



**AKTIVITAS ANTIAMILASE DAN ANTIOKSIDAN INFUSA
DAUN JATI BELANDA (*Guazuma ulmifolia* Lam.)**

SKRIPSI

Oleh:

Khoirun Nisak

NIM 162210101079

BAGIAN BIOLOGI FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**AKTIVITAS ANTIAMILASE DAN ANTIOKSIDAN INFUSA
DAUN JATI BELANDA (*Guazuma ulmifolia* Lam.)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Khoirun Nisak

NIM 162210101079

BAGIAN BIOLOGI FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Khoiroh Umatin dan ayahanda Suhadak tercinta, atas segala kesabaran, kerja keras, kasih sayang, dan dukungan yang selama ini telah dicurahkan kepada penulis;
2. Kakak Uswatun Hasanah yang senantiasa memberi semangat, nasihat, serta do'a;
3. Bapak/Ibu guru yang telah membimbing dan memberikan ilmunya sedari penulis di bangku TK Dharma Wanita Kepuharum, SD Negeri Kepuharum, SMP Negeri 3 Kutorejo, SMA Negeri 1 Kutorejo, serta Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember;
4. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”
(Al-Insyirah 94:6)



• Ali, Maulana Muhammad. 2015. *Qur'an Suci Terjemahan dan Tafsir*.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Khoirun Nisak

NIM : 162210101079

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Aktivitas Antiamilase dan Antioksidan Infusa Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lam.)" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Januari 2020

Yang menyatakan,



Khoirun Nisak

NIM 162210101079

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIAMILASE DAN ANTIOKSIDAN INFUSA DAUN JATI
BELANDA (*Guazuma ulmifolia* Lam.)**

Oleh:
Khoirun Nisak
NIM 162210101079

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Nuri, S.Si., M.Si., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Aktivitas Antiamilase dan Antioksidan Infusa Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lam.)" karya Khoirun Nisak telah diuji dan disahkan pada:

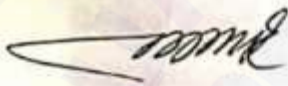
hari, tanggal : Senin, 20 Januari 2020

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,



Nuri, S.Si., Apt., M.Si.
NIP. 196904122001121007



Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198107232006042002

Tim Penguji

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,



Moch. Amrun Hidayat, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP. 197801262001121004



Indah Yulia N, S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP. 198407122008122002

Mengesahkan
Fakultas Farmasi Universitas Jember,



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

RINGKASAN

Aktivitas Antiamilase dan Antioksidan Infusa Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lam.): Khoirun Nisak; 162210101079; 2020; 93 halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Tanaman Jati belanda (*Guazuma ulmifolia*) merupakan salah satu tanaman berkhasiat obat di Indonesia yang masih digunakan sebagai obat tradisional. Daun Jati belanda secara tradisional dapat digunakan sebagai pelangsing tubuh (antiobesitas). Pada umumnya, masyarakat membuat obat tradisional dalam bentuk rebusan dan infusa dengan menggunakan pelarut air. Infusa daun Jati belanda dilaporkan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan triterpenoid (Sukandar dkk., 2009). Polifenol seperti flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan enzim α -amilase (Piparo dkk., 2008) dan antioksidan (Heim dkk., 2002).

Senyawa polifenol dilaporkan dapat dimanfaatkan sebagai antiobesitas dan antidiabetes (Saad dkk., 2017). Penghambatan terhadap enzim α -amilase dapat digunakan sebagai agen antiobesitas dan antidiabetes melalui penghambatan pemecahan polisakarida menjadi oligosakarida, sehingga akumulasi lemak berlebih dan peningkatan glukosa plasma dalam tubuh dapat dicegah. Adanya gugus hidroksil spesifik pada posisi C7 dan/ atau R4' serta ikatan terkonjugasi pada polifenol seperti flavonoid dilaporkan mampu membentuk ikatan hidrogen serta menstabilkan interaksi dengan residu katalitik enzim (Piparo dkk., 2008). Flavonoid (inhibitor) akan berikatan dengan enzim α -amilase sehingga proses pemecahan polisakarida menjadi glukosa dapat dicegah. Selain itu, adanya gugus hidroksil pada posisi C3' dan C4' dalam cincin B flavonoid dilaporkan berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan karena dapat menyumbangkan hidrogen ke radikal bebas membentuk radikal flavonoid yang stabil (Heim dkk., 2002). Aktivitas antioksidan dilaporkan dapat mencegah terjadinya lipotoksisitas lemak, dimana lipotoksisitas tersebut dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan disfungsi reseptor insulin yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya hiperglikemia (Siddiqui, 2018).

Sebagaimana yang telah disebutkan, infusa daun Jati belanda dilaporkan mengandung polifenol seperti flavonoid (Sukandar dkk., 2009). Polifenol seperti flavonoid pada infusa daun Jati belanda diduga memiliki aktivitas penghambatan α -amilase dan antioksidan. Penelitian penghambatan enzim α -amilase (antiamilase) dan antioksidan belum pernah dilakukan. Oleh sebab itu, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antiamilase dan antioksidan, serta penetapan kadar fenol dan flavonoid total infusa daun Jati belanda *in vitro*.

