



**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIDIABETES EKSTRAK DAUN  
TANAMAN MELALUI METODE INHIBISI  $\alpha$ -AMILASE  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI  
NIR DAN KEMOMETRIK**

**SKRIPSI**

Oleh

**Fitri Valentina Santoso  
NIM 142210101003**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIDIABETES EKSTRAK DAUN  
TANAMAN MELALUI METODE INHIBISI  $\alpha$ -AMILASE  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI  
NIR DAN KEMOMETRIK**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Farmasi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

**Fitri Valentina Santoso  
NIM 142210101003**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

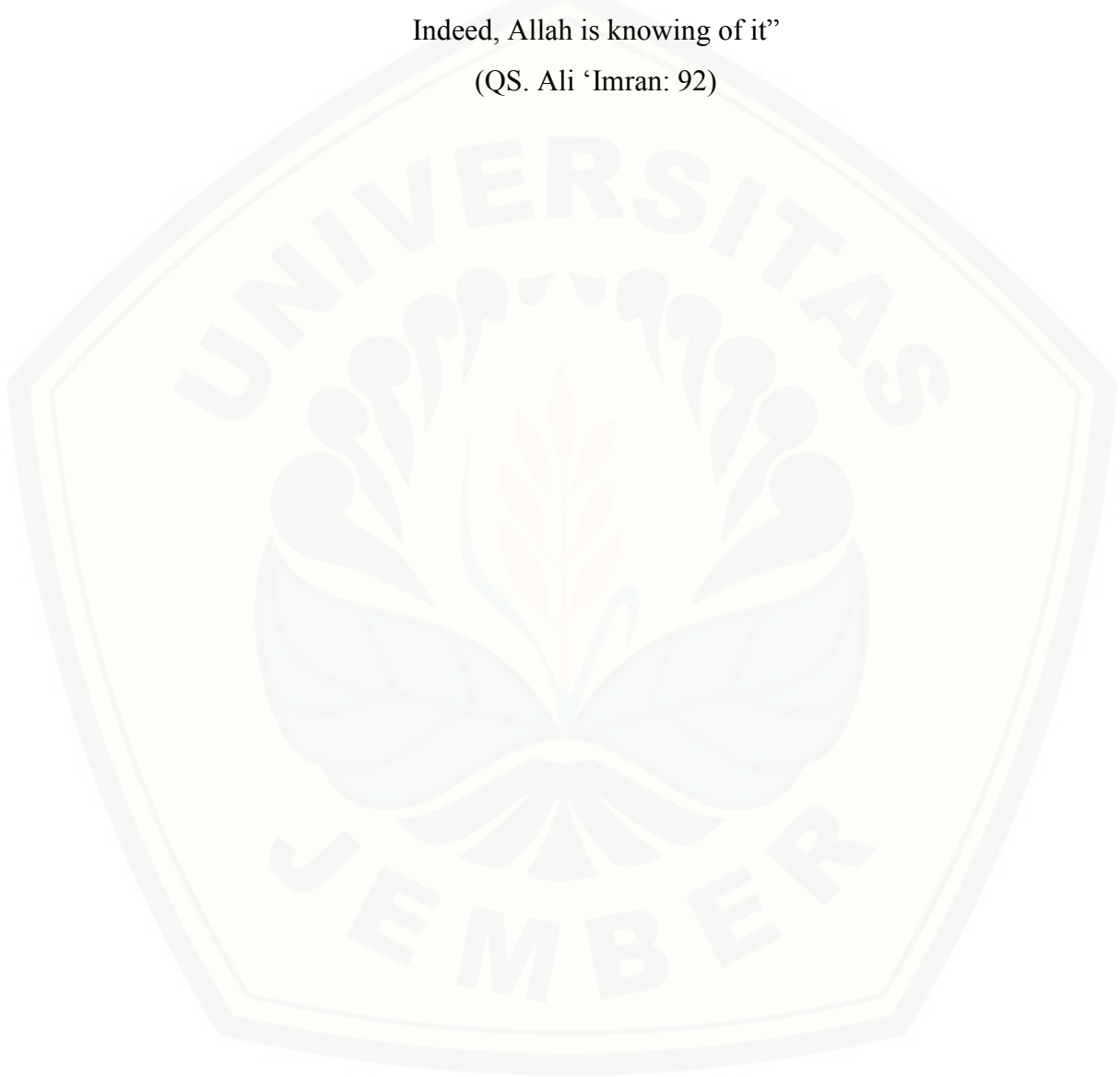
1. Ayahanda Ir. Ribut Santoso dan Ibunda Suwarsih tercinta, yang selalu selalu memberikan dukungan dan doa serta semangat yang mengalir tiada henti kepada penulis.
2. Adik Dewi Reformasi Santoso yang selalu menjadi penyemangat penulis.
3. Bapak dan Ibu Guru yang telah membimbing penulis dan memberikan ilmunya sedari penulis mengenyam bangku TK Aisyiyah Bustanul Athfal Poncowati, SD Negeri 1 Poncowati, SMP Negeri1 Terbanggi Besar, dan SMA Negeri 1 Terbanggi Besar.
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTTO**

“Never will you attain the good (reward) until you spend  
(in the way of Allah) from that which you love. And whatever you spend.

Indeed, Allah is knowing of it”

(QS. Ali ‘Imran: 92)



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Fitri Valentina Santoso

NIM : 142210101003

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Penentuan Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Daun Tanaman Melalui Inhibisi  $\alpha$ -Amilase Menggunakan Spektrofotometri NIR dan Kemometrik” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,

Yang menyatakan,

Fitri Valentina Santoso

NIM 142210101003

**SKRIPSI**

**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIDIABETES EKSTRAK DAUN  
TANAMAN MELALUI METODE INHIBISI  $\alpha$ -AMILASE  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI  
NIR DAN KEMOMETRIK**

Oleh :

Fitri Valentina Santoso

NIM 142210101003

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm., Apt.

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Penentuan Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Daun Tanaman Melalui Inhibisi  $\alpha$ -Amilase Menggunakan Spektrofotometri NIR dan Kemometrik” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 12 Juli 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,



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

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

NIP. 198204062006042001

NIP. 197604142002122001

Tim Penguji

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,



Prof. Drs. Bambang K., M.Sc., Ph.D.

Diana Holidan, SF., M.Farm., Apt.

NIP. 196902011994031002

NIP. 197812212005012002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas  
Jember



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

NIP. 197604142002122001



## RINGKASAN

**Penentuan Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Daun Tanaman Melalui Inhibisi  $\alpha$ -Amilase Menggunakan Spektrofotometri NIR dan Kemometrik;** Fitri Valentina Santoso, 142210101003; 2018; 89 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

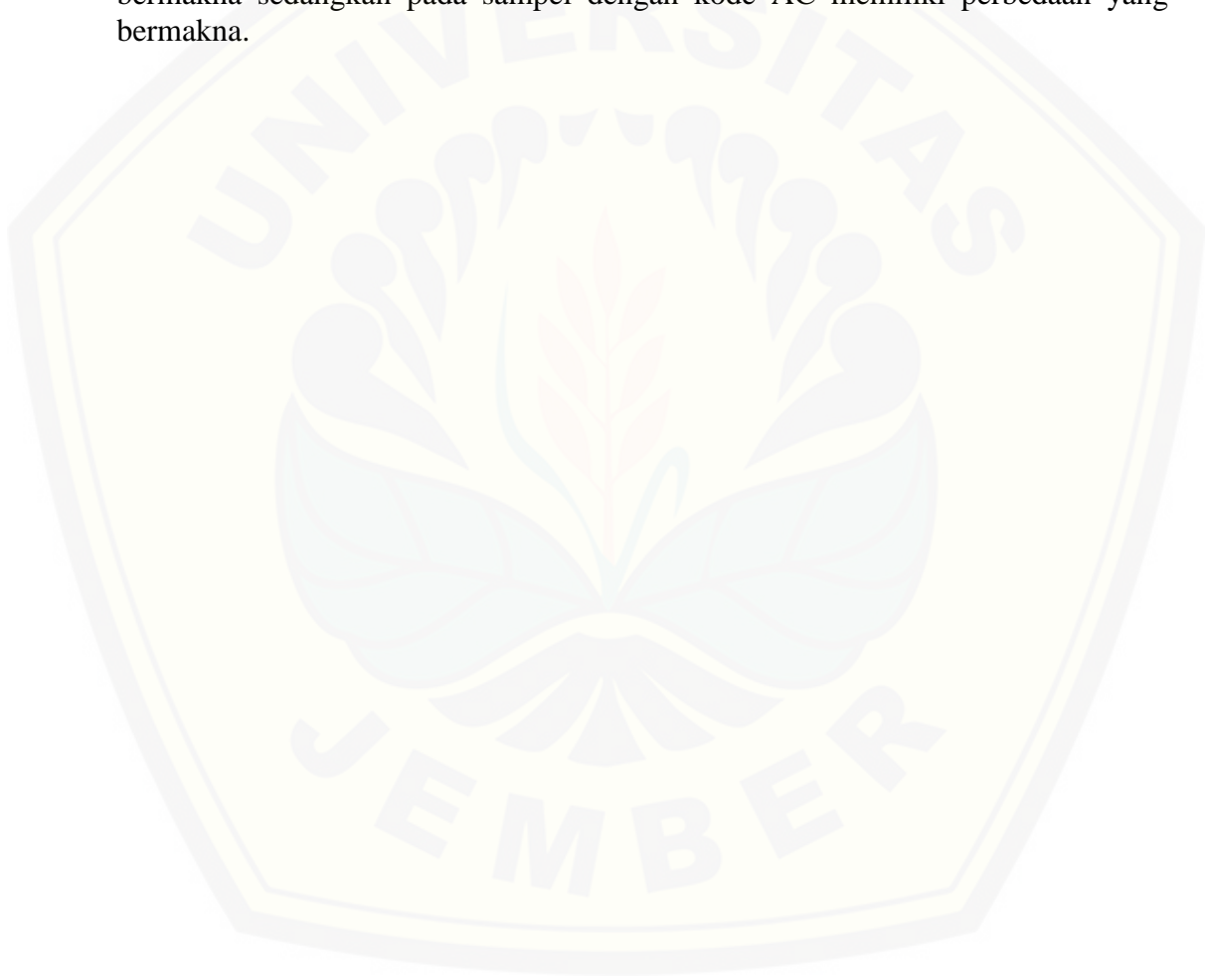
Diabetes melitus adalah gangguan metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia). Diabetes melitus tipe 2 merupakan tipe diabetes yang lebih umum dimana jumlah penderitanya lebih banyak dibandingkan dengan diabetes melitus tipe 1 dan gestasional. Jumlah penderita diabetes melitus tipe 2 mencapai 90% dari total kasus keseluruhan diabetes melitus, biasanya ditandai dengan resistensi insulin dan defisiensi insulin relatif. Prevalensi diabetes melitus yang terus mengalami peningkatan sebanding dengan peningkatan terapi farmakologi dengan menggunakan obat hipoglikemik oral maupun insulin. Obat hipoglikemik oral dapat memberikan efek samping yang tidak diinginkan, sehingga banyak penelitian diarahkan untuk terapi menggunakan bahan alami agar terhindar dari efek samping tersebut.

Pada penelitian ini dilakukan penentuan aktivitas antidiabetes menggunakan instrumen spektrofotometri *near infrared* karena metode analisis yang umum digunakan untuk menentukan aktivitas antidiabetes melalui inhibisi  $\alpha$ -amilase membutuhkan tahapan analisis yang panjang dan waktu analisis yang cukup lama. Keuntungan menggunakan metode spektrofotometri *near infrared* diantaranya yaitu efektif, mudah, cepat, biaya penelitian ekonomis, dan bersifat non-destruktif. Penentuan aktivitas antidiabetes melalui inhibisi  $\alpha$ -amilase dengan menggunakan metode spektrofotometri *near infrared* memerlukan suatu analisis data multivariat (kemometrik) agar dapat mengekstrak informasi yang dibutuhkan dari spektrum inframerah dan menggunakan informasi tersebut untuk diaplikasikan secara kuantitatif dengan menggunakan *software The Unscrambler X 10.2*. Beberapa teknik yang digunakan untuk pembentukan model kalibrasi (analisis kuantitatif) dalam penelitian ini yaitu *Partial Least Square* (PLS). Untuk menguji validitas model regresi dari model kalibrasi yang terpilih maka dilakukan validasi dengan metode validasi silang *2-Fold Cross Validation* dan *Leave One Out Cross Validation* (LOOCV).

Metode pembandingan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode spektrofotometri UV-Vis dengan pembandingan jamu tersaintifikasi dari B2P2TOOT. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, model PLS dengan spektroskopi *near infrared* memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan PCR dan SVMR dengan nilai  $R^2$  kalibrasi 0,9802943;  $R^2$  validasi 0,9786547; RMSE kalibrasi 0,6606693; dan RMSE validasi 0,6925296. Validasi model yang dilakukan menghasilkan nilai yang baik dengan  $R^2$  *2-Fold Cross Validation* 0,9910494; sedangkan untuk nilai  $R^2$  kalibrasi dan  $R^2$  validasi *Leave One Out Cross Validation* (LOOCV) masing-masing sebesar 0,9809417 dan 0,9794762.



Model kalibrasi PLS yang terbentuk dan tervalidasi kemudian diaplikasikan pada sampel nyata.  $IC_{50}$  sampel nyata yang didapat dari spektrofotometri NIR untuk sampel dengan kode AA yaitu sebesar  $1092,879 \pm 2,862 \mu\text{g/mL}$ ; sampel dengan kode AB yaitu sebesar  $1261,623 \pm 0,710 \mu\text{g/mL}$ ; dan sampel dengan kode AC yaitu sebesar  $1252,662 \pm 0,314 \mu\text{g/mL}$ . Hasil yang didapatkan tersebut kemudian di uji dengan analisis uji statistik dengan Uji T Dua Sampel Berpasangan dengan metode pembandingan spektrofotometri UV-Vis. Nilai signifikansi yang diperoleh untuk sampel nyata dengan kode AA, AB dan AC berturut-turut yaitu 0,020; 0,185; dan 0,006 dengan tingkat kepercayaan 99% sehingga, dapat disimpulkan bahwa kadar  $IC_{50}$  yang didapat dari kedua metode tersebut pada sampel dengan kode AA dan AB tidak memiliki perbedaan yang bermakna sedangkan pada sampel dengan kode AC memiliki perbedaan yang bermakna.



## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penentuan Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Daun Tanaman Melalui Inhibisi  $\alpha$ -Amilase Menggunakan Spektrofotometri NIR dan Kemometrik”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

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

1. Ibu Lesty Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Nia Kristiningrum S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Lesty Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta dengan sabar membimbing dan membantu penulis untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
3. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D selaku Dosen Penguji I dan Ibu Diana Holidah, SF., M.Farm., Apt selaku Dosen Penguji II yang dengan sabar memberikan saran dalam penulisan skripsi ini;
4. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama saya menjadi mahasiswa;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan, juga staf dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama saya menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember.
6. Ibu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi yang selalu sabar dalam membantu dan memberikan saran selama penulis melakukan penelitian;

7. Orang tua tercinta Bapak Ir. Ribut Santoso dan Ibu Suwarsih yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tak terhingga untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
8. PBS yang selalu menemani dan siap memberikan bantuan berupa tenaga, pikiran dan juga pundak saat hasil yang didapat kurang memuaskan;
9. Partner biawak (Syafira Nur Hayati, Tiara Ismihayati K, Novita Tansha P, Laili Wafa NK, dan Monica Cinuradha) yang selalu setia menemani dan memberikan semangat;
10. Agus, Tsulsi, Mili, Erlinda, Leny, Ainun, Erika, Mila, Ari, Yanti, Liya, dan Ain atas segala masukan, *sharing* pengalaman, cerita dan bantuan yang telah diberikan;
11. Semua rekan seperjuangan penelitian bagian Kimia Farmasi yang telah banyak membantu;
12. Teman-teman angkatan 2014 Fakultas Farmasi Universitas Jember (Pharmagen) yang tidak dapat disebutkan satu per satu;

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 26 Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING .....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Daun .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Ekstrak.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Diabetes Melitus .....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Klasifikasi Diabetes Melitus (DM) .....	6
2.3.2 Gejala dan Diagnosis Diabetes Melitus .....	8
<b>2.4 Enzim.....</b>	<b>9</b>
2.4.1 Enzim $\alpha$ -Amilase.....	9
2.4.2 Inhibitor $\alpha$ -Amilase .....	11
<b>2.5 Jamu .....</b>	<b>12</b>

<b>2.6 Metode Uji Aktivitas Penghambatan Enzim <math>\alpha</math>-Amilase.....</b>	<b>13</b>
<b>2.7 Spektrofotometri UV-Vis .....</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Near Infrared Spectroscopy (NIR) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.9 Kemometrik dan Multivariat.....</b>	<b>18</b>
2.9.1 <i>Principal Component Analysis (PCA)</i> .....	19
2.9.2 <i>Soft Independent Modelling of Class Analogies (SIMCA)</i> .....	19
2.9.3 <i>Partial Least Square (PLS)</i> .....	20
2.9.4 <i>Principal Component Regression (PCR)</i> .....	20
2.9.5 <i>Support Vector Machines Regression (SVMR)</i> .....	21
2.9.6 <i>Linear Discriminant Analysis (LDA)</i> .....	21
<b>2.10 Validasi Silang .....</b>	<b>21</b>
2.10.1 <i>Leave-one-out Cross Validation</i> .....	22
2.10.2 <i>K-fold Cross Validation</i> .....	22
2.10.3 <i>2-fold Cross Validation</i> .....	23
<b>BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Alat dan Bahan Penelitian.....</b>	<b>24</b>
3.3.1 Alat Penelitian.....	24
3.3.2 Bahan Penelitian.....	24
<b>3.4 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>25</b>
3.4.1 Rancangan Percobaan .....	25
3.4.2 Alur Penelitian .....	26
<b>3.5 Prosedur Penelitian.....</b>	<b>27</b>
3.5.1 Pengumpulan Sampel.....	27
3.5.2 Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	29
3.5.3 Penentuan Data Spektra NIR .....	31
3.5.4 Pembentukan Model Kalibrasi.....	32
3.5.5 Validasi Model Terpilih .....	33
3.5.6 Aplikasi pada Sampel Ekstrak Nyata.....	33
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Pembuatan Ekstrak .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Pengukuran Aktivitas Antidiabetes Melalui Inhibisi <math>\alpha</math>-Amilase.....</b>	<b>35</b>
4.2.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum .....	35
4.2.2 Pengukuran Aktivitas Antidiabetes Melalui Inhibisi $\alpha$ -Amilase .....	35

<b>4.3 Pembentukan Model Kalibrasi .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Validasi Metode Kalibrasi Terpilih.....</b>	<b>42</b>
4.4.1 Validasi Model dengan <i>2-Fold Cross Validation</i> .....	42
4.4.2 Validasi Model dengan <i>Leave One Out Cross Validation</i> .....	43
<b>4.5 Penerapan Model Terpilih terhadap Sampel .....</b>	<b>44</b>
<b>BAB 5 PENUTUP.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>46</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>47</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>53</b>



