



**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIDIABETES
EKSTRAK DAUN TRENGGULUN (*Protium javanicum* Burm.f)
SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh :

Ainun Nihayah

NIM 142210101043

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIDIABETES
EKSTRAK DAUN TRENGGULUN (*Protium javanicum* Burm.f)
SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh :

Ainun Nihayah

NIM 142210101043

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIDIABETES
EKSTRAK DAUN TRENGGULUN (*Protium javanicum* Burm.f)
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 :

Ainun Nihayah

NIM 142210101043

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Ghoniyul Khusnah dan ayah Syafiuddin yang selalu memberi dukungan dan doa serta semangat kepada penulis.
2. Kakak-kakak tercinta Suryaningtiyas, Fahmi Saputra, Hasbian Saputra dan Anis Fatmawati yang selalu memberi semangat, nasihat dan doa.
3. Bapak dan Ibu guru yang telah membimbing penulis dan memberikan ilmunya sedari penulis di bangku TK Kartika jaya, SD Kepuharjo 2, SMP Negeri 1 Lumajang, SMA Negeri 2 Lumajang dan Fakultas Farmasi Universitas Jember.
4. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“Dan mereka yang berjuang dan bersungguh-sungguh datang kepada Kami,
Kami pasti akan menunjuki mereka jalan-jalan kami”

(Q.S. Al-Ankabut: 69)

“Allah tidak membebani seseorang itu melainkan sesuai dengan kesanggupannya”

(Q.S. Al-Baqarah: 286)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ainun Nihayah

NIM : 142210101043

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Penentuan Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetes Ekstrak Daun Trenggulun (*Protium javanicum* Burm.f)” 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 manapun seta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Juli 2018

Yang menyatakan,

Ainun Nihayah

NIM 142210101043

SKRIPSI

**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIDIABETES
EKSTRAK DAUN TRENGGULUN (*Protium javanicum* Burm.f)
SECARA IN VITRO**

Oleh :

Ainun Nihayah

NIM 142210101043

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Penetapan Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetes Ekstrak Daun Trenggulun (*Protium javanicum* Burm.f) secara In Vitro” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 30 Juli 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Ketua,

Anggota I,

Lestyo Wulandari, S.Farm., M.Sc., Apt.

Ari Satia Nugraha, S.F., Gdip.MSc-res., Apt., Ph.D

NIP. 197604142002122001

NIP. 197807212003121001

Anggota II,

Anggota III,

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

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

NIP. 198504282009121004

NIP. 198304282008122004

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember

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

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Penentuan Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetes Ekstrak Daun Trenggulun (*Protium javanicum* Burm.f) secara In Vitro; Ainun Nihayah; 142210101043; Halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Diabetes menjadi penyebab kematian urutan ketiga di Indonesia setelah stroke dan IHD (*Ischemic Heart Disease*). Pada tahun 2012 prevalensi diabetes di Indonesia telah mencapai 100.400 jiwa. Diabetes merupakan kondisi hiperglikemik kronik yang mengganggu metabolisme karbohidrat, lemak dan protein diakibatkan karena kerusakan sekresi insulin, aksi insulin ataupun keduanya. Kondisi hiperglikemik terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas yang menyebabkan autooksidasi dari glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol, selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Hal ini berakibat awal kerusakan oksidatif atau biasa disebut dengan stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan suatu kondisi saat radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh tidak seimbang. Berbagai komplikasi diabetes diakibatkan oleh stress oksidatif antara lain penyakit vaskular sistemik, penyakit jantung, mikrovaskular pada mata (penyebab kebutaan dan degenerasi retina), katarak dan kerusakan ginjal

Radikal bebas merupakan senyawa yang memiliki satu elektron tidak berpasangan sehingga senyawa ini bersifat tidak stabil. Senyawa antioksidan dapat diproduksi oleh tubuh namun, untuk memaksimalkan perawatan tubuh diperlukan antioksidan eksternal yang bisa didapatkan dari tumbuhan. Kandungan antioksidan pada tumbuhan mampu mengubah radikal bebas menjadi kurang reaktif

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan antidiabetes ekstrak metanol dan etil asetat daun trenggulun sehingga dapat menjadi alternatif obat antidiabetes. Sampel daun diperoleh dari kawasan Taman Nasional Meru Betiri. Sampel kemudian dilakukan proses ekstraksi secara ultrasonik dengan metanol dan etil asetat. Rendemen yang diperoleh untuk ekstrak metanol trenggulun (EMT) dan ekstrak etil asetat (EAT) berturut-turut adalah 24,910 % dan 9,387%.

EMT memiliki rendemen yang lebih besar dibandingkan ekstrak etil asetat hal ini disebabkan karena senyawa yang terkandung lebih larut dalam pelarut metanol.

Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian antioksidan dengan metode DPPH dengan mengukur peredaman dan vitamin C sebagai kontrol. Aktivitas antidiabetes ditentukan dengan mengukur penghambatan enzim α -amilase menggunakan akarbose sebagai kontrol positif.

Aktivitas antioksidan pada kontrol positif dan ekstrak memiliki nilai IC_{50} yaitu vitamin C $2,440 \pm 3,702 \mu\text{g/mL}$; EMT $9,799 \pm 1,155 \mu\text{g/mL}$ dan EAT $118,683 \pm 0,173 \mu\text{g/mL}$. Aktivitas antidiabetes kontrol positif dan ekstrak memiliki nilai IC_{50} yaitu akarbose $24,877 \pm 0,404 \mu\text{g/mL}$; EMT $539,836 \pm 2,978 \mu\text{g/mL}$; EAT $2397,840 \pm 1,470 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil data diatas menunjukkan bahwa EMT memiliki aktivitas antioksidan dan antidiabetes lebih besar dibandingkan ekstrak etil asetat. Hal ini mungkin disebabkan karena kandungan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dan antidiabetes lebih larut pada pelarut polar.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penentuan Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetes Ekstrak Daun Trenggulun (*Protium javanicum* Burm.f) secara In Vitro”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan 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 Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
3. Ibu Lestyo Wulandari S.Si., M.Farm., Apt. dan Bapak Ari Ari Satia Nugraha S.F., GDipSc., MSc-res., Ph.D., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatiannya dalam membantu dan membimbing penulis untuk menyelesaikan tugas akhir ini;
4. Bapak Dwi Koko Pratoko S.Farm., M.Sc., Apt. dan Ibu Indah Purnama Sary S.Si., M.Farm., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dalam penulisan tugas akhir ini;
5. Ibu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi yang selalu membantu dan memberikan saran selama penulis melakukan penelitian;
6. Orang tua tercinta Ibunda Ghoniyul Khusnah dan ayah Syafiuddin yang memberikan semangat dan doa;
7. Kakak-kakakku tersayang (Mas Fahmi, Mbak Tiyas, Mas Hasbi dan Mbak Anis) yang selalu memberikan masukan dan saran untuk penulis;
8. Bapak Beny, Bapak Budi, Bapak Hafid dan Bapak Aswi yang telah membantu dan meluangkan waktu bagi penulis untuk mengumpulkan sampel di Taman Nasional Meru Betiri;

9. Sahabatku Sri Respati Ayuningsih dan Balgis Yulia Anggraini yang selalu memberi semangat, menemani dan memberikan keceriaan;
10. Teman-teman KKN 5 Locare yang saya sayangi;
11. Teman-teman skripsi kimia (Fitri, Erika, Mila, Laili, Agus, Ari, Yanti) yang selalu memberikan canda dan tawa;
12. Teman-teman Pharmagen 2014 “Gold Generation” Fakultas Farmasi Universitas Jember.

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

Jember, 20 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR PERSAMAAN	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	3
1.1 Latar Belakang	3
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Batasan Masalah	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tumbuhan Trenggulun	5
2.1.1 Klasifikasi (Protium javanicum) Trenggulun	5

2.1.2 Nama sinonim Trenggulun	5
2.1.3 Nama Daerah Trenggulun.....	5
2.1.4 Deskripsi Trenggulun	5
2.1.5 Ekologi Trenggulun	6
2.1.6 Kegunaan Trenggulun.....	6
2.1.7 Kandungan Kimia Trenggulun	6
2.2 Tinjauan Ekstraksi.....	7
2.2.1 Tujuan Ekstraksi	7
2.2.2 Metode Ekstraksi	8
2.3 Tinjauan Pelarut.....	9
2.4 Tinjauan Radikal Bebas	11
2.5 Tinjauan Antioksidan	12
2.6 Tinjauan Uji Aktivitas Antioksidan	13
2.6.1 Metode CUPRAC (<i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i>).....	13
2.6.2 Metode ABTS	13
2.6.3 Metode FRAP	13
2.6.4 Metode DPPH.....	14
2.7 Tinjauan Enzim α-Amilase.....	15
2.8 Tinjauan Uji Aktivitas Antidiabetes.....	16
2.9 Spektrofotometer UV-VIS	17
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1 Jenis Penelitian	20
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.3 Variabel Penelitian	20
3.3.1 Variabel Bebas	20

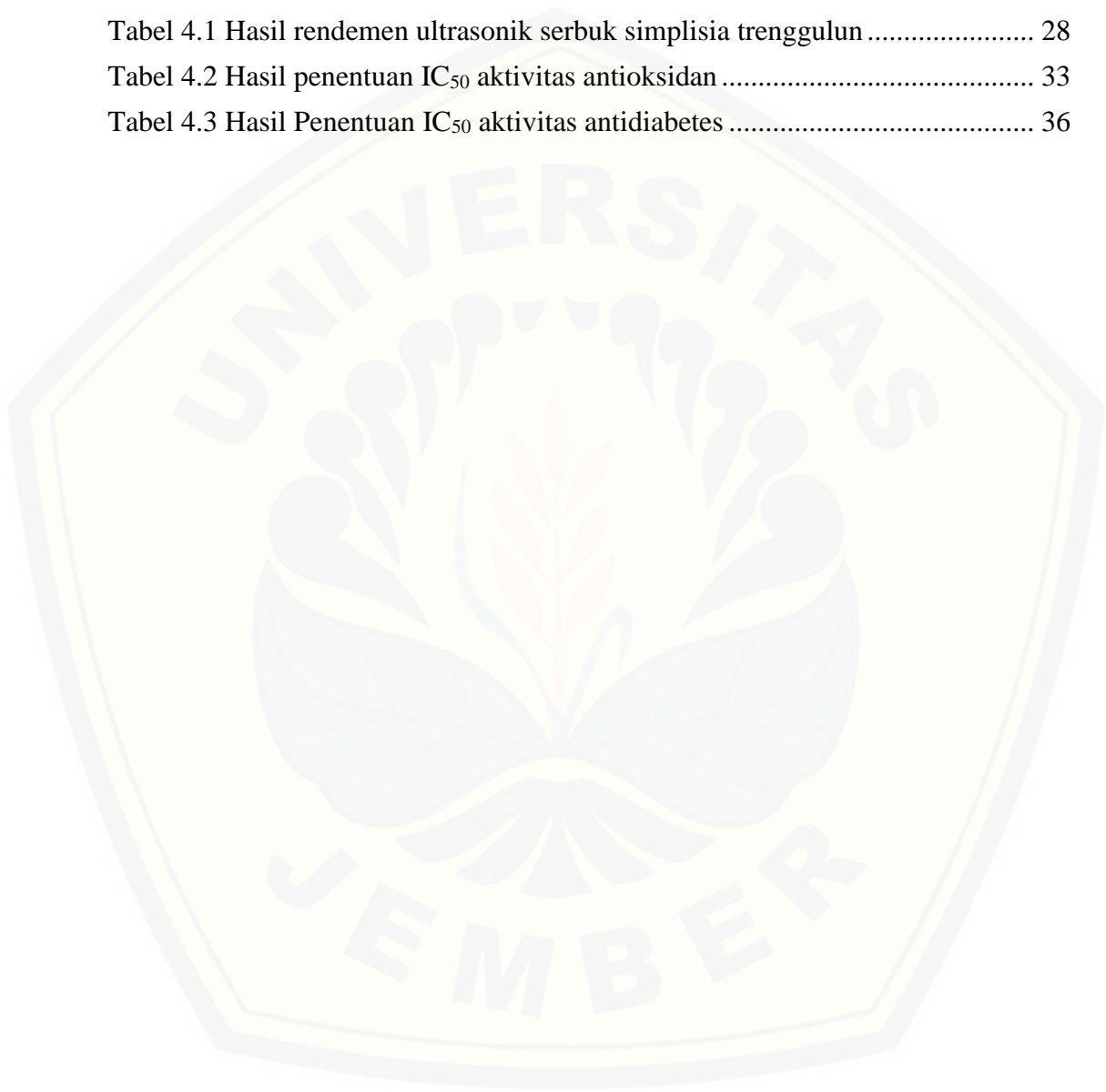
3.3.2 Variabel Terikat	20
3.3.2 Variabel Terkendali	20
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	20
3.4.1 Alat.....	20
3.4.2 Bahan	21
3.5 Rancangan Penelitian.....	21
3.6 Skema Rancangan Kerja	22
3.7 Prosedur Penelitian	23
3.7.1 Preparasi Sampel.....	23
3.7.2 Ekstraksi.....	23
3.7.3 Penentuan Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	23
3.7.4 Penentuan Aktivitas Antidiabetes Metode Penghambatan α -amilase ..	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Determinasi Daun Trenggulun.....	27
4.2 Ekstraksi Daun Trenggulun	27
4.3 Penetapan Aktivitas Antioksidan.....	28
4.3.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum	29
4.3.2 Penetapan Waktu Inkubasi.....	30
4.3.3 Penetapan Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	31
4.4 Penetapan Aktivitas Antidiabetes	33
BAB 5. PENUTUP.....	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Trenggulun (<i>Protium javanicum</i> Burm.f)	6
Gambar 2.2 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan.....	15
Gambar 2.3 Reaksi DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) dengan gula pereduksi.....	17
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian.....	22
Gambar 4.1 Spektra larutan DPPH	29
Gambar 4.2 Optimasi waktu inkubasi.....	30
Gambar 4.3 Kurva konsentrasi vs % peredaman DPPH EMT.....	32
Gambar 4.4 Kurva konsentrasi vs % peredaman DPPH EAT	32
Gambar 4.5 Kurva konsentrasi vs % penghambatan α -amilase EMT	35
Gambar 4.6 Kurva konsentrasi vs % penghambatan α -amilase EAT	35

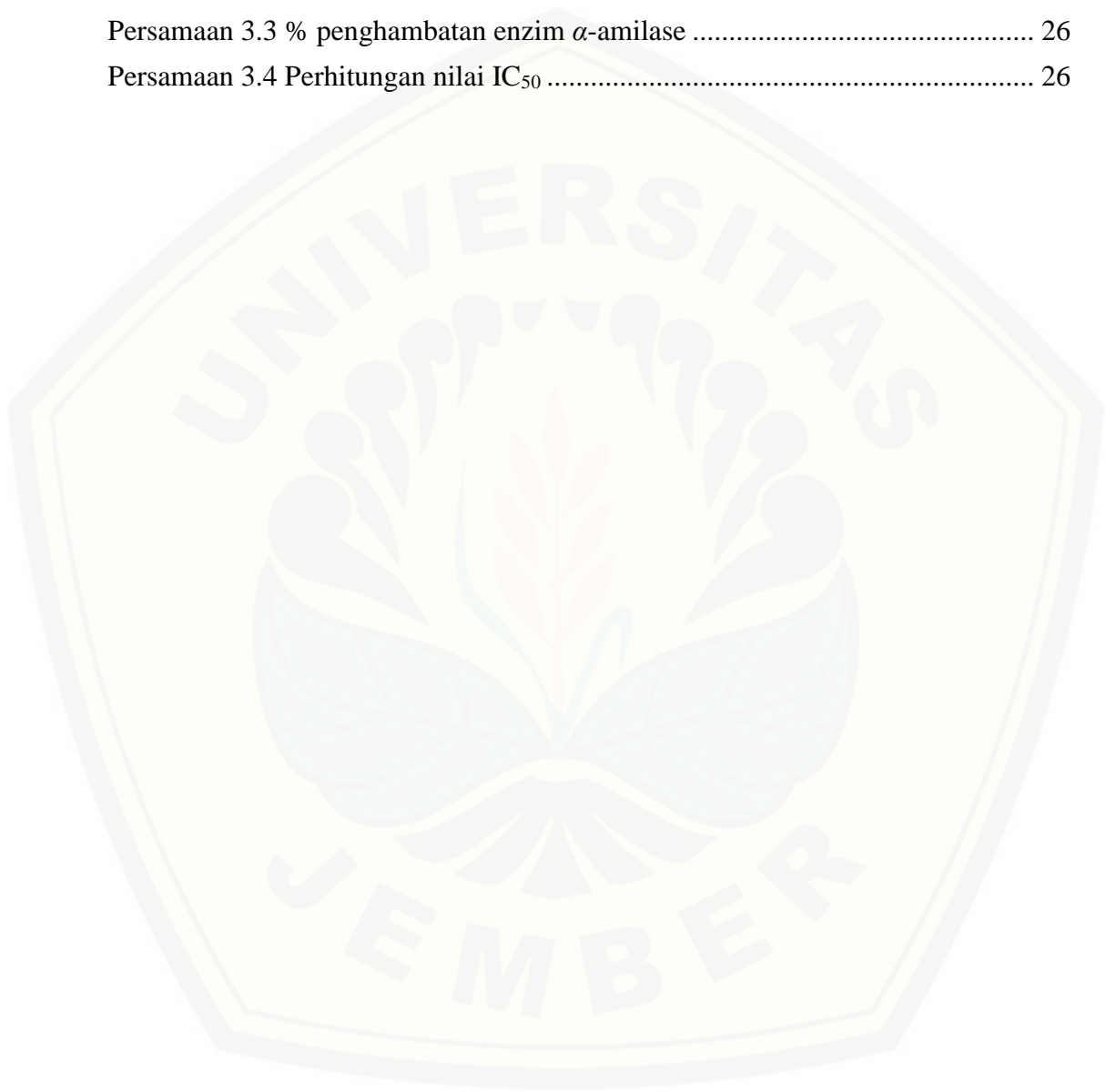
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Tingkat kekuatan antioksidan	14
Tabel 3.1 Preparasi larutan uji	26
Tabel 4.1 Hasil rendemen ultrasonik serbuk simplisia trenggulun	28
Tabel 4.2 Hasil penentuan IC ₅₀ aktivitas antioksidan	33
Tabel 4.3 Hasil Penentuan IC ₅₀ aktivitas antidiabetes	36



DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1 % inhibisi DPPH.....	24
Persamaan 3.2 Perhitungan nilai IC ₅₀	24
Persamaan 3.3 % penghambatan enzim α -amilase	26
Persamaan 3.4 Perhitungan nilai IC ₅₀	26



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 4.1 Hasil Determinasi Trenggulun.....	43
Lampiran 4.2 Data Rendemen Ekstrak Daun Trenggulun	44
Lampiran 4.3 Pembuatan Larutan DPPH.....	45
Lampiran 4.4 Pembuatan Larutan Uji Aktivitas Antioksidan.....	46
Lampiran 4.5 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum	50
Lampiran 4.6 Penetapan Waktu Inkubasi	51
Lampiran 4.7 Data Absorbansi dan Persamaan Regresi	52
Lampiran 4.8 Hasil % peredaman dan IC ₅₀	58
Lampiran 4.9 Contoh Perhitungan % peredaman DPPH dan IC ₅₀	59
Lampiran 4.10 Pembuatan Dapar Fosfat, Reagen DNS dan Enzim α -amilase	60
Lampiran 4.11 Panjang Gelombang Maksimum Kontrol Negatif.....	62
Lampiran 4.12 Pembuatan Larutan Uji Aktivitas Antidiabetes	63
Lampiran 4.13 Data Absorbansi dan Persamaan Regresi Inhibitor α -amilase	66
Lampiran 4.14 Hasil % penghambatan dan IC ₅₀	74
Lampiran 4.15 Contoh Perhitungan % penghambatan dan IC ₅₀	75
Lampiran 4.16 Dokumentasi Penelitian.....	76

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Dalam peradaban manusia, tumbuhan telah banyak dimanfaatkan salah satunya sebagai pengobatan suatu penyakit. Selain itu penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional telah diuji dan terbukti efektif untuk pengobatan dalam jangka panjang tanpa atau sedikit menimbulkan efek samping dibandingkan obat sintetis. Penggunaan kuno tumbuhan sebagai obat dapat dilihat pada pengobatan tradisional dari India, China, Mesir dan Persia (Trankina, 1998). Obat herbal sering digunakan sebagai pencegahan utama untuk menjaga kesehatan tubuh seperti suplemen antioksidan dan pemeliharaan kesehatan. Fakta menunjukkan 75% populasi manusia telah menggunakan tumbuhan ataupun dalam bentuk ekstraknya sebagai pengobatan (Abelson, 1990).

Indonesia sebagai negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Sekitar 40.000 jenis tumbuhan tersebar di Indonesia dan 6.000 diantaranya merupakan tumbuhan yang berpotensi sebagai obat (Nugraha, 2011). Keanekaragaman hayati terutama flora sangat penting untuk mengembangkan ilmu pengetahuan salah satunya sebagai obat tradisional. Taman Nasional Meru Betiri merupakan suatu kawasan hutan hujan tropis dataran rendah yang memiliki berbagai vegetasi hutan. Taman Nasional ini berlokasi di Kabupaten Jember dan Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur. Taman Nasional Meru Betiri memiliki potensi tumbuhan obat sekitar 364 jenis (70 famili) (Heriyanto, 2006). Salah satu tumbuhan obat yang terdapat di Taman Nasional Meru Betiri adalah trenggulun.

Trenggulun (*Protium javanicum*) merupakan tumbuhan yang banyak ditemukan di Jawa. Tumbuhan ini oleh masyarakat Indonesia biasanya dimanfaatkan bagian kayunya sebagai bahan bangunan dan alat-alat bangunan sedangkan daunnya jarang sekali digunakan dan dibuang begitu saja. Pada penelitian sebelumnya trenggulun diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi dan antibakteri, namun belum dilakukan penelitian pada aktivitas antioksidan dan antidiabetes. Pada tumbuhan lain dari famili Bursacea yakni *Protium heptaphyllum*

telah dilakukan studi pada mencit terbukti memiliki khasiat antidiabetes (Santos dkk., 2012). Menurut Farnsworth (1966), golongan tumbuhan dalam satu famili dimungkinkan memiliki kandungan dan khasiat yang hampir sama

Diabetes menjadi penyebab kematian urutan ketiga di Indonesia setelah stroke dan IHD (*Ischemic Heart Disease*). Setiap tahunnya penderita diabetes dan kasus kematian akibat diabetes selalu mengalami peningkatan. Pada tahun 2012 prevalensi diabetes di Indonesia telah mencapai 100.400 jiwa. Rentang usia kematian akibat diabetes berkisar 30-70 tahun yang merupakan usia produktif (WHO, 2015).

Diabetes merupakan kondisi hiperglikemik kronik yang mengganggu metabolisme karbohidrat, lemak dan protein diakibatkan karena kerusakan sekresi insulin, aksi insulin ataupun keduanya (Abelson, 1990). Kondisi hiperglikemik terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas yang menyebabkan autooksidasi dari glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol, selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lemak, DNA dan protein pada beberapa jaringan. Modifikasi molekul pada berbagai jaringan mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif dan peningkatan produksi radikal bebas. Hal ini berakibat awal kerusakan oksidatif atau biasa disebut dengan stress oksidatif. Berbagai komplikasi diabetes diakibatkan oleh stress oksidatif antara lain penyakit vaskular sistemik, penyakit jantung, mikrovaskular pada mata (penyebab kebutaan dan degenerasi retina), katarak dan kerusakan ginjal (Basha dan Kumari, 2012).

Radikal bebas merupakan senyawa yang memiliki satu elektron tidak berpasangan sehingga senyawa ini bersifat tidak stabil. Secara alami tubuh memproduksi radikal bebas namun radikal bebas juga dapat berasal dari luar yang bersumber dari polusi udara, rokok dan sinar UV. Antioksidan adalah substansi yang mampu menunda atau menghambat reaksi oksidasi pada molekul target, bahkan pada konsentrasi yang relatif kecil. Senyawa antioksidan dapat diproduksi oleh tubuh namun, untuk memaksimalkan perawatan tubuh diperlukan antioksidan eksternal seperti penggunaan suplemen atau obat sintesis lainnya, untuk

mengurangi efek merugikan dari obat sintetis yang bisa didapatkan dari tumbuhan. Kandungan antioksidan pada tumbuhan mampu mengubah radikal bebas menjadi kurang reaktif (Yadav dkk., 2016)

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas antioksidan dan antidiabetes pada trenggulun. Diharapkan penelitian dapat menjadi alternatif obat antidiabetes dan mengetahui apakah ekstrak daun trenggulun mengandung antioksidan sehingga dapat mengurangi efek merugikan dari penggunaan obat sintetis serta meningkatkan nilai guna trenggulun dan menambah pengetahuan mengenai tumbuhan obat.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian diatas, permasalahan yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak metanol dan etil asetat daun trenggulun?
2. Bagaimana aktivitas antidiabetes ekstrak metanol dan etil asetat daun trenggulun?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah maka penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak metanol dan etil asetat daun trenggulun
2. Mengetahui aktivitas antidiabetes ekstrak metanol dan etil asetat daun trenggulun

1.4 Batasan Masalah

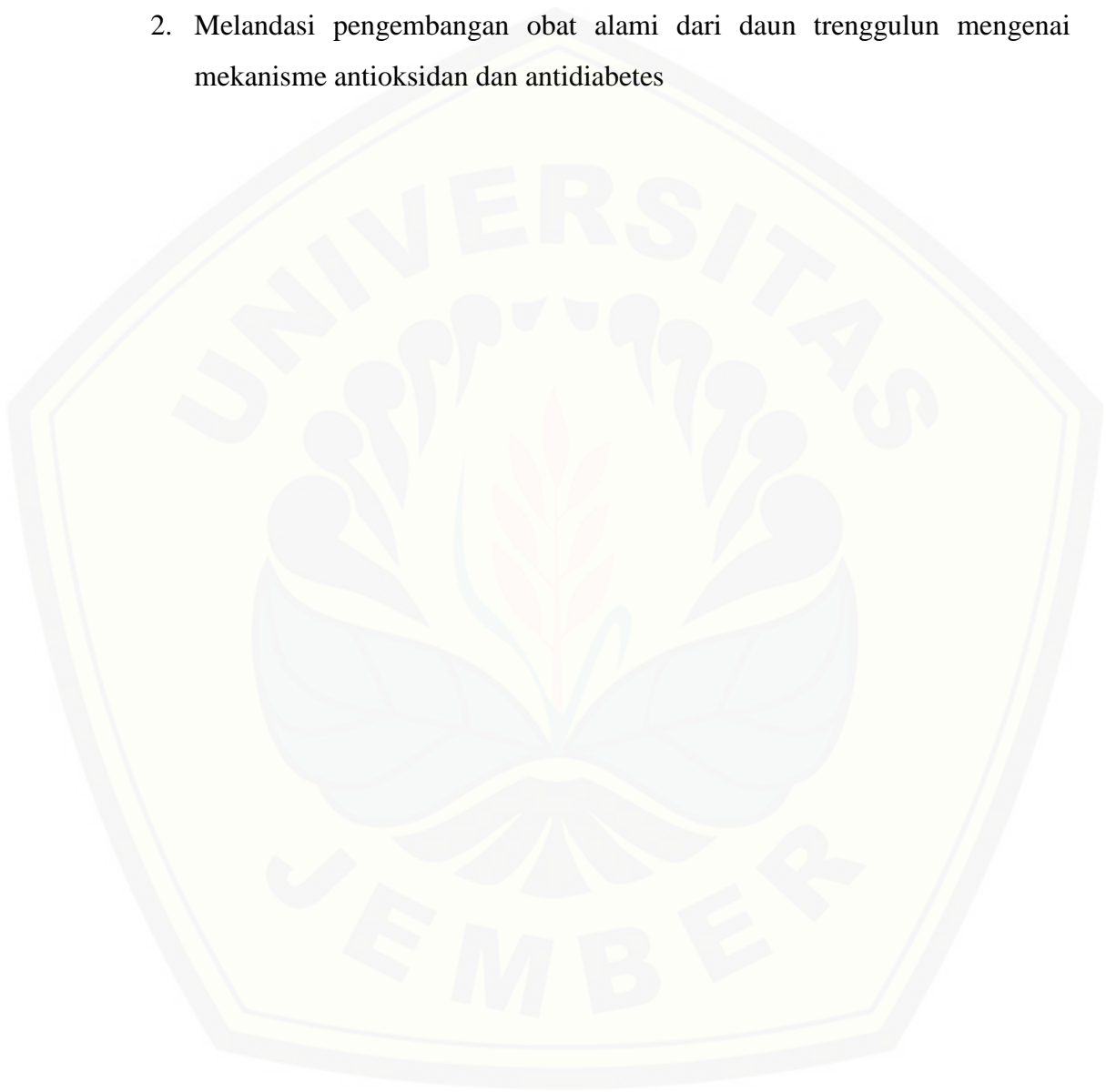
Pada penelitian ini diperlukan adanya batasan masalah:

1. Pelarut ekstrak yang digunakan adalah metanol dan etil asetat.
2. Bahan penelitian diambil dari Taman Nasional Meru Betiri Kabupaten Jember.
3. Uji aktivitas hanya dilakukan pada antidiabetes dan antioksidan.

1.5 Manfaat penelitian

Berdasarkan tujuan penelitian, manfaat yang diperoleh antara lain:

1. Memberikan informasi tentang aktivitas antioksidan dan antidiabetes dari ekstrak daun trenggulun
2. Melandasi pengembangan obat alami dari daun trenggulun mengenai mekanisme antioksidan dan antidiabetes



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Trenggulun

2.1.1 Klasifikasi (*Protium javanicum*) trenggulun:

Kingdom	: Plantae
Filum	: Tracheobionta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Sapindales
Famili	: Bursaceae
Genus	: Protium
Spesies	: <i>Protium javanicum</i> Burm.f

(GBIF, 2017)

2.1.2 Nama sinonim Trenggulun

Tumbuhan trenggulun mempunyai sinonim antara lain *Amyris denata* Blume, *Amyris protium* L. *Clausena javanica* M.Roem. *Icica protium* H.karst (The Plant List, 2012)

2.1.3 Nama daerah Trenggulun

Trenggulun memiliki berbagai nama daerah antara lain: tinggulun atau tenggulun (bali), kayu bawang (sunda), trenggulun (jawa)

2.1.4 Deskripsi Trenggulun

Tinggi pohon mencapai 30 m, diameter mencapai 115 cm, batangnya pendek dan bengkok, permukaan kulit batangnya bersisik tipis besar, berwarna abu-abu terang hingga coklat, didalam kulit batang berwarna kemerahan atau kuning hingga merah kecoklatan, memiliki getah yang lengket. Rantingnya terkadang berduri. Daunnya tersusun spiral, *imparipinnate*, *extipulate*. Bunga biasanya *unisex*. Bunga jantan dengan benang sari yang bebas, jumlahnya 2 kali lebih banyak dibandingkan kelopak bunga. Bunga betina memiliki 4-5 lokular ovari dengan 2

obula setiap sel. Bunganya muncul saat musim kemarau dan berbuah saat musim penghujan (Sossef dkk., 1998).

2.1.5 Ekologi Trenggulun

Trenggulun memiliki kayu yang keras dengan kerapatan 750-1600 kg/m³ pada kandungan lembab 15%. Tumbuhan ini banyak ditemukan di iklim yang cenderung kering, selain itu juga ditemukan di sepanjang perbatasan di dalam hutan dan sering ditemukan di pantai. Seringkali trenggulun dihubungkan dengan jati karena biasanya tumbuhan ini digunakan sebagai pembatas di perkebunan jati (Sossef dkk., 1998)

2.1.6 Kegunaan Trenggulun

Kayu Trenggulun digunakan sebagai material bangunan dan sebagai dasar *tools kit*, selain itu oleh masyarakat Bali daun trenggulun digunakan sebagai obat batuk dan sakit perut dalam bentuk dekoknya (Sossef dkk., 1998; Puspawati dkk., 2016).

2.1.7 Kandungan kimia Trenggulun

Trenggulun telah dilaporkan memiliki kandungan senyawa kuersetin, mirisitin, minyak atsiri, skopoletin, stigmasterol (Adfa dkk., 2013; Puspawati dkk., 2016).



Gambar 2.1 Trenggulun (*Protium javanicum* Burm.f)

2.2 Tinjauan Ekstraksi

Proses ekstraksi pada dasarnya adalah proses perpindahan massa dari komponen zat padat yang terdapat pada simplisia ke dalam pelarut organik yang digunakan. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan selanjutnya akan masuk ke dalam rongga sel tumbuhan yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut dalam pelarut organik pada bagian luar sel untuk selanjutnya berdifusi masuk ke dalam pelarut. Proses ini terus berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif antara di dalam sel dengan konsentrasi zat aktif di luar sel (Marjoni, 2016).

2.2.1 Tujuan Ekstraksi

Tujuan dari ekstraksi adalah menarik semua zat aktif dan komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan ekstraksi :

1. Jumlah simplisia yang diekstrak

Jumlah simplisia yang akan diekstrak sangat erat kaitannya dengan jumlah pelarut yang digunakan. Semakin banyak simplisia yang digunakan, maka pelarut yang digunakan juga semakin banyak.

2. Derajat kehalusan simplisia

Semakin halus simplisia, maka luas kontak permukaan dengan pelarut juga akan semakin besar sehingga proses ekstraksi akan dapat lebih optimal.