Pada penelitian ini, sampel daun Jati belanda diekstraksi dengan menggunakan metode infusa. Filtrat yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan *freeze-dry* sehingga diperoleh ekstrak kering infusa daun jati belanda. Rendemen yang diperoleh yaitu sebesar 8,957%. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian aktivitas penghambatan enzim α -amilase, antioksidan, penetapan kadar fenol dan flavonoid total infusa daun Jati belanda. Hasil penelitian aktivitas penghambatan enzim α -amilase pada kontrol positif akarbose dan infusa memiliki nilai IC_{50} berturut-turut yaitu $3,609 \pm 0,383$ $\mu\text{g/mL}$ dan $261,030 \pm 6,829$ $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas antioksidan kontrol positif kuersetin dan infusa memiliki nilai IC_{50} berturut-turut yaitu $1,945 \pm 0,021$ $\mu\text{g/mL}$ dan $6,853 \pm 0,504$ $\mu\text{g/mL}$ dengan kategori yang sangat aktif. Kadar fenol dan flavonoid total infusa daun jati belanda berturut-turut sebesar $40,773 \pm 2,504$ mg GAE/g infusa dan $46,203 \pm 2,449$ mg QE/g infusa.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ Aktivitas Antiamilase dan Antioksidan Infusa Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lam.)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penulis menyadari dan mengakui bahwa terselesaikannya skripsi ini tidak lepas dari upaya, do'a, arahan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt. atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Dosen Pembimbing Akademik, Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt. yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
3. Bapak Nuri, S.Si., M.Si., Apt. dan Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatiannya kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
4. Bapak M. Amrun H., S.Si., M.Farm., Apt. dan Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan saran dalam penulisan skripsi ini;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi yang telah memberikan ilmu, seluruh civitas akademi Fakultas Farmasi atas bantuannya, terkhusus Ibu Widi dan Ibu Parka selaku teknisis Laboratorium Biologi Farmasi yang secara senang hati berkenan untuk membantu dan memberikan saran selama proses penelitian;
6. Orang tua tercinta ibunda Khoiroh Umatin dan ayahanda Suhadak yang senantiasa memberi do'a, kasih sayang, dukungan, dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis. Kakak Uswatun Hasanah dan seluruh keluarga besar penulis yang selalu menjadi penyemangat bagi penulis;
7. Sahabat tercinta Jihan, Ragil, Nargiss, dan Dimas yang senantiasa memberi dukungan serta berkenan kebersamai dalam suka dan duka;

8. Teman-teman seperjuangan satu tim skripsi (Nargis, Yolanda, Ayunil, dan Miyah) yang telah kebersamai dalam mengukir banyak kenangan dan pengalaman manis maupun pahit saat penelitian, yang dengan ikhlas dan sabar berkenan menjadi sandaran dalam berkeluh kesah selama penyelesaian skripsi ini;
9. Keluarga kos yang telah menjadi keluarga dan rumah kedua bagi penulis selama di perantauan;
10. Teman-teman KKN 284 (Taufik, Dimas, Doni, Riski, Imrotul, Wulan, Sari, Diah, dan Sinta) serta seluruh warga Desa Watupanjang yang sudah memberikan keceriaan, dukungan, dan pengalaman yang sangat berarti bagi penulis;
11. BPH dan Kepala Divisi UKKI Asy-Syifa' 2019 Farmasi Universitas Jember yang telah menjadi rekan berorganisasi dengan begitu banyak pengalaman dan kenangan;
12. Teman-teman seperjuangan Kelas A dan Morfin angkatan 2016 Fakultas Farmasi Universitas Jember;
13. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

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

Jember, 20 Januari 2020

Penulis

DAFTAR ISI

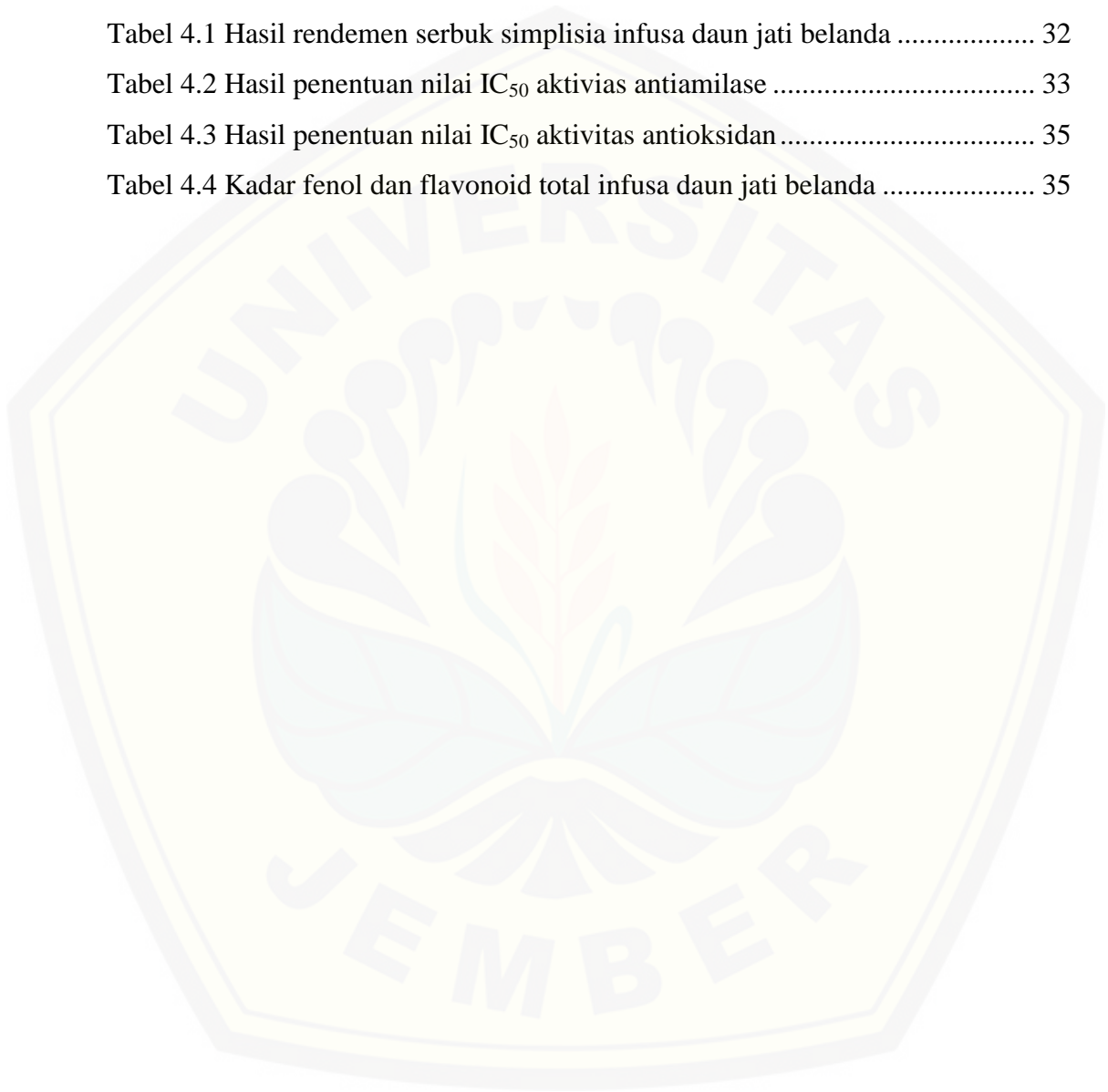
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR PERSAMAAN	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Jati Belanda	5
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Jati Belanda	5
2.1.2 Morfologi Jati Belanda	5
2.1.3 Kandungan dan Manfaat Jati Belanda	6
2.2 Tinjauan Fenol dan Flavonoid	7
2.2.1 Fenol	7
2.2.2 Flavonoid	8
2.3 Tinjauan Enzim -Amilase	9
2.3.1 Enzim -amilase	9
2.3.2 Pengujian Aktivitas Antiamilase	10
2.3.3 Hubungan Polifenol dan Flavonoid dengan Aktivitas -amilase	10