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 3.1 Identitas kode ekstrak tanaman <i>training set</i> .....	28
Tabel 3.2 Identitas kode ekstrak tanaman <i>test set</i> .....	28
Tabel 3.3 Identitas kode ekstrak tanaman sampel nyata.....	28
Tabel 3.4 Daftar larutan uji.....	30
Tabel 4.1 Hasil penentuan nilai $IC_{50}$ sampel <i>training set</i> .....	37
Tabel 4.2 Hasil penentuan nilai $IC_{50}$ <i>test set</i> .....	37
Tabel 4.3 Hasil penentuan nilai $IC_{50}$ sampel nyata.....	37
Tabel 4.4 Perbandingan parameter model kalibrasi.....	41
Tabel 4.5 Hasil perhitungan $IC_{50}$ ekstrak sampel nyata dengan spektroskopi NIR dan spektrofotometri UV-Vis.....	45

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur $\alpha$ -amilase .....	11
Gambar 2.2 Mekanisme reaksi inhibisi akarbose .....	12
Gambar 2.3 Mekanisme $SN_2$ .....	15
Gambar 2.4 Hidrolisis pati oleh enzim $\alpha$ -amilase.....	15
Gambar 2.5 Tahapan reaksi reduksi DNS.....	16
Gambar 2.6 Instrumentasi NIR .....	18
Gambar 3.1 Skema alur penelitian .....	26
Gambar 4.1 Spektra optimasi panjang gelombang .....	35
Gambar 4.2 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model PCR.....	39
Gambar 4.3 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model PLS .....	40
Gambar 4.4 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model SVMR.....	41
Gambar 4.5 Grafik hasil kalibrasi sampel pada validasi <i>2-fold cross validation</i> ..	43
Gambar 4.6 Grafik hasil kalibrasi sampel pada validasi LOOCV .....	44

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 4.1 Alat dan Bahan yang Digunakan .....	53
Lampiran 4.2 Perhitungan % Rendemen Ekstrak .....	54
Lampiran 4.3 Perhitungan Pembuatan Larutan Enzim $\alpha$ -Amilase 0,5 U/mL.....	55
Lampiran 4.4 Perhitungan Pembuatan Larutan Substrat 0,5% .....	55
Lampiran 4.5 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak .....	55
Lampiran 4.6 Gambar Campuran Larutan Uji Aktivitas Inhibisi $\alpha$ -Amilase .....	56
Lampiran 4.7 Perhitungan Nilai $IC_{50}$ dari Spektrofotometri UV-Vis Pada Sampel dengan Kode C .....	57
Lampiran 4.8 Nilai $IC_{50}$ Hasil Pengukuran dengan Spektrofotometri UV-Vis ....	59
Lampiran 4.9 Grafik Hasil Pemetaan Sampel pada <i>Training Set</i> .....	61
Lampiran 4.10 Grafik Hasil Validasi dengan <i>2-Fold Cross Validation</i> dan LOOCV .....	63
Lampiran 4.11 Data Hasil Prediksi Sampel pada Model Kalibrasi .....	65
Lampiran 4.12 Contoh Perhitungan $IC_{50}$ Hasil Prediksi NIR Pada Sampel Nyata dengan Kode AA.....	69
Lampiran 4.13 Hasil Analisis dengan SPSS .....	70

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan salah satu gangguan metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia). Hal ini disebabkan karena keadaan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang terjadi akibat kelainan sekresi insulin, kerja insulin (sensitivitas) ataupun keduanya, karena faktor genetik serta faktor lingkungan dan menyebabkan komplikasi kronis diantaranya yaitu disfungsi hingga kegagalan pada berbagai organ (Wells dkk., 2009).

Diabetes melitus merupakan salah satu keadaan darurat kesehatan global terbesar pada abad ke-21 (WHO, 2016). Menurut Funke dan Melzig (2006), jumlah penderita diabetes melitus akan terus meningkat dari 173 menjadi 366 juta yaitu dua kali lipat lebih banyak pada tahun 2030. Menurut data WHO pada tahun 2000 Indonesia telah menempati urutan terbesar ke-4 di dunia yang masyarakatnya menderita penyakit diabetes melitus setelah India, China, dan USA. Prevalensi diabetes melitus yang terus mengalami peningkatan tersebut membutuhkan penanganan yang cepat dan efektif. Secara umum terapi diabetes melitus dapat dibagi menjadi 2 yaitu terapi farmakologi dan non farmakologi. Terapi secara farmakologi dapat dilakukan dengan memberikan insulin dan obat hipoglikemik oral yang bekerja dengan menstimulasi sekresi insulin, meningkatkan sensitivitas insulin, dan menghambat pemecahan dari oligo- dan disakarida (karbohidrat), sedangkan terapi secara non farmakologi dapat dilakukan dengan menerapkan gaya hidup sehat dan berolahraga (Wells dkk., 2009).

Salah satu terapi farmakologi yang digunakan secara luas untuk mengobati pasien pada diabetes melitus tipe 2 adalah akarbose (Aberg dkk., 2009). Akarbose merupakan obat sintesis yang telah dilaporkan dapat menimbulkan berbagai efek samping seperti rasa mual, perut kembung, atau diare (Feng dkk., 2011). Saat ini, banyak penelitian diarahkan untuk terapi menggunakan bahan alami agar

terhindar dari efek samping tersebut karena obat tradisional yang berasal dari bahan alami memiliki efek samping yang jauh lebih rendah tingkat bahayanya apabila dibandingkan dengan obat-obatan sintetis (Muhlisah, 2001).

Indonesia merupakan negara tropis dengan potensi tanaman yang secara turun temurun digunakan sebagai obat tradisional, salah satu contohnya adalah jamu. Jamu merupakan obat tradisional yang telah menjadi budaya masyarakat Indonesia sejak berabad lalu sebagai bagian dari upaya menjaga kesehatan tubuh (Aditama, 2015). Namun, masih banyak tanaman di Indonesia yang belum diteliti untuk mengetahui potensinya sebagai sumber pengobatan. Berdasarkan hal tersebut, maka usaha untuk mencari informasi kandungan senyawa kimia melalui penelitian ilmiah menjadi sangat penting.

Kandungan senyawa kimia yang ada pada tanaman dapat ditemukan secara tersebar ataupun terpusat pada organ tanaman seperti bunga, daun, biji, buah, rimpang, kulit batang, atau akar. Pada beberapa organ tanaman, terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis yaitu pada bagian daun, telah banyak ditemukan senyawa flavonoid yang merupakan salah satu agen antidiabetes alami (Kumar dan Pandey, 2013). Berbagai proses pengerjaan dilakukan untuk mendapatkan kandungan kimia dari suatu tanaman, diantaranya yaitu ekstraksi, skrining dan identifikasi komponen zat kimia (Harborne, 1982). Pembuatan sediaan ekstrak bertujuan agar zat berkhasiat yang terdapat pada simplisia didapat dalam bentuk sediaan yang memiliki kadar tinggi (Anief, 1987). Kelebihan dari penggunaan ekstrak dibandingkan dengan simplisia adalah lebih sederhana dan bobot pemakaian yang dibutuhkan lebih sedikit dibandingkan dengan bobot tanaman aslinya.

Ada beberapa metode yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya aktivitas antidiabetes dengan enzim  $\alpha$ -amilase, diantaranya yaitu dengan mengukur sisa pati yang tidak terhidrolisis oleh enzim  $\alpha$ -amilase atau jumlah gula pereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim  $\alpha$ -amilase terhadap pati dengan menggunakan reagen. Metode yang terpilih yaitu dengan mengukur gula pereduksi yang terbentuk kemudian melihat nilai *Inhibition Concentration 50%* ( $IC_{50}$ ) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan reagen 3,5-



*Dinitrosalysilic acid* (DNS) (Gupta dkk., 2014; Khairunnisa, 2017; dan Subramanian dkk., 2008) dan *near infrared* (NIR) (Belščak-Cvitanović dkk., 2018).

Spektrofotometri NIR merupakan salah satu metode pilihan yang efektif karena mudah, cepat, biaya penelitian ekonomis, dan bersifat non-destruktif (Roggo dkk., 2007). Tetapi, spektrum yang dihasilkan oleh NIR tidak dapat diekstrak dan digali informasinya secara langsung sehingga, untuk mengekstrak informasi spektrum yang diperlukan baik untuk pengaplikasian kualitatif maupun kuantitatif diperlukan metode analisis data multivariat. Metode statistik multivariat sering disebut dengan metode kemometrik. Kemometrik merupakan disiplin bidang ilmu yang menggunakan metode matematik dan statistik untuk memilih prosedur penelitian dan pengolahan analisis data yang optimal (Johnson dan Wichern, 2007). Pada penelitian kali ini untuk membentuk model kalibrasi digunakan *Partial Least Square* (PLS), *Principal Component Regression* (PCR), dan *Support Vector Machines Regression* (SMVR).

Berdasarkan uraian tersebut, maka dalam penelitian ini akan dilakukan penentuan aktivitas antidiabetes pada ekstrak daun tanaman menggunakan metode spektrofotometri NIR dan kemometrik. Hasil nilai kadar yang didapatkan akan dibandingkan dengan hasil nilai kadar pada analisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang diperoleh adalah:

1. Apakah metode spektrofotometri NIR dan kemometrik dapat menentukan aktivitas antidiabetes ( $IC_{50}$ ) pada ekstrak daun tanaman?
2. Apakah aktivitas antidiabetes ( $IC_{50}$ ) sampel nyata yang ditetapkan dengan metode spektrofotometri NIR-kemometrik tidak berbeda signifikan dengan metode spektrofotometri UV-Vis dengan reagen DNS?



### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas antidiabetes ( $IC_{50}$ ) pada ekstrak daun tanaman dengan metode spektrofotometri NIR dan kemometrik.
2. Mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara aktivitas antidiabetes ( $IC_{50}$ ) yang ditetapkan dengan metode spektrofotometri NIR-kemometrik dibandingkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis dengan reagen DNS.

### 1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan pengetahuan tentang metode analisis aktivitas antidiabetes secara *in vitro* yang sederhana, cepat, dan mudah.
2. Bagi mahasiswa peneliti dapat mengasah kemampuan, kreativitas dan keahlian di bidang kimia analisis.
3. Model yang diperoleh dapat digunakan untuk efisiensi *screening* obat baru.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Daun

Daun adalah istilah yang digunakan untuk organ tumbuhan yang memiliki bentuk seperti lembaran pipih, tumbuh dari batang, dan umumnya berwarna hijau karena mengandung klorofil (Fahn, 1991). Secara umum, organ tumbuhan terdiri dari batang, akar, daun, dan bunga. Daun merupakan organ tanaman yang berfungsi dalam proses fotosintesis, transpirasi, dan transportasi. Daun tersusun atas beberapa macam jaringan seperti epidermis, parenkim dan ikatan pembuluh (xilem dan floem) (Latifa, 2015).

Secara morfologi dan anatomi, daun merupakan organ tumbuhan yang paling bervariasi menurut bentuk dan ukuran. Fungsi utama daun ialah menggunakan cahaya sebagai sumber energi untuk menjalankan sintesis senyawa organik. Proses fotosintesis dan transpirasi sangat berkaitan dengan struktur eksternal dan internal daun (Fahn, 1991). Salah satu proses metabolisme yang utama yaitu proses fotosintesis yang berfungsi dalam menghasilkan bahan makanan yang sangat dibutuhkan oleh tumbuhan untuk kelangsungan hidupnya. Proses ini terjadi pada bagian helaian daun yang tipis. Pada kebanyakan tanaman dikotil, helaian daun menempel pada batang dengan tangkai daun (petiola). Sistem pembuluh pada batang meluas sampai ke tangkai daun, dan tulang daun ke dalam helaian itu sendiri (Cutter, 1989).

### 2.2 Ekstrak

Menurut Farmakope Indonesia Edisi IV (1995), ekstrak merupakan sediaan kental yang didapat dengan mengekstrak senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi persyaratan yang ditentukan.

Menurut Voight (1995), berdasarkan sifatnya ekstrak dikelompokkan menjadi 4 yaitu:

- a. Ekstrak kering: memiliki konsistensi yang kering dan mudah digosokkan. Dengan penguapan cairan pengekstraksi dan pengeringan maka terbentuk suatu produk yang memiliki kandungan kelembaban <5%.
- b. Ekstrak cair: merupakan ekstrak yang memiliki perbandingan satu bagian simplisia sesuai dengan dua bagian ekstrak cair.
- c. Ekstrak encer: saat ini ekstrak jenis ini sudah tidak digunakan lagi. Memiliki konsistensi madu dan dapat dituang.
- d. Ekstrak kental: memiliki kandungan air hingga 30%. Ketika dingin berada dalam keadaan liat dan tidak bisa dituang. Ekstrak jenis ini sudah tidak sesuai lagi untuk digunakan karena tidak stabil secara kimiawi maupun biologi akibat kandungan airnya yang tinggi.

### 2.3 Diabetes Melitus

Diabetes melitus merupakan salah satu penyakit metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah atau hiperglikemia yang terjadi akibat gangguan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin, maupun akibat dari keduanya (ADA, 2010). Seiring dengan berkembangnya penyakit dapat menyebabkan kerusakan jaringan atau pembuluh darah yang kemudian menyebabkan komplikasi parah seperti retinopati, nefropati, neuropati, penyakit kardiovaskular, dan ulserasi kaki (Sweetman, 2009).

Insulin adalah hormon yang dihasilkan oleh kelenjar pankreas dan berfungsi untuk mengatur keseimbangan kadar glukosa dalam darah. Bila terjadi gangguan pada kerja insulin, keseimbangan tersebut akan terganggu sehingga kadar glukosa darah menjadi naik (WHO, 2016).

#### 2.3.1 Klasifikasi Diabetes Melitus (DM)

Klasifikasi diabetes melitus menurut IDF (2015), terbagi menjadi 3 yaitu:

1. Diabetes melitus gestasional (GDM)

Diabetes gestasional (GDM) merupakan diabetes yang dapat terjadi pada ibu hamil dan ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah

atau hiperglikemia. Wanita yang terdiagnosis diabetes gestasional memiliki peningkatan risiko komplikasi selama kehamilan dan saat melahirkan, serta memiliki risiko diabetes tipe 2 yang lebih tinggi pasca melahirkan (IDF, 2015).

Diabetes gestasional cenderung terjadi sejak usia kehamilan 24 minggu (IDF, 2015). Faktor resiko terjadinya diabetes gestasional diantaranya yaitu usia (semakin tua maka semakin tinggi resiko mengalami GDM), obesitas, kenaikan berat badan yang berlebih selama kehamilan, riwayat keluarga, riwayat GDM pada kehamilan sebelumnya, riwayat melahirkan bayi dengan kelainan kongenital dan kelebihan glukosa dalam urin selama kehamilan (WHO, 2016).

2. Diabetes tipe I (*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus* atau IDDM)

Diabetes Tipe I (IDDM) terjadi pada 5-10% total kasus diabetes (Wells dkk., 2009). Terdapat pada kondisi dimana insulin yang dihasilkan oleh pankreas hanya sedikit atau sama sekali tidak dapat menghasilkan insulin sehingga tubuh mengalami kekurangan insulin. Glukosa di dalam darah menumpuk karena tidak dapat diangkut ke dalam sel. Diabetes tipe ini tergantung pada insulin, oleh karena itu penderita memerlukan suntikan insulin (Sweetman, 2009).

Pada diabetes tipe I (IDDM) terjadi kerusakan pada sel-sel  $\beta$ -pankreas yang disebabkan karena adanya gangguan autoimun (*autoimmune disorder*). Karena itu, diabetes jenis ini kebanyakan ditemukan pada anak-anak atau pada usia muda (Wells dkk., 2009). Tidak diketahui secara pasti mengenai faktor yang memicu respon autoimun, namun proses reaksi dimediasi oleh makrofag dan sel limfosit T dengan autoantibodi dan berbagai antigen sel  $\beta$ -pankreas (Wells dkk., 2009).

3. Diabetes tipe II (*Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus* atau NIDDM)

Diabetes tipe II terjadi pada hampir 90% kasus diabetes (Wells dkk., 2009). Diabetes tipe ini biasanya terjadi pada usia lanjut, karena berhubungan dengan degenerasi atau kerusakan organ dan faktor gaya hidup (Sweetman, 2009). Namun, saat ini diabetes tipe II mulai banyak terjadi

pada anak-anak dan remaja (IDF, 2015). Pada diabetes tipe ini, tubuh dapat memproduksi insulin tetapi insulin yang dihasilkan mengalami resistensi sehingga insulin menjadi tidak efektif. Seiring berjalannya waktu, kadar insulin menjadi tidak dapat mencukupi kebutuhan. Baik resistensi insulin maupun kadar insulin yang tidak mencukupi menyebabkan meningkatnya kadar glukosa dalam darah (IDF, 2015).

Banyak penderita diabetes tipe II yang tidak menyadari kondisi mereka dalam waktu yang cukup lama karena gejala yang timbul tidak disadari dan membutuhkan waktu hingga bertahun-tahun lebih lama untuk dikenali dibandingkan dengan diabetes tipe I. Akibatnya banyak penderita yang sudah mengalami komplikasi ketika didiagnosis diabetes tipe II (IDF, 2015).

Faktor resiko terjadinya diabetes tipe II diantaranya yaitu etnis, riwayat keluarga, riwayat diabetes gestasional, obesitas, diet tidak sehat, kurangnya melakukan aktivitas fisik dan merokok (WHO, 2016).

### 2.3.2 Gejala dan Diagnosis Diabetes Melitus

Gejala bagi penderita diabetes melitus adalah adanya keluhan banyak minum (polidipsi), banyak makan (polifagia), banyak buang air kecil (poliuri), badan lemas serta penurunan berat badan yang tidak jelas penyebabnya (ADA, 2010). Diagnosis diabetes melitus dilakukan atas dasar pemeriksaan kadar glukosa dalam darah. Pemeriksaan yang dianjurkan yaitu pemeriksaan glukosa secara enzimatis dengan bahan plasma darah vena. Pemantauan hasil pengobatan dapat dilakukan dengan menggunakan pemeriksaan glukosa darah kapiler dengan glukometer (ADA, 2017). Diagnosis diabetes melitus menurut ADA (2017) jika hasil pemeriksaan:

1. Kadar gula darah sewaktu  $\geq 200$  mg/dl (11,0 mmol/L)
2. Kadar gula puasa  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/L)
3. Kadar gula darah 2 jam *post prandial*  $\geq 200$  mg/dl (11,0 mmol/L)



Tes toleransi glukosa oral dilakukan dengan standar WHO, menggunakan beban glukosa yang setara dengan 75 gram glukosa anhidrus yang dilarutkan ke dalam air. Apabila hasil pemeriksaan tidak memenuhi kriteria normal atau DM, maka dapat digolongkan ke dalam kelompok Toleransi Glukosa Terganggu (TGT) atau Glukosa Darah Puasa Terganggu (GDPT) tergantung dari hasil yang diperoleh:

- a. TGT: glukosa darah plasma 2 jam setelah beban antara 140-199 mg/dl (7,8-11,0 mmol/L)
- b. GDPT: glukosa darah puasa antara 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/L)

## 2.4 Enzim

Enzim merupakan senyawa makromolekul yang terbentuk secara alami atau sintetis yang terdiri dari sekelompok protein (Smith, 1997). Dalam suatu reaksi kimia organik, enzim berfungsi sebagai katalis yaitu senyawa yang mempercepat terjadinya reaksi tanpa habis bereaksi dengan cara menurunkan energi aktivasinya. Molekul awal yang disebut substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk. Sebagian besar enzim bekerja secara khas, dimana setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam reaksi kimia atau senyawa. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan struktur kimia pada setiap enzim yang bersifat tetap. Salah satu contohnya yaitu pada enzim  $\alpha$ -amilase yang hanya dapat digunakan pada penghidrolisis pati menjadi molekul gula (Fersht, 1999).