3. Jenis pelarut yang digunakan dalam ekstraksi

Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi sangat dipengaruhi oleh kepolaran dari pelarut itu sendiri. Senyawa dengan kepolaran yang sama akan lebih mudah larut dalam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama pula (*like dissolves like*).

4. Waktu ekstraksi

Waktu yang digunakan selama proses ekstraksi akan sangat menentukan banyaknya senyawa-senyawa yang terekstrak.

5. Metode ekstraksi

Berbagai metode ekstraksi dapat digunakan untuk menarik senyawa kimia dari simplisia.

6. Kondisi proses ekstraksi

Beberapa proses ekstraksi memerlukan keadaan dan kondisi tertentu. Bahan alam yang mengandung senyawa kumarin dan kuinon umumnya dilakukan pada kondisi terlindung dari cahaya (Marjoni, 2016).

2.2.2 Metode Ekstraksi

Adapun beberapa metode ekstraksi antara lain:

a. Cara dingin

- 1) Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia ke dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar.
- 2) Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan dialirkan dari atas kebawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampa keadaan jenuh.

b. Cara panas

- 1) Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
- 2) Soxhletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi yang kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

c. Ultrasonik

Ekstraksi dengan menggunakan ultrasonik merupakan salah satu metode ekstraksi yang efisien dan mudah dilakukan dan relatif terjangkau selain itu, prosesnya yang cepat sehingga dapat digunakan untuk skala besar. Gelombang ultrasonik berinteraksi dengan bahan tanaman dan mengubah sifat fisik dan

kimianya. Ultrasonik dapat digunakan pada suhu moderate (sedang) dan bisa digunakan untuk senyawa yang peka terhadap panas. Efek kavital pada ultrasonik memungkinkan pelepasan senyawa dan meningkatkan transportasi massa dengan mengganggu dinding sel tumbuhan. Dibandingkan penggunaan metode ekstraksi maserasi, ultrasonik memberikan kandungan polifenol yang lebih tinggi dibandingkan metode maserasi (Safdar dkk., 2017).

Mekanisme proses ekstraksi ultrasonik memiliki dua tahap. Pertama disolusi atau melarutnya komponen dari tumbuhan atau biasa disebut *washing*. Kedua transfer massa solut dari tumbuhan ke pelarut dengan proses difusi dan osmosis yang diketahui sebagai *slow extraction*. Tahap pencucian atau *washing* terjadi saat dimulainya proses ekstraksi, proses ini berlangsung sangat cepat. Setelah 20 menit berlangsung masuk pada tahap *slow* ekstraksi (Şahin dan Şamli, 2013). Gelombang ultrasonik saat proses ekstraksi akan membentuk gelembung kavitas yang memecah sel-sel tumbuhan sehingga pelarut bisa masuk kedalam sel. Penetrasi pelarut ke dalam sel mengakibatkan *swelling* dan hidrasi sehingga terjadi pembesaran pori-pori dinding sel yang mengakibatkan meningkatnya proses difusi (Ilghami dkk., 2015). Waktu optimum yang dibutuhkan untuk ekstraksi dengan metode ultrasonik adalah 60 menit, karena pada waktu tersebut terjadi kesetimbangan dari konsentrasi daun yang diekstraksi (Şahin dan Şamli, 2013).

2.3 Tinjauan Pelarut

Pada umumnya pelarut adalah zat yang berbeda pada larutan dalam jumlah yang besar, sedangkan zat lainnya dianggap sebagai zat terlarut. Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi haruslah merupakan pelarut yang terbaik untuk zat aktif yang terdapat dalam sampel atau simplisia, sehingga zat aktif dapat dipisahkan dari simplisia dan senyawa lainnya yang ada dalam simplisia tersebut. Hasil akhir dari ekstraksi ini adalah didapatkan ekstrak yang hanya mengandung sebagian besar dari zat aktif yang diinginkan. Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi memiliki beberapa sifat penting. Diantara sifat-sifat penting tersebut antara lain:

- Kemampuan melarutkan

- Kecepatan menguap
- Titik didih
- Berat jenis

Pengelompokkan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi berdasarkan kepolarannya:

a. Pelarut Polar

Pelarut polar adalah senyawa yang memiliki rumus umum R-OH dan menunjukkan adanya atom hidrogen yang menyerang atom elektronegatif (oksigen). Pelarut dengan tingkat kepolaran yang tinggi merupakan pelarut yang cocok baik untuk semua jenis zat aktif (universal) karena disamping menarik senyawa yang bersifat polar, pelarut polar juga tetap dapat menarik senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran lebih rendah. Contoh pelarut polar: air, metanol, etanol dan asam asetat

b. Pelarut Semipolar

Pelarut semipolar adalah pelarut yang memiliki molekul yang tidak mengandung ikatan O-H. Pelarut dalam kategori ini, semuanya memiliki ikatan dipol yang besar. Ikatan dipol ini biasanya merupakan ikatan rangkap antara karbon dengan oksigen atau nitrogen. Pelarut semipolar memiliki tingkat kepolaran yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut polar. Pelarut ini baik digunakan untuk melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat semipolar dari tumbuhan. Contoh pelarut semipolar adalah: aseton, etil asetat, DMSO dan diklorometan.

c. Pelarut Nonpolar

Pelarut nonpolar merupakan senyawa yang memiliki konstanta dielektrik yang rendah dan tidak larut dalam air. Pelarut ini baik digunakan untuk menarik senyawa-senyawa yang sama sekali tidak larut dalam pelarut polar seperti minyak. Contoh pelarut nonpolar: heksana, kloroform dan eter.

Persyaratan pelarut yang ideal untuk ekstraksi antara lain:

1. Selektif yang berarti dapat melarutkan semua zat dengan cepat, sempurna dan sedikit mungkin melarutkan bahan lain yang tidak dibutuhkan.

2. Mempunyai titik didih yang rendah dan seragam
3. Ramah lingkungan
4. Mampu mengekstrak semua senyawa dalam simplisia
5. Stabil secara fisik dan kimia
6. Bersifat inert
7. Mudah untuk dihilangkan dari ekstrak
8. Tidak bereaksi dengan senyawa-senyawa dalam simplisia yang diekstrak
9. Murah dan ekonomi (Marjoni, 2016)

2.4 Tinjauan Radikal Bebas

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai suatu spesies kimia yang reaktif, memiliki satu elektron tidak berpasangan pada orbit terluar. Konfigurasi tidak stabil ini mengakibatkan energi yang dilepaskan bereaksi dengan molekul yang berdekatan seperti protein, lipid, karbohidrat dan asam nukleat (Rahman, 2007).

Radikal bebas oksigen merupakan jenis radikal bebas yang paling banyak mengakibatkan kerusakan pada sistem biologi atau yang biasa dikenal dengan spesies oksigen reaktif (ROS). ROS dapat diperoleh dari luar tubuh yang berasal dari (i) radiasi oleh sinar UV, sinar X dan sinar gamma, (ii) polusi udara, (iii) produksi oleh neutrophil dan makrofag selama inflamasi, (iv) produk dari reaksi katalisis transport elektron pada mitokondria, (v) alkohol, rokok, pestisida, (vi) obat-obatan seperti *halothane* dan parasetamol (Rahman, 2007).

Radikal bebas dapat bersifat merusak jika terjadi stress oksidatif yaitu suatu kondisi jumlah radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh tidak seimbang. Selain itu radikal bebas dilaporkan dapat menjadi penyebab beberapa penyakit seperti diabetes melitus, gangguan neurodegeneratif (Alzheimer's dan *Multiple sclerosis*), penyakit kardiovaskular (arterosklerosis dan hipertensi), penyakit saluran pernafasan (asma) dan berbagai kanker (kanker kolorektal, prostat, payudara, dan paru-paru) (Basha dan Kumari, 2012).

2.5 Tinjauan Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menghambat terjadinya proses oksidasi dari ROS (turunan oksigen lainnya yang reaktif). Antioksidan ikut andil dalam mekanisme pertahanan organisme melawan patogen yang diakibatkan oleh radikal bebas. Berdasarkan asalnya terdiri dari antioksidan endogen yang berasal dari dalam tubuh misalnya enzim seperti superoksida dismutase, katalase atau senyawa non enzimatis seperti asam urat, bilirubin dan antioksidan eksogen berasal dari sumber alami seperti vitamin C, vitamin E, flavonoid dan beberapa mineral lainnya. Selain itu dari senyawa sintetis, butilhidroksianisol, butilhidroksitoluena (Pisoschi dan Negulescu, 2012).

Antioksidan diperlukan oleh tubuh untuk mencegah stress oksidatif, sehingga senyawa radikal bebas mampu mengoksidasi molekul sekitarnya seperti (lemak, DNA, protein dan karbohidrat) yang dapat memicu terjadinya kerusakan sel. Antioksidan mudah bereaksi dengan radikal bebas dibandingkan molekul lain karena sifatnya yang cenderung cepat teroksidasi dibandingkan molekul lainnya (Werdhasari, 2014). Maka dari itu semakin tinggi kemampuan antioksidan bergantung pada daya oksidasinya dibandingkan dengan senyawa lain. Semakin mudah teroksidasi maka semakin efektif antioksidan tersebut (Khaira, 2010).

Vitamin C atau yang biasa disebut asam askorbat merupakan suatu antioksidan yang larut dalam air. Selain itu vitamin C dapat meregenerasi vitamin E dalam membrane sel bersama dengan GSH sehingga mampu menyumbangkan dan mereduksi secara ekuivalen. Vitamin C akan berubah menjadi radikal askorbat dengan menyumbangkan elektron ke radikal lemak untuk menghentikan reaksi berantai peroksidasi lemak (Nimse dan Pal, 2015). Manfaat dari vitamin C selain sebagai antioksidan antara lain sebagai anti kanker, anti aterogenik dan imonomodulator.

2.6 Tinjauan Uji Aktivitas Antioksidan

Berbagai metode pengukuran aktivitas antioksidan telah dikembangkan oleh para peneliti. Metode tersebut antara lain:

2.6.1 Metode CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)

CUPRAC menggunakan reagen Cu(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc)₂ digunakan sebagai agen pengoksidasi kromogenik (Randi pratama). Pengukuran pada metode ini didasarkan pada pengurangan Cu(II) menjadi Cu(I) akibat adanya reaksi redoks dari rantai antioksidan dengan reagen CUPRAC oleh aksi antioksidan didalam sampel. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 450 nm (Özyürek dkk., 2011). Kelebihan metode menggunakan reagen CUPRAC adalah lebih stabil dan mudah dilakukan.

2.6.2 Metode ABTS

ABTS merupakan kation dari radikal, dihasilkan dengan mereaksikan zat pengoksidasi (kalium permanganat dan kalium persulfat) dengan garam ABTS. Metode ini didasarkan pada pembentukan warna hijau muda akibat kehilangan 1 elektron pada atom N dari ABTS 2,2-Azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat (Pisoschi dan Negulescu, 2012). Serapan dari metode ini diukur pada panjang gelombang 734 nm. Kelebihan metode ini dapat digunakan pada pH yang berbeda selain itu ABTS mudah larut dalam air dan pelarut organik sehingga sangat berguna untuk penentuan antioksidan dari sampel yang berbeda media serta reaksi antara sampel dan ABTS relatif cepat pada larutan dapar (Shalaby dan Shanab, 2013).

2.6.3 Metode FRAP (*The Ferric Reducing Ability of Plasma* atau *ferric reducing antioxidant power*)

Metode ini didasarkan pada reduksi antioksidan dari kompleks *ferric-tripyridyl triazine* (Fe(III)-TPTZ) direduksi menjadi bentuk (Fe(II)-TPTZ) (Benzie dan Strain, 1999). Ikatan dari Fe²⁺ pada ligan memberikan warna biru *navy*. Absorbansi diukur dengan menghitung jumlah Fe (III) yang tereduksi dan dapat dihubungkan dengan

jumlah antioksidan didalamnya (Pisoschi dan Negulescu, 2012). Pembacaan menggunakan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 598 nm.

2.6.4 Metode DPPH

Metode ini telah digunakan secara luas untuk mengevaluasi penghambatan aktivitas radikal dari berbagai ekstrak tumbuhan. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil larut dalam metanol maupun etanol. Ketika DPPH menerima radikal elektron atau hydrogen maka akan menjadi stabil dan menjadi lebih sulit teroksidasi. Reduksi radikal bebas DPPH akan ditentukan dengan penurunan absorpsi pada panjang gelombang 517 nm dan larutan yang akan berubah warna dari ungu menjadi kuning. Metode memiliki beberapa keuntungan seperti pengujiannya yang cepat, mudah dilakukan, dapat bereaksi dengan semua sampel meskipun memiliki aktivitas antioksidan yang lemah dan merupakan metode yang ekonomis (Kedare dan Singh, 2011).

Aktivitas peredaman radikal bebas dengan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidan semakin besar (Molyneux, 2004). Blois (1958) mengkategorikan kekuatan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} .

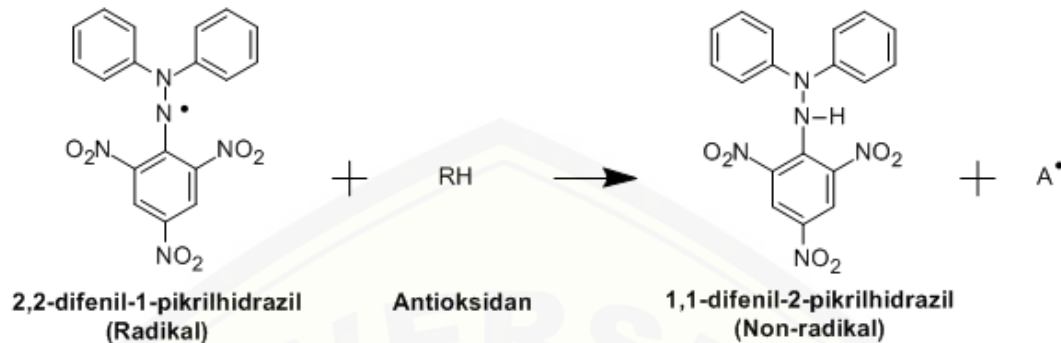
Tabel 2.1 Tingkat kekuatan antioksidan

Intensitas	Nilai IC_{50}
Sangat Kuat	< 50 ppm
Kuat	50 – 100 ppm
Sedang	101 – 150 ppm
Lemah	151 – 200 ppm

(Blois, 1958)

Difenilpikrihidrazil (DPPH) memiliki elektron yang tidak berpasangan pada atom H jika berpasangan dengan antiradikal bebas akan membentuk difenilpikrihidrazilin dengan pengikatan satu elektron atom H sehingga membentuk senyawa yang tidak reaktif, ditunjukkan pada gambar 2.4 (Molyneux, 2004). Saat

DPPH menerima elektron atau hidrogen maka DPPH yang semula bersifat radikal menjadi stabil, selain itu sulit untuk dioksidasi dan bersifat ireversibel.



Gambar 2.2 Reaksi radikal DPPH dengan Antioksidan (Molyneux, 2004)

2.7 Inhibitor Enzim α -amilase

Alfa amilase adalah suatu enzim hidrolase yang mengkatalisis hidrolisis dari ikatan internal α -1,4-glikosida dalam pati menjadi glukosa dan maltosa. Enzim hidrolase terdapat dua jenis yaitu endo-hidrolase yang bekerja pada bagian dalam molekul substrat dan ekso-hidrolase pada bagian terminal non reduksi (Keharom dkk., 2016). Substrat dari enzim α -amilase adalah pati. Pati merupakan polisakarida yang tersusun dari dua tipe polimer yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa terdiri sekitar 20-25% sedangkan amilopektin terdiri dari 75-80% dari molekul pati dan dihubungkan oleh ikatan α -1,4-glikosida (Sundarram dan Murthy, 2014).

Alfa amilase akan mengubah bentuk gula kompleks menjadi gula sederhana sehingga dapat diserap oleh tubuh. Jika terjadi konversi gula secara berlebihan maka akan terjadi peningkatan kadar gula dalam darah. Dalam beberapa kasus, hal ini dapat menyebabkan hiperglikemia (Agarwal dan Gupta, 2016). Salah satu cara agar dapat mengontrol gula darah dalam tubuh yaitu dengan menggunakan inhibitor α -amilase.

Inhibitor α -amilase atau yang lebih dikenal sebagai pati bloker karena mengandung senyawa yang dapat mencegah pati diserap oleh tubuh. Selain itu Aktivitas enzim α -amilase didasarkan terbentuknya gula pereduksi dan penurunan kadar pati yang terlarut (Judoamidjojo dkk., 1992). Enzim α -amilase dapat dihambat dengan obat-obatan inhibitor α -glukosidase (Agarwal dan Gupta, 2016).

Akarbose merupakan obat antidiabetes terutama pada diabetes tipe 2. Obat ini adalah inhibitor enzim α -glukosidase selain itu obat ini juga dapat bertindak sebagai inhibitor α -amilase (Oyedemi dkk., 2017). Selain itu akarbose merupakan inhibitor *pseudotetrasaccharidic* dari enzim α -amilase yang bertindak sebagai analog pada keadaan transisi dengan mengikat sisi aktif (Santimone dkk., 2004).