2.4 Tinjauan Oksidan dan Antioksidan.....	12
2.4.1 Oksidan	12
2.4.2 Antioksidan.....	12
2.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	13
2.4.4 Hubungan Polifenol dan Flavonoid dengan Aktivitas Antioksidan	14
2.5 Tinjauan Obesitas dan Diabetes Melitus.....	14
2.5.1 Pengertian Obesitas dan Diabetes Melitus	14
2.5.2 Patofisiologi terjadinya Obesitas dan Diabetes Melitus	15
2.5.3 -amilase dan Obesitas	16
2.5.4 Obesitas dan Stres Oksidatif.....	16
2.5.5 Mekanisme Pembentukan Radikal Bebas pada Obesitas	17
2.5.6 Obesitas dan Kapasitas Antioksidan	18
2.5.7 Hubungan Polifenol dengan Metabolisme Karbohidrat dan Homeostasis Glukosa	18
2.6 Tinjauan Infusa.....	19
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	21
3.1 Jenis Penelitian.....	21
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
3.3 Variabel Penelitian	21
3.3.1 Variabel Bebas.....	21
3.3.2 Variabel Terikat.....	21
3.3.3 Variabel Terkendali	21
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	22
3.4.1 Alat	22
3.4.2 Bahan	22
3.5 Rancangan Penelitian.....	22
3.5.1 Definisi Operasional	22
3.5.2 Rancangan Percobaan.....	23
3.5.3 Alur Penelitian.....	23
3.6 Prosedur Penelitian	23
3.6.1 Determinasi Tanaman Jati Belanda	23
3.6.2 Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Jati Belanda.....	23

3.6.3 Pembuatan Infusa Daun Jati Belanda	25
3.6.4 Pengujian Aktivitas Antiamilase	25
3.6.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan Infusa Daun Jati Belanda.....	28
3.6.6 Penetapan Kadar Fenol dan Flavonoid Total	29
3.7 Analisis Data	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Determinasi Daun Jati Belanda.....	32
4.2 Ekstraksi Daun Jati Belanda	32
4.3 Aktivitas Antiamilase	33
4.4 Aktivitas Antioksidan.....	33
4.5 Kadar Fenol dan Flavonoid Total Infusa Daun Jati Belanda	35
BAB 5. PENUTUP.....	38
5.1 Kesimpulan.....	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan senyawa flavonoid dan asam fenolat daun jati belanda.....	7
Tabel 2.2 Nilai IC_{50} dan persentase penghambatan α -amilase dari flavonoid.....	11
Tabel 3.1 Preparasi larutan uji aktivitas antiamilase.....	27
Tabel 4.1 Hasil rendemen serbuk simplisia infusa daun jati belanda	32
Tabel 4.2 Hasil penentuan nilai IC_{50} aktivitas antiamilase	33
Tabel 4.3 Hasil penentuan nilai IC_{50} aktivitas antioksidan.....	35
Tabel 4.4 Kadar fenol dan flavonoid total infusa daun jati belanda	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi daun jati belanda	6
Gambar 2.2 Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh polifenol	7
Gambar 2.3 Reaksi reagen folin-cioucalteu dengan senyawa fenol	8
Gambar 2.4 Mekanisme reaksi uji kandungan flavonoid total	9
Gambar 2.5 Reaksi DNS dengan gula pereduksi	10
Gambar 2.6 Mekanisme reaksi radikal DPPH dengan antioksidan	13
Gambar 2.7 Hubungan antara obesitas dan diabetes melitus	16
Gambar 2.8 Hubungan polifenol dengan metabolisme karbohidrat dan homeostasis glukosa	18
Gambar 4.1 Spektra larutan DPPH	34

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1 Perhitungan persentase inhibisi enzim -amilase.....27
Persamaan 3.2 Perhitungan nilai IC_{50} aktivitas penghambatan enzim -amilase.28
Persamaan 3.3 Perhitungan persentase peredaman DPPH.....29
Persamaan 3.4 Perhitungan nilai IC_{50} aktivitas antioksidan.....29