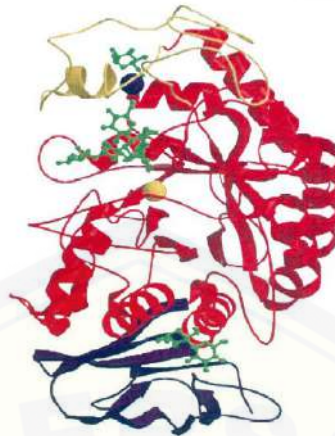
### 2.4.1 Enzim $\alpha$ -Amilase

Enzim  $\alpha$ -amilase merupakan produk utama yang dihasilkan oleh kelenjar pankreas dan *saliva* (de Sales dkk., 2012). Enzim  $\alpha$ -amilase bekerja dengan menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-D-glikosidik menjadi monosakarida dan disakarida. Enzim ini dikategorikan ke dalam endoenzim karena memutuskan ikatan  $\alpha$ -1,4 pada bagian dalam molekul amilosa maupun amilopektin secara acak (Pandey dkk., 2000).



Mekanisme kerja enzim  $\alpha$ -amilase terhadap molekul amilosa terjadi melalui 2 tahap. Tahap pertama yaitu terjadinya degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa secara acak. Tahap selanjutnya merupakan pembentukan glukosa dan maltosa dari amilosa sebagai hasil akhir. Molekul amilopektin akan menghasilkan glukosa, maltosa dan berbagai limit dextrin yaitu oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih residu gula yang semuanya mengandung ikatan  $\alpha$ -1,6. Pengukuran hasil degradasi pati maupun kadar dextrin dapat digunakan untuk menentukan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase (Winarno, 1995).

Enzim  $\alpha$ -amilase tersusun oleh protein yang terdiri dari 3 domain, yaitu domain A, B, dan C yang dapat dilihat pada gambar 2.1. Domain A ditandai dengan warna merah merupakan domain terbesar yang memiliki bentuk seperti super struktur barrel ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Domain B ditandai dengan warna kuning dimana domain B menempel dengan domain A karena adanya ikatan disulfida serta berada di antara domain A dan C. Domain C ditandai dengan warna biru dan memiliki struktur lembaran  $\beta$  yang terhubung dengan domain A karena adanya rantai polipeptida sederhana. Sisi aktif enzim ditandai dengan warna hijau yang merupakan rantai panjang, terletak di bagian akhir gugus karboksil domain A dan B. Pada enzim juga terdapat ion kalsium yang ditandai dengan bola berwarna biru dan ion klorida yang ditandai dengan bola berwarna kuning. Ion kalsium berperan sebagai stabilisator dan *activator allosteric*. Beberapa enzim memiliki lebih dari satu bagian aktif yang dapat berikatan dengan substrat supaya enzim dapat mengikat substrat lain ketika sudah terikat dengan suatu substrat tertentu. Sifat enzim tersebut disebut dengan *allosteric* (de Souza dan e Magalhães, 2010). Enzim  $\alpha$ -amilase bersifat *calcium metalloenzymes* yang tidak dapat berfungsi tanpa adanya ion kalsium (Howard, 2015).



Gambar 2.1 Struktur  $\alpha$ -amilase (de Souza dan e Magalhães, 2010)

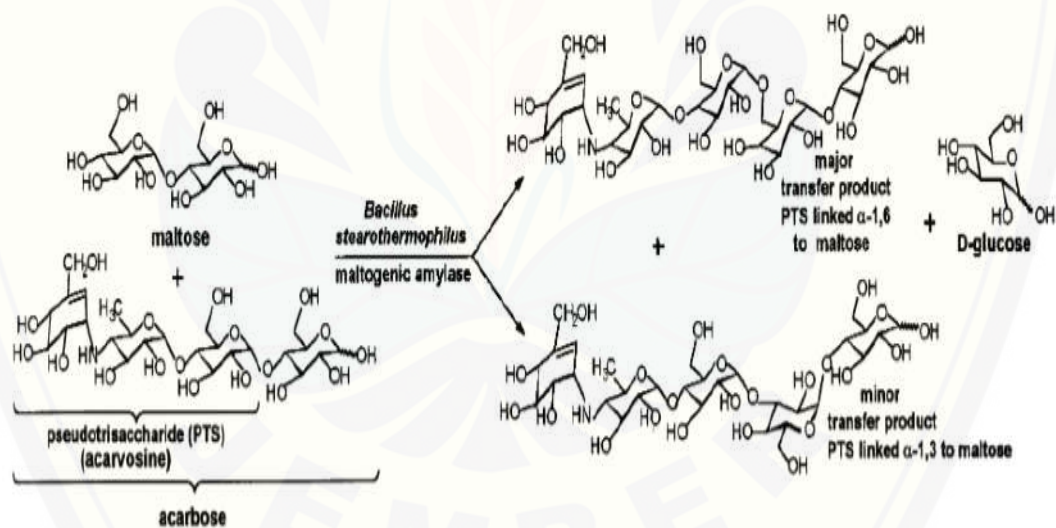
#### 2.4.2 Inhibitor $\alpha$ -Amilase

Inhibitor merupakan molekul yang dapat menghambat, menurunkan, bahkan menghentikan laju reaksi enzimatik saat ditambahkan ke dalam reaksi enzim-substrat. Pada umumnya, inhibitor akan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak lagi berikatan dengan substrat dan tidak memiliki fungsi katalitik. Inhibitor enzim merupakan senyawa kimia yang memiliki berat molekul rendah. Senyawa tersebut dapat mengurangi maupun benar-benar menghambat aktivitas katalitik baik secara reversibel atau permanen (irreversibel) (Sharma, 2012).

Penghambat amilase dapat juga disebut sebagai penghambat pati karena mengandung senyawa yang mencegah agar pati tidak di hidrolisis dan di absorpsi oleh tubuh. Pati termasuk ke dalam karbohidrat kompleks yang merupakan polimer glukosa. Dalam sistem pencernaan manusia terdapat enzim yang bertugas dalam mencerna makanan. Enzim yang terlibat dalam pemecahan pati antara lain  $\alpha$ -amilase dalam air liur (*saliva*) dan pankreas. Enzim  $\alpha$ -amilase mengkatalis pemecahan pati menjadi maltosa dan glukosa yang merupakan satu-satunya bentuk gula yang dapat diserap tubuh. Peristiwa pemecahan pati yang terjadi berlangsung sangat cepat. Beberapa menit setelah menelan pati, akan terjadi hiperglikemia yang mengarah ke hiperinsulinemia. Kedua kondisi hiperglikemia dan hiperinsulinemia tidak dikehendaki terjadi pada penderita diabetes melitus, obesitas atau hiperlipoproteinemia (Kotowaroo dkk., 2006).

Pada penderita diabetes melitus, penghambatan terhadap enzim yang berperan dalam hidrolisis karbohidrat menyebabkan absorpsi glukosa menjadi tertunda sehingga dapat menurunkan keadaan hiperglikemia setelah makan. Enzim  $\alpha$ -amilase dapat dihambat oleh obat-obatan golongan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yaitu akarbose dan miglitol (Dipiro dkk., 2008).

Akarbose merupakan obat yang telah banyak digunakan untuk terapi pada penderita diabetes melitus (de Sales dkk., 2012). Akarbose bekerja sebagai penghambat kompetitif enzim  $\alpha$ -amilase. Dapat dilihat pada Gambar 2.3 reaksi yang terjadi antara *Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase* (BMSA) dengan maltosa dan akarbose membentuk pseudotrisakarida (PTS) yang kemudian berikatan dengan  $\alpha$ -1,6 untuk membentuk produk utama yaitu D-glukosa dan  $\alpha$ -1,3 untuk membentuk produk minor yaitu maltosa yang bukan merupakan gula pereduksi (Park dkk., 1998).



Gambar 2.2 Mekanisme reaksi inhibisi akarbose (Park dkk., 1998)

## 2.5 Jamu

Jamu merupakan obat tradisional yang berasal dari tumbuh-tumbuhan, hewan dan mineral dan atau sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman (Permenkes, 2012). Sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku, obat tradisional dilarang menggunakan bahan kimia hasil

isolasi atau sintesis berkhasiat obat, narkotika atau psikotropika dan hewan atau tumbuhan yang dilindungi (BPOM RI, 2009).

Untuk menjamin tersedianya jamu yang aman, berkhasiat dan bermutu, Pemerintah Indonesia melakukan langkah dan upaya untuk menjamin keamanan jamu. Untuk memperkuat data dan informasi ilmiah tentang jamu (terutama formula jamu). Pemerintah Indonesia melaksanakan Program Saintifikasi Jamu atau *Scientific Based Jamu Development*, yaitu penelitian berbasis pelayanan yang mencakup Pengembangan Tanaman Obat menjadi Jamu Saintifik, meliputi tahap-tahap:

- 1) Studi etnofarmakologi untuk mendapatkan *base-line* data terkait penggunaan tanaman obat secara tradisional.
- 2) Seleksi formula jamu yang potensial untuk terapi alternatif/komplementer.
- 3) Studi klinik untuk mendapatkan bukti terkait manfaat dan keamanan.
- 4) Jamu yang terbukti berkhasiat dan aman dapat digunakan dalam sistem pelayanan kesehatan formal.

Jamu saintifik yang dihasilkan dari program digunakan untuk terapi komplementer di fasilitas pelayanan kesehatan dan dijadikan pilihan masyarakat jika mereka menginginkan untuk mengonsumsi jamu saja sebagai subyek dalam upaya preventif, promotif, kuratif, rehabilitatif dan paliatif (Aditama, 2015).

## 2.6 Metode Uji Aktivitas Penghambatan Enzim $\alpha$ -Amilase

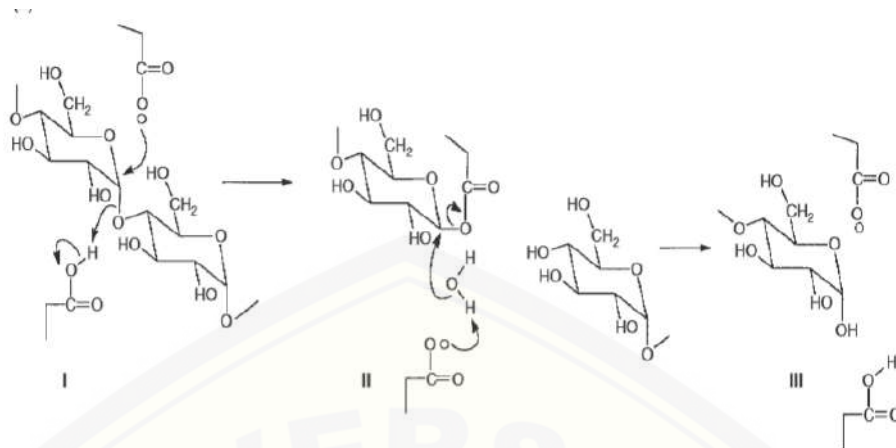
Aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase umumnya dapat diukur dengan dua cara yaitu dengan mengukur sisa pati yang tidak terhidrolisis oleh enzim  $\alpha$ -amilase atau jumlah gula pereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim  $\alpha$ -amilase terhadap pati. Metode yang digunakan Fuwa (1954), Marshall & Lauda (1975) dan Xiao (2007) dalam mengukur aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase adalah dengan mengukur warna kompleks iodine dengan pati. Semakin besar aktivitas penghambatannya, maka jumlah pati yang terhidrolisis semakin sedikit sehingga kompleks iodine dengan pati yang terbentuk semakin banyak dan menghasilkan



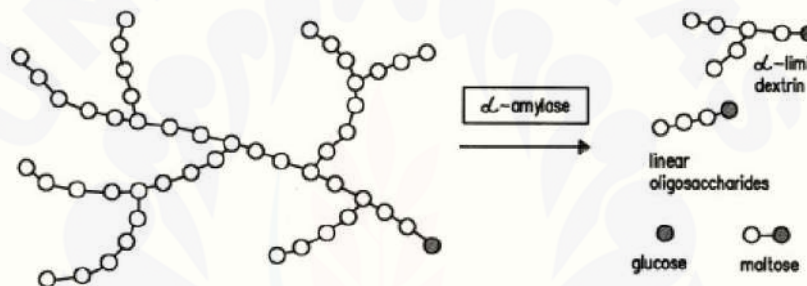
warna biru. Warna kompleks tersebut dapat dikuantifikasi dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer.

Metode lain yang dapat digunakan adalah pengukuran gula pereduksi yang terbentuk akibat hidrolisis pati oleh enzim  $\alpha$ -amilase. Terdapat dua pereaksi yang umum digunakan dalam pengukuran gula pereduksi, yaitu reagen DNS (Khairunnisa, 2017; Fossum dan Whitaker, 1972; Xiao dkk., 2007) dan *alkaline copper* (Fuwa, 1954; Roychan dan Chaudhari, 2001). Kedua pereaksi ini dapat bereaksi dengan gula pereduksi yang terbentuk dan menghasilkan kompleks warna yang juga dapat dikuantifikasi dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer. Adanya penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dapat diamati oleh perbedaan nilai absorbansi yang dihasilkan.

Pengujian inhibitor enzim  $\alpha$ -amilase secara *in vitro* yang umum ialah dengan menggunakan reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) yang didasarkan pada penurunan jumlah gula pereduksi hasil reaksi hidrolisis pati terlarut oleh  $\alpha$ -amilase dengan adanya senyawa inhibitor. Mekanisme hidrolisis pati menggunakan katalis enzim  $\alpha$ -amilase dapat dilihat pada gambar 2.2 dan 2.3 dimana pati terlarut akan dihidrolisis oleh enzim  $\alpha$ -amilase menjadi gula pereduksi oligosakarida yang lebih pendek karena adanya pemutusan ikatan  $\alpha$ -D-(1-4) glikosidik. Hasil penguraian oleh  $\alpha$ -amilase adalah limit dekstrin, dekstrin, turunan silodekstrin, dan oligosakarida. Dekstrin merupakan produk antara pati dan dekstrosa glukosa yang terdiri dari campuran oligosakarida kompleks dan memiliki rumus molekul  $C_6H_{10}O_5$ . Limit dekstrin merupakan campuran oligosakarida dengan rantai lebih pendek (Howard, 2015).



Gambar 2.3 Mekanisme  $S_N2$  pemutusan ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik oleh enzim  $\alpha$ -amilase (Lewandowski dkk., 2015)

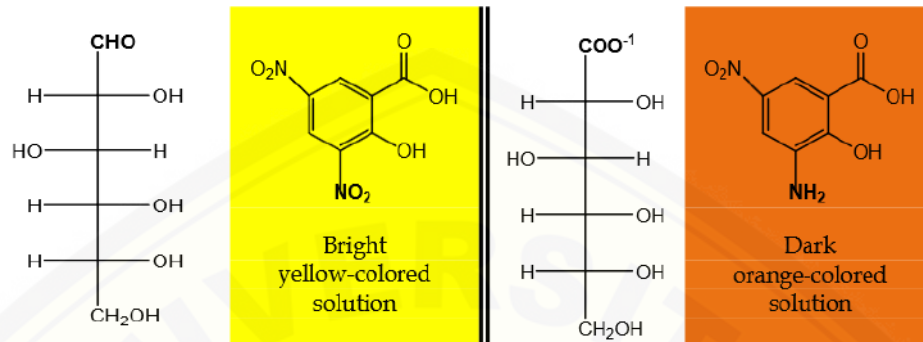
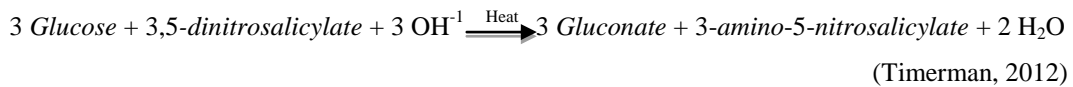


Gambar 2.4 Hidrolisis pati oleh enzim  $\alpha$ -amilase (Horváthová dkk., 2000)  
Catatan : (•) residu  $\alpha$ -D-glukosa pereduksi; (◦) residu  $\alpha$ -D-glukosa nonpereduksi

Penghentian reaksi hidrolisis  $\alpha$ -amilase dapat dilakukan dengan melakukan pemanasan. Pemanasan dapat menyebabkan perubahan konfigurasi dari  $\alpha$ -amilase, sehingga akan menghilangkan aktivitasnya. Setelah reaksi dihentikan, konsentrasi produk dari reaksi hidrolisis kemudian ditentukan menggunakan reagen pewarna asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Reagen tersebut akan direduksi oleh gula reduksi yang ada di dalam larutan, sehingga produk campuran tersebut dapat ditentukan konsentrasinya. Dapat dilihat pada gambar 2.5, senyawa 3,5-dinitrosalisilat yang awalnya berwarna kuning cerah berubah menjadi senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna *orange* gelap yang selanjutnya diukur pada panjang gelombang 540 nm. Reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) oleh salah satu gula reduksi yaitu glukosa (Timerman, 2012).



Reaksinya yaitu:



Gambar 2.5 Tahapan reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) (Timerman, 2012)

## 2.7 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri ultraviolet-visibel (UV-Vis) adalah salah satu teknik analisis fisika-kimia yang mengamati tentang interaksi atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik pada daerah panjang gelombang 190-380 nm (UV) atau 380-780 nm (Vis) (Mulja dan Suharman, 1995).

Prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan atom, ion, atau molekul. Serapan atom menyebabkan peralihan atau transisi elektronik, yaitu peningkatan energi elektron dari keadaan dasar (*ground state*) ke satu atau lebih tingkat energi yang lebih tinggi atau tereksitasi (*excited state*). Transisi terjadi jika energi yang dihasilkan oleh radiasi sama dengan energi yang diperlukan untuk melakukan transisi (Watson, 2003). Pada umumnya prinsip kerja spektrofotometri adalah berdasarkan atas interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan materi. Materi dapat berupa atom, ion atau molekul, sedangkan radiasi elektromagnetik merupakan salah satu jenis energi yang ditransmisikan dalam ruang kecepatan tinggi (Khopkar, 1990). Interaksi radiasi elektromagnetik dengan bahan yaitu bila cahaya jatuh pada senyawa maka sebagian dari cahaya diserap oleh molekul-molekul sesuai struktur dari molekul. Setiap senyawa mempunyai tingkatan tenaga yang spesifik.