2.8 Tinjauan Uji Aktivitas Antidiabetes

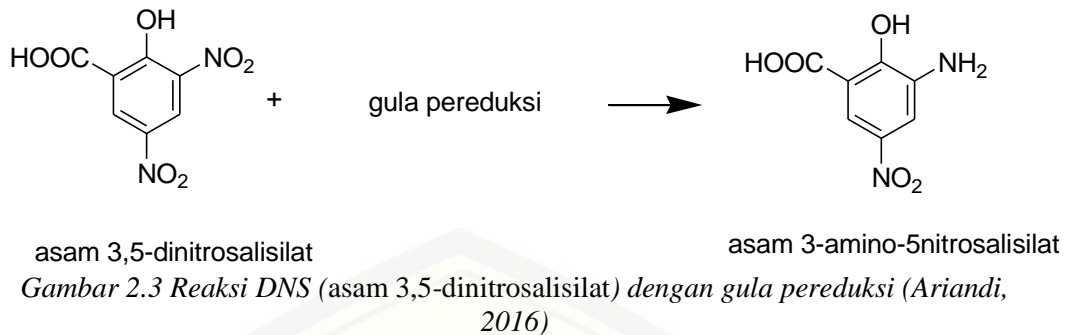
Terdapat dua metode yang dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas antidiabetes yaitu:

2.8.1 Metode Penghambatan α -amilase.

Enzim amilase (*α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase*) dihasilkan oleh pankreas dan kelenjar ludah, bertanggung jawab untuk menghirolisis karbohidrat kompleks menjadi oligosakarida dan disakarida yang kemudian dicerna lebih lanjut oleh α -glukosidase (Oyedemi dkk., 2017).

Terdapat dua cara untuk mengukur aktivitas penghambatan enzim α -amilase antara lain dengan mengamati penurunan warna biru kompleks dari iodin pati akibat berkurangnya hidrolisis pati oleh enzim α -amilase (Wardani dkk., 2017). Semakin besar aktivitas penghambatan enzim α -amilase, maka jumlah pati yang dihidrolisis akan semakin sedikit sehingga kompleks iodin pati yang terbentuk semakin banyak dan menghasilkan warna biru. Warna yang terbentuk dapat dikuantifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Metode kedua yaitu dengan pengukuran terbentuknya gula pereduksi akibat hidrolisis pati oleh enzim alfa amilase dengan menggunakan reagen DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat). DNS akan bereaksi dengan gula pereduksi sehingga membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat dibawah kondisi larutan basa yang kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 540 nm (Sastrohamidjojo, 2005). Semakin banyak asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk maka aktivitas gula pereduksinya semakin tinggi (Sazci dkk., 1986). DNS yang berwarna kuning akan menjadi jingga kemerahan akibat adanya gula pereduksi.



2.8.2 Metode Penghambatan α -glukosidase

Alfa glukosidase merupakan enzim yang berperan dalam pemecahan dikasariida menjadi monosakarida pada saluran cerna sehingga dapat meningkatkan kadar gula darah. Gula darah bagi penderita diabetes dapat dicegah dengan menggunakan suatu inhibitor enzim α -glukosidase. Mekanisme penghambatan oleh enzim α -glukosidase yakni dengan memotong ikatan glikosidik yang bergantung pada jumlah, posisi dan konfigurasi gugus hidroksil didalam molekul gula (Febrinda dkk., 2013). Aktivitas enzim diukur berdasarkan pembentukan senyawa *p*-nitrofenol warna kuning hasil dari reaksi antara substrat dengan enzim. Substrat yang digunakan adalah larutan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (*p*-NPG) (Elmaniar, 2017).

2.9 Spektrofotometer UV-VIS

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometri uv-vis terutama untuk senyawa yang semula tidak berwarna yang akan dianalisis dengan spektrofotometri visibel karena senyawa tersebut harus diubah terlebih dahulu menjadi berwarna, berikut adalah tahapan-tahapan yang harus diperhatikan

a. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar Uv-Vis.

Hal ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan pereaksi tertentu. Pereaksi yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu:

- Reaksinya selektif
- Reaksinya cepat, kuantitatif dan reproduibel

- Hasil reaksi stabil dalam jangka yang lama

Keselektifan dapat dinaikkan dengan mengatur pH, pemakaian masking agent, atau penggunaan teknik ekstraksi.

b. Waktu Operasional

Cara ini biasanya digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.

Pada saat awal terjadi reaksi, absorbansi senyawa yang berwarna ini meningkat sampai waktu tertentu hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Semakin lama waktu pengukuran maka ada kemungkinan senyawa yang berwarna tersebut menjadi rusak atau terurai sehingga intensitas warnanya turun akibatnya absorbansinya juga turun. Karena alasan inilah, maka untuk pengukuran senyawa berwarna (hasil suatu reaksi kimia) harus dilakukan pada saat waktu operasional.

c. Pemilihan Panjang Gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Untuk memilih panjang gelombang maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertera.

Beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal yaitu:

- Pada panjang gelombang maksimal, kepekaannya juga maksimal karena pada panjang gelombang maksimal tersebut, perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar
- Disekitar panjang gelombang maksimal bentuk kurva absorbansi datar pada konsisi tersebut hukum Lambert Beer akan terpenuhi
- Jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali, ketika digunakan panjang gelombang maksimal.

d. Pembuatan Kurva Baku

Dibuat seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur, kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan absorbansi (y) dengan konsentrasi (x). Bila hukum Lambert Beer terpenuhi maka akan terbentuk garis lurus pada kurva. Penyimpangan dapat terjadi diakibatkan oleh kekuatan ion yang tinggi dan perubahan suhu.

e. Pembacaan absorbansi sampel

Absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 hingga 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmittan. Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa kesalahan pembacaan T adalah 0,005 atau 0,5% (kesalahan fotometrik) (Gandjar dan Rohman, 2007).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengetahui kandungan fitokimia dan bioaktivitas dari ekstrak daun trenggulun (*Protium javanicum* Burm.f)

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari 2018 hingga selesai, bertempat di Laboratorium Analisis Instrumen Bagian Kimia dan Laboratrium Fitokimia Bagian Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis ekstrak dan konsentrasi ekstrak daun trenggulun yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aktivitas penghambatan enzim α -amilase dan aktivitas antioksidan metode DPPH daun trenggulun

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah cara ekstraksi, waktu ekstraksi, pelarut untuk ekstraksi.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain blender, oven, desikator, seperangkat alas gelas, kertas saring, *rotary evaporator*, ultrasonik (Elmasonic), pompa vakum, spektrofotometer U-1800 Hitachi, mikropipet

(Socorex), *hot plate*, neraca analitik, *stopwatch*, pH meter (Denver instrument), *disposable cuvette*.

3.4.2 Bahan

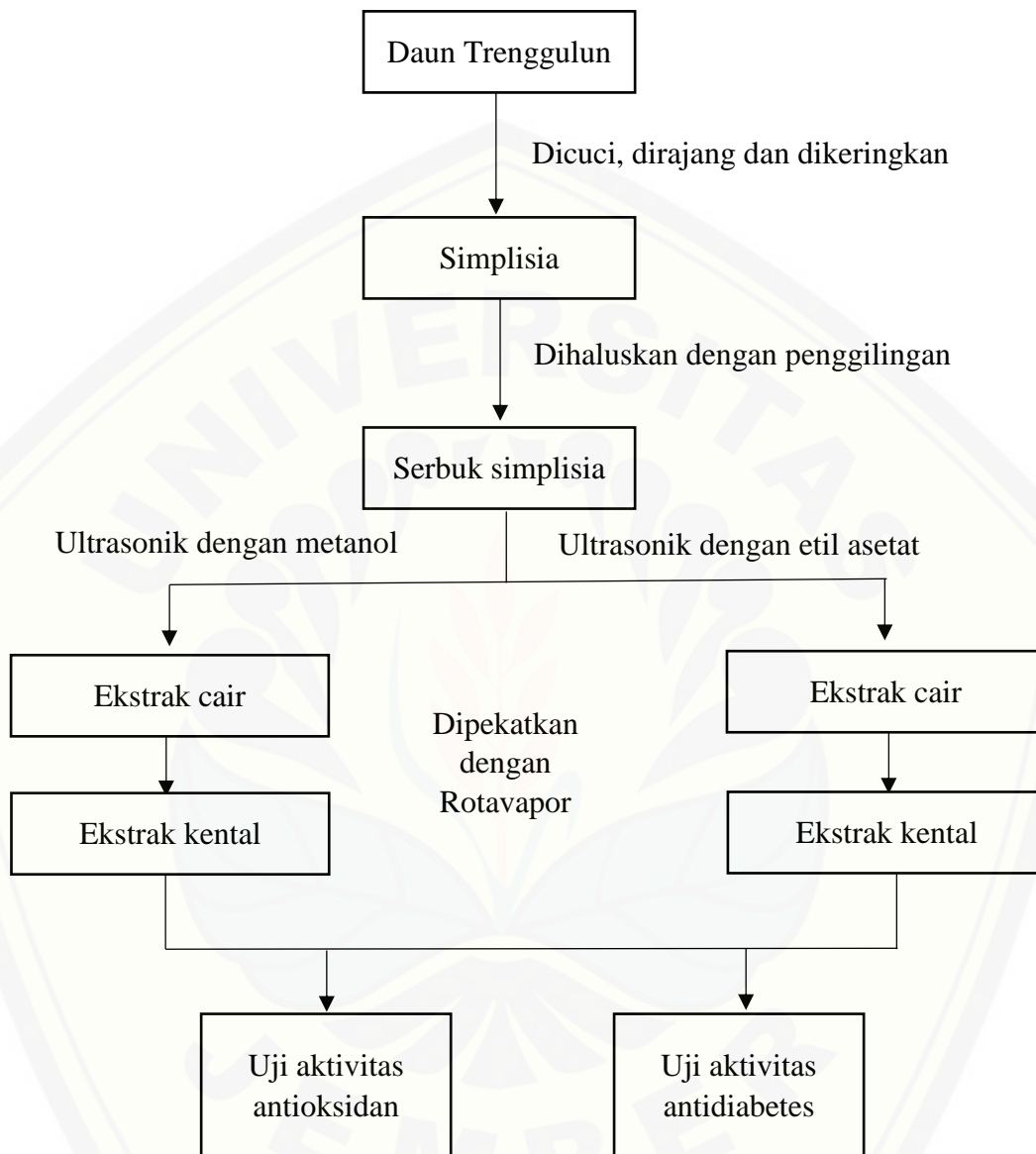
Tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun trenggulun yang didapatkan dari Taman Nasional Meru Betiri (TNMB) kemudian dicuci dan dikeringkan hingga menjadi simplisia. Etil asetat, metanol, reagen DPPH, akuabides, enzim α -amilase (Sigma-Aldrich), natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), natrium dihidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$), vitamin C (asam askorbat), natrium hidroksida (NaOH), pati (Merck KgaA), substrat pati, akkarbose, kalium natrium tartat (Na-K tartat), 3,5-dinitrosalisilat (Sigma-Aldrich).

3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap:

1. Pengeringan sampel daun trenggulun menjadi simplisia dan dihaluskan hingga menjadi serbuk simplisia
2. Pembuatan ekstrak daun trenggulun dalam metanol dan etil asetat dengan metode ultrasonik
3. Pengukuran uji aktivitas antioksidan dan antidiabetes masing-masing ekstrak

3.6 Skema Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi sampel

Sampel daun trenggulun yang diperoleh kemudian dikeringkan (dihindarkan terkena sinar matahari langsung) kemudian digiling hingga membentuk serbuk halus dan diayak untuk mendapatkan ukuran serbuk yang seragam.

3.7.2 Ekstraksi

Ekstraksi daun trenggulun menggunakan metode ultrasonik. Serbuk halus 60 g dan diberi pelarut 600 mL (1:10) kemudian di ultrasonik selama 60 menit. Setelah itu ekstrak cair disaring menggunakan corong bunchner. Lalu setelah disaring dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C dan dioven pada suhu 50 °C.

3.7.3 Penentuan Antioksidan Metode DPPH

Uji antioksidan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang didasarkan pada peredaman DPPH oleh ekstrak trenggulun:

a. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 2 mg DPPH dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur sampai 50 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,1 mM. Larutan ini kemudian disimpan pada botol gelap.

b. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 1,2 mL larutan DPPH 0,1 mM ditambahkan 0,3 mL metanol dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan diukur dengan spektrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 400-600 nm

c. Penentuan Operating Time

Dipipet sebanyak 1,2 mL larutan DPPH 0,1 mM ditambahkan dengan 0,3 mL larutan uji 400 ppm. Larutan diukur absorbanisnya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 5 menit sampai diperoleh absorbnasi stabil

d. Pembuatan Kontrol Positif Vitamin C

Dibuat dengan konsentrasi vitamin c 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL dan 25 µg/mL dan 30 µg/mL dengan menimbang 20 mg kemudian dilarutkan dalam labu ukur 10 ml. Lalu diambil 500 µg/mL dilarutkan dalam labu 10 ml dengan metanol.

e. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Diambil 0.3 mL larutan sampel pada masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan 1.2 mL DPPH 0,1 mM. Campuran tersebut didiamkan pada waktu operating time pada tempat gelap dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Dilakukan dengan perlakuan yang sama pada kontrol positif vitamin C.

f. Perhitungan

Data absorbansi dihitung aktivitas antioksidan menggunakan persamaan:

$$\%inhibisi = \frac{(Abs\ DPPH - Abs\ sampel)}{Abs\ DPPH} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.1})$$

Kemudian dihitung nilai IC_{50} menggunakan persamaan regresi dengan konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y.

Persamaan regersi $y=bx+a$ digunakan untuk menentukan IC_{50} menggunakan persamaan:

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b} \quad (\text{Persamaan 3.2})$$

3.7.4 Penentuan Aktivitas Antidiabetes Metode α -amilase

Uji antidiabetes dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang didasarkan pada penghambatan enzim α -amilase dan mengukur penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak. Metode ini telah divalidasi oleh Khairunisa (2017)

a. Penyiapan reagen dan larutan:

1) Pembuatan reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Dibuat dengan melarutkan 30 gram kalium natrium tartrat dalam 20 mL NaOH 2 M dan dipanaskan hingga larut. Kemudian dilarutkan 1,095 gram 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan

ditambahkan akuabides hingga tepat tanda. Larutan potassium sodium tartat dan larutan 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dicampurkan dan di tambahkan hingga ad 100 mL

2) Larutan dapar fosfat pH 6,9

Dibuat dengan mencampurkan 245 mL Na_2HPO_4 0,1 M dengan menimbang 15,54 gram dalam 600 mL aquabides dan 255 mL NaH_2PO_4 0,1 M dengan menimbang 6,90 gram dalam 500 mL aquabides

3) Larutan NaOH 2 M

Dibuat dengan menimbang 2 gram NaOH dan dilarutkan ke dalam labu ukur 25 ml dengan aquabides hingga hingga tepat tanda.

4) Pembuatan enzim α -amilase

Ditimbang enzim sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,9 dalam labu ukur 10 ml hingga tepat tanda, sehingga didapatkan konsentrasi enzim 20 U/mL. kemudian diambil sebanyak 25 μL untuk mendapatkan 0,5 U/mL (hasil optimasi). Larutan kemudian disimpan dalam lemari pendingin agar enzim tetap stabil dan mencegah kerusakan enzim.

5) Substrat Pati 0,5 %

Dengan menimbang 0,05 gram pati dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,9 hingga 10 mL dalam labu ukur. Kemudian dipanaskan diatas *hot plate* hingga larut

b. Pengujian aktivitas antidiabetes larutan uji

Pengujian aktivitas antidiabetes dilakukan terhadap larutan kontrol negatif (tanpa sampel), kontrol positif (akarbose), dan larutan sampel (ekstrak). Dibuat seri konsentrasi larutan uji 100-1000 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian masing-masing larutan ditambahkan larutan dapar dan enzim dengan jumlah yang berbeda kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C. Lalu ditambahkan substrat dan diinkubasi kembali pada waktu dan suhu yang sama. Setelah itu ditambahkan reagen DNS dan dipanaskan diatas *hot plate* selama 15 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang 540 nm. Jumlah larutan yang digunakan dapat dilihat di tabel 3.1.

Tabel 3.1 Preparasi larutan uji

Larutan (μL)	Dapar (μL)	Ekstrak (μL)	Enzim (μL)	Substrat Pati (μL)	Akarbose (μL)	DNS (μL)
A	375	100	25	100	-	400
B	400	100	-	100	-	400
C	375	-	25	100	100	400
D	400	-	-	100	100	400
E	475	-	25	100	-	400
F	500	-	-	100	-	400

Keterangan:

A = Larutan uji

B = Blanko larutan uji

C = Kontrol positif (akarbose)

D = Blanko kontrol positif

E = Kontrol negatif

F = Blanko kontrol negatif

a. Perhitungan

Presentase penghambatan diukur dengan menggunakan persamaan

$$\% \text{penghambatan} = \frac{(C-S)}{C} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.3})$$

Keterangan:

C = absorbansi blanko

S = absorbansi ekstrak (selisih absorbansi ekstrak dengan enzim dan tanpa enzim).