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 4.1 Hasil Determinasi <i>Guazuma ulmifolia</i>	44
Lampiran 4.2 Data Rendemen Infusa Daun Jati Belanda....	45
Lampiran 4.3 Pembuatan Dapar Fosfat, Reagen DNS, dan Enzim -amilase.....	46
Lampiran 4.4 Penentuan Panjang Gelombang 3,5-dinitrosalisilat.....	48
Lampiran 4.5 Perhitungan Larutan Uji Aktivitas Antiamilase.....	50
Lampiran 4.6 Data Absorbansi, % Penghambatan -amilase dan Persamaan Regresi.....	51
Lampiran 4.7 Pembuatan Larutan DPPH.....	57
Lampiran 4.8 Penentuan Panjang Gelombang DPPH dan Waktu Optimum Sampel dapat Bereaksi Sempurna dengan DPPH.....	58
Lampiran 4.9 Perhitungan Larutan Uji Aktivitas Antioksidan.....	62
Lampiran 4.10 Data Absorbansi Peredaman DPPH dan Persamaan Regresi.....	63
Lampiran 4.11 Perhitungan Bahan Penetapan Kadar Fenol Total Infusa Daun Jati Belanda.....	69
Lampiran 4.12 Perhitungan Kadar Fenol Total Infusa Daun Jati Belanda.....	70
Lampiran 4.13 Contoh Perhitungan Penetapan Kadar Fenol Total Infusa Daun Jati Belanda.....	72
Lampiran 4.14 Perhitungan Bahan Penetapan Kadar Flavonoid Total Infusa Daun Jati Belanda.....	73
Lampiran 4.15 Perhitungan Kadar Flavonoid Total Infusa Daun Jati Belanda.....	74
Lampiran 4.16 Contoh Perhitungan Penetapan Kadar Flavonoid Total Infusa Daun Jati Belanda.....	76

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman Jati belanda (*Guazuma ulmifolia*) merupakan satu dari sekian banyak tanaman berkhasiat obat yang masih banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia sebagai obat tradisional. Secara tradisional daun Jati belanda digunakan sebagai pelangsing tubuh (Suharmiati dan Maryani, 2003). Masyarakat pada umumnya melakukan perebusan menggunakan pelarut air dengan mempertimbangkan kepraktisan metode serta biaya yang rendah. Selain dalam bentuk rebusan, obat tradisional juga dapat dibuat dalam bentuk lain dengan prinsip yang sama dengan rebusan yaitu infusa. Pada infusa, penyarian dengan pelarut air dilakukan dalam waktu 15 menit pada suhu 90 °C (BPOM RI, 2012)

Selain secara tradisional dapat digunakan sebagai pelangsing tubuh, pada penelitian terbaru yang dilakukan oleh Rachmi (2016) dilaporkan bahwa daun Jati belanda memiliki aktivitas antidiabetes melalui penghambatan enzim -glukosidase. Penggunaan tradisional serta aktivitas farmakologis yang dihasilkan tentu didukung oleh kandungan kimia yang ada pada tanaman Jati belanda. Daun Jati belanda dilaporkan mengandung tanin, asam fenolat (asam klorogenat), dan flavonoid (rutin, kuersetin, dan luteolin) (Morais dkk., 2016). Selain itu, pada penelitian yang dilakukan oleh Sukandar dkk. (2009) dilaporkan bahwa ekstrak air (infusa) daun Jati belanda mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, steroid dan triterpenoid.

Senyawa polifenol dilaporkan berperan dalam mengatur metabolisme karbohidrat dan lipid, menurunkan hiperglikemia, dislipidemia, dan resistensi insulin, memperbaiki metabolisme jaringan adiposa serta menurunkan stres oksidatif pada proses inflamasi, sehingga adanya golongan polifenol dalam tanaman dapat dimanfaatkan sebagai antiobesitas dan antidiabetes (Saad dkk., 2017). Penghambatan terhadap enzim -amilase dapat digunakan sebagai agen antiobesitas dan antidiabetes melalui pencegahan pemecahan polisakarida menjadi oligosakarida sederhana, sehingga dapat menurunkan jumlah glukosa dan

akumulasi lemak berlebih didalam tubuh. Polifenol seperti flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -amilase (Piparo dkk., 2008), dan antioksidan (Heim dkk., 2002). Flavonoid memiliki gugus hidroksil spesifik pada posisi C7 dan/ atau R4' serta ikatan terkonjugasi sehingga dapat membentuk ikatan hidrogen dan menstabilkan interaksi antara inhibitor (flavonoid) dengan residu katalitik enzim. Selain itu, polifenol seperti asam klorogenat juga dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan enzim α -amilase melalui pembentukan struktur kuinon atau lakton atau senyawa yang memiliki struktur *4-oxo-pyrane*, sehingga dapat menghambat reaksi hidrolisis α -1,4-glikosida pada karbohidrat (Funke dan Melzig, 2005).

Flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan karena memiliki gugus hidroksil pada posisi C3' dan C4' dalam cincin B flavonoid yang dapat menyumbangkan hidrogen ke radikal bebas membentuk radikal flavonoid yang stabil. Selain itu, adanya ikatan rangkap C2-C3 yang terhubung dengan gugus karbonil pada posisi C4 dilaporkan berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan (Heim dkk., 2002). Aktivitas antioksidan dapat berperan sebagai antidiabetes melalui pencegahan lipotoksisitas sehingga dapat menghambat terjadinya stres oksidatif pada retikulum endoplasma dan mitokondria (Siddiqui, 2018). Jika stres oksidatif tersebut tidak dihambat, akibatnya pada jaringan adiposa dan non-adiposa mengalami disfungsi reseptor insulin dan terjadi resistensi insulin yang menyebabkan terjadinya diabetes melitus yang ditandai dengan hiperglikemia (Siddiqui, 2018). Dengan adanya kandungan polifenol seperti flavonoid pada daun Jati belanda, maka Jati belanda diduga memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -amilase (antiamilase) dan antioksidan.