Semua molekul dapat menyerap radiasi elektromagnetik di daerah UV-Vis karena memiliki elektron sekutu maupun menyendiri, yang dapat dieksitasikan ke tingkat energi yang lebih tinggi. Sementara panjang gelombang yang menunjukkan terjadinya serapan tergantung pada kuat lemahnya ikatan elektron dalam molekul (Day dan Underwood, 1986).

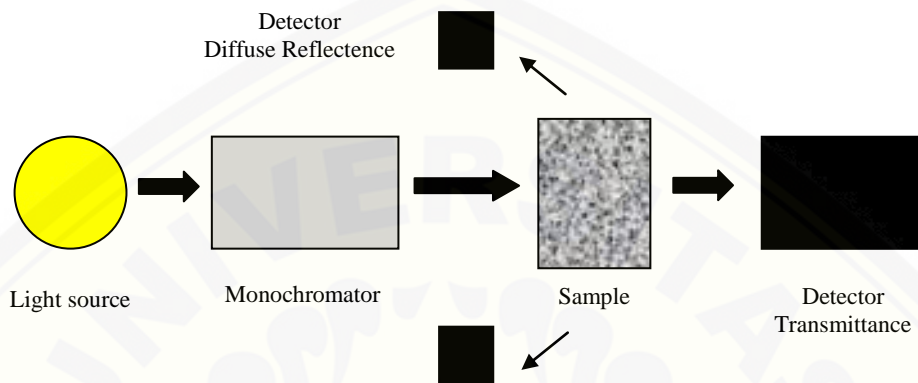
### **2.8 Near Infrared Spectroscopy (NIR)**

Dalam beberapa tahun terakhir, spektroskopi NIR telah digunakan secara luas dalam proses analisis dan dalam industri farmasi untuk pengujian bahan baku, kontrol kualitas produk dan proses monitoring (Aenugu dkk., 2011).

Metode spektroskopi NIR menggunakan gelombang elektromagnetik dengan panjang gelombang 780-2500 nm atau jumlah gelombang per cm  $12.820\text{ cm}^{-1}$  hingga  $4000\text{ cm}^{-1}$  (Schwanninger dkk., 2011). Prinsip teori spektroskopi NIR adalah bekerja berdasarkan adanya vibrasi molekul yang berkorespondensi dengan panjang gelombang yang terdapat pada daerah IR dekat pada spektrum elektromagnetik. Vibrasi inilah yang dimanfaatkan dan diterjemahkan untuk mengetahui karakteristik kandungan kimia dari bahan. Vibrasi ini menyebabkan pita penyerapan naik sesuai dengan kombinasi gugus fungsi kimianya. Gugus fungsi yang paling utama di amati dengan NIR yaitu  $-\text{CH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ , dan  $-\text{NH}$  (Roggo dkk., 2007).

Spektroskopi NIR dikembangkan sebagai salah satu metode yang non-destruktif, dapat melakukan analisis dengan kecepatan tinggi, tidak menyebabkan polusi, penggunaan preparat contoh yang sederhana dan tidak memerlukan bahan kimia (Roggo dkk., 2007). Spektrum infra merah memiliki informasi struktur molekular yang terdiri atas gerak rotasi dan vibrasi. Banyaknya gerakan molekular dari molekul poliatom akan membentuk serangkaian pita serapan yang spesifik untuk masing-masing molekul. Hal ini membuat spektroskopi infra merah menjadi metode analisis kualitatif yang sangat berguna, tetapi sulit dilakukan akibat adanya kemiripan dari setiap respon spektrum. Analisis kuantitatif spektrum infra merah juga sangat sulit karena adanya tumpang tindih spektrum

serapan dari molekul-molekul dalam sampel. Untuk dapat mengekstraksi informasi sari data spektrum infra merah tersebut, diperlukan suatu metode kemometrik berupa analisis multivariat (Stchur dkk., 2002). Instrumentasi NIR dapat dilihat pada gambar 2.5.



Gambar 2.6 Instrumentasi NIR

## 2.9 Kemometrik dan Multivariat

Kemometrik atau analisis data multivariat merupakan bidang ilmu yang menggunakan matematika dan statistik dalam memproses data (Roussel dkk., 2014). Analisis multivariat berasal kata *multi* (banyak) dan *variate* (variabel), sehingga analisis multivariat adalah analisis terhadap banyak variabel yang merupakan pengembangan dari analisis *univariate* dan *bivariate*. Analisis multivariat memiliki lebih dari dua variabel.

Kemometrik dalam analisis NIR terdiri atas tiga aspek, yaitu pra-pengolahan data spektra, membangun model kalibrasi untuk analisis kuantitatif dan transfer model. Salah satu analisis kemometrik yang terpenting adalah membentuk model kalibrasi melalui metode pengenalan pola untuk mengidentifikasi kemiripan dan pola utama data. Selanjutnya, model ini digunakan untuk memprediksi sampel yang tidak diketahui (Roggo dkk., 2007).

Saat ini, kemometrik memungkinkan untuk menganalisis data multivariat. Data multivariat merupakan suatu data yang memiliki banyak variabel dan dari setiap variabel tersebut dapat saling berkorelasi. Keuntungan dari analisis

multivariat adalah informasi yang didapat akan lebih banyak karena analisis multivariat mempertimbangkan banyak variabel secara bersamaan, dibandingkan jika hanya mempertimbangkan masing-masing variabel secara individual. Selain itu, keuntungan lainnya adalah bahwa analisis multivariat dapat mereduksi *noise*, lebih selektif dalam pengukuran, dan dapat mendeteksi adanya sampel palsu (Bro, 2003). Fungsi kemometrik dalam spektroskopi digunakan untuk meningkatkan kualitas data. Kemometrik memungkinkan adanya pengukuran data multivariat, yang mana beberapa variabel (absorbansi dalam banyak bilangan gelombang) diukur untuk suatu sampel yang dituju (Miller dan Miller, 2010).

Metode kemometrik multivariat dapat dibedakan berdasarkan kegunaannya sebagai analisis kualitatif atau kuantitatif. Untuk analisis kualitatif dapat menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA), *Linear Discriminant Analysis* (LDA), dan *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (SIMCA). Kemudian untuk analisis kuantitatif dapat menggunakan *Partial Least Square* (PLS) dan *Support Vector Regression* (SVR) (Roggo dkk., 2007).

#### 2.9.1 *Principal Component Analysis* (PCA)

*Principal Component Analysis* (PCA) adalah suatu teknik yang dapat digunakan untuk mereduksi jumlah variabel dalam suatu matriks data awal sehingga diperoleh variabel baru yang tidak saling berkorelasi tetapi tetap menyimpan sebagian informasi yang terkandung dalam matriks data awal (Miller dan Miller, 2010). Tujuan utama PCA yaitu untuk mengurangi dimensi peubah yang saling berhubungan dan cukup banyak variabelnya sehingga lebih mudah untuk menginterpretasikan data-data tersebut (Johnson dan Wichern, 2007).

#### 2.9.2 *Soft Independent Modelling of Class Analogies* (SIMCA)

Pemodelan SIMCA dibentuk dalam *training set* berdasarkan pembuatan model PCA. Sampel yang tidak diketahui selanjutnya dibandingkan dengan model SIMCA dan penilaian kategori berdasarkan analogi pada sampel percobaan. SIMCA dapat digunakan untuk menentukan jarak kategori, kemampuan pemodelan dan diskriminasi. Jarak kategori dapat dihitung sebagai jarak

geometrik dari model komponen-komponen utama. Pendekatan lain menyatakan bahwa tiap kategori dibatasi dengan jarak wilayah yang mewakili persentase tingkat kepercayaan (biasanya 99%). Kemampuan diskriminasi yang dimiliki dapat mengukur seberapa baik variabel dalam membedakan antara dua kategori. Sedangkan kemampuan pemodelan digunakan untuk mengukur pengaruh variabel terhadap model yang diberikan. Alat yang berguna untuk interpretasi hasil SIMCA adalah plot Coomans yang dapat menunjukkan diskriminasi dari dua kategori (Berrueta dkk., 2007).

### 2.9.3 *Partial Least Square (PLS)*

*Partial Least Square (PLS)* adalah teknik kalibrasi multivariat yang sangat luas digunakan dalam analisis kuantitatif data spektroskopi dan elektrokimia. PLS lebih umum digunakan dalam kalibrasi multivariat karena mutu model kalibrasi yang dihasilkan dan kemudahan penerapannya. Tujuan dari PLS adalah untuk membangun hubungan linear antara dua matriks, yaitu spektra data ( $X$ ) dan nilai referensi ( $Y$ ). Teknik ini merupakan pemodelan untuk  $X$  dan  $Y$  untuk mengetahui variabel pada matriks  $X$  yang menggambarkan matriks  $Y$  secara baik. Hal ini dijelaskan dengan representasi dari spektra pada panjang gelombang untuk menunjukkan arah yang akan menjadi kombinasi linear dari panjang gelombang (Roggo dkk., 2007).

### 2.9.4 *Principal Component Regression (PCR)*

*Principal Component Regression (PCR)* adalah teknik analisis multivariat yang dilakukan dengan mereduksi komponen dengan PCA terlebih dahulu dan dilanjutkan dengan teknik analisis regresi antara komponen utama yang baru terhadap respon. Pada prinsipnya, PCR hampir sama dengan PLS. Perbedaan kedua metode ini berada pada proses penentuan komponen utama. Pada PCR, penentuan komponen utama berdasarkan variasi maksimum data spektrum dan data respon (Miller dan Miller, 2010).



### 2.9.5 Support Vector Machines Regression (SVMR)

*Support Vector Machines Regression (SVMR)* merupakan pendekatan baru untuk klasifikasi dimana telah dikemukakan pada awal tahun 1990. SVMR disebut sebagai metode pembatas. SVMR tidak membentuk model kategori tetapi membentuk pembatas antara dua kategori. SVMR diterapkan sebagai pengklasifikasian dua kategori, dimana SVMR akan membedakan kedua kategori tersebut (Brereton, 2007).

### 2.9.6 Linear Discriminant Analysis (LDA)

LDA didasarkan pada penentuan fungsi diskriminan linier yang memaksimalkan rasio antara kelas varians dan meminimalkan rasio dalam kelas varians. Pada LDA, kelas seharusnya mengikuti distribusi normal multivariat dan distribusi linear (Berrueta dkk., 2007).

Keberhasilan LDA dalam pengkategorian objek dapat diuji dengan beberapa cara. Cara yang paling sederhana adalah dengan menggunakan model klasifikasi yang telah dibuat untuk mengklasifikasikan objek dan menentukan apakah hasil pengklasifikasian tersebut benar atau tidak. Objek yang diklasifikasi merupakan bagian dari set data yang digunakan untuk membentuk model. Metode yang lebih baik adalah dengan membagi data asli menjadi dua kelompok yang dipilih secara acak. Kelompok pertama disebut dengan *training set* dan kelompok kedua disebut dengan *test set*. *Training set* digunakan untuk menentukan fungsi diskriminan linier sedangkan *test set* digunakan untuk mengevaluasi kinerja fungsi diskriminan linier dan keberhasilan LDA dapat diketahui (Miller dan Miller, 2010).

## 2.10 Validasi Silang

Validasi silang merupakan teknik yang digunakan untuk menilai seberapa jauh suatu hasil analisis statistik dapat diimplementasikan ke dalam set data independen (Schneider, 1997). Hal ini digunakan untuk untuk memperkirakan seberapa akurat model prediksi yang dibuat untuk dapat diimplementasikan.



Satu putaran validasi silang melibatkan partisi sampel data ke dalam himpunan bagian komplementer, lalu melakukan analisis terhadap satu subset (*training set*), dan memvalidasi analisis terhadap subset lain (*test set*). Untuk mengurangi variabilitas, beberapa putaran validasi silang dapat dilakukan dengan menggunakan partisi yang berbeda, dan hasil validasi adalah rata-rata selama putaran.

Menurut Kohavi (1995), ada beberapa tipe dan cara validasi silang yaitu *k-fold cross validation*, *2-fold cross validation*, dan *leave-one-out*.

#### 2.10.1 *Leave-one-out Cross Validation*

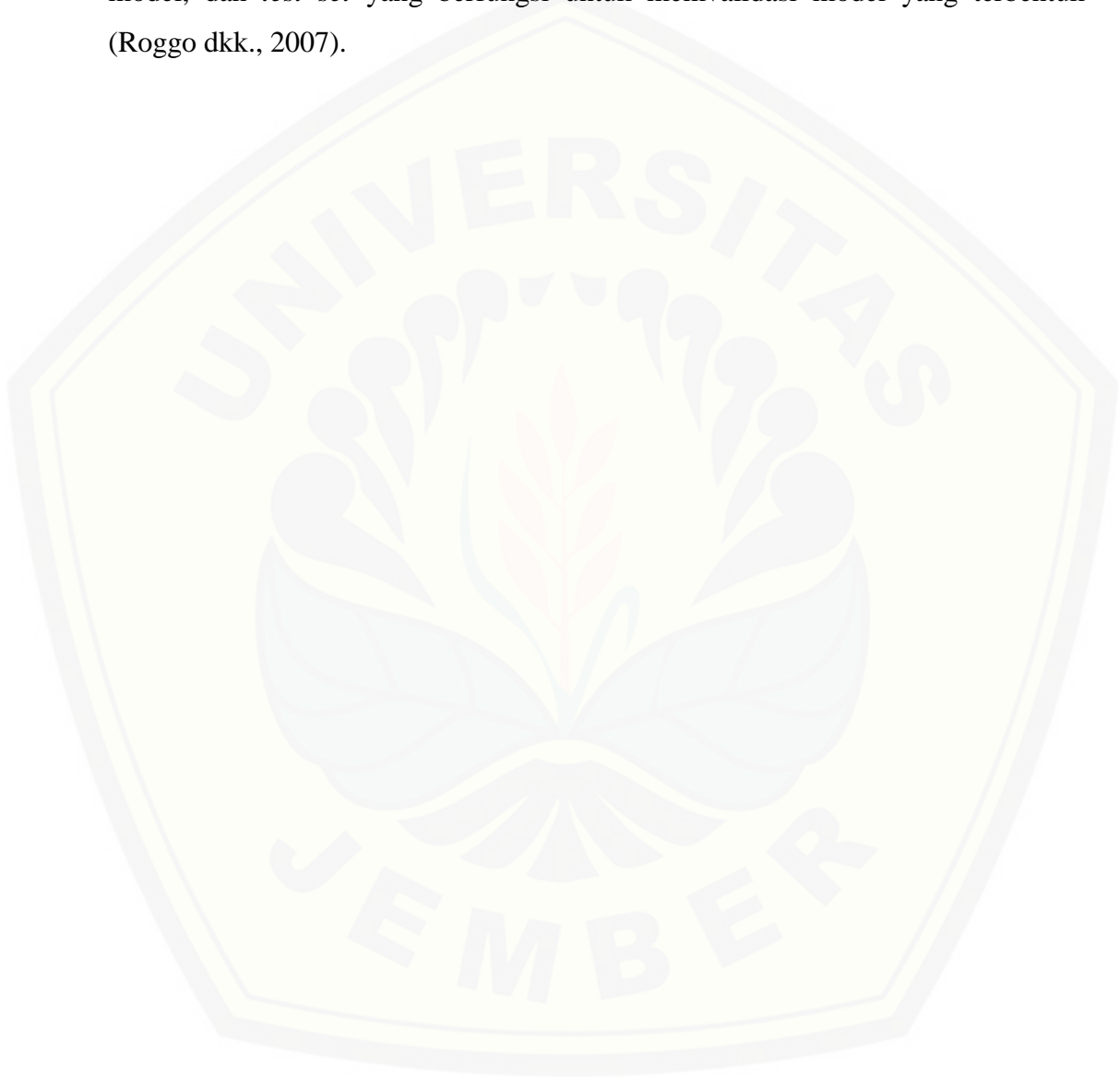
Seperti diketahui dari namanya, *leave-one-out* (LOOCV) yang berarti meninggalkan satu untuk validasi silang, yaitu dengan melibatkan sampel pengamatan tunggal dari sampel asli digunakan sebagai *training set*. Hal ini dilakukan berulang pada setiap observasi dalam sampel yang digunakan sekaligus sebagai data validasi. LOOCV akan menjadi sama dengan *k-fold*, bila jumlah *k*-lipatnya sama dengan jumlah sampel asli pengamatan (Schneider, 1997).

#### 2.10.2 *K-fold Cross Validation*

Dalam validasi silang *k-fold*, seluruh sampel asli dibagi secara acak ke dalam *k*-sub sampel. Dari sebanyak *k*-sub sampel, satu sub sampel tunggal dipertahankan sebagai validasi data untuk pengujian model, dan sisanya *k*-1 sub sampel digunakan sebagai *training set*. Proses validasi silang yang kemudian dilakukan berulang *k*-kali (lipatan), dengan masing-masing *k*-sub sampel digunakan tepat satu kali sebagai validasi data. Hasil dari *k*-kali lipatan kemudian didapat rata-rata (atau dikombinasi) untuk menghasilkan estimasi tunggal. Keuntungan dari metode ini adalah seluruh sampel pengamatan digunakan secara acak dan berulang sebagai data pelatihan dan validasi (Roggo dkk., 2007).

### 2.10.3 2-fold Cross Validation

Tipe ini merupakan metode validasi silang yang paling sederhana. Pada pelaksanaannya, metode ini biasanya dilakukan dengan membagi data sampel menjadi dua bagian yang sama yaitu *training set* yang digunakan untuk membuat model, dan *test set* yang berfungsi untuk memvalidasi model yang terbentuk (Roggo dkk., 2007).



## BAB 3 METODOLOGI 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 Januari 2018 hingga bulan Juli 2018.

### 3.3 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Hitachi), spektrofotometer *near infrared* (Brimrose Luminar 3070), perangkat lunak Brimrose, perangkat lunak *The Unscrambler X 10.2* (Camo), *ultrasonicator* (Elmasonic), mikropipet (Socorex), tip, pH meter (Denver Instrument), *hot plate*, *disposable cuvette*, timbangan analitik digital, batang pengaduk, corong, corong buchner, *rotary evaporator*, kertas saring dan alat-alat gelas.