Dihitung nilai IC_{50} menggunakan persamaan regresi dengan konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Persamaan regresi $y=bx+a$ digunakan untuk menentukan IC_{50} menggunakan persamaan:

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b} \dots \dots \dots (\text{Persamaan 3.4})$$

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Nilai IC_{50} uji antioksidan untuk ekstrak metanol trenggulun (EMT) $9,799 \pm 1,155 \mu\text{g/mL}$ dan etil asetat $118,663 \pm 0,173 \mu\text{g/mL}$. Ekstrak metanol trenggulun memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat.
2. Nilai IC_{50} uji antidiabetes dengan penghambatan enzim α -amilase untuk ekstrak metanol trenggulun (EMT) $539,836 \pm 2,978 \mu\text{g/mL}$ dan ekstrak etil asetat $2397,840 \pm 1,470 \mu\text{g/mL}$

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, ekstrak metanol trenggulun memiliki aktivitas antioksidan dan antidiabetes maka perlu dilakukan pengujian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa aktif yang berperan dalam ekstrak tersebut serta kinetika penghambatan enzim α -amilase. Selain itu perlu dilakukan penentuan aktivitas penghambatan pada enzim α -glukosidase.

DAFTAR PUSTAKA

- Abelson, P. H. 1990. *Medicine From Plants*. Science.
- Adfa, M., Y. Hattori, M. Ninomiya, Y. Funahashi, T. Yoshimura, dan M. Koketsu. 2013. Chemical constituents of Indonesian plant *Protium javanicum* Burm. f. and their antifeedant activities against *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Natural Product Research*. 27(3):270–273.
- Agarwal, P. dan R. Gupta. 2016. Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. *Journal of Medical and Health Sciences*. 5(4):1–8.
- Ariandi. 2016. Pengenalan enzim amilase (alpha-amylase) dan reaksi enzimatisnya menghidrolisis amilosa pati menjadi glukosa. *Jurnal Dinamika*. 7(1):74–82.
- Basha, S. K. dan V. S. Kumari. 2012. In vitro antidiabetic activity of *Psidium guajava* leaves extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2(SUPPL.1):S98–S100.
- Benzie, I. F. F. dan J. J. Strain. 1999. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Methods Enzymol*. 299:15–36.
- Blois, M. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199–1200.
- Carolina, M., A. D. A. Silva, dan S. R. Paiva. 2012. Antioxidant activity and flavonoid content of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. 84:609–616.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat
- Elmaniar, R. dan Muhtadi. 2017. Aktivitas penghambatan enzim alfa glukosidase oleh ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L). (February):745–751.
- Elya, B., R. Handayani, R. Sauriasari, , Azizahwati, U. S. Hasyiyati, I. T. Permana, dan Y. I. Permatasari. 2015. Antidiabetic activity and phytochemical screening of extracts from Indonesian plants by inhibition of alpha amylase, alpha glucosidase and dipeptidyl peptidase IV. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 18:273–278.
- Febrinda, A. E., M. Astawan, T. Wresdiyati, dan N. Dewi Yuliana. 2013. Kapasitas antioksidan dan inhibitor alfa glukosidase ekstrak umbi bawang dayak. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*. 24(2):161–167.


- Gandjar, I. G. dan A. Rohman. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Belajar.
- GBIF. 2017. *Protium Javanicum* Burm.f. <https://www.gbif.org/species/5834450> [Diakses pada July 10, 2018].
- Heriyanto, N. M. 2006. Keanekaragaman Jenis Pohon Yang Berpotensi Obat Di Taman Nasional Meru Betiri, Jawa Timur. *Jurnal Penelitian Hutan Dan Konservasi Alam*. 2006.
- Ilgami, A., S. Ghanbarzadeh, dan H. Hamishehkar. 2015. Optimization of the ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, ferric reducing activity and antioxidant activity of the beta vulgaris using response surface methodology. *Pharmaceutical Sciences*. 21(1):46–50.
- Judoamidjojo, M., A. A. Darwis, dan E. G. Sai'd. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Pers.
- Kedare, S. B. dan R. P. Singh. 2011. Genesis and development of dpph method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 48(4):412–422.
- Keharom, S., R. Mahachai, dan S. Chanthai. 2016. The optimization study of α -amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method. *International Food Research Journal*. 23(1):10–17.
- Khaira, K. 2010. Menangkal Radikal Bebas Dengan Anti-Oksidan. *Jurnal Saintek*. 2010.
- Khairunnisa, P. 2017. *Pengembangan Dan Validasi Metode Uji Aktivitas Inhibitor α -Amilase Dari Ekstrak Metanol Daun Kopi Secara in Vitro*. Jember: Universitas Jember.
- Marjoni, M. R. 2016. *Dasar-Dasar Fitokimia Untuk Diploma III Farmasi*. Jakarta: Buku Mahasiswa Kesehatan.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (dpph) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 26(December 2003):211–219.
- Nimse, S. B. dan D. Pal. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 5(35):27986–28006.
- Nugraha, A. S. dan P. a. Keller. 2011. Revealing indigenous indonesian traditional medicine: anti-infective agents. *Natural Product Communications*. 6(12):1953–1966.
- Oyedemi, S. O., B. O. Oyedemi, I. I. Ijeh, P. E. Ohanyerem, R. M. Cooposamy,

- dan O. A. Aiyegoro. 2017. Alpha-amylase inhibition and antioxidative capacity of some antidiabetic plants used by the traditional healers in southeastern nigeria. *Scientific World Journal*. 2017:1–11.
- Özyürek, M., K. Güçlü, E. Tütem, K. S. Başkan, E. Erçağ, S. Esin Çelik, S. Baki, L. Yıldız, Ş. Karaman, dan R. Apak. 2011. A comprehensive review of cuprac methodology. *Analytical Methods*. 3(11):2439.
- Pisoschi, A. M. dan G. P. Negulescu. 2012. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 1(1):1–10.
- Puspawati, N. M., I. A. R. A. Asih, dan P. J. Burm. 2016. Aktifitas antiinflamasi topikal minyak atsiri dan. 4:8–17.
- Rahimzadeh, M., S. Jahanshahi, S. Moein, dan M. R. Moein. 2014. Evaluation of alpha- amylase inhibition by urtica dioica and juglans regia extracts. (5)
- Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2(2):219–236.
- Ridho, E. Al, R. Sari, dan S. Wahdaningsih. 2013. Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol buah lakum (cayratia trifolia) dengan metode dpph (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)
- Safdar, M. N., T. Kausar, dan M. Nadeem. 2017. Comparison of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from the mango peel. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(4):1–13.
- Şahin, S. dan R. Şamli. 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20(1):595–602.
- Santimone, M., R. Koukiekolo, Y. Moreau, dan G. Marchis-mouren. 2004. Porcine pancreatic a -amylase inhibition by the kidney bean (phaseolus vulgaris) inhibitor (a -ai1) and structural changes in the a -amylase inhibitor complex. 1696:181–190.
- Santos, F. A., J. T. Frota, B. R. Arruda, T. S. De Melo, A. A. D. C. A. Da Silva, G. A. D. C. Brito, M. H. Chaves, dan V. S. Rao. 2012. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α,β -amyrin, a triterpenoid mixture from protium heptaphyllum in mice. *Lipids in Health and Disease*. 11:1–8.
- Sazci, A., K. Erenler, dan A. Radford. 1986. Detection of cellulolytic fungi by using congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology*. 61(6):559–562.


- Shalaby, E. A. dan S. M. M. Shanab. 2013. Comparison of dpph and abts assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of spirulina platensis. *Indian Journal of Marine Sciences*. 42(5):556–564.
- Shankaraiah, P., R. Devde, dan Y. N. Reddy. 2012. Alpha amylase inhibitory activity of flavonoids in diabetic induced rats. 5(2):1183–1187.
- Sharma, R. 2012. *Enzyme Inhibition: Mechanisms and Scope. Enzyme Inhibition and Bioapplications*.
- Sossef, M. S. M., L. T. Hong, dan P. S. 1998. *PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 5 (3); Timber Tress*. Lesser-known timbers.
- Strelow, J., W. Dewe, P. W. Iversion, H. B. Brooks, J. a Radding, J. McGee, dan J. Weidner. 2012. Mechanism of action assays for enzymes. *Assay Guidance Manual*. 1–24.
- Sundarram, A. dan T. P. K. Murthy. 2014. A -amylase production and applications : a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 2(4):166–175.
- The Plant List. 2012. Protium Javanicum Burm.f. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2412191> [Diakses pada May 9, 2018].
- Trankina, M. L. 1998. *Drugs That Grow on Trees*
- Wardani, N. A. K., Andini, P. T. Indriani, dan D. I. Sarinastiti. 2017. Enzim α -amilase inhibitor pada ekstrak air kacang merah (phaseolus vulgaris l .) untuk penanggulangan diabetes melitus. 1(2):50–59.
- Werdhasari, A. 2014. Peran antioksidan bagi kesehatan. *Jurnal Biomedik Medisiana Indonesia*. 3(2):59–68.
- WHO. 2015. Indonesia: who statistical profile. *Health Systems in Transition*. 34(9):80.
- Yadav, Anuj, K. Rewa, Ashwani Yadav, J. P. Mishra, S. Srivatva, dan S. Prabha. 2016. Antioxidants and its functions in human body - a review. *Research in Environment and Life Sciences*. 9(November):1328–1331.

LAMPIRAN

Lampiran 4.1 Hasil Determinasi Trenggulun



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI
Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 426046
website : <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>


SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN

No: 415 /IPH.06/HM/III/2018

Kepala Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi LIPI dengan ini menerangkan bahwa material tumbuhan yang dibawa oleh:

Nama : Ainun Nihayah
NIM : 142210101043
Instansi : Fakultas Farmasi Universitas Jember
Tanggal material : 12 Maret 2018
diterima

Telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan koleksi herbarium dan koleksi kebun serta referensi ilmiah, dengan hasil sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Division : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Subclass : Rosidae
Ordo : Sapindales
Family : Burseraceae
Genus : Protium
Species : *Protium javanicum* Burm.f

Referensi:

1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1965. Flora of Java Vol.II. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 113
2. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, USA. Hal. XVI
3. M.S.M.Sosef, L.T. Hong dan S.Prawirohatmodjo, 1998, PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 5 (3) ; Timber trees: Lesser-known timbers, Hal. 474

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 19 Maret 2018

An. Kepala

Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan



Sugeng Budiharta, M.Sc, P.hD

Lampiran 4.2 Data Rendemen Ekstrak Daun Trenggulun

a) Ekstrak Metanol (EMT)

$$\begin{aligned}\text{Berat Wadah + ekstrak metanol} &= 116,99 \text{ g} \\ \text{Berat Wadah} &= 101,94 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak metanol} &= 15,05 \text{ g} \\ \text{Rendemen ekstrak metanol} &= \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{berat awal serbuk}} \times 100\% \\ &= \frac{15,05}{60,4} \times 100\% \\ &= 24,917\%\end{aligned}$$

b) Ekstrak Etil Asetat (EAT)

$$\begin{aligned}\text{Berat Wadah + ekstrak etil asetat} &= 108,70 \\ \text{Berat Wadah} &= 107,70 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak etil asetat} &= 1,00 \text{ gra,} \\ \text{Rendemen ekstrak etil asetat} &= \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{berat awal serbuk}} \times 100\% \\ &= \frac{1,00}{60,4} \times 100\% \\ &= 1,655 \%\end{aligned}$$

Lampiran 4.3 Pembuatan Larutan DPPH

Konsentrasi DPPH yang dibuat = 0,1 mM (Molyneux, 2004)

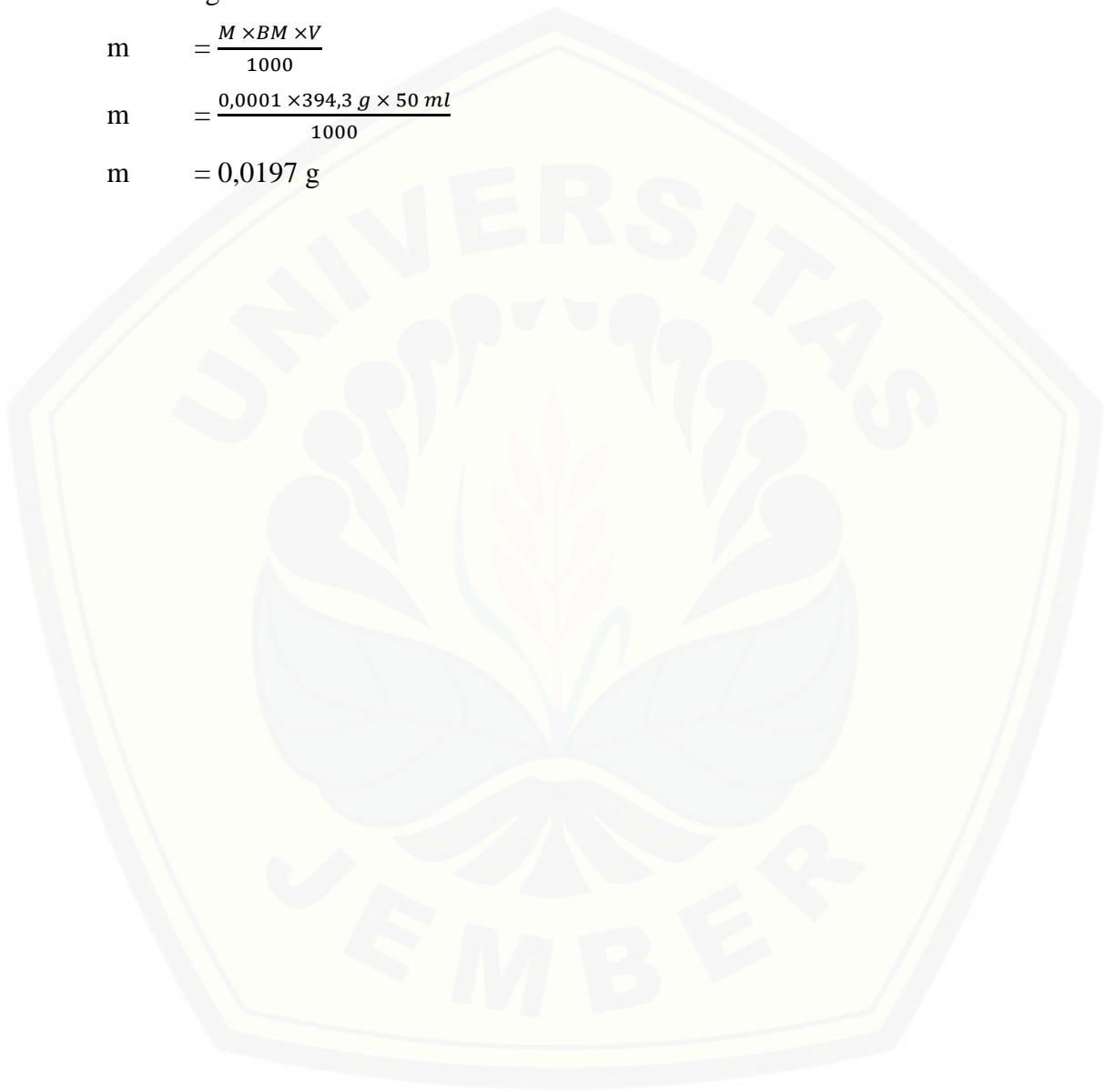
Mr DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) = 394,33 (Molyneux, 2004)

Perhitungan:

$$m = \frac{M \times BM \times V}{1000}$$

$$m = \frac{0,0001 \times 394,3 \text{ g} \times 50 \text{ ml}}{1000}$$

$$m = 0,0197 \text{ g}$$



Lampiran 4.4 Pembuatan Larutan Uji Aktivitas Antioksidan

1) Ekstrak Metanol

Larutan induk:

$$\frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 2000 \text{ ppm}$$

diencerkan

$$\frac{500 \mu\text{L}}{10000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$$

Seri konsentrasi larutan uji

$$\frac{100 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$$

$$\frac{600 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 60 \text{ ppm}$$

$$\frac{200 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 20 \text{ ppm}$$

$$\frac{700 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 70 \text{ ppm}$$

$$\frac{300 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 30 \text{ ppm}$$

$$\frac{800 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 80 \text{ ppm}$$

$$\frac{400 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 40 \text{ ppm}$$

$$\frac{900 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 90 \text{ ppm}$$

$$\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 50 \text{ ppm}$$

Sampel	Konsentrasi uji
Replikasi 1 (0,0203 g)	10,15 ppm; 20,3 ppm; 30,45 ppm;
Larutan induk 2030 ppm	40,6 ppm; 50,75 ppm; 60,9 ppm; 71,05 ppm; 81,2 ppm; 91,35 ppm; 101,5 ppm
Replikasi 2 (0,0202 g)	10,1 ppm; 20,2 ppm; 30,3 ppm; 40,4 ppm; 50,5 ppm; 60,6 ppm; 70,7 ppm; 80,8 ppm; 90,9 ppm, 101 ppm