Sebagaimana yang telah disebutkan, infusa daun Jati belanda dilaporkan mengandung polifenol seperti flavonoid (Sukandar dkk., 2009). Senyawa flavonoid diduga dapat menghambat aktivitas α -amilase dan aktivitas antioksidan. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Santos dkk. (2018) menunjukkan bahwa ekstrak air daun jati belanda dengan menggunakan metode ekstraksi berupa pemanasan pada suhu 80 °C selama 15 menit dengan pelarut air memiliki aktivitas antioksidan yang sangat aktif dengan nilai IC_{50} sebesar $39,9 \pm 8,8 \mu\text{g/mL}$. Namun

belum pernah dilakukan penelitian mengenai aktivitas penghambatan enzim - amilase (antiamilase) dan antioksidan infusa daun Jati belanda. Oleh sebab itu, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antiamilase dan antioksidan serta penetapan kadar fenol dan flavonoid total infusa daun Jati belanda *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah infusa daun jati belanda memiliki aktivitas antiamilase dan antioksidan?
2. Berapa kandungan fenol dan flavonoid total infusa daun jati belanda?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui aktivitas antiamilase dan antioksidan infusa daun jati belanda.
2. Mengetahui kandungan fenol dan flavonoid total infusa daun jati belanda.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi pengembangan alternatif pengobatan antiobesitas dan antidiabetes dari bahan alam dengan mekanisme penghambatan antiamilase.
2. Memberikan informasi tambahan pengembangan alternatif pengobatan antidiabetes dari bahan alam melalui mekanisme penghambatan reaksi radikal bebas (antioksidan).
3. Menjadi dasar pengembangan terapi pengobatan alami pada tanaman lain yang juga berpotensi memiliki aktivitas antiamilase dan antioksidan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Jati Belanda

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Jati Belanda

Berdasarkan USDA (2011), klasifikasi tanaman jati belanda adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: <i>Guazuma</i>
Spesies	: <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.
Sinonim	: <i>Guazuma tomentosa</i> Kunth

2.1.2 Morfologi Jati Belanda

Jati belanda merupakan pohon dengan tinggi 10 m sampai 20 m. Berdaun tunggal berwarna hijau, bentuk daun bulat telur sampai lanset dengan panjang helai daun 4 cm sampai 22,5 cm dan lebar daun 2 cm sampai 10 cm. Tepi daun bergerigi, ujung runcing, dan mempunyai pertulangan menyirip. Panjang tangkai daun 5 mm sampai 25 mm. Pangkal daun Jati belanda berlekuk, dengan permukaan daun kasar. Jati belanda mempunyai daun penumpu berbentuk lanset dengan panjang 3 cm sampai 6 cm. Morfologi daun Jati belanda dapat dilihat pada Gambar 2.1. Perbungaan jati belanda berupa mayang dengan panjang 2 cm sampai 4 cm, dan biasanya tumbuh di bagian ketiak daun. Panjang gagang bunga kurang lebih 5 mm; kelopak bunga kurang lebih 3 mm; dan mahkota bunga berwarna kuning dengan panjang 3 mm sampai 4 mm. Tabung benang sari berbentuk mangkuk dan bakal buah berambut dengan panjang buah 2 cm sampai 3,5 cm. Buah Jati belanda yang telah masak berwarna hitam (DepKes RI, 1978). Jati belanda mempunyai akar tunggang berwarna putih kecoklatan (BPOM RI, 2008).



Gambar 2.1 Morfologi daun Jati belanda (Sumber: BPOM RI, 2008)

2.1.3 Kandungan dan Manfaat Jati Belanda

Tanaman Jati belanda merupakan salah satu tanaman berkhasiat obat yang masih banyak digunakan masyarakat Indonesia sebagai obat tradisional. Rebusan daun jati belanda dapat digunakan untuk menurunkan berat badan (pelangsing). Biji tanaman ini dapat digunakan untuk menghentikan diare dan sebagai karminatif (Suharmiati dan Maryani, 2003).

Jati belanda memiliki aktivitas farmakologi sebagai antidiabetes (Rachmi, 2016), antikolesterol (Batubara dkk., 2017), antioksidan, antikolinesterase (Morais dkk., 2016). Kandungan senyawa kimia yang ada pada ekstrak etanol daun jati belanda adalah tanin, asam fenolat (asam klorogenat) dan flavonoid (rutin, kuersetin, dan luteolin). Senyawa yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan adalah asam klorogenat, kuersetin dan senyawa fenolik lainnya seperti rutin dan kuersitrin (Morais dkk., 2016). Persentase kandungan senyawa kimia dalam ekstrak etanol daun Jati belanda dapat dilihat pada Tabel 2.1. Penelitian yang dilakukan oleh Rachmadani (2001) menunjukkan bahwa serbuk kering daun Jati belanda mengandung senyawa steroid dan tanin. Sukandar dkk. (2009) melaporkan bahwa ekstrak air daun Jati belanda dapat menghambat peningkatan kadar kolesterol total dan LDL pada tikus jantan dengan dosis 50 mg/kg BB. Kandungan dalam ekstrak air tersebut adalah alkaloid, flavonoid, tanin dan steroid/ triterpenoid.