#### 3.3.2 Bahan Penelitian

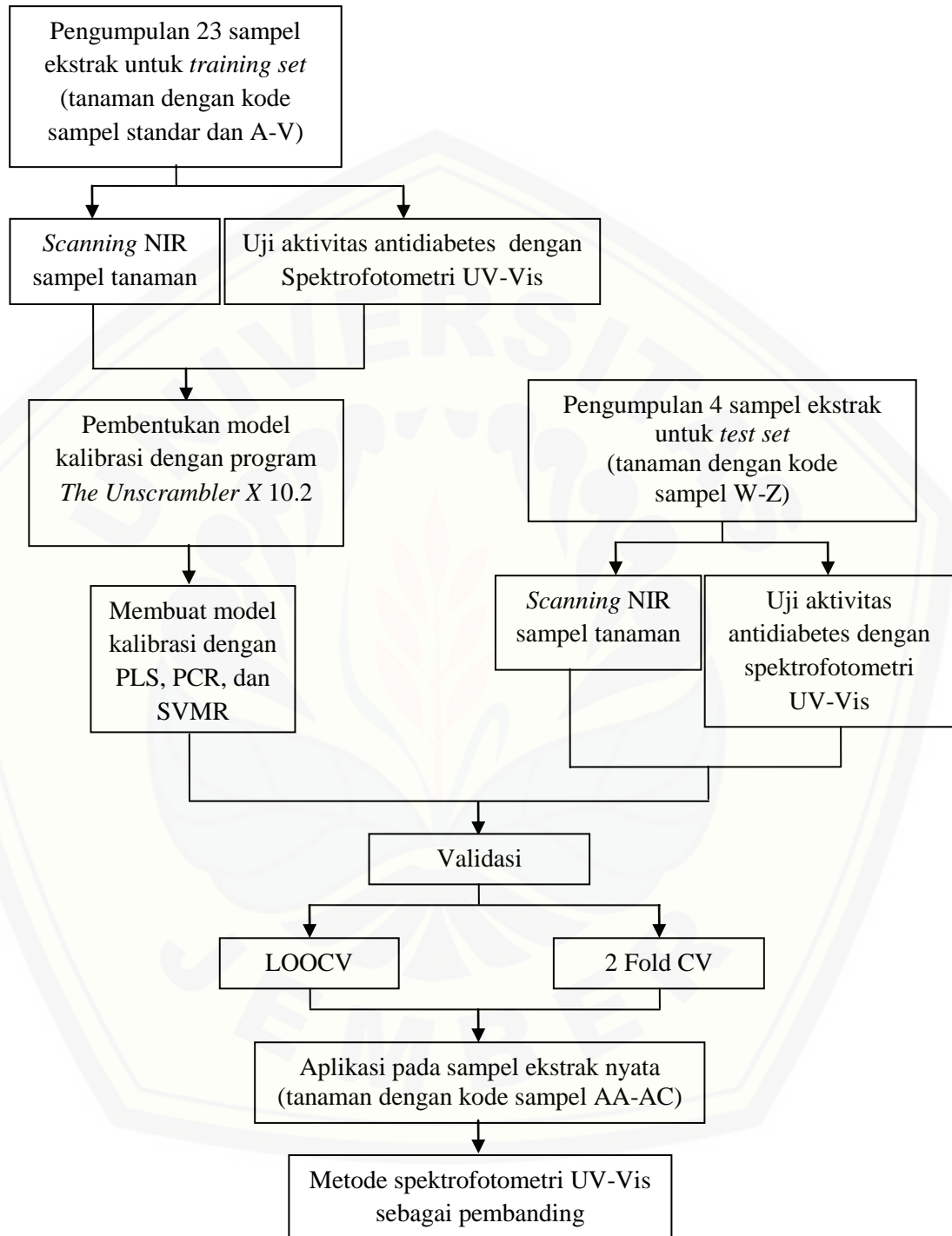
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kental yang terdapat pada laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember, aerosil, ramuan jamu tersaintifikasi antidiabetes (dari B2P2TOOT Tawangmangu), etanol 96%, enzim  $\alpha$ -amilase (dari *porcine*, Sigma-Aldrich), *starch* (Merck KgaA), asam 3,5-dinitrosalisilat (Sigma-Aldrich), *sodium potassium tartrate* (Na-K Tartrat), natrium hidroksida (NaOH), natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), natrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), dan aquabides.

### 3.4 Rancangan Penelitian

#### 3.4.1 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antidiabetes melalui inhibisi enzim  $\alpha$ -amilase pada beberapa ekstrak secara *in vitro* menggunakan metode spektrofotometri *near infrared* dan kemometrik. Tahap pertama yang perlu dilakukan adalah melakukan uji aktivitas antidiabetes pada ekstrak kental secara *in vitro* dengan spektrofotometri UV-Vis. Ekstrak kental yang telah digunakan lalu dikeringkan dengan menggunakan aerosil sebanyak 50% untuk selanjutnya diuji dengan spektrofotometri *near infrared*. Analisis aktivitas antidiabetes dilakukan dengan melihat pola spektrumnya melalui spektrofotometri *near infrared* yang dikombinasi dengan analisis kemometrik. Dari model yang terbentuk kemudian dievaluasi menggunakan validasi silang dengan metode *leave-one-out-cross validation* (LOOCV) dan *2-fold cross validation*. Model terpilih kemudian selanjutnya digunakan untuk menetapkan nilai  $IC_{50}$  dalam sampel nyata. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

## 3.4.2 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Skema alur penelitian

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan ialah ekstrak kental daun tanaman yang tersedia di laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember. Ekstrak kental yang ada dikeringkan dengan menggunakan aerosil. Peneliti tidak melakukan identifikasi masing-masing sampel ekstrak tanaman, sehingga untuk selanjutnya nama tanaman menggunakan identitas kode tanaman. Kemudian dari ekstrak-ekstrak tanaman tersebut dipilih 23 ekstrak yang akan digunakan sebagai *training set*, 4 ekstrak untuk *test set*, dan 3 ekstrak untuk sampel nyata. Jadi, total keseluruhan ekstrak yang dibutuhkan yaitu 29 ekstrak daun tanaman dan 1 ekstrak jamu sebagai standar. Ekstrak yang akan digunakan sebagai *training set* dapat dilihat pada Tabel 3.1 yaitu tanaman dengan kode sampel A-V beserta standar, untuk *test set* pada Tabel 3.2 yaitu tanaman dengan kode sampel W-Z, dan untuk sampel nyata pada Tabel 3.3 yaitu tanaman dengan kode sampel AA-AC. Standar yang digunakan yaitu jamu tersaintifikasi dari B2P2TOOT. Penggunaan jamu sebagai pembanding bertujuan agar hasil nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan dari sampel dan standar tidak jauh berbeda karena baik sampel maupun standar sama-sama berasal dari tanaman. Jamu tersebut merupakan ramuan herbal yang terdiri dari beberapa simplisia tanaman yaitu daun salam, daun sambiloto, kayu manis dan rimpang temulawak yang kemudian di ekstrak. *Training set* terdiri dari sampel yang diketahui pengkategorianannya dan digunakan untuk membentuk model klasifikasi kemometrik, sedangkan *test set* terdiri dari sampel yang diketahui pengkategorianannya tetapi digunakan untuk mengevaluasi reliabilitas model yang telah dibentuk oleh *training set* (Berrueta dkk., 2007).



Tabel 3.1 Identitas kode ekstrak tanaman *training set*

Kode Sampel	Nama Tanaman	Nama Ilmiah
Standar	Jamu tersaintifikasi	-
A	Daun patikan kebo	<i>Euphorbiae hirtae</i>
B	Daun sirih merah malang	<i>Piper ornatum</i>
C	Daun rosela	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
D	Daun robusta muda	<i>Coffea canephora</i>
E	Daun sambiloto	<i>Andrographis paniculata</i>
F	Daun buncis	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>
G	Daun mengkudu madura	<i>Morinda citrifolia L.</i>
H	Daun benalu apel	<i>Scurrula ferruginea (Jack.) Dans.</i>
I	Daun kembang bulan	<i>Tithonia diversifoliu</i>
J	Daun arabika muda	<i>Coffea arabica</i>
K	Daun sirih madura	<i>Piper betle</i>
L	Daun kunir	<i>Kaempferia rotunda L.</i>
M	Daun juwet kediri	<i>Syzygium cumini</i>
N	Daun kemangi	<i>Ocimum sanctum</i>
O	Daun beluntas	<i>Pluchea indica Less.</i>
P	Daun pandan	<i>Pandanus amaryllifolius Roxb.</i>
Q	Daun mimba kediri	<i>Azadirachta indica</i>
R	Daun mindi	<i>Melia azedarach</i>
S	Daun pakel	<i>Mangifera foetida</i>
T	Daun belimbing wuluh	<i>Averrhoa bilimbi</i>
U	Daun meniran kediri	<i>Phyllanthus niruri</i>
V	Daun binahong	<i>Anredera cordifolia</i>

Tabel 3.2 Identitas kode ekstrak tanaman *test set*

Kode Sampel	Nama Tanaman	Nama Ilmiah
W	Daun jati belanda	<i>Guazuma ulmifolia</i>
X	Daun benalu kelor	<i>Dendrophthoe pentandra (L.) Miq.</i>
Y	Daun tembakau	<i>Nicotiana tabacum L.</i>
Z	Daun robusta tua	<i>Coffea canephora</i>

Tabel 3.3 Identitas kode ekstrak tanaman sampel nyata

Kode Sampel	Nama Tanaman	Nama Ilmiah
AA	Daun meniran madura	<i>Phyllanthus niruri</i>
AB	Daun mimba malang	<i>Azadirachta indica</i>
AC	Daun pepaya	<i>Carica papaya L.</i>

### 3.5.2 Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Spektrofotometer UV-Vis

#### a) Penyiapan Larutan

Penyiapan larutan pereaksi yang digunakan antara lain:

##### 1) Larutan dapar fosfat pH 6,9

Dibuat dengan mencampurkan 245 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M (15,84 gram dalam 600 mL aquabides) dengan 255 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (6,90 gram dalam 500 mL aquabides).

##### 2) Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 2M

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

##### 3) Reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Reagen DNS dibuat dengan melarutkan 30 gram *potassium sodium tartrate* dalam 20 mL NaOH 2M dan dipanaskan hingga larut. Kemudian melarutkan 1,095 gram asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dalam aquabides hingga 50 mL dalam labu ukur. Larutan *potassium sodium tartrate* dan larutan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) kemudian dicampurkan dan ditambahkan aquabides ad 100 mL lalu aduk sampai homogen.

##### 4) Larutan enzim $\alpha$ -amilase

Larutan enzim  $\alpha$ -amilase disimpan dalam lemari pendingin agar enzim tetap stabil untuk mencegah kerusakan enzim. Larutan ini dibuat dengan menimbang enzim sebesar 20 mg dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,9 sampai 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi enzim 20 U/ mL.

##### 5) 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 di atas *hot plate* sampai larut selama  $\pm$  5-10 menit.

#### b) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan *scanning* panjang gelombang pada spektrofotometer UV-Vis. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada 400-700 nm. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mereaksikan 475  $\mu\text{l}$  dapar fosfat pH 6,9

dan 25  $\mu\text{l}$  larutan enzim  $\alpha$ -amilase. Lalu dilakukan pre-inkubasi pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  larutan substrat pati dan diinkubasi pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400  $\mu\text{l}$  larutan DNS, lalu dipanaskan dalam air mendidih ( $\pm 90^{\circ}\text{C}$ ). Setelah itu larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-700 nm. Pada blanko, proses yang dilakukan tanpa penambahan enzim. Panjang gelombang maksimum terpilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi.

c) Pengujian Aktivitas Antidiabetes Larutan Uji

Pengujian aktivitas antidiabetes dilakukan dengan larutan kontrol negatif (tanpa larutan sampel atau standar), larutan kontrol positif (dengan larutan jamu antidiabetes tersaintifikasi dari B2P2TOOT Tawangmangu), dan larutan sampel/uji (dengan ekstrak daun tanaman). Masing-masing larutan tersebut ditambahkan larutan dapar, ekstrak dan enzim dengan jumlah yang berbeda kemudian dilakukan inkubasi pertama pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Lalu ditambahkan larutan pati dan diinkubasi kembali pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Dan terakhir ditambahkan reagen DNS dan dipanaskan di dalam air mendidih ( $\pm 90^{\circ}\text{C}$ ) di atas *hot plate* selama 15 menit. Campuran tersebut kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan 3 kali replikasi. Jenis dan jumlah larutan yang digunakan masing-masing dapat dilihat pada Tabel 3.2 (Khairunnisa, 2017).

Tabel 3.4 Daftar larutan uji

Larutan	Dapar ( $\mu\text{l}$ )	Ekstrak ( $\mu\text{l}$ )	Enzim ( $\mu\text{l}$ )	Substrat (pati) ( $\mu\text{l}$ )	Jamu tersaintifikasi ( $\mu\text{l}$ )	DNS ( $\mu\text{l}$ )
a	375	-	25	100	100	400
b	400	-	-	100	100	400
c	475	-	25	100	-	400
d	500	-	-	100	-	400
e	375	100	25	100	-	400
f	400	100	-	100	-	400

Keterangan:

Larutan a = kontrol positif dengan ramuan jamu antidiabetes tersaintifikasi

Larutan b = blanko kontrol positif

Larutan c = kontrol negatif

Larutan d = blanko kontrol negatif

Larutan e = larutan uji

Larutan f = blanko larutan uji

d) Perhitungan  $IC_{50}$

Nilai penghambatan  $IC_{50}$  enzim  $\alpha$ -amilase pada masing-masing ekstrak dihitung dengan persamaan 3.1 berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{K-S}{K} \times 100\% \dots\dots\dots(3.1)$$

Keterangan:

K = Absorbansi kontrol negatif

S = Absorbansi sampel/Absorbansi kontrol positif

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

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b} \dots\dots\dots(3.2)$$

### 3.5.3 Penentuan Data Spektra NIR

a) Preparasi Sampel

Ekstrak kental yang akan diperiksa spektrumnya terlebih dahulu dikeringkan menggunakan aerosil dengan persentase 50%. Selanjutnya ekstrak yang sudah kering digerus dan di ayak dengan ayakan B-60, kemudian disimpan dalam vial yang telah diberi label.

b) Pengukuran Spektra NIR

Metode pengukuran atau pengumpulan spektrum dengan instrumen NIR ini digunakan pada setiap pengukuran untuk memperoleh data NIR sampel *training set*, *test set* dan sampel nyata. Instrumen NIR dihidupkan dan selanjutnya dibuka perangkat lunak Brimrose. Sampel yang telah dipreparasi diletakkan di atas plat tempat sampel secara merata. Setiap sampel dilakukan 5 kali replikasi dan 3 kali penembakan pada masing-masing replikasi. Selanjutnya langkah-langkah tersebut diulangi untuk masing-masing sampel.

#### 3.5.4 Pembentukan Model Kalibrasi

Nilai  $IC_{50}$  *training set* 23 tanaman yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrofotometri UV-Vis dan data spektrum hasil *scanning* dengan NIR kemudian diolah dengan menggunakan perangkat lunak *The Unscrambler versi X 10.2* (*Camo software*). Perangkat lunak *The Unscrambler versi X 10.2* dibuka dan data dimasukkan dengan memilih file, *import data*, lalu pilih Brimrose kemudian akan muncul tampilan data dengan masing-masing panjang gelombang. Selanjutnya dibuat kategori objek. Objek dikelompokkan dengan memilih *define range* dan *coloumn range* diisi dengan nilai  $IC_{50}$  pada kolom 1 dan absorbansi pada kolom yang lain.

Model kalibrasi dibuat dengan metode *Partial Least Square* (PLS), *Principal Component Regression* (PCR), dan *Support Vector Machines Regression* (SMVR). Langkah-langkah yang dilakukan diantaranya yaitu pilih *task, analyze*, lalu pilih *Partial Least Square* untuk PLS, *Principal Component Regression* untuk PCR, dan *Support Vector Machines Regression* untuk SMVR. Kriteria yang harus dipenuhi adalah nilai  $R^2$ , RMSEC (*Root Mean Standart Error of Calibration*), RMSECV (*Root Mean Square Error Cross Validation*). Pemilihan set data spektrum didasarkan pada kemampuan prediksi yang terbaik dengan nilai korelasi  $R^2$  semakin besar, nilai galat RMSEC dan RMSECV terbaik apabila nilai semakin kecil (Kawamura dkk., 2017).



### 3.5.5 Validasi Model Terpilih

#### 1) *Leave-One-Out-Cross Validation (LOOCV)*

Set validasi ini dibuat untuk mengevaluasi data dengan mengambil satu set data sampel dari *training set* dimana data tersebut digunakan sebagai set validasi. Sedangkan data yang tersisa digunakan untuk membentuk model baru, demikian seterusnya hingga semua data kalibrasi digunakan sebagai set validasi.

#### 2) *2-Fold Cross Validation*

Set validasi ini dibuat dengan preparasi 4 sampel ekstrak yang ditetapkan nilai  $IC_{50}$  dengan spektrofotometri UV-Vis. Penetapan data NIR dilakukan dengan *scanning* sampel *test set* hingga menghasilkan data spektrum yang kemudian diolah dengan menggunakan *software The Unscrambler versi X 10.2*.

### 3.5.6 Aplikasi pada Sampel Ekstrak Nyata

Tahapan ini bertujuan untuk mengaplikasikan model kemometrik yang telah dibentuk pada sampel ekstrak nyata. Ekstrak nyata yang digunakan adalah ekstrak kental daun tanaman yang terdapat pada laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember. Masing-masing sampel ekstrak dikeringkan menggunakan aerosil dengan persentase 50% kemudian diayak dengan ayakan B-60 lalu di-*scan* dengan instrumen NIR sehingga diperoleh data spektrum yang absorbansinya digunakan sebagai prediktor pada model kalibrasi terpilih untuk analisis secara kuantitatif. Sebagai data pembanding untuk penetapan  $IC_{50}$ , digunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil analisis aktivitas antidiabetes dengan metode NIR yang terpilih dan kemometrik yang dibandingkan dengan metode pembanding spektrofotometri UV-Vis kemudian diuji dengan analisis statistik Uji T Dua Sampel Berpasangan.