Replikasi 3 (0,0204 g)	10,2 ppm; 20,4 ppm; 30,6 ppm; 40,8 ppm; 51 ppm; 61,2 ppm; 71,4 ppm; 81,6 ppm, 91,8 ppm; 102 ppm
------------------------	---

2) Ekstrak Etil Asetat

Larutan induk

$$\frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 2000 \text{ ppm}$$

Seri konsentrasi larutan uji :

$$\frac{50 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm} \quad \frac{300 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 600 \text{ ppm}$$

$$\frac{100 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 200 \text{ ppm} \quad \frac{350 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 700 \text{ ppm}$$

$$\frac{150 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 300 \text{ ppm} \quad \frac{400 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 800 \text{ ppm}$$

$$\frac{200 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 400 \text{ ppm} \quad \frac{450 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 900 \text{ ppm}$$

$$\frac{250 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 500 \text{ ppm} \quad \frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 1000 \text{ ppm}$$

Sampel	Konsentrasi uji
Replikasi 1 (0,0219)	109,5 ppm; 219 ppm; 328,5 ppm; 438 ppm; 547,5 ppm; 657 ppm; 766,5 ppm; 876 ppm; 985,5 ppm; 1095 ppm

Replikasi 2 (0,0219)	109,5 ppm; 219 ppm; 328,5 ppm; 438 ppm; 547,5 ppm; 657 ppm; 766,5 ppm; 876 ppm; 985,5 ppm; 1095 ppm
Replikasi 3 (0,0216)	108 ppm; 216 ppm; 324 ppm; 432 ppm; 540 ppm; 648 ppm; 756 ppm; 864 ppm; 972 ppm; 1080 ppm

2. Vitamin C

Larutan induk

$$\frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 2000 \text{ ppm}$$

$$\frac{500 \mu\text{L}}{10000 \mu\text{L}} \times 2000 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$$

Seri konsentrasi larutan uji :

$$\frac{50 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 5.06 \text{ ppm}$$

$$\frac{250 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 25.3 \text{ ppm}$$

$$\frac{100 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 10.12 \text{ ppm}$$

$$\frac{300 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 30.36 \text{ ppm}$$

$$\frac{150 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} \\ = 15.18 \text{ ppm}$$

$$\frac{350 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 35.42 \text{ ppm}$$

$$\frac{200 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} \\ = 20.24 \text{ ppm}$$

$$\frac{400 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \text{ ppm} = 40.48 \text{ ppm}$$

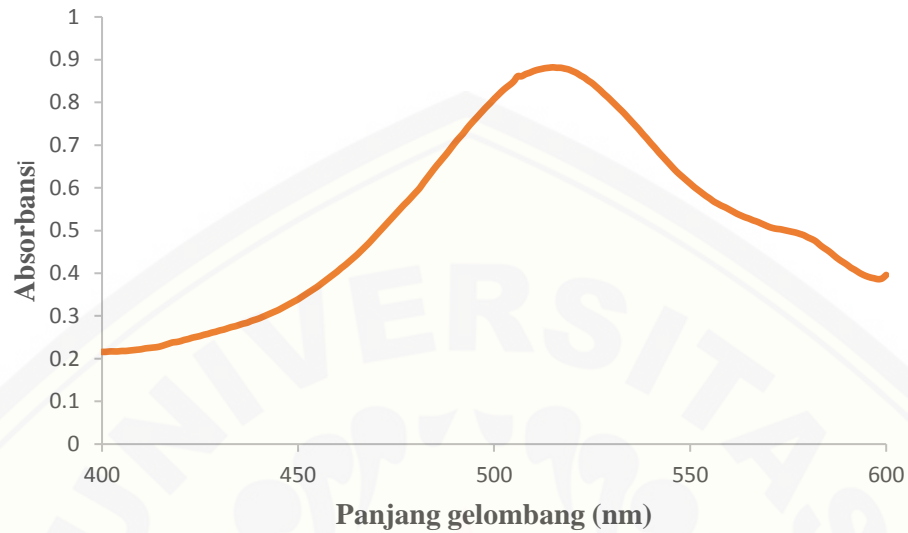
Sampel	Konsentrasi uji
Replikasi 1 (0.0203 g)	5,075 ppm; 10,15 ppm; 15,225 ppm; 20,3 ppm; 25,375 ppm; 30,45 ppm;

Replikasi 2 (0,0202 g)	5,05 ppm; 10,1 ppm; 15,15 ppm; 20,2 ppm; 25,25 ppm; 30,3 ppm
Replikasi 3 (0,0204 g)	5,1 ppm; 10,2 ppm; 15,3 ppm; 20,4 ppm; 25,5 ppm; 30,6 ppm



Lampiran 4.5 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Spektra larutan DPPH



Wavelength Scan

Data Mode	: ABS
Scan Range	: 600,0-400,0 nm
Slit Width	: 4 nm
Speed (nm/min)	: 800 nm/min
Lamp Change Wavelength	: 340,0 nm

Lampiran 4.6 Penetapan Waktu Inkubasi

Menit ke-	Vitamin C	Ekstrak Metanol	Ekstrak Etil Asetat
5	0,357	0,259	0,562
10	0,362	0,231	0,486
15	0,371	0,199	0,453
20	0,375	0,155	0,424
25	0,382	0,123	0,403
30	0,384	0,103	0,371
35	0,384	0,092	0,350
40	0,384	0,087	0,336
45	0,383	0,085	0,318
50	0,381	0,085	0,303
55	0,379	0,085	0,293
60	0,377	0,087	0,278
65	0,374	0,090	0,268
70	0,370	0,094	0,259
75	0,365	0,096	0,248
80	0,361	0,097	0,245
85	0,355	0,101	0,237
90	0,350	0,103	0,238
95	0,344	0,107	0,240
100	0,339	0,110	0,241

Lampiran 4.7 Data Absorbansi dan Persamaan Regresi

1. EMT

• Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
10,150	2,026	0,859	0,938	8,422	9,879
20,300	4,052	0,766		18,336	
30,450	6,078	0,628		33,049	
50,750	10,130	0,434		53,731	
60,900	12,156	0,371		60,447	
71,050	14,182	0,243		74,093	
91,350	18,234	0,092		90,191	

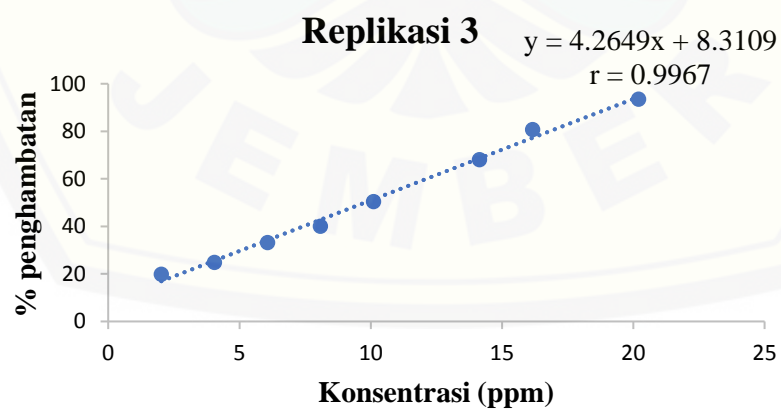
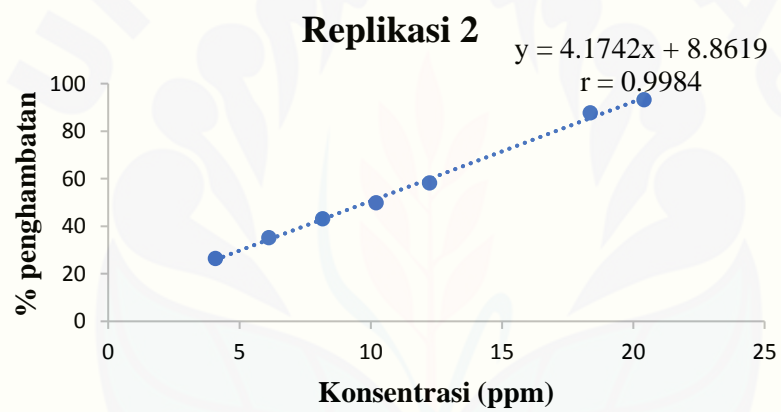
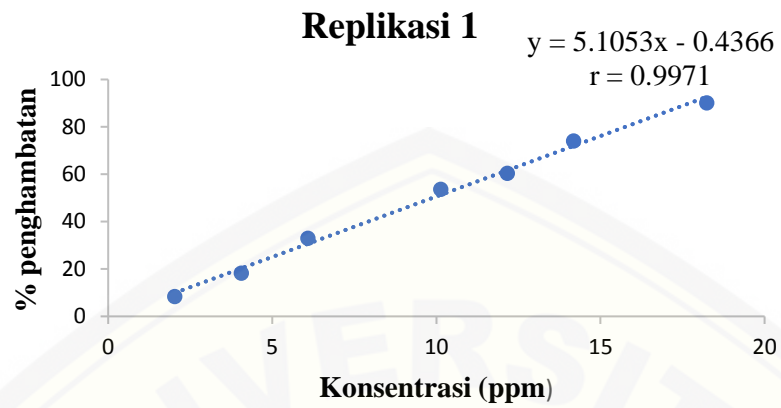
• Replikasi 2

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
10,100	2,020	0,751	0,938	19,936	9,774
20,200	4,040	0,705		24,840	
30,300	6,060	0,626		33,262	
40,400	8,080	0,562		40,085	
50,500	10,100	0,465		50,426	
70,700	14,140	0,299		68,123	
80,800	16,160	0,18		80,810	
101,000	20,200	0,06		93,603	

• Replikasi 3

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
20,200	4,080	0,690	0,938	26,439	9,855
30,600	6,120	0,607		35,287	
40,800	8,160	0,533		43,176	
51,000	10,200	0,470		49,893	
61,200	12,240	0,391		58,315	
91,800	18,360	0,115		87,739	
102,000	20,400	0,063		93,283	

- Regresi linier IC₅₀ EMT



2. EAT

• Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
109,500	21,900	0,802	0,999	18,989	118,663
219,000	43,800	0,734		25,858	
328,500	65,700	0,681		31,212	
438,000	87,600	0,593		40,101	
547,500	109,500	0,548		44,646	
657,000	131,400	0,453		54,242	
766,500	153,300	0,374		62,222	
876,000	175,200	0,298		69,898	
985,500	197,100	0,242		75,555	

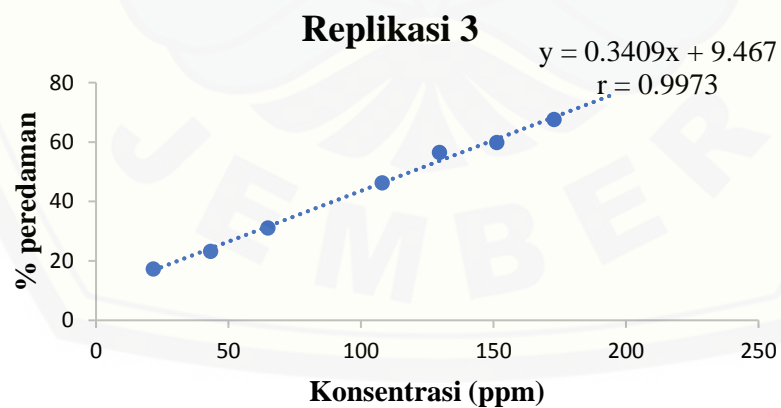
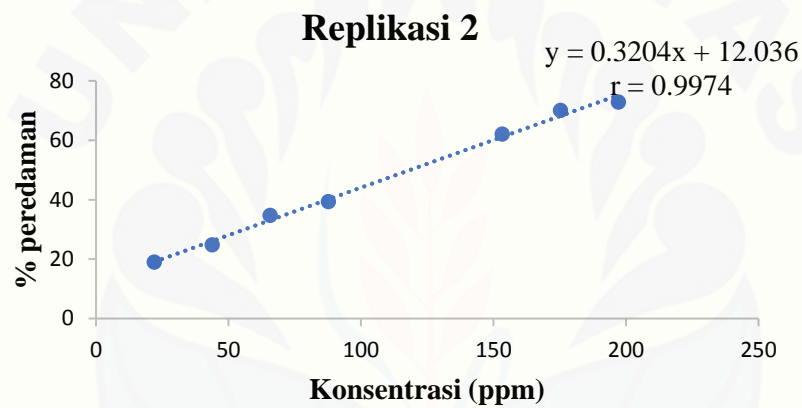
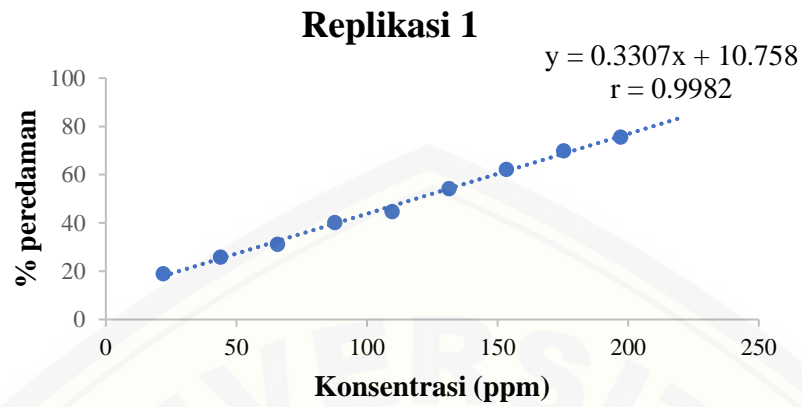
• Replikasi 2

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
109,500	21,900	0,810	0,999	18,918	118,489
219,000	43,800	0,751		24,824	
328,500	65,700	0,652		34,734	
438,000	87,600	0,606		39,339	
766,500	153,300	0,379		62,062	
876,000	175,200	0,299		70,070	
985,500	197,100	0,271		72,872	

• Replikasi 3

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
108,000	21,600	0,826	0,999	17,317	118,899
216,000	43,200	0,767		23,223	
324,000	64,800	0,688		31,131	
540,000	108,000	0,537		46,246	
648,000	129,600	0,434		56,556	
756,000	151,200	0,401		59,859	
864,000	172,800	0,324		67,567	

- Regresi linier IC₅₀ EAT



3. Vitamin C

• Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
10,150	2,030	0,432	0,796	45,728	2,526
15,225	3,450	0,357		55,150	
20,300	4,060	0,281		64,698	
25,375	5,750	0,150		81,155	
30,450	6,090	0,076		90,452	

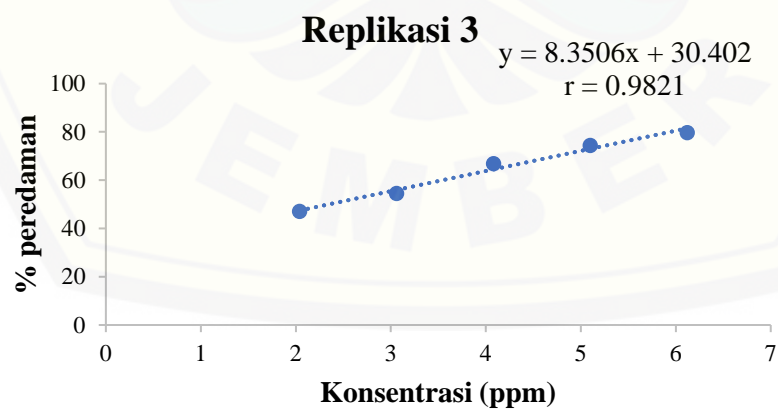
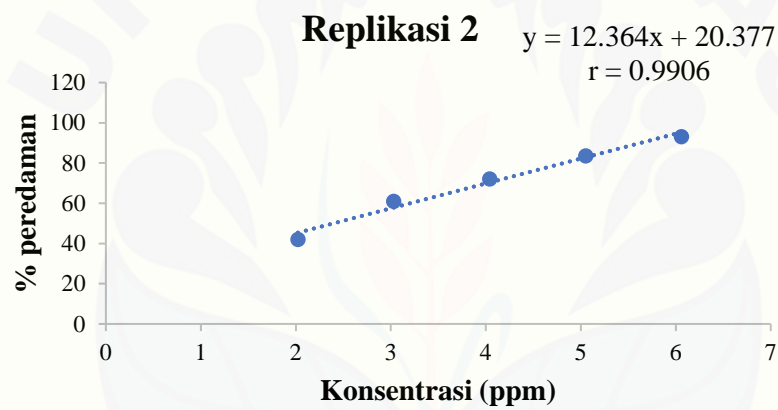
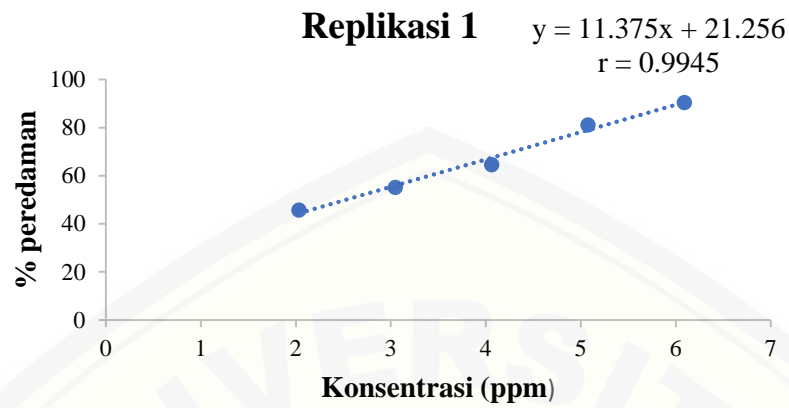
• Replikasi 2