Tabel 2.1 Kandungan senyawa flavonoid dan asam fenolat daun Jati belanda

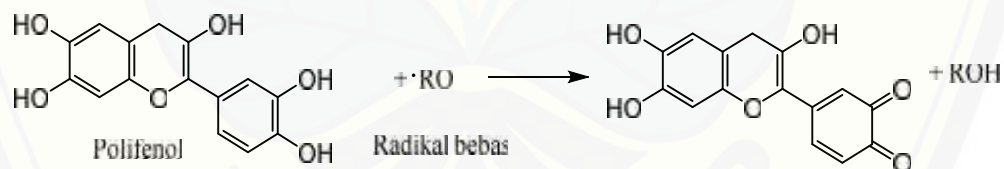
Senyawa	Kandungan (%)
Katekin	0,98
Asam klorogenat	2,53
Rutin	1,00
Kuersitrin	0,81
Kuersetin	2,15
Luteolin	0,46

Sumber: Morais dkk., 2016

2.2 Tinjauan Fenol dan Flavonoid

2.2.1 Fenol

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil terikat pada atom karbonnya. Senyawa fenolik yang memiliki banyak gugus fenol disebut sebagai senyawa polifenol. Gugus hidroksil pada senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogen sehingga berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan dan penangkapan radikal bebas (Tursiman dkk., 2012). Mekanisme antiradikal polifenol dapat dijelaskan pada Gambar 2.2.

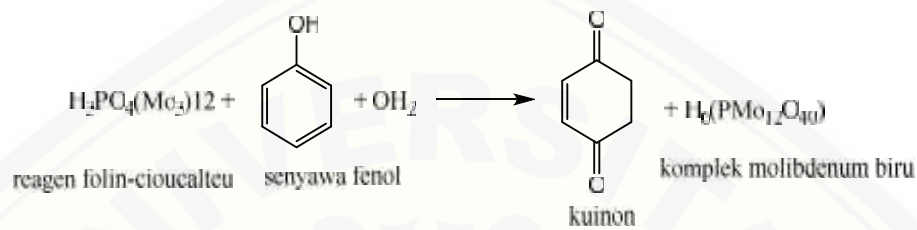


Gambar 2.2 Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh polifenol (Sumber: Kumar dan Pandey, 2013)

Senyawa polifenol dilaporkan berperan dalam mengatur metabolisme karbohidrat dan lipid; menurunkan hiperglikemia, dislipidemia, dan resistensi insulin; memperbaiki metabolisme jaringan adiposa; dan menurunkan stres oksidatif pada proses inflamasi. Selain itu, senyawa polifenol juga dapat mengurangi perkembangan komplikasi diabetes jangka panjang termasuk penyakit kardiovaskular, neuropati, nefropati, dan retinopati (Saad dkk., 2017).

Kadar fenol total dapat ditentukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Prinsip dasar metode ini adalah reaksi oksidasi reduksi kolorimetrik.

Senyawa fenolik akan bereaksi dengan oksidator fosfomolibdat dalam kondisi alkalis menghasilkan senyawa fenolat dan kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru (Adawiah dkk., 2015). Semakin banyak kandungan senyawa fenolik dalam sampel uji maka intensitas warna biru yang terbentuk akan semakin tinggi (Tursiman dkk., 2012). Reaksi reagen folin-cioucalteu dengan senyawa fenol membentuk kompleks molibdenum-tungsten dapat dilihat pada Gambar 2.3.



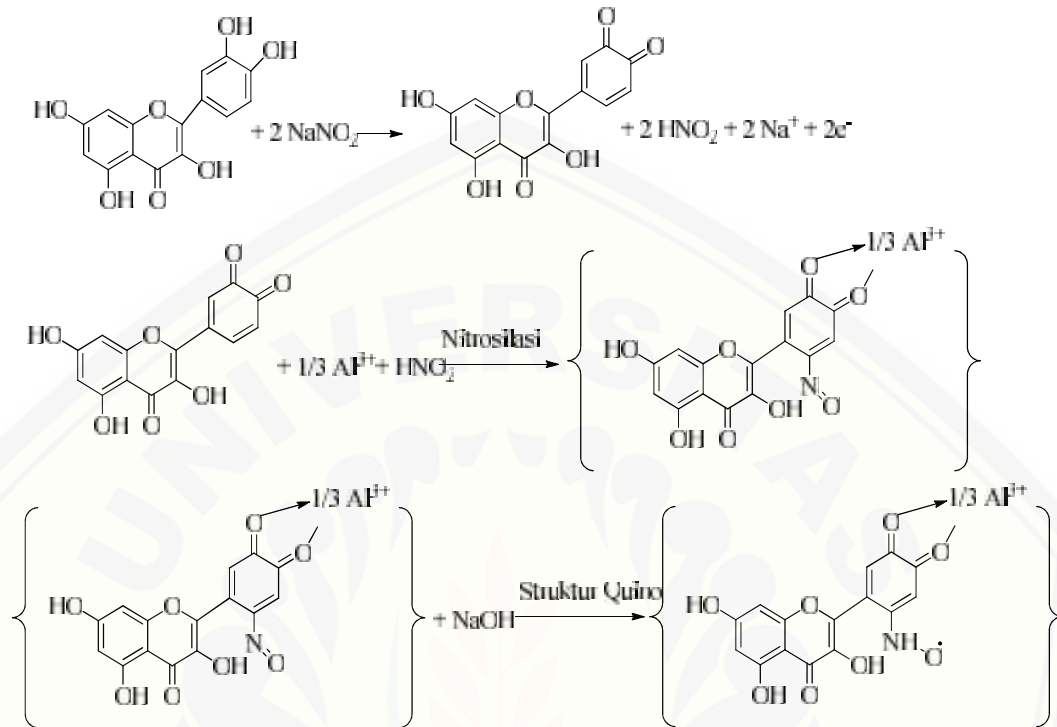
Gambar 2.3 Reaksi reagen folin-cioucalteu dengan senyawa fenol (Sumber: Singleton dan Rossi, 1965)