## BAB 5 PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditulis beberapa kesimpulan di antaranya sebagai berikut:

1. Penentuan aktivitas antidiabetes dapat ditentukan menggunakan metode spektrofotometri NIR dan kemometrik dengan menggunakan model kalibrasi PLS. Hasil model kalibrasi analisis data multivariat secara kemometrik dengan PLS yang terbentuk dari data *training set* dengan nilai  $R^2$  kalibrasi 0,9802943;  $R^2$  validasi 0,9786547; RMSE kalibrasi 0,6606693; dan RMSE validasi 0,6925296.
2. Hasil analisis nilai  $IC_{50}$  dengan metode NIR-kemometrik dibandingkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis pada sampel dengan kode AA dan AB tidak memiliki perbedaan yang bermakna sedangkan pada sampel dengan kode AC memiliki perbedaan yang bermakna.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan pembentukan sebuah model kalibrasi PLS dengan jumlah sampel yang lebih banyak sehingga nilai parameter seperti  $R^2$  kalibrasi,  $R^2$  validasi, RMSEC, dan RMSECV menjadi lebih baik serta memiliki rentang konsentrasi yang lebih luas agar dapat memberikan hasil yang lebih baik pada sampel yang akan diperiksa.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Aberg, J. A., C. Lacy, L. Amstrong, M. Goldman, dan L. L. Lance. 2009. *Drug Information Handbook 17<sup>th</sup> Edition*. Lexi-Comp. American Pharmacists Association.
- ADA. 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. Volume 33
- ADA. 2017. Standard of medical care in diabetes. *Diabetes Care*
- Aditama, T. Y. 2015. *Jamu Dan Kesehatan Edisi II*. Jakarta: Balitbangkes.
- Aenugu, H. P. R., D. S. Kumar, Srisudharson, N. Parthiban, S. S. Ghosh, dan D. Banji. 2011. Near infra red spectroscopy- an overview. *International Journal of ChemTech Research*. 3(2):825–836.
- Anief, M. 1987. *Ilmu Meracik Obat: Teori Dan Praktek*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Anonim. 2017. Running T-Test in SPSS. <https://harding.edu/sbreezeel/460/files/t-test.pdf> [Diakses pada 25 Juni 2018].
- Azwanida, N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 04(03):3–8.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2009. Suplemen I 2009 Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik 2006.
- Belščak-Cvitanović, A., D. Valinger, M. Benković, A. J. Tušek, T. Jurina, D. Komes, dan J. G. Kljusurić. 2018. Integrated approach for bioactive quality evaluation of medicinal plant extracts using hplc-dad, spectrophotometric, near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *International Journal of Food Properties*. 00(00):1–18.
- Berrueta, L. A., R. M. Alonso-Salces, dan K. Héberger. 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 1158(1–2)
- Brereton, R. 2007. *Applied Chemometrics for Scientists*. Chichester, UK: John Wiley and Sons.

- Bro, R. 2003. Multivariate calibration: what is in chemometrics for the analytical chemist? *Analytica Chimica Acta*. 500(1–2):185–194.
- Cutter, E. 1989. *Plant Anatomy: Experiment and Interpretation Part 2 Organs*. London: The English Language Book Society and Edward Arnold.
- Day, R. A. dan A. L. Underwood. 1986. *Quantitative Analysis*. Jakarta: Erlangga.
- de Sales, P. M., P. M. de Souza, L. A. Simeoni, P. de O. Magalhães, dan D. Silveira. 2012.  $\alpha$ -amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 15(1):141–183.
- de Souza, P. M. dan P. de O. e Magalhães. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(4):850–861.
- Dipiro, T. J., L. R. Talbert, C. G. Yee, R. G. Matzke, G. B. Wells, dan M. L. Posey. 2008. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. 7<sup>th</sup> Edition. New York: Mc Graw Hill.
- Ditjen POM. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Fahn, A. 1991. *Anatomi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Falleh, H., R. Ksouri, M. E. Lucchessi, C. Abdelly, dan C. Magné. 2012. Ultrasound-assisted extraction: effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of mesembryanthemum edule l. aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 11(2):243–249.
- Feng, J., X.-W. Yang, dan R.-F. Wang. 2011. Bio-assay guided isolation and identification of alpha glucosidase inhibitors from the leaves of aquilaria sinensis. *Phytochemistry*. 72(2):242–247.
- Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. New York: W.H. Freeman and Company New York. *Lavoisier.Fr*.
- Fossum, K. dan J. R. Whitaker. 1972. Simple method for detecting alpha-amylase inhibitors in biological materials. 3(February):930–936.

- Funke, I. dan M. F. Melzig. 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16(1):1–5.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrat. *The Journal of Biochemistry*. 41(5)
- Gupta, M., P. Sharma, dan A. K. Nath. 2014. Purification of a novel  $\alpha$ -amylase inhibitor from local himalayan bean (*phaseolus vulgaris*) seeds with activity towards bruchid pests and human salivary amylase. *Journal of Food Science and Technology*. 51(7):1286–1293.
- Harborne, J. B. 1982. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terjemahan Kosasih P. Dan Iwang S.J.* Bandung: ITB Press.
- Horváthová, V., Š. Janeček, dan E. Šturdík. 2000. Amylolytic enzymes : their specificities , origins and properties. *Biologia, Bratislava*. 55(6):605–615.
- Howard, W. 2015. Pengujian aktivitas enzim alfa-amilase. *Research Gate*
- IDF. 2015. *IDF Diabetes Atlas*. 7<sup>th</sup> Edition. Karakas Print. *International Diabetes Federation*.
- Johnson, R. dan D. Wichern. 2007. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. 6<sup>th</sup> Edition. New Jersey: Prentice Hall Inc.
- Karoui, R., A. M. Mouazen, É. Dufour, L. Pillonel, E. Schaller, J. De Baerdemaeker, dan J. O. Bosset. 2006. Chemical characterisation of european emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. *International Dairy Journal*. 16(10):1214.
- Kawamura, K., Y. Tsujimoto, M. Rabenarivo, H. Asai, A. Andriamananjara, dan T. Rakotoson. 2017. Vis-nir spectroscopy and pls regression with waveband selection for estimating the total c and n of paddy soils in madagascar. *Remote Sensing*. 9(10)
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2012. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 007 Tahun 2012 Tentang Registrasi Obat Tradisional.
- Khairunnisa, P. 2017. Pengembangan Dan Validasi Metode Uji Aktivitas Inhibitor  $\alpha$ -Amilase Dari Ekstrak Metanol Daun Kopi Secara in Vitro. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.



- Khopkar, S. M. 1990. *Basic Concepts of Analytical Chemistry*. Jakarta: Indonesia University Press.
- Kohavi, R. 1995. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. *Appears in the International Joint Conference on Artificial Intelligence (IJCAI)*. 5:1–7.
- Kotowaroo, M. I., M. F. Mahomoodally, A. Gurib-Fakim, dan A. H. Subratty. 2006. Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of mauritius for possible  $\alpha$ -amylase inhibitory effects in vitro. *Phytotherapy Research*. 20(3):228–231.
- Kumar, S. dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*
- Latifa, R. 2015. Karakter morfologi daun beberapa jenis pohon penghijauan hutan kota di kota malang. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi*
- Lewandowski, C. M., N. Co-investigator, dan C. M. Lewandowski. 2015. *Starch Chemistry and Technology 3<sup>rd</sup> Edition*. USA: Academic Press is an imprint of Elsevier. *Food Science and Technology, International Series*.
- Marshall, J. J. dan C. M. Lauda. 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, phaseolus vulgaris. *The Journal of Biological Chemistry*. 250(20):8030–8037.
- Miller, J. N. dan J. C. Miller. 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6<sup>th</sup> Edition. Gosport, UK: Ashford Colour Press Ltd.
- Muhlisah, F. 2001. *Tanaman Obat Keluarga*. Edisi 7. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Mulja, M. dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Pandey, A., P. Nigam, C. R. Soccol, V. T. Soccol, D. Singh, dan R. Mohan. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 31(2):135–152.
- Park, K. H., M. J. Kim, H. S. Lee, N. S. Han, D. Kim, dan J. F. Robyt. 1998. Transglycosylation reactions of bacillus stearothermophilus maltogenic amylase with acarbose and various acceptors. *Carbohydrate Research*. 313(3–4):235–246.

- Roggo, Y., P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, dan N. Jent. 2007. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 44(3 SPEC. ISS.):683–700.
- Roussel, S., S. Preys, F. Chauchard, dan J. Lallemand. 2014. Process analytical technology for the food industry. *Springer*. (VII):301.
- Roychan, K. J. dan A. Chaudhari. 2001. Purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from indian major carp catla catla. *Asian Fisheries Science*. 14:269–277.
- Schneider, J. 1997. Cross Validation. <https://www.cs.cmu.edu/~schneide/tut5/node42.html> [Diakses pada 16 Januari 2018].
- Schwanninger, M., J. C. Rodrigues, dan K. Fackler. 2011. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 19(5):287–308.
- Sharma, R. 2012. *Basic Concepts Enzyme Inhibition and Bioapplications*. Croatia: InTech.
- Smith, A. 1997. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. <http://www.oxfordreference.com> [Diakses pada 28 Juni 2018].
- Stchur, P., D. Cleveland, J. Zhou, dan R. G. Michel. 2002. A review of recent applications of near infrared spectroscopy, and of the characteristics of a novel pbs ccd array-based near-infrared spectrometer. *Applied Spectroscopy Reviews*. 37(4):383–428.
- 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.
- Sweetman, S. C. 2009. *Martindale The Complete Drug Reference 36<sup>th</sup> Edition*. London: Pharmaceutical Press.
- Timerman, A. P. 2012. *Protein Purification: The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies*. USA: InTech.

- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Watson, D. G. 2003. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. United States of America: Churchill Livingstone.
- Wells, B., J. Dipiro, T. Schwinghammer, dan C. Dipiro. 2009. *Pharmacotherapy Handbook*. 7<sup>th</sup> Edition. New York: Mc Graw Hill Companies.
- WHO. 2016. Global report on diabetes. 978:88.
- Wickramaratne, M. N., J. C. Punchihewa, dan D. B. M. Wickramaratne. 2016. In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of adenanthera pavonina. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16(1):1–5.
- Winarno, F. G. 1995. *Enzim Pangan*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Xiao, Z., R. Storms, dan A. Tsang. 2007. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*. 362(1):154.

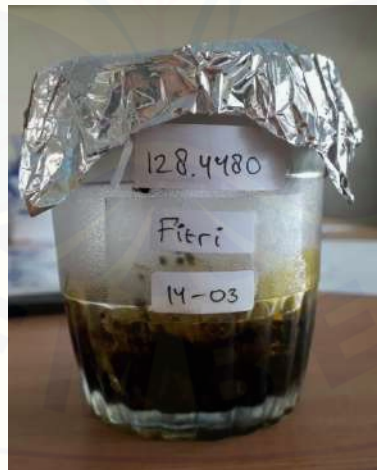
## LAMPIRAN

### Lampiran 4.1 Alat dan Bahan yang Digunakan

#### 4.1.1 Sampel *Training Set*, *Test Set*, dan Sampel Nyata



#### 4.1.2 Ekstrak Jamu dari B2P2TOOT



### 4.1.3 Instrumen yang Digunakan



### 4.1.4 Kompartemen Sampel



### Lampiran 4.2 Perhitungan % Rendemen Ekstrak

$$\begin{aligned}\% \text{Rendemen ekstrak} &= \frac{\text{berat ekstrak yang didapat}}{\text{berat serbuk yang diekstraksi}} \times 100\% \\ &= \frac{5,3756}{50,037} \times 100\% \\ &= 10,743\%\end{aligned}$$



**Lampiran 4.3 Perhitungan Pembuatan Larutan Enzim  $\alpha$ -Amilase 0,5 U/mL**

1 mg enzim  $\alpha$ -amilase mengandung 10-16 unit/mg

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

Untuk mendapatkan konsentrasi enzim sebesar 0,5 U/mL :

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

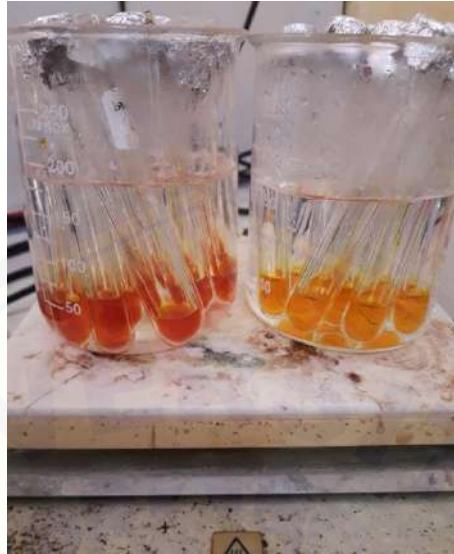
**Lampiran 4.4 Perhitungan Pembuatan Larutan Substrat 0,5%**

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

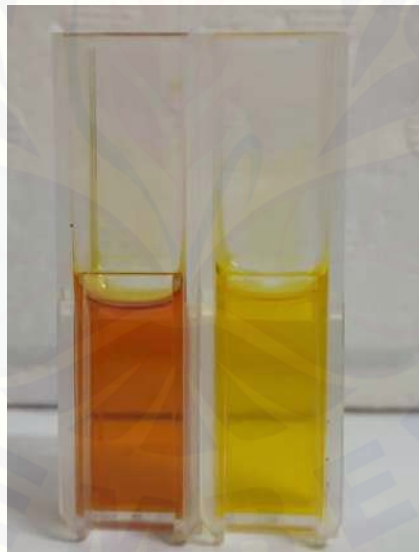
**Lampiran 4.5 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak**

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

1.  $1000 \text{ ppm} = \frac{100 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$
2.  $2000 \text{ ppm} = \frac{200 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$
3.  $3000 \text{ ppm} = \frac{300 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$
4.  $4000 \text{ ppm} = \frac{400 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$
5.  $5000 \text{ ppm} = \frac{500 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$
6.  $6000 \text{ ppm} = \frac{600 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$
7.  $7000 \text{ ppm} = \frac{700 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$
8.  $8000 \text{ ppm} = \frac{800 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$
9.  $9000 \text{ ppm} = \frac{900 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 10000 \text{ ppm}$

**Lampiran 4.6 Gambar Campuran Larutan Uji Aktivitas Inhibisi  $\alpha$ -Amilase**

(a) Larutan uji dan blanko yang telah direaksikan dengan DNS kemudian dipanaskan



(b) Gambar sesudah (kanan) dan sebelum (kiri) dipanaskan

#### Lampiran 4.7 Perhitungan Nilai IC<sub>50</sub> dari Spektrofotometri UV-Vis Pada Sampel dengan Kode C

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

##### a) Replikasi 1

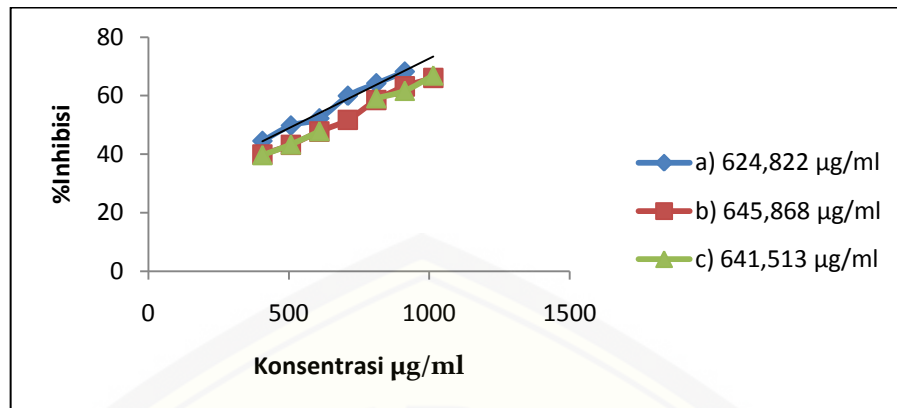
Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi Sampel	% Inhibisi
507	0,612	44,515
608,4	0,554	49,773
709,8	0,527	52,221
811,2	0,442	59,927
912,6	0,395	64,189
1014	0,351	68,178
Absorbansi kontrol : 1,103		
Persamaan regresi $y = 0,0477x + 20,196$ ; $R^2 = 0,9876$		

##### b) Replikasi 2

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi Sampel	% Inhibisi
405,6	0,666	39,892
507	0,629	43,231
608,7	0,579	47,744
709,8	0,535	51,715
811,2	0,460	58,484
912,6	0,408	63,177
1014	0,376	66,065
Absorbansi kontrol : 1,108		
Persamaan regresi $y = 0,0455x + 20,163$ ; $R^2 = 0,9915$		

##### c) Replikasi 3

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi Sampel	% Inhibisi
405,6	0,667	39,747
507	0,627	43,360
608,4	0,577	47,877
811,2	0,452	59,169
912,6	0,424	61,698
1014	0,366	66,938
Absorbansi kontrol : 1,107		
Persamaan regresi $y = 0,0456x + 20,747$ ; $R^2 = 0,9944$		



Keterangan :

- a) =  $IC_{50}$  replikasi 1
- b) =  $IC_{50}$  replikasi 2
- c) =  $IC_{50}$  replikasi 3

Perhitungan SD dan %RSD

$$\begin{aligned}
 SD &= \sqrt{\frac{(\text{rata-rata } IC_{50} - IC_{50} 1)^2 + (\text{rata-rata } IC_{50} - IC_{50} 2)^2 + (\text{rata-rata } IC_{50} - IC_{50} 3)^2}{n-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{(637,401 - 624,822)^2 + (637,401 - 645,868)^2 + (637,401 - 641,513)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{158,231 + 71,690 + 16,908}{2}} \\
 &= \sqrt{123,414} \\
 &= 11,109
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \%RSD &= \frac{SD}{\text{Rata-rata } IC_{50}} \times 100\% \\
 &= \frac{11,109}{637,401} \times 100\% = 1,743\%
 \end{aligned}$$

**Lampiran 4.8 Nilai IC<sub>50</sub> Hasil Pengukuran dengan Spektrofotometri UV-Vis****4.8.1 Training set**

Kode Sampel	Replikasi IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Rata-rata IC <sub>50</sub> (µg/mL) Ekstrak (n=3)	SD	%RSD
Standar	1124,303	1143,294	22,464	1,965
	1137,489			
	1168,091			
A	1420,627	1431,122	15,946	1,114
	1449,471			
	1423,267			
B	2121,973	2143,880	29,948	1,397
	2131,662			
	2178,005			
C	643,645	656,024	10,979	1,674
	664,583			
	659,845			
D	514,489	510,672	4,061	0,795
	506,405			
	511,121			
E	1578,176	1569,860	14,875	0,948
	1578,718			
	1552,687			
F	1218,007	1240,288	19,756	1,593
	1255,669			
	1247,188			
G	1225,794	1218,117	9,239	0,758
	1220,693			
	1207,863			
H	624,822	637,401	11,109	1,743
	645,868			
	641,513			
I	1483,104	1459,088	21,686	1,486
	1440,939			
	1453,220			
J	291,103	289,652	1,376	0,475
	288,365			
	289,489			
K	2474,775	2526,722	56,461	2,235
	2586,813			
	2518,578			
L	1375,612	1373,038	13,520	0,985
	1358,416			
	1385,085			
M	1304,468	1327,169	21,320	1,606
	1346,768			
	1330,271			



N	1394,080	1389,281	20,004	1,440
	1367,314			
	1406,45			
O	1130,181	1138,543	24,123	2,119
	1119,714			
	1165,735			
P	1469,776	1455,440	12,507	0,859
	1449,778			
	1446,765			
Q	1435,036	1444,258	18,951	1,312
	1431,682			
	1466,055			
R	1117,424	1123,514	16,740	1,490
	1110,672			
	1466,447			
S	969,998	965,961	7,851	0,813
	956,913			
	970,972			
T	1311,110	1339,791	25,245	1,884
	1358,646			
	1349,617			
U	1162,215	1167,663	17,505	1,499
	1153,530			
	1187,245			
V	1466,680	1435,167	27,549	1,920
	1423,175			
	1415,646			