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
10,100	2,020	0,462	0,796	41,959	2,395
15,150	3,030	0,311		60,929	
20,200	4,040	0,222		72,110	
25,250	5,050	0,131		83,542	
30,300	6,060	0,055		93,090	

• Replikasi 3

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC ₅₀
10,200	2,040	0,422	0,796	46,984	2,346
15,300	3,060	0,362		54,522	
20,400	4,080	0,264		66,834	
25,500	5,100	0,204		74,371	
30,600	6,120	0,162		79,648	

- Regresi linier IC₅₀ dengan Vitamin C



Lampiran 4.8 Hasil %peredaman DPPH dan IC₅₀

$$\% \text{ peredaman DPPH} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi larutan uji}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

Sampel	IC ₅₀ (ppm)	Rata-rata IC ₅₀	SD (ppm)	%CV
EMT	9,879	9,799	0,113	1,155
	9,670			
	9,855			
EAT	118,663	118,683	0,205	0,173
	118,489			
	118,899			
Vitamin C	2,526	2,440	0,090	3,702
	2,395			
	2,346			

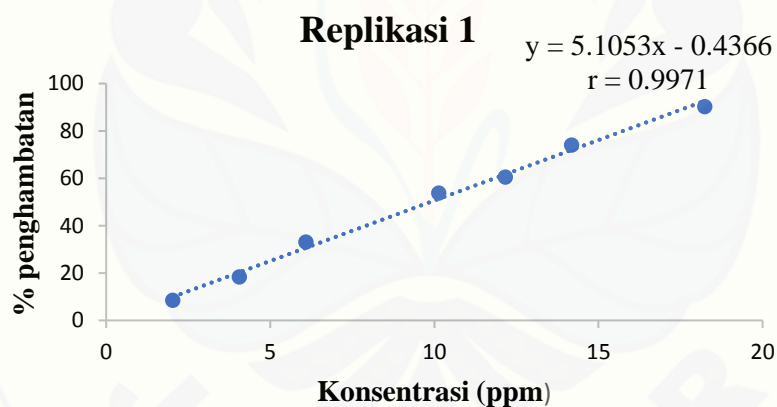
Lampiran 4.9 Contoh perhitungan % peredaman DPPH dan IC₅₀

Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs DPPH	% inhibisi
2,026	0,859		8,422
4,052	0,766		18,336
6,078	0,628		33,049
10,130	0,434	0,938	53,731
12,156	0,371		60,447
14,182	0,243		74,093
18,234	0,092		90,191

Perhitungan % peredaman

$$\% \text{ peredaman DPPH} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi larutan uji}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 2,026} \rightarrow \% \text{ peredaman DPPH} &= \frac{0,938 - 0,859}{0,938} \times 100\% \\ &= 8,422 \% \end{aligned}$$



Perhitungan IC₅₀ (y=50)

$$50 = 5,1053x - 0,4366$$

$$x = \frac{50 - 0,4366}{5,1053}$$

$$x = 9,879 \text{ ppm}$$

$$\text{IC}_{50} = 9,879 \text{ ppm}$$

Lampiran 4.10 Pembuatan Dapar fosfat, Reagen DNS dan Enzim α -Amilase

1. Pembuatan Larutan dapar fosfat pH 6,9

a. Penimbangan NaH_2PO_4 0.1 M

$$M = \frac{\text{massa}}{BM} \times \frac{1000}{V}$$

$$M = \frac{M \times BM \times V}{1000}$$

$$M = \frac{0,1 \times 119,98 \times 100}{1000}$$

$M = 1,1998$ gram dilarutkan dalam 100 mL akuabides

b. Penimbangan Na_2HPO_4

$$M = \frac{\text{massa}}{BM} \times \frac{1000}{V}$$

$$M = \frac{M \times BM \times V}{1000}$$

$$M = \frac{0,1 \times 141,96 \times 100}{1000}$$

$M = 1,4196$ gram dilarutkan dalam 100 mL akuabides

2. Pembuatan Reagen DNS

a. Pembuatan Larutan NaOH 2M

$$M = \frac{\text{massa}}{BM} \times \frac{1000}{V}$$

$$M = \frac{M \times BM \times V}{1000}$$

$$M = \frac{2 \times 40 \times 25}{1000}$$

$M = 2$ gram dilarutkan dalam 25 mL akuabides

- b. Ditimbang *potassium sodium tartrate* 30 gram dilarutkan dalam 20 mL NaOH 2M kemudian ditimbang 1,095 gram DNS ditambahkan akuabides 50 mL. Larutan *potassium sodium tartrate* dan DNS dicampur dan ditambahkan akuabides ad 100 mL.

3. Pembuatan Larutan Enzim α -amilase 0,5 U/mL

1 mg enzim α -amilase mengandung 10-16 unit/mg

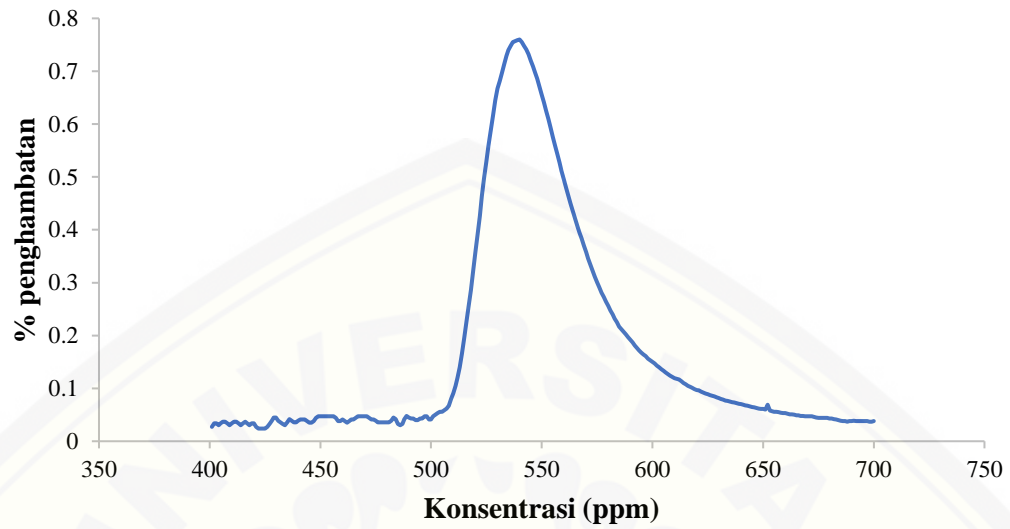
$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi larutan enzim } \alpha\text{-amilase} &= \frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 10 \text{ U} \\ &= 20 \text{ U/mL}\end{aligned}$$

Untuk mendapatkan konsentrasi enzim sebesar 0,5/mL:

$$\begin{aligned}\frac{20 \text{ U}}{1000 \mu\text{L}} &= \frac{0,5 \text{ U}}{x} \\ x &= 25 \mu\text{L}\end{aligned}$$

4. Pembuatan Substrat 0,5%

$$\begin{aligned}\frac{0,5 \text{ g}}{100 \text{ mL}} &= \frac{x}{10 \text{ mL}} \\ x &= 0,05 \text{ gram}\end{aligned}$$

Lampiran 4.11 Panjang Gelombang Maksimum Kontrol Negatif**Wavelength Scan**

Data Mode : ABS
Scan Range : 700,0-400,0 nm
Slit Width : 4 nm
Speed (nm/min) : 800 nm/min
Lamp Change Wavelength : 340,0 nm

Lampiran 4.12 Pembuatan Larutan Uji Aktivitas Antidiabetes

1. Ekstrak Metanol

$$\frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 = 10000 \text{ ppm}$$

Seri konsentrasi larutan uji

$$\frac{100 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 1000 \text{ ppm}$$

$$\frac{600 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 6000 \text{ ppm}$$

$$\frac{200 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 2000 \text{ ppm}$$

$$\frac{700 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 7000 \text{ ppm}$$

$$\frac{300 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 3000 \text{ ppm}$$

$$\frac{800 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 8000 \text{ ppm}$$

$$\frac{400 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 4000 \text{ ppm}$$

$$\frac{900 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 9000 \text{ ppm}$$

$$\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 5000 \text{ ppm}$$

Sampel	Konsentrasi uji
Replikasi 1 (0.1004 g)	1004 ppm; 2008 ppm; 3012 ppm; 4016 ppm; 5020 ppm; 6024 ppm; 7028 ppm; 8032 ppm; 9036 ppm; 10040 ppm
Replikasi 2 (0,1004 g)	1004 ppm; 2008 ppm; 3012 ppm; 4016 ppm; 5020 ppm; 6024 ppm; 7028 ppm; 8032 ppm; 9036 ppm; 10040 ppm

Replikasi 3 (0,1001 g)	1001 ppm; 2002 ppm; 3003 ppm; 4004 ppm; 5005 ppm; 6006 ppm; 7007 ppm; 8008 ppm; 9009 ppm; 10010 ppm
------------------------	--

2. Ekstrak Etil Asetat

$$\frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 = 10000 \text{ ppm}$$

$$\frac{600 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 6000 \text{ ppm}$$

$$\frac{700 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 7000 \text{ ppm}$$

$$\frac{800 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 8000 \text{ ppm}$$

$$\frac{900 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 10000 \text{ ppm} = 9000 \text{ ppm}$$

Sampel	Konsentrasi uji
Replikasi 1 (0,1003 g)	6018 ppm; 7021 ppm; 8024 ppm; 9027 ppm;
Replikasi 2 (0,1003 g)	6018 ppm; 7021 ppm; 8024 ppm; 9027 ppm;
Replikasi 3 (0,1003 g)	6018 ppm; 7021 ppm; 8024 ppm; 9027 ppm;

3. Akarbose

$$\frac{5 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 500 \text{ ppm}$$

$$\frac{100 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 50 \text{ ppm}$$

$$\frac{600 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 300 \text{ ppm}$$

$$\frac{200 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$$

$$\frac{700 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 350 \text{ ppm}$$

$$\frac{300 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 150 \text{ ppm}$$

$$\frac{800 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 400 \text{ ppm}$$

$$\frac{400 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 200 \text{ ppm}$$

$$\frac{900 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 450 \text{ ppm}$$

$$\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 250 \text{ ppm}$$

Sampel	Konsentrasi uji
Replikasi 1 (5,045 mg)	50,45 ppm; 100,9 ppm; 151,35 ppm; 201,8 ppm; 252,25 ppm; 302,7 ppm; 353,15 ppm; 403,6 ppm; 454,05 ppm
Replikasi 2 (5,045 mg)	50,45 ppm; 100,9 ppm; 151,35 ppm; 201,8 ppm; 252,25 ppm; 302,7 ppm; 353,15 ppm; 403,6 ppm; 454,05 ppm
Replikasi 3 (5,045 mg)	50,45 ppm; 100,9 ppm; 151,35 ppm; 201,8 ppm; 252,25 ppm; 302,7 ppm; 353,15 ppm; 403,6 ppm; 454,05 ppm

Lampiran 4.13 Data Absorbansi dan Persamaan Regresi Inhibitor α -amilase

1. EMT

• Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
2008	200,800	0,879	1,090	19,357	521,522
3012	301,200	0,756		30,642	
4016	401,600	0,666		38,899	
5020	502,000	0,556		48,990	
6024	602,400	0,434		60,183	
7024	702,800	0,353		67,614	
8032	803,200	0,306		71,926	

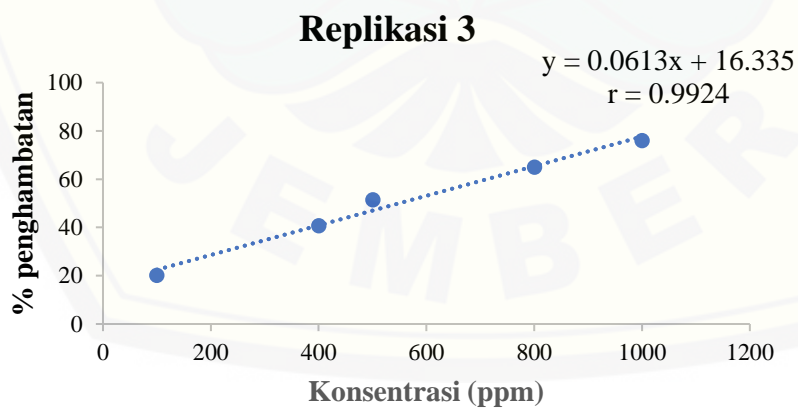
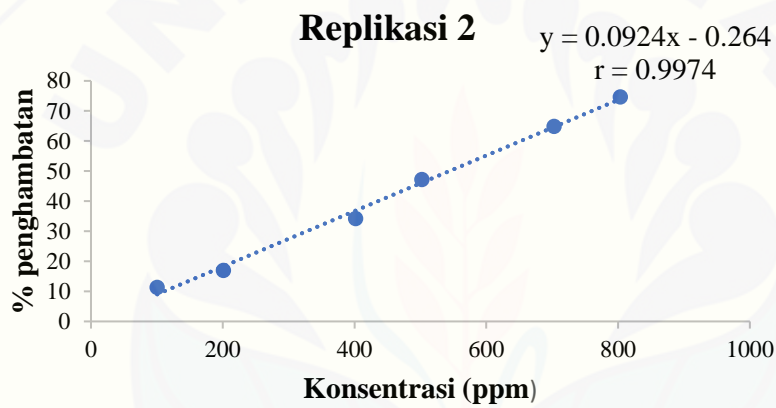
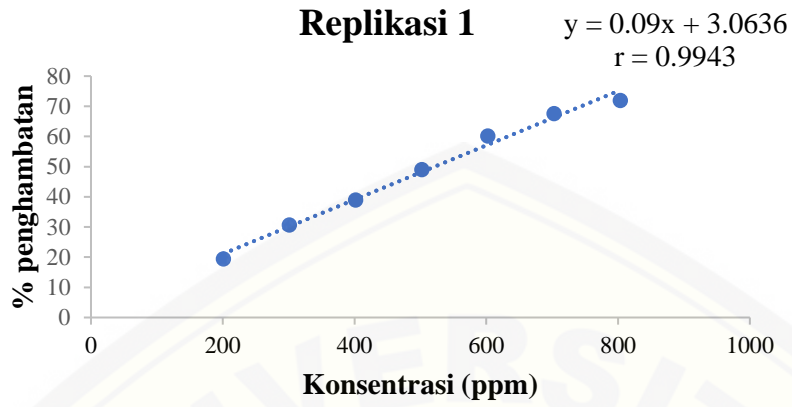
• Replikasi 2

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
1004	100,400	0,972	1,096	11,313	546,347
2008	200,800	0,911		16,879	
4016	401,600	0,722		34,124	
5020	502,000	0,579		47,171	
7028	702,800	0,386		64,781	
8032	803,200	0,339		74,635	

• Replikasi 3

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
1001	100,100	0,920	1,153	20,208	551,639
4004	400,400	0,684		40,676	
5005	500,500	0,559		51,517	
8008	800,800	0,404		64,960	
10010	1001,000	0,276		76,062	

- Regresi linier IC₅₀ EMT antidiabetes



2. EAT

• Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
7021	1404,200	0,830	1,042	20,345	2438,402
8024	1604,800	0,799		23,320	
9027	1805,400	0,758		27,255	
7021	2106,300	0,628		39,731	
9027	2708,100	0,421		59,969	

