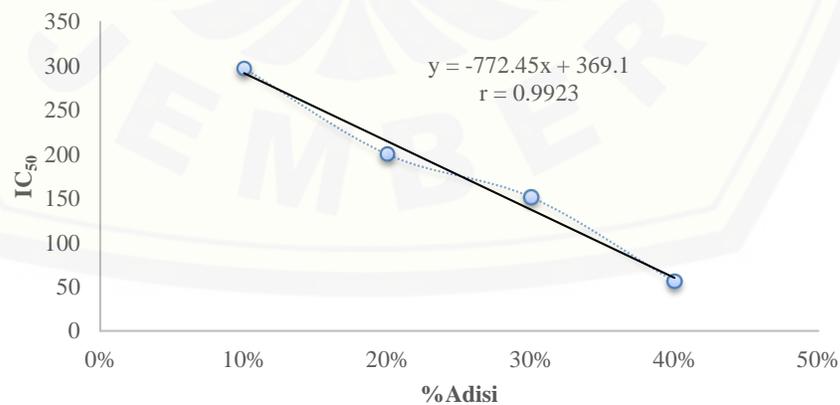
Hari Ke-	%INHIBISI						IC ₅₀	SD	CV
	400 ppm	500 ppm	600 ppm	700 ppm	800 ppm	900 ppm			
1	44,341	52,941	57,257	66,816	74,776	81,490	476,483	1,876	0,394
2	43,664	48,751	59,935	67,133	75,580	87,388	493,068	1,859	0,377
3	39,277	48,912	58,55	68,950	74,519	84,475	510,995	1,218	0,238

5. Akurasi

Adisi	Kons (ppm)	SI-S0			KI-K0			%Inhibisi		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
10%	100	0,789	0,775	0,782	1,15	1,091	1,108	31,391	28,964	29,422
	200	0,606	0,616	0,625	1,15	1,091	1,108	47,304	43,538	43,592
	300	0,568	0,556	0,566	1,15	1,091	1,108	50,608	49,037	48,916
	400	0,486	0,465	0,48	1,15	1,091	1,108	57,739	57,378	56,678
	500	0,334	0,326	0,344	1,15	1,091	1,108	70,956	70,119	68,953
	600	0,221	0,235	0,249	1,15	1,091	1,108	80,782	78,460	77,527
	700	0,179	0,184	0,198	1,15	1,091	1,108	84,434	83,134	82,129
	800	0,109	0,129	0,134	1,15	1,091	1,108	90,521	88,175	87,906
20%	100	0,619	0,605	0,632	1,050	1,071	1,058	41,048	43,511	40,265
	200	0,536	0,516	0,525	1,050	1,071	1,058	48,952	51,821	50,378
	300	0,480	0,456	0,466	1,050	1,071	1,058	54,286	57,423	55,955
	400	0,376	0,395	0,384	1,050	1,071	1,058	64,190	63,119	63,705
	500	0,244	0,236	0,264	1,050	1,071	1,058	76,762	77,965	75,047
	600	0,201	0,200	0,199	1,050	1,071	1,058	80,857	81,326	81,191
	700	0,159	0,169	0,148	1,050	1,071	1,058	84,857	84,220	86,011
	800	0,089	0,090	0,084	1,050	1,071	1,058	91,524	91,597	92,060
30%	100	0,549	0,545	0,561	1,062	1,101	1,119	48,305	50,500	49,866
	200	0,512	0,506	0,496	1,062	1,101	1,119	51,789	54,042	55,675
	300	0,428	0,436	0,442	1,062	1,101	1,119	59,699	60,400	60,500

	400	0,397	0,382	0,406	1,062	1,101	1,119	62,618	65,304	63,718
	500	0,304	0,309	0,334	1,062	1,101	1,119	71,375	71,935	70,152
	600	0,238	0,246	0,241	1,062	1,101	1,119	77,589	77,657	78,463
	700	0,117	0,121	0,104	1,062	1,101	1,119	88,983	89,010	90,706
	800	0,035	0,013	0,025	1,062	1,101	1,119	96,704	98,819	97,766
	100	0,509	0,525	0,518	1,042	1,111	1,119	51,152	52,745	53,709
	200	0,412	0,446	0,416	1,042	1,111	1,119	60,461	59,856	62,824
	300	0,368	0,360	0,332	1,042	1,111	1,119	64,683	67,597	70,331
40%	400	0,317	0,312	0,306	1,042	1,111	1,119	69,578	71,917	72,654
	500	0,224	0,239	0,214	1,042	1,111	1,119	78,503	78,488	80,876
	600	0,128	0,136	0,131	1,042	1,111	1,119	87,716	87,759	88,293
	700	0,056	0,021	0,044	1,042	1,111	1,119	94,626	98,110	96,068
	800	0,007	0,002	0,000	1,042	1,111	1,119	99,328	99,820	100,000

Konsentrasi (ppm)	Adisi				IC ₅₀			
	10%	20%	30%	40%	10%	20%	30%	40%
100	29,949	41,617	49,573	52,567				
200	44,849	50,393	53,870	61,064				
300	49,537	55,898	60,207	67,604				
400	57,271	63,668	63,894	71,424				
500	70,021	76,596	71,146	79,309	297,131	199,712	151,312	55,781
600	78,949	81,126	77,910	87,928				
700	83,249	85,027	89,580	96,302				
800	88,892	91,727	97,776	99,725				



Lampiran D. Uji Aktivitas pada Daun Kopi Arabika

Konsentrasi	S1-S0	K1-K0	% Inhibisi	IC ₅₀
100	0,671	1,101	39,086	286,804
200	0,595	1,101	45,958	
400	0,466	1,101	57,675	
600	0,366	1,101	66,757	
800	0,300	1,101	72,782	
1000	0,250	1,101	77,263	