#### 4.8.2 Test set

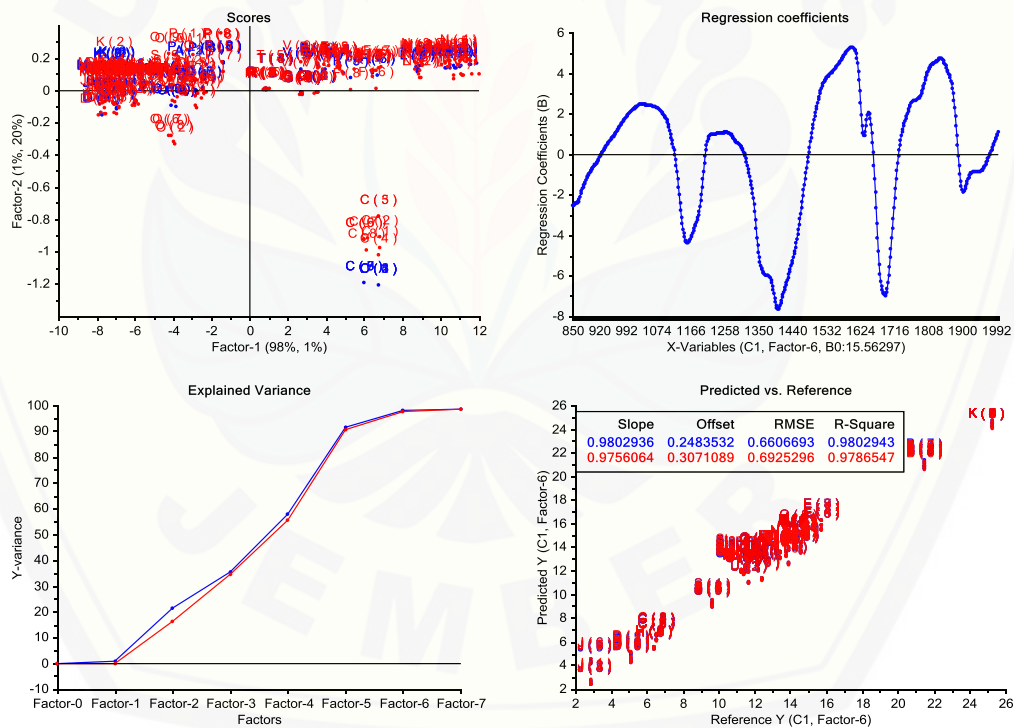
Kode Sampel	Replikasi IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Rata-rata IC <sub>50</sub> (µg/mL) Ekstrak (n=3)	SD	%RSD
W	1027,190	1036,915	11,450	1,104
	1049,535			
	1034,021			
X	1567,734	1567,559	23,561	1,503
	1543,911			
	1591,032			
Y	2156,037	2138,516	42,967	2,009
	2169,953			
	2089,557			
Z	913,784	918,021	3,683	0,401
	919,827			
	920,452			

### 4.8.3 Sampel nyata

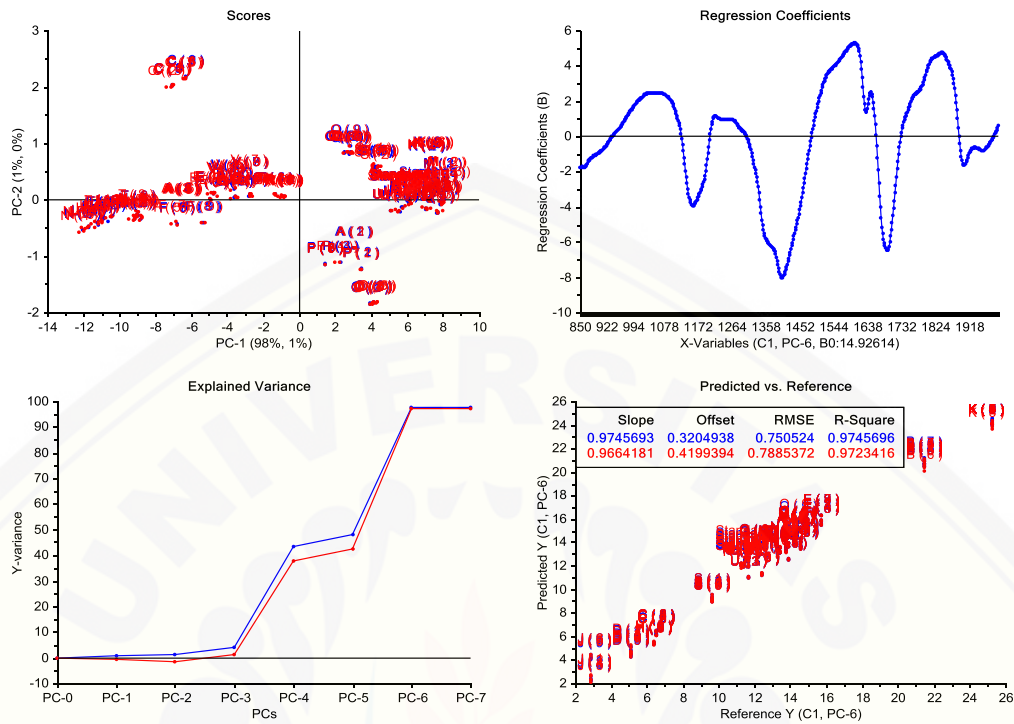
Kode Sampel	Replikasi IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Rata-rata IC <sub>50</sub> (µg/mL) Ekstrak (n=3)	SD	%RSD
AA	940,275	935,361	6,733	0,720
	927,687			
	938,121			
AB	1217,704	1239,681	23,557	1,900
	1236,789			
	1264,550			
AC	1170,761	1173,348	10,971	0,935
	1185,381			
	1163,902			

### Lampiran 4 9 Grafik Hasil Pemetaan Sampel pada *Training Set*

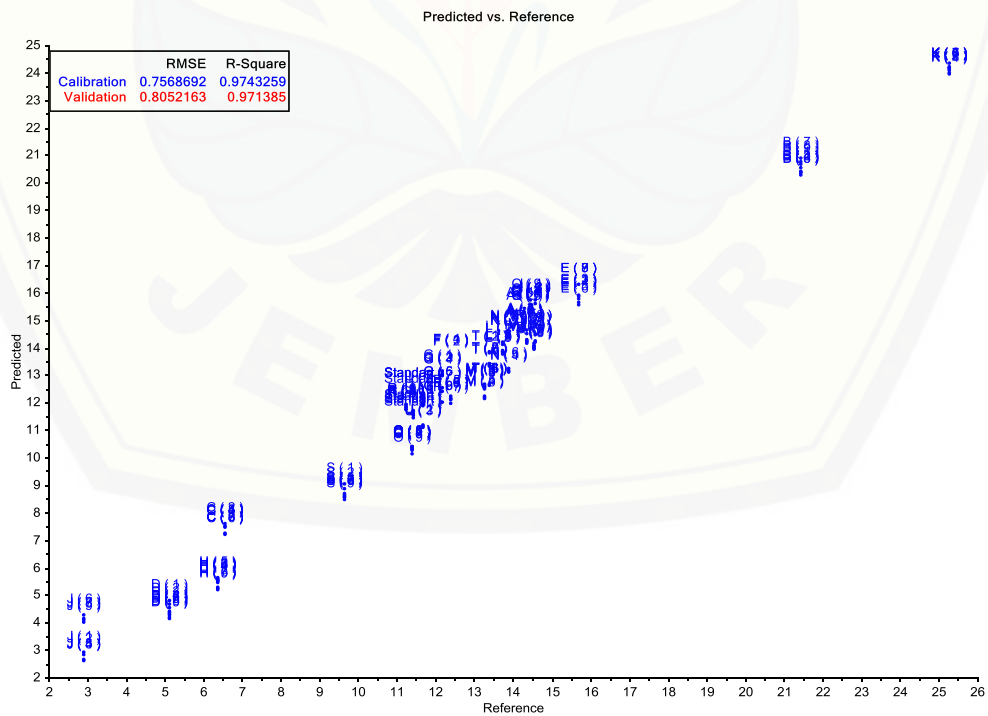
#### 4.9.1 Grafik Hasil Pemetaan *Training Set* dengan PLS



### 4.9.2 Grafik Hasil Pemetaan *Training Set* dengan PCR

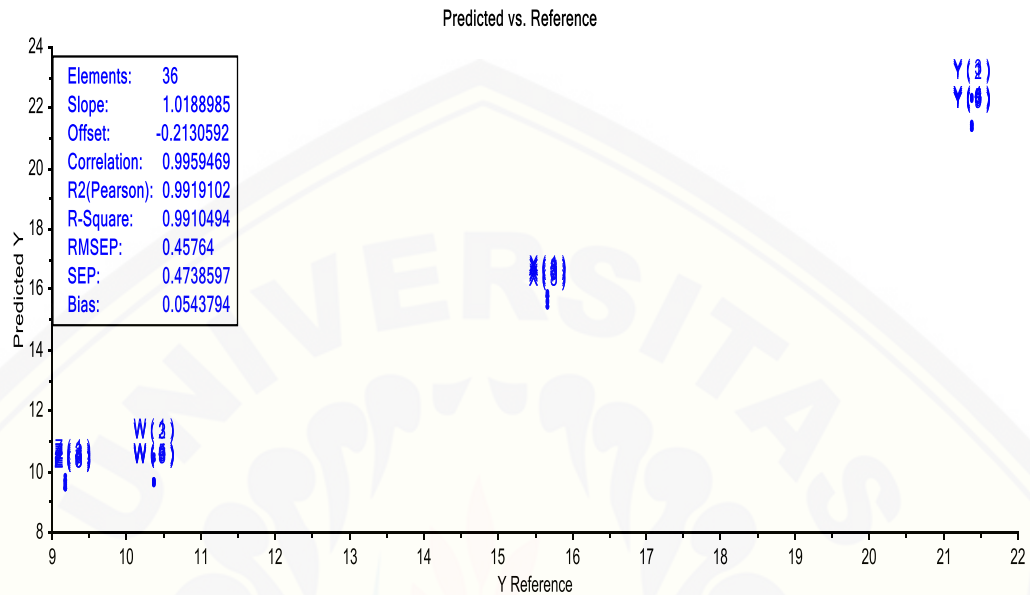


### 4.9.3 Grafik Pemetaan *Training Set* dengan SVMR



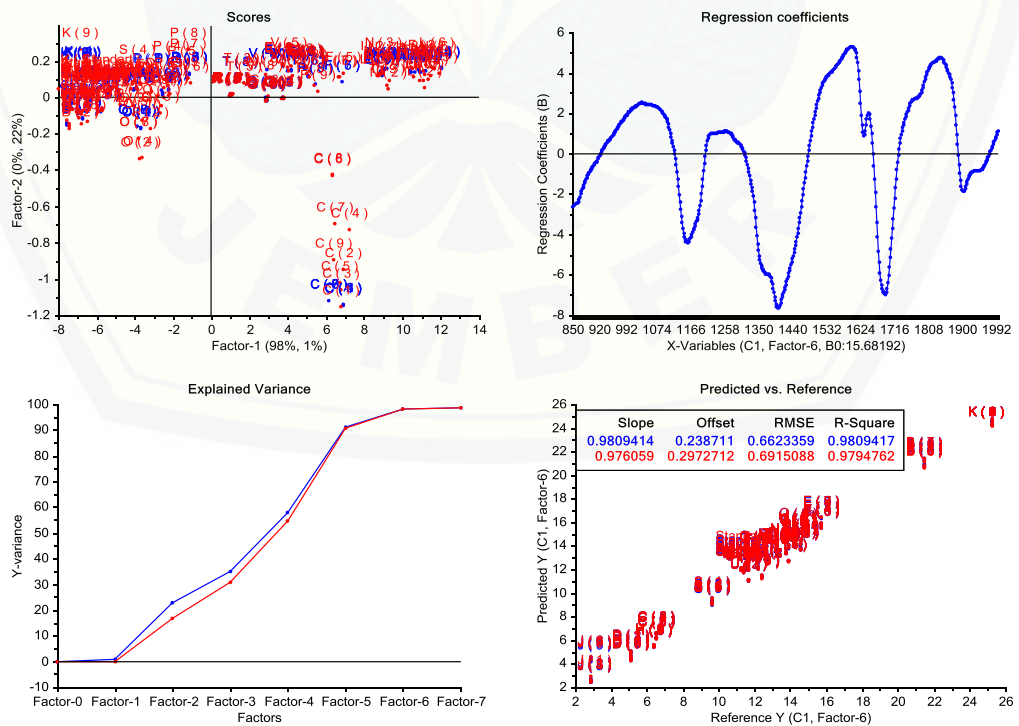
**Lampiran 4.10 Grafik Hasil Validasi dengan 2-Fold Cross Validation dan LOOCV**

**4.10.1 Grafik hasil kalibrasi sampel pada validasi 2-fold cross validation**

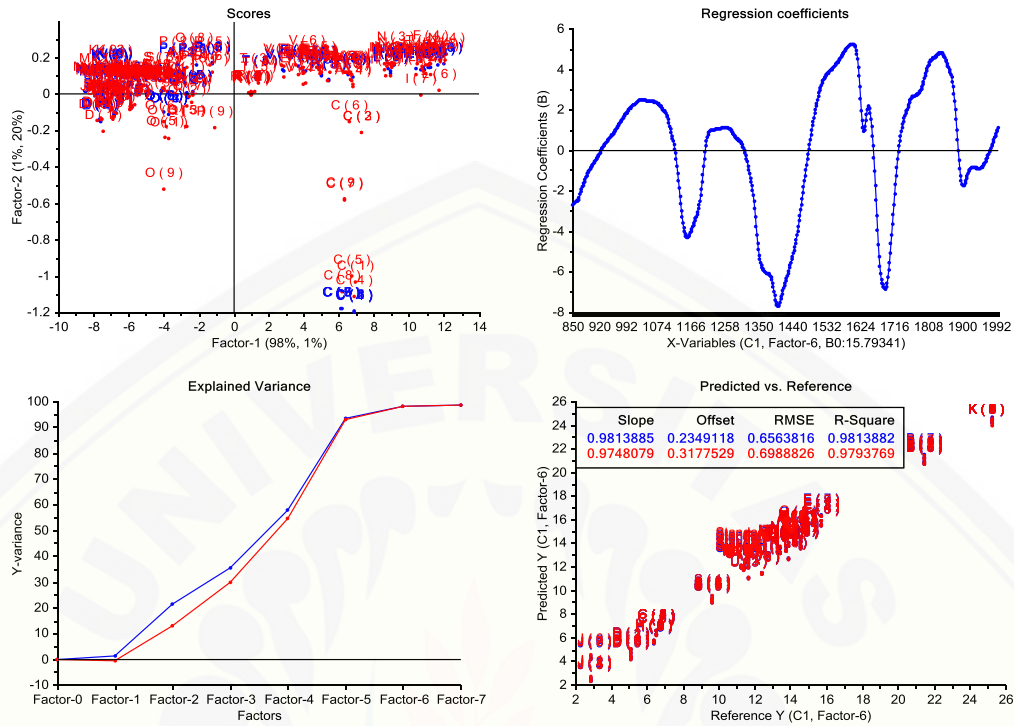


**4.10.2 Grafik hasil kalibrasi sampel pada validasi LOOCV**

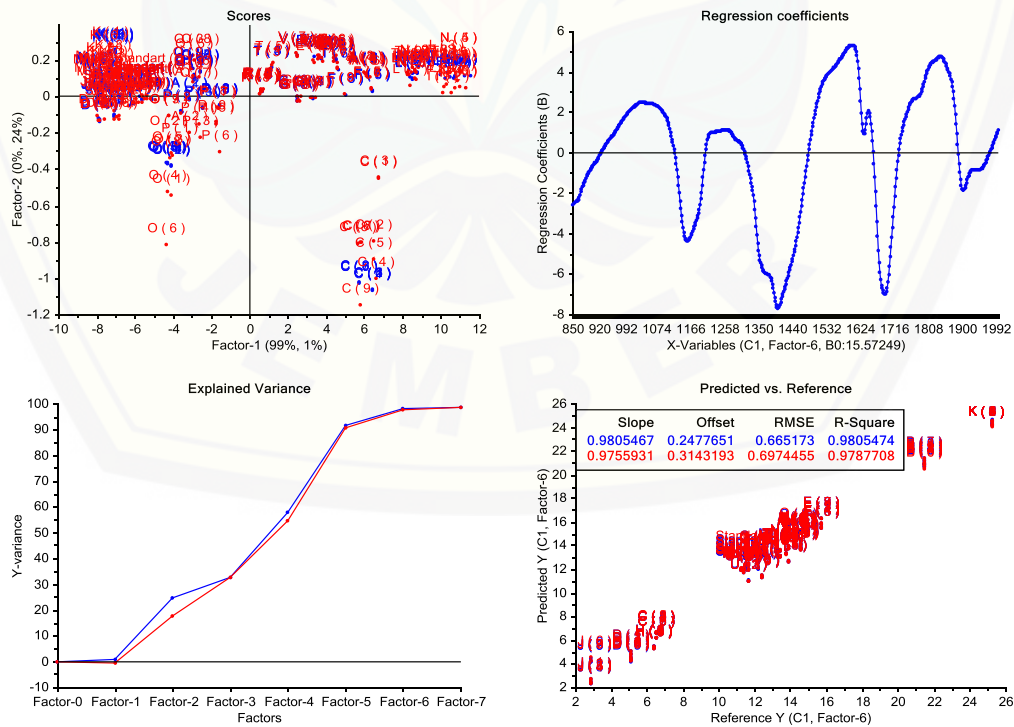
**a. LOOCV1**



b. LOOCV2

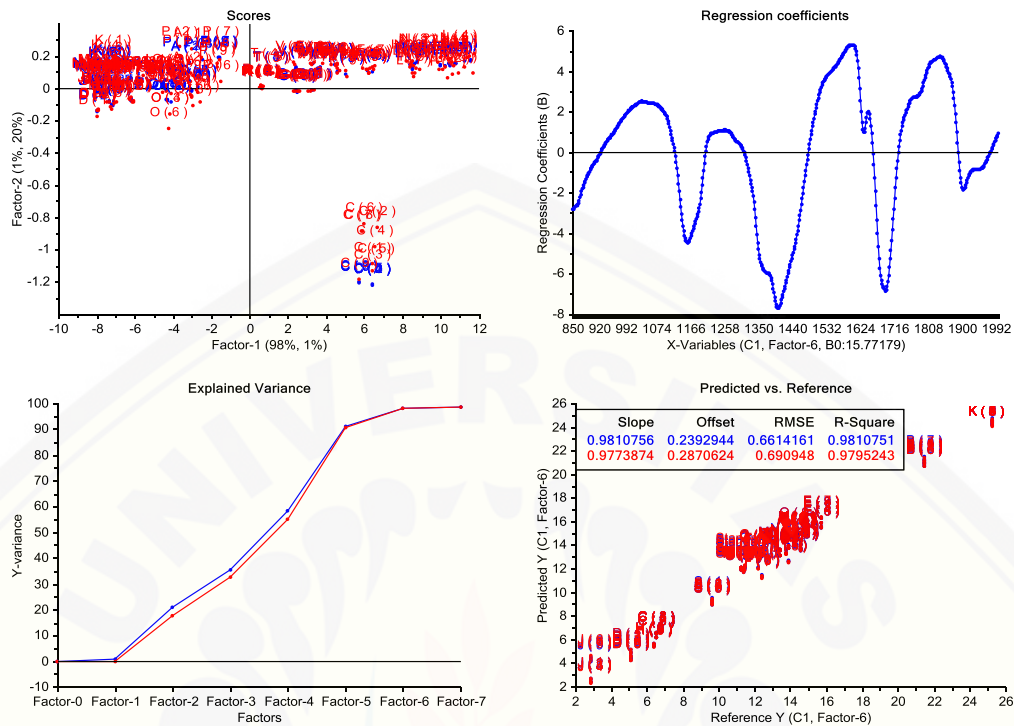


c. LOOCV3





d. LOOCV4



Lampiran 4.11 Data Hasil Prediksi Sampel pada Model Kalibrasi

4.11.1 Prediksi IC<sub>50</sub> Sampel pada *Training Set*

	Predicted	Deviation	Reference
Standart ( 1 )	13.2438	1.0605	11.4329
Standart ( 2 )	13.1838	1.0894	11.4329
Standart ( 3 )	12.9726	0.8640	11.4329
Standart ( 4 )	12.9910	0.8746	11.4329
Standart ( 5 )	12.3046	1.0606	11.4329
Standart ( 6 )	12.2824	1.0623	11.4329
Standart ( 7 )	12.1779	1.1050	11.4329
Standart ( 8 )	12.1875	1.0972	11.4329
Standart ( 9 )	12.0897	1.1457	11.4329