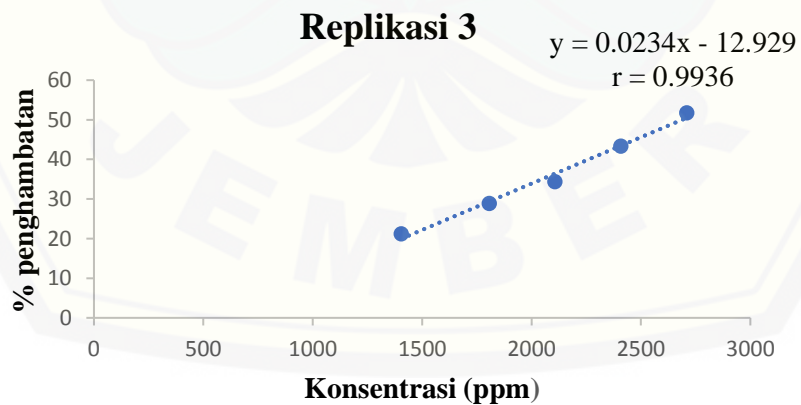
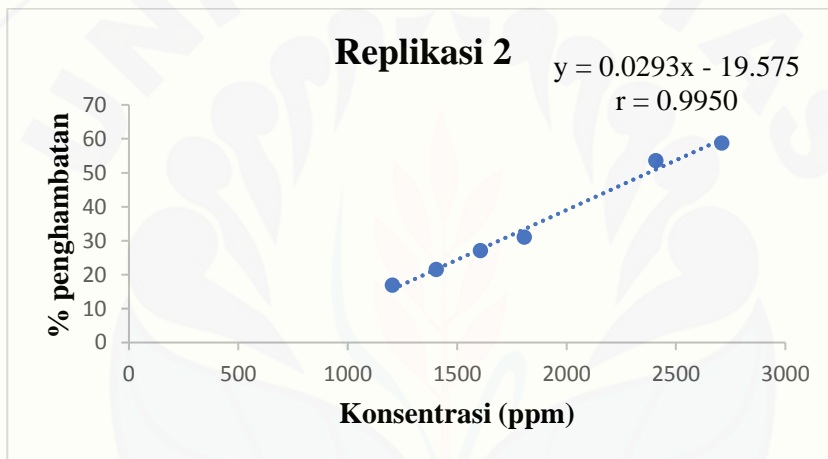
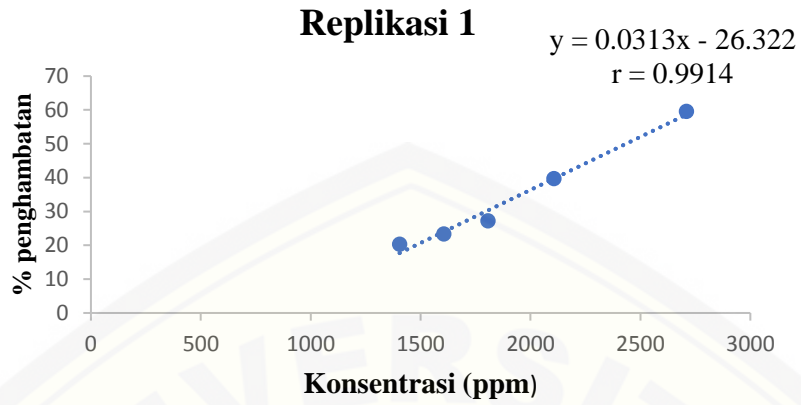
• Replikasi 2

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
6018	1203,600	0,838	1,008	16,865	2380,546
7021	1404,200	0,791		21,527	
8024	1604,800	0,735		27,083	
9027	1805,400	0,695		31,051	
8024	2407,200	0,468		53,571	
9027	2708,100	0,416		58,730	

• Replikasi 3

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
7021	1404,200	0,864	1,096	21,167	2374,573
9027	1805,400	0,779		28,923	
7021	2106,300	0,719		34,397	
8024	2407,200	0,621		43,339	
9027	2708,100	0,529		51,733	

- Regresi linier IC₅₀ EAT



3. Akarbose

• Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
100,900	10,090	0,883	1,061	16,776	24,885
126,120	12,612	0,809		23,751	
151,350	15,135	0,770		27,426	
227,020	22,702	0,586		44,769	
252,250	25,225	0,507		52,214	
277,470	27,747	0,466		56,079	
302,700	30,270	0,409		61,451	

• Replikasi 2

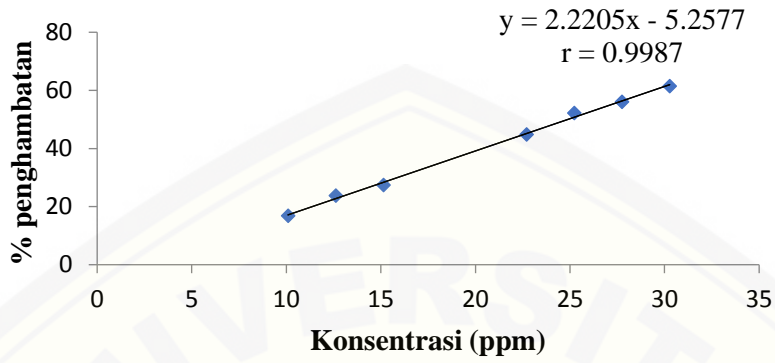
Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
100,900	10,090	0,874	1,050	16,761	24,972
126,120	12,612	0,804		23,428	
151,350	15,135	0,765		27,142	
201,800	20,180	0,671		36,095	
227,020	22,702	0,580		44,761	
252,250	25,225	0,500		52,380	
277,470	27,747	0,452		56,952	
302,700	30,270	0,403	61,619		

• Replikasi 3

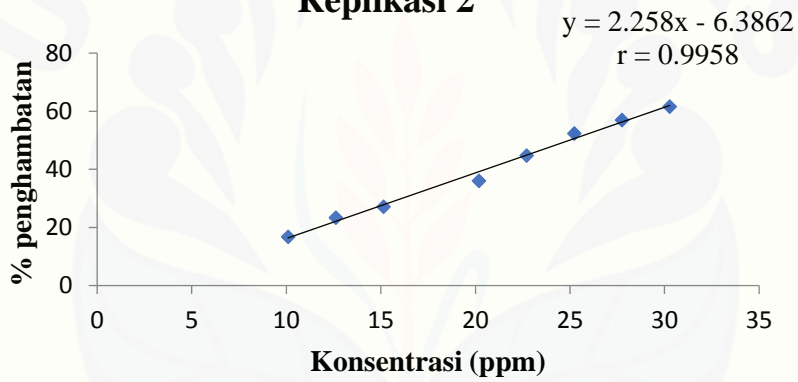
Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
100,900	10,090	0,870	1,069	18,615	24,773
126,120	12,612	0,801		25,070	
151,350	15,135	0,761		28,811	
201,800	20,180	0,673		37,043	
227,020	22,702	0,587		45,088	
252,250	25,225	0,508		52,478	
277,470	27,747	0,457		57,249	
302,700	30,270	0,409	61,739		

- Regresi linier IC₅₀ Akarbose

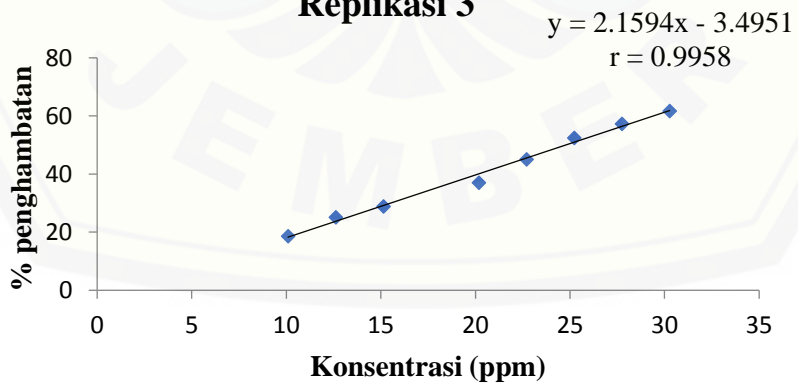
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



4. Jamu antidiabetes tersaintifikasi

• Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
1008	100,800	1,087	1,235	11,983	1124,303
2016	201,600	1,056		14,493	
3024	302,400	0,990		19,838	
4032	403,200	0,995		22,672	
5040	504,000	0,898		27,287	
6048	604,800	0,840		31,983	
8064	806,400	0,774		37,327	
10080	1008,000	0,674		45,425	

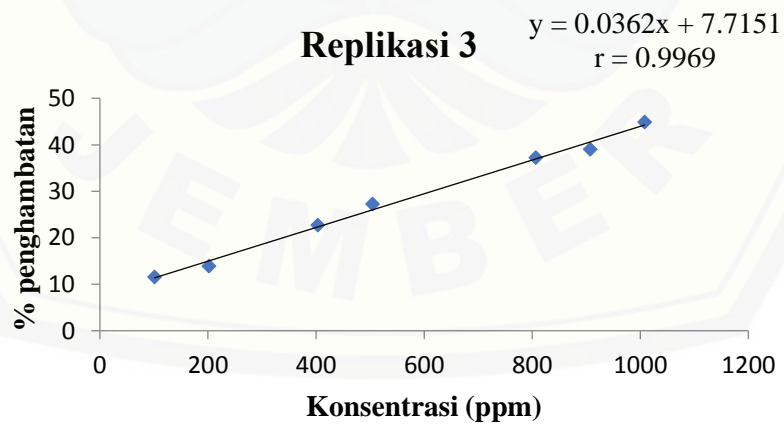
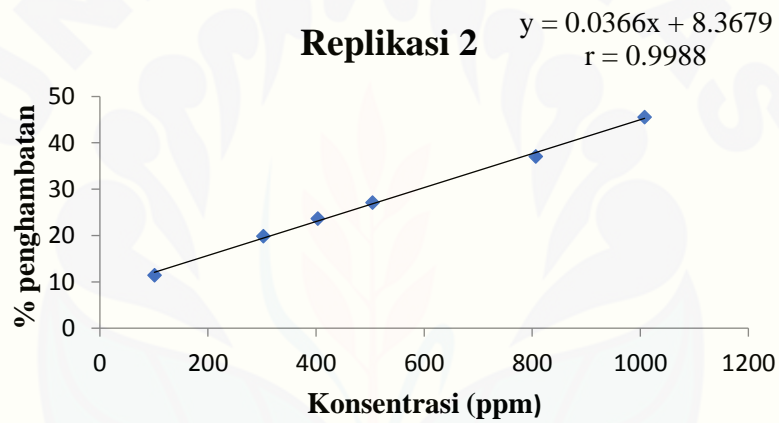
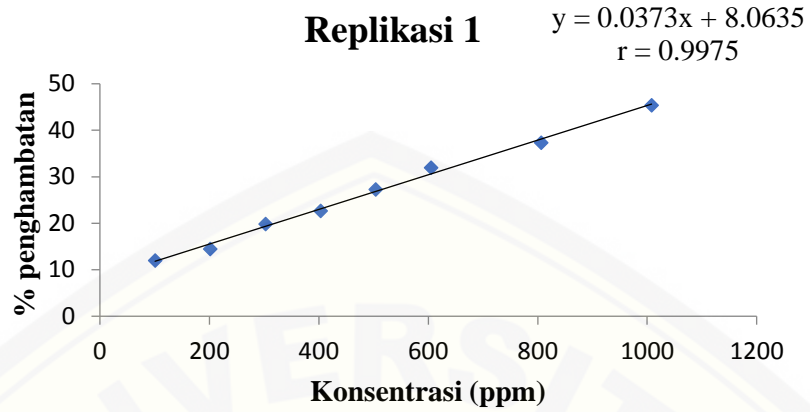
• Replikasi 2

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
1008	100,800	1,087	1,231	11,454	1137,489
3024	302,400	1,056		19,821	
4032	403,200	0,990		23,639	
5040	504,000	0,995		27,132	
8064	806,400	0,898		37,043	
10080	1008,000	0,840		45,572	

• Replikasi 3

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi	IC ₅₀
1008	100,800	1,090	1,230	11,544	1168,091
2016	201,600	1,059		13,902	
4032	403,200	0,940		22,682	
5040	504,000	0,897		27,235	
8064	806,400	0,775		37,235	
9072	907,200	0,749		39,024	
10080	1008,000	0,670		44,878	

- Regresi linier IC₅₀ jamu antidiabetes tersaintifikasi



Lampiran 4.14 Hasil % penghambatan dan IC₅₀

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Sampel	IC ₅₀ (ppm)	Rata-rata IC ₅₀	SD (ppm)	%CV
Jamu tersaintifikasi B2P2TOOT	1124,3	1143,2	22,463	1,964
	1137,4			
	1168,0			
EMT	521,522	539,836 ppm	16,079	2,978
	546,347			
	551,639			
EAT	2374,573	2397,8 ppm	35,254	1,470
	2438,402			
	2380,546			
Akarbose	24,885	24,876 ppm	0,099	0,401
	24,972			
	24,773			

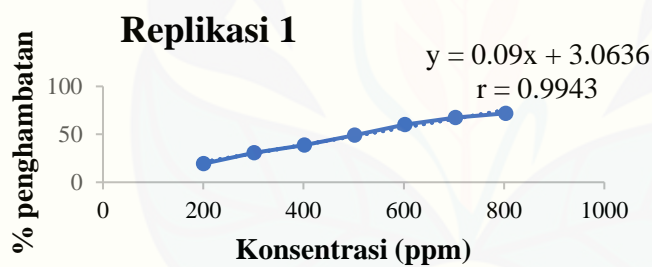
Lampiran 4.15 Contoh Perhitungan % penghambatan dan IC₅₀

Konsentrasi dalam kuvet	Abs sampel	Abs Kontrol (-)	% inhibisi
200,800	0,879		19,357
301,200	0,756		30,642
401,600	0,666		38,899
502,000	0,556	1,090	48,990
602,400	0,434		60,183
702,800	0,353		67,614
803,200	0,306		71,926

Perhitungan %peredaman

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 200,800} \rightarrow \% \text{ penghambatan} &= \frac{1,090 - 0,879}{1,090} \times 100\% \\ &= 19,357\% \end{aligned}$$



Perhitungan IC₅₀ (y=50)

$$50 = 0,09x + 3,0636$$

$$x = \frac{50 - 3,0636}{0,09}$$

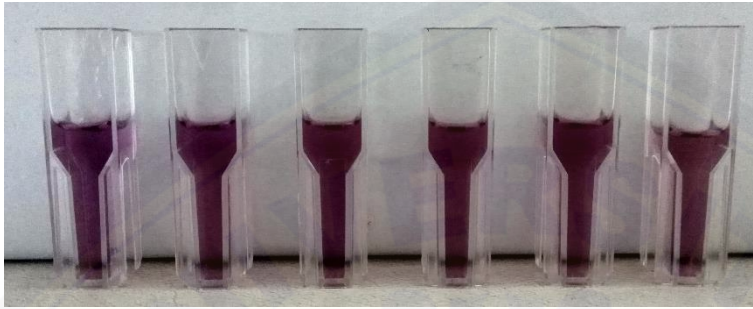
$$x = 521,515 \text{ ppm}$$

$$\text{IC}_{50} = 521,515 \text{ ppm}$$

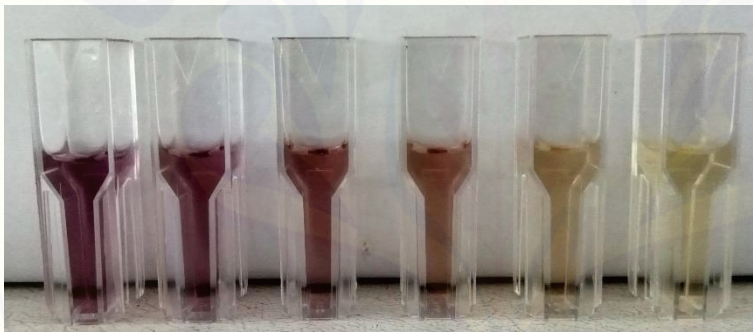
Lampiran 4.16 Dokumentasi Penelitian

1) Uji aktivitas antioksidan

a) Larutan DPPH dan ekstrak sebelum bereaksi

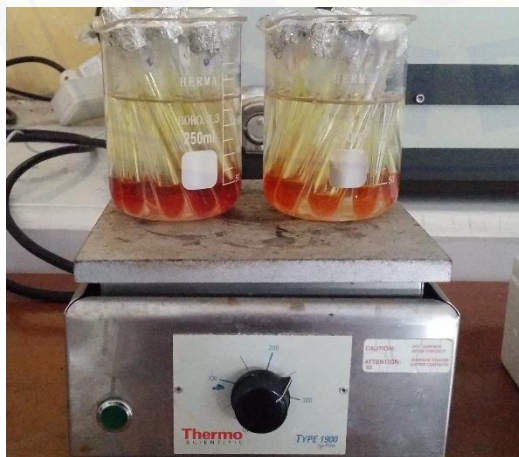


b) Larutan DPPH dan Ekstrak setelah bereaksi



2) Uji Aktivitas Antidiabetes

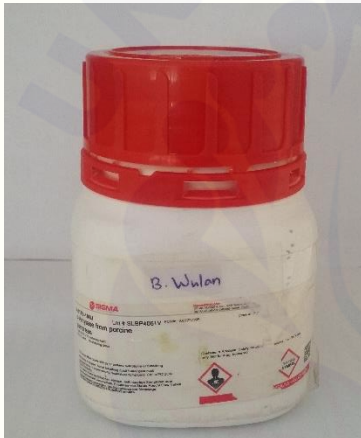
a. Proses pemanasan



b. Larutan yang telah direaksikan dan dipanaskan



c. Enzim α -amilase (α -amilase from porcine pancreas) No.Cat: A3176-1MU



d. Substrat (Pati) No.Cat: 1.01252.0250