2.2.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa fenol yang tersusun oleh 15 atom karbon dengan konfigurasi $C_6-C_3-C_6$ (Kumar dan Pandey, 2013). Flavonoid dapat melindungi tubuh dari penyakit kardiovaskuler dan berbagai penyakit kronis lainnya, memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah, mengurangi kepekaan LDL terhadap pengaruh radikal bebas, dapat bersifat hipolipidemik, antiinflamasi dan antioksidan yang baik (Na'im, 2016). Saad dkk. 2015 melaporkan bahwa kandungan flavonoid pada teh hijau memiliki aktivitas antiobesitas dengan mekanisme menurunkan penyerapan lipid dan protein di usus sehingga mengurangi asupan kalori, dan mengaktifkan AMPK (*Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase*) dalam otot rangka, jaringan adiposa dan hati. Senyawa isoflavon pada kacang kedelai seperti genistein dan daidzein yang terdapat pada famili fabaceae bermanfaat dalam mencegah oksidasi dari partikel lipid dan mampu menurunkan resiko terjadinya aterosklerosis (Adawiah dkk., 2015).

Penetapan kadar flavonoid dalam suatu tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan reagen aluminium klorida ($AlCl_3$). Senyawa flavonoid akan bereaksi dengan reagen aluminium klorida membentuk kompleks senyawa quino

yang berwarna kuning (Zhu dkk., 2009). Mekanisme uji kandungan flavonoid total dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Mekanisme reaksi uji kandungan flavonoid total (Sumber: Zhu dkk., 2009)

2.3 Tinjauan Enzim -Amilase

2.3.1 Enzim -amilase

-amilase (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolase) merupakan salah satu produk sekretori utama kelenjar ludah dan pankreas (5–6%) yang berperan dalam proses hidrolisis pati dan glikogen. -amilase merupakan famili endoamilase yang mengkatalisis hidrolisis pati menjadi oligosakarida pendek melalui pemecahan ikatan glikosidik α -D-(1-4). Produk akhir dari reaksi -amilase adalah oligosakarida dengan panjang bervariasi, dengan α -konfigurasi dan α -limit deksrin terdiri dari campuran maltose, maltotriosa, dan cabang oligosakarida (6-8 unit glukosa) (Sales dkk., 2012). Penghambatan terhadap enzim -amilase dapat menunda dan memperlama waktu cerna karbohidrat, menyebabkan penurunan laju absorpsi glukosa dan mencegah peningkatan kadar plasma glukosa postprandial

(Saad dkk., 2017). Berdasarkan hasil studi klinis pada manusia menunjukkan bahwa penghambatan α -amilase pada gandum dan kacang putih secara signifikan menurunkan puncak glukosa postprandial pada subjek sehat dan diabetes tipe 2 (Piparo dkk., 2008).

2.3.2 Pengujian Aktivitas Antiamilase

Pengujian aktivitas penghambatan enzim α -amilase pada penelitian ini dilakukan dapat dilakukan dengan melakukan pengukuran gula pereduksi yang terbentuk akibat hidrolisis pati oleh enzim α -amilase dengan menggunakan reagen DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat). Pati akan dihidrolisis oleh enzim α -amilase dengan melakukan pemutusan ikatan α -D-(1-4) glikosidik menjadi gula pereduksi oligosakarida yang lebih pendek. DNS akan bereaksi dengan gula pereduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat berwarna orange gelap dengan panjang gelombang 540 nm (Khairunnisa, 2017). Mekanisme reaksi DNS dengan gula pereduksi dapat dilihat pada Gambar 2.5. Semakin banyak asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk maka aktivitas gula pereduksinya semakin tinggi (Nihayah, 2018).



Gambar 2.5 Reaksi DNS dengan gula pereduksi (Sumber: Nihayah, 2018)

2.3.3 Hubungan Polifenol dan Flavonoid dengan Aktivitas α -amilase

Beberapa senyawa flavonoid mempunyai aktivitas penghambatan α -amilase yang poten, seperti luteolin, mirisetin, dan kuersetin. Potensi penghambatan tersebut berhubungan dengan jumlah gugus hidroksil yang ada pada cincin B dari struktur flavonoid (Piparo dkk., 2008). Pada penelitian yang dilakukan oleh Piparo dkk. (2008) dilaporkan bahwa senyawa yang mempunyai aktivitas penghambatan α -amilase adalah flavanol (kuersetin, kuersetagetin, mirisetin, fisetin) dan flavon (luteolin, eupafolin, dan skutellarein). Sedangkan flavanol, flavanon dan isoflavon mempunyai aktivitas penghambatan yang rendah.

Maksimum penghambatan α -amilase dari senyawa diatas dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Nilai IC₅₀ dan persentase penghambatan α -amilase dari flavonoid

	Famili	IC ₅₀ (μ M)	Penghambatan maksimum (%)
Akarbose		0.996 \pm 0.011	99.2 \pm 0.5
Kuersetagetin	flavonol	10.2 \pm 2.2	97.6 \pm 2.4
Fisetin	flavonol	19.6 \pm 6.4	85.6 \pm 7.3
Kuersetin	flavonol	21.4 \pm 4.3	82.1 \pm 4.6
Myrisetin	flavonol	30.2 \pm 2.9	79.0 \pm 7.5
Kaempferol	flavonol	Tidak terdeteksi	34.5
Isorhamnetin	flavonol	Tidak terdeteksi	35.4
Rhamnetin	flavonol	Tidak terdeteksi	8.1
Skutellarein	flavon	9.64 \pm 0.30	98.4 \pm 1.6
Luteolin	flavon	18.4 \pm 3.9	88.8 \pm 7.2
Eupafolin	flavon	48.0 \pm 14.8	99.4 \pm 0.6
Genkwanin	flavon	Tidak terdeteksi	17.5
Diosmetin	flavon	Tidak terdeteksi	19.2
Akasetin	flavon	Tidak terdeteksi	14.1
Katekin	flavanol	Tidak terdeteksi	13.1
Epikatekin	flavanol	Tidak terdeteksi	10.3
Hesperetin	flavanon	Tidak terdeteksi	39.8
Naringenin	flavanon	Tidak terdeteksi	26.8
Genistein	isoflavon	Tidak terdeteksi	25.1
Daidzein	isoflavon	Tidak terdeteksi	23.3

Sumber: Piparo dkk., 2008

Aktivitas penghambatan flavonoid terhadap enzim α -amilase bergantung pada pembentukan ikatan hidrogen antara gugus OH pada R7 dan/ atau R4' pada ligan flavonoid dengan rantai samping Asp¹⁹⁷ dan Glu²³³, dan kemungkinan terbentuknya sistem terkonjugasi antara cincin AC atau B dengan Trp⁵⁹ (Piparo dkk., 2008). Piparo dkk. (2008) menyebutkan bahwa efek penghambatan enzim α -amilase flavon dan flavonol bergantung pada ikatan hidrogen antara gugus hidroksi pada flavonoid dan residu katalitik, dan pembentukan sistem terkonjugasi pada flavonoid yang mampu menstabilkan interaksi dengan sisi aktif. Sistem terkonjugasi dibentuk melalui cincin A dan C dengan gugus karbonil pada posisi C4 dan ikatan rangkap C2, C3, dan gugus hidroksil spesifik yang muncul pada cincin A posisi C5 dan C7 dan C3' dan C4' pada cincin B.

2.4 Tinjauan Oksidan dan Antioksidan

2.4.1 Oksidan

Oksidan merupakan bahan kimia elektrofil yang sangat reaktif dan dapat memindahkan elektron dari molekul lain serta menghasilkan oksidasi dari molekul tersebut. Menurut ilmu kimia, oksidan adalah senyawa penerima elektron (*electron acceptor*) yang dapat menarik elektron (Mukono, 2011). Contoh dari oksidan adalah superoksida, hidrogen peroksida, radikal peroksil, dan radikal hidroksil (Haryoto dan Priyanto, 2018). Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki atom tidak berpasangan. Radikal bebas merupakan suatu oksidan, tetapi tidak semua oksidan adalah radikal bebas. Dalam keadaan normal, sistem pertahanan tubuh yang baik dapat meredam oksidan dengan memproduksi antioksidan yang memadai. Jika keseimbangan antara oksidan dan antioksidan terganggu, maka akan terjadi stres oksidatif (Mukono., 2011). Radikal bebas mempunyai sifat reaktivitas yang tinggi berupa kecenderungan untuk menarik elektron dan kemampuan mengubah suatu molekul menjadi radikal bebas baru sehingga terjadi reaksi rantai, dan reaksi akan berhenti jika radikal bebas diredam dengan antioksidan (Yuslianti, 2018).

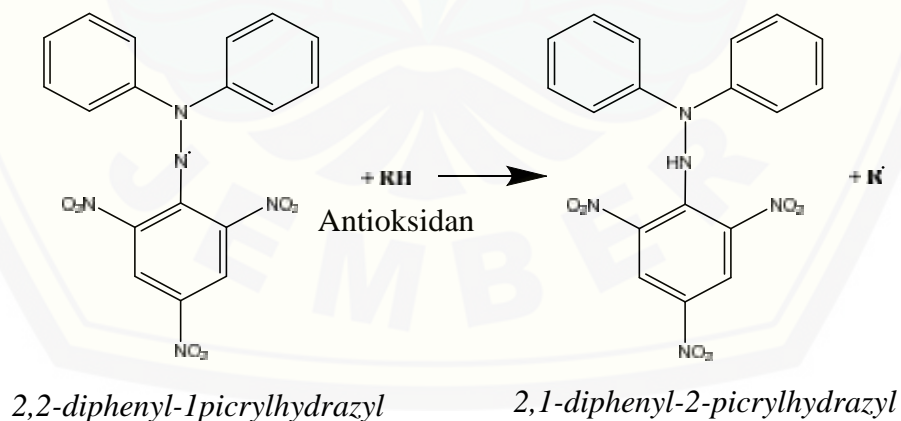
2.4.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron atau reduktan dengan berat molekul kecil, yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang reaktif (Winarsi, 2007). Antioksidan dapat dihasilkan dari dalam tubuh (endogen) dan luar tubuh (eksogen). Antioksidan endogen merupakan sitem pertahanan utama terhadap kondisi stres oksidatif yang bekerja dengan cara mencegah terbentuknya senyawa radikal bebas baru. Contoh dari antioksidan endogen yaitu *superoksida dismutase* (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase. Sedangkan antioksidan eksogen dapat berupa vitamin C, E, A dan -karoten, asam urat, bilirubin, albumin, dan flavonoid yang berasal dari sayuran, buah-buahan, biji-bijian, dan kacang-kacangan (Haryoto dan Priyanto, 2018; Winarsi., 2007). Secara umum antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen dan fungsi kedua yaitu

memperlambat laju autooksidasi dengan mengubah radikal lipid ke bentuk lebih stabil (Na'im, 2016).

2.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) merupakan metode uji aktivitas antioksidan yang mudah dilakukan, cepat dan sederhana serta dapat digunakan untuk sampel padat atau cair (Dontha, 2016). DPPH merupakan radikal bebas stabil akibat adanya delokalisasi elektron pada molekul secara keseluruhan, sehingga tidak terbentuk molekul dimer (Molyneux, 2004). Delokalisasi elektron tersebut menyebabkan DPPH berwarna ungu dengan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 520 nm (Molyneux, 