	Predicted	Deviation	Reference
A ( 1 )	14.9265	0.6203	14.3112
A ( 2 )	14.7148	0.6336	14.3112
A ( 3 )	14.8845	0.2213	14.3112
A ( 4 )	14.8360	0.2159	14.3112
A ( 5 )	14.7873	0.2270	14.3112
A ( 6 )	14.7433	0.2463	14.3112
A ( 7 )	14.7243	0.2427	14.3112
A ( 8 )	14.7120	0.2105	14.3112
A ( 9 )	14.7113	0.1895	14.3112

	Predicted	Deviation	Reference
B ( 1 )	21.1212	0.7842	21.4388
B ( 2 )	20.9069	0.7681	21.4388
B ( 3 )	20.8814	0.8173	21.4388
B ( 4 )	20.8638	0.7397	21.4388
B ( 5 )	20.6986	0.7662	21.4388
B ( 6 )	20.6687	0.7678	21.4388
B ( 7 )	21.4165	0.7750	21.4388
B ( 8 )	21.2948	0.7507	21.4388
B ( 9 )	21.1646	0.7596	21.4388

	Predicted	Deviation	Reference
C ( 1 )	6.5304	0.6085	6.5602
C ( 2 )	6.6127	0.5927	6.5602
C ( 3 )	6.5757	0.5985	6.5602
C ( 4 )	6.5846	0.6054	6.5602
C ( 5 )	6.5528	0.5991	6.5602
C ( 6 )	6.1753	0.3675	6.5602
C ( 7 )	6.1836	0.3635	6.5602
C ( 8 )	6.2059	0.3711	6.5602
C ( 9 )	6.1921	0.3782	6.5602

	Predicted	Deviation	Reference
D ( 1 )	5.1134	0.6638	5.1067
D ( 2 )	4.9943	0.6587	5.1067
D ( 3 )	4.8182	0.6692	5.1067
D ( 4 )	4.6809	0.6755	5.1067
D ( 5 )	4.5202	0.6579	5.1067
D ( 6 )	4.4015	0.6726	5.1067
D ( 7 )	4.4275	0.6937	5.1067
D ( 8 )	4.3041	0.6943	5.1067
D ( 9 )	4.2329	0.7030	5.1067

	Predicted	Deviation	Reference
E ( 1 )	15.8814	0.3026	15.6986
E ( 2 )	15.8645	0.3005	15.6986
E ( 3 )	15.8833	0.3085	15.6986
E ( 4 )	15.6119	0.3147	15.6986
E ( 5 )	15.5132	0.3011	15.6986
E ( 6 )	15.4804	0.3076	15.6986
E ( 7 )	16.3459	0.3819	15.6986
E ( 8 )	16.3180	0.3801	15.6986
E ( 9 )	16.3101	0.3853	15.6986

	Predicted	Deviation	Reference
F ( 1 )	13.1553	0.2449	12.4029
F ( 2 )	13.0952	0.2298	12.4029
F ( 3 )	13.0773	0.2789	12.4029
F ( 4 )	13.1105	0.2769	12.4029
F ( 5 )	11.4463	0.5454	12.4029
F ( 6 )	11.3614	0.5360	12.4029
F ( 7 )	11.2617	0.5021	12.4029
F ( 8 )	11.3674	0.6392	12.4029
F ( 9 )	11.3183	0.6323	12.4029

	Predicted	Deviation	Reference
G ( 1 )	13.4240	0.8883	12.1812
G ( 2 )	13.3502	0.8679	12.1812
G ( 3 )	13.2917	0.8546	12.1812
G ( 4 )	13.2133	0.8387	12.1812
G ( 5 )	12.6798	0.9474	12.1812
G ( 6 )	12.6086	0.9484	12.1812
G ( 7 )	12.5321	0.9206	12.1812
G ( 8 )	12.0662	0.8615	12.1812
G ( 9 )	12.0231	0.8714	12.1812

	Predicted	Deviation	Reference
H ( 1 )	5.5111	0.4922	6.3740
H ( 2 )	5.5013	0.5572	6.3740
H ( 3 )	5.4951	0.5449	6.3740
H ( 4 )	5.5439	0.4481	6.3740
H ( 5 )	5.6138	0.5444	6.3740
H ( 6 )	5.5210	0.5599	6.3740
H ( 7 )	5.4791	0.5227	6.3740
H ( 8 )	5.4728	0.4869	6.3740
H ( 9 )	5.3992	0.5188	6.3740

	Predicted	Deviation	Reference
I ( 1 )	15.1168	0.3375	14.5909
I ( 2 )	15.0336	0.3652	14.5909
I ( 3 )	15.0392	0.3547	14.5909
I ( 4 )	13.7144	0.2796	14.5909
I ( 5 )	13.7003	0.2781	14.5909
I ( 6 )	13.6930	0.2880	14.5909
I ( 7 )	14.0783	0.2788	14.5909
I ( 8 )	14.1156	0.2352	14.5909
I ( 9 )	14.1065	0.2433	14.5909

	Predicted	Deviation	Reference
J ( 1 )	2.7567	0.6589	2.8965
J ( 2 )	2.6078	0.6781	2.8965
J ( 3 )	2.4576	0.7000	2.8965
J ( 4 )	2.4114	0.7140	2.8965
J ( 5 )	2.3765	0.7105	2.8965
J ( 6 )	4.5177	0.4673	2.8965
J ( 7 )	4.3629	0.5065	2.8965
J ( 8 )	4.2815	0.4900	2.8965

	Predicted	Deviation	Reference
K ( 1 )	24.4231	0.6532	25.2708
K ( 2 )	24.2951	0.6930	25.2708
K ( 3 )	24.2482	0.6930	25.2708
K ( 4 )	24.1887	0.7130	25.2708
K ( 5 )	24.7524	0.5977	25.2708
K ( 6 )	24.6354	0.6229	25.2708
K ( 7 )	24.5958	0.6479	25.2708
K ( 8 )	24.5338	0.6783	25.2708
K ( 9 )	24.4492	0.6688	25.2708

	Predicted	Deviation	Reference
L ( 1 )	13.6443	0.2016	13.7304
L ( 2 )	13.6542	0.2030	13.7304
L ( 3 )	13.6773	0.2230	13.7304
L ( 4 )	13.3163	0.2866	13.7304
L ( 5 )	13.3050	0.2885	13.7304
L ( 6 )	13.3436	0.2882	13.7304
L ( 7 )	13.3725	0.2032	13.7304
L ( 8 )	13.3467	0.2035	13.7304
L ( 9 )	13.3205	0.1935	13.7304

	Predicted	Deviation	Reference
M ( 1 )	13.6783	1.3512	13.2717
M ( 2 )	13.6049	1.3527	13.2717
M ( 3 )	13.5331	1.3554	13.2717
M ( 4 )	13.1842	1.3482	13.2717
M ( 5 )	13.1769	1.3551	13.2717
M ( 6 )	13.1100	1.3530	13.2717
M ( 7 )	13.4104	1.3627	13.2717
M ( 8 )	13.2836	1.3673	13.2717
M ( 9 )	13.1991	1.3756	13.2717

	Predicted	Deviation	Reference
N (1)	13.7869	0.3026	13.8928
N (2)	13.7434	0.3035	13.8928
N (3)	13.7422	0.3075	13.8928
N (4)	12.6225	0.3938	13.8928
N (5)	12.6317	0.3848	13.8928
N (6)	12.6921	0.3684	13.8928
N (7)	13.9802	0.2463	13.8928
N (8)	13.9689	0.2532	13.8928
N (9)	14.0042	0.2511	13.8928

	Predicted	Deviation	Reference
O (1)	11.9274	0.5491	11.3854
O (2)	11.8819	0.5485	11.3854
O (3)	11.8963	0.5522	11.3854
O (4)	11.8302	0.5690	11.3854
O (5)	12.0305	0.5704	11.3854
O (6)	11.9465	0.5445	11.3854
O (7)	11.8439	0.5370	11.3854
O (8)	11.8040	0.5382	11.3854
O (9)	11.6953	0.5675	11.3854

	Predicted	Deviation	Reference
P (1)	14.1430	0.8643	14.5544
P (2)	14.0176	0.8719	14.5544
P (3)	14.4156	0.7090	14.5544
P (4)	14.3364	0.7134	14.5544
P (5)	13.7708	0.6475	14.5544
P (6)	13.6755	0.6524	14.5544
P (7)	13.6934	0.6133	14.5544
P (8)	13.5775	0.6262	14.5544
P (9)	13.5797	0.6267	14.5544

	Predicted	Deviation	Reference
Q (1)	14.8604	0.8770	14.4426
Q (2)	14.8874	0.8548	14.4426
Q (3)	14.8813	0.8328	14.4426
Q (4)	14.8388	0.8373	14.4426
Q (5)	14.8675	0.8132	14.4426
Q (6)	14.7637	0.8152	14.4426
Q (7)	14.7538	0.7929	14.4426
Q (8)	14.8054	0.7687	14.4426
Q (9)	15.3413	0.8003	14.4426

	Predicted	Deviation	Reference
R (1)	12.0655	0.7900	11.2331
R (2)	12.0282	0.7698	11.2331
R (3)	11.9866	0.7845	11.2331
R (4)	11.9923	0.7952	11.2331
R (5)	11.9203	0.7763	11.2331
R (6)	12.0655	0.7900	11.2331
R (7)	12.0282	0.7698	11.2331
R (8)	11.9866	0.7845	11.2331
R (9)	11.9203	0.7763	11.2331

	Predicted	Deviation	Reference
S (1)	9.5322	0.5844	9.6596
S (2)	9.3823	0.6410	9.6596
S (3)	9.2779	0.7640	9.6596
S (4)	9.2586	0.6798	9.6596
S (5)	9.2189	0.6306	9.6596
S (6)	9.1076	0.6381	9.6596
S (7)	9.0867	0.6169	9.6596
S (8)	9.0438	0.6049	9.6596
S (9)	8.9799	0.6394	9.6596

	Predicted	Deviation	Reference
T (1)	13.6196	0.2079	13.3979
T (2)	13.6017	0.2125	13.3979
T (3)	13.1771	0.8440	13.3979
T (4)	13.1594	0.8423	13.3979
T (5)	13.1430	0.8330	13.3979
T (6)	13.5536	0.5467	13.3979
T (7)	13.5987	0.4910	13.3979
T (8)	13.1417	0.2003	13.3979
T (9)	13.1562	0.1803	13.3979

	Predicted	Deviation	Reference
U (1)	11.0872	0.4796	11.6766
U (2)	11.0282	0.4942	11.6766
U (3)	10.9628	0.4984	11.6766
U (4)	12.0175	0.5608	11.6766
U (5)	11.9924	0.6240	11.6766
U (6)	11.8815	0.6322	11.6766
U (7)	12.5511	0.5646	11.6766
U (8)	12.4548	0.6089	11.6766
U (9)	12.3089	0.5385	11.6766

	Predicted	Deviation	Reference
V (1)	14.5898	0.4944	14.3517
V (2)	14.6012	0.5010	14.3517
V (3)	14.5903	0.5113	14.3517
V (4)	14.9996	0.5280	14.3517
V (5)	14.9560	0.5344	14.3517
V (6)	14.8743	0.5025	14.3517
V (7)	14.6760	0.6102	14.3517
V (8)	14.6961	0.6353	14.3517
V (9)	14.6399	0.6288	14.3517



#### 4.11.2 Prediksi $IC_{50}$ Sampel pada *Test Set/Validasi 2-Fold Cross Validation*

	Predicted	Deviation	Reference
W ( 1 )	10.5395	1.6233	10.3692
W ( 2 )	10.4069	1.6187	10.3692
W ( 3 )	10.3795	1.6241	10.3692
W ( 4 )	9.7072	1.7612	10.3692
W ( 5 )	9.6686	1.7569	10.3692
W ( 6 )	9.6628	1.7582	10.3692
W ( 7 )	9.5500	1.4661	10.3692
W ( 8 )	9.5956	1.4566	10.3692
W ( 9 )	9.6491	1.4491	10.3692
X ( 1 )	15.8807	1.8639	15.6759
X ( 2 )	15.7400	1.8989	15.6759
X ( 3 )	15.7587	1.8795	15.6759
X ( 4 )	15.8436	1.9183	15.6759
X ( 5 )	15.7426	1.9400	15.6759
X ( 6 )	15.6536	1.9321	15.6759
X ( 7 )	15.5790	1.8852	15.6759
X ( 8 )	15.4417	1.8630	15.6759
X ( 9 )	15.4008	1.8889	15.6759
Y ( 1 )	22.2692	2.1181	21.3801
Y ( 2 )	22.2036	2.1315	21.3801
Y ( 3 )	22.3471	2.0966	21.3801
Y ( 4 )	21.4512	1.8274	21.3801
Y ( 5 )	21.4136	1.8367	21.3801
Y ( 6 )	21.4221	1.8423	21.3801
Y ( 7 )	21.2807	1.5607	21.3801
Y ( 8 )	21.3184	1.5493	21.3801
Y ( 9 )	21.2455	1.5985	21.3801
Z ( 1 )	9.8142	0.6266	9.1802
Z ( 2 )	9.7083	0.6082	9.1802
Z ( 3 )	9.6838	0.6071	9.1802
Z ( 4 )	9.6550	0.6301	9.1802
Z ( 5 )	9.5857	0.6053	9.1802
Z ( 6 )	9.4262	0.5694	9.1802
Z ( 7 )	9.5035	0.5606	9.1802
Z ( 8 )	9.4608	0.5621	9.1802
Z ( 9 )	9.4165	0.5759	9.1802

4.11.3 Prediksi IC<sub>50</sub> Sampel pada Sampel Nyata

	Predicted	Deviation
AA ( 1 )	11.1625	0.7206
AA ( 2 )	11.0217	0.6943
AA ( 3 )	10.9114	0.6807
AA ( 4 )	11.2807	0.5354
AA ( 5 )	11.2389	0.5276
AA ( 6 )	11.1253	0.5396
AA ( 7 )	10.5909	0.5378
AA ( 8 )	10.5442	0.5345
AA ( 9 )	10.4835	0.5291
AB ( 1 )	12.5317	1.6793
AB ( 2 )	12.6528	1.6587
AB ( 3 )	12.6498	1.6999
AB ( 4 )	12.5308	1.5645
AB ( 5 )	12.5244	1.5537
AB ( 6 )	12.5154	1.5300
AB ( 7 )	12.7191	1.5815
AB ( 8 )	12.7165	1.5948
AB ( 9 )	12.7056	1.6142
AC ( 1 )	12.5945	1.3855
AC ( 2 )	12.5143	1.3893
AC ( 3 )	12.5334	1.4070
AC ( 4 )	12.5247	1.4242
AC ( 5 )	12.5056	1.4192
AC ( 6 )	12.5484	1.2511
AC ( 7 )	12.4956	1.2468
AC ( 8 )	12.5627	1.2612
AC ( 9 )	12.4604	1.2626

Lampiran 4.12 Contoh Perhitungan IC<sub>50</sub> Hasil Prediksi NIR Pada Sampel Nyata dengan Kode AA

$$\begin{aligned}\text{Nilai IC}_{50} &= 11,1625 \mu\text{g/mL} \times 100 \\ &= 1116,25 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

Replikasi	Konsentrasi (μg/mL)	Rata-rata (μg/mL)	Rata-rata IC <sub>50</sub> (μg/mL)	SD	%RSD
Replikasi 1	1116,25	1103,187	1092,879	31,276	2,862
	1102,17				
	1091,14				
	1128,07				
Replikasi 2	1123,89	1121,497	1092,879	31,276	2,862
	1112,53				
	1059,09				
	1054,42				
Replikasi 3	1054,42	1053,953			
	1048,35				



## Lampiran 4.13 Hasil Analisis dengan SPSS

## 4.14.1 Sampel Nyata Kode AA

## Uji Normalitas

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nir	.283	3	.	.935	3	.506
uvvis	.326	3	.	.874	3	.307

a. Lilliefors Significance Correction

## Uji T Berpasangan

## Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	nir	1.09288E3	3	34.931921	20.167954
	uvvis	9.35361E2	3	6.732580	3.887057

## Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	nir & uvvis	3	-.588	.600

## Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	99% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	nir - uvvis	1.575180E2	39.267844	22.671300	-67.491099	382.527099	6.948	2	.020

### 4.14.2 Sampel Nyata Kode AB

#### Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nir	.187	3	.	.998	3	.917
uvvis	.216	3	.	.989	3	.797

a. Lilliefors Significance Correction

#### Uji T Berpasangan

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	nir	1.26162E3	3	9.519081	5.495844
	uvvis	1.23968E3	3	23.556521	13.600364

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	nir & uvvis	3	.624	.571

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	99% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	nir - uvvis	2.194200E1	19.123076	11.040713	-87.635345	131.519345	1.987	2	.185

### 4.14.3 Sampel Nyata Kode AC

#### Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nir	.177	3	.	1.000	3	.969
uvvis	.260	3	.	.958	3	.607

a. Lilliefors Significance Correction

#### Uji T Berpasangan

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 nir	1.25266E3	3	2.058777	1.188635
uvvis	1.17335E3	3	10.970701	6.333937

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 nir & uvvis	3	.297	.808

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	99% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 nir - uvvis	7.931400E1	10.544170	6.087680	18.894734	139.733266	13.029	2	.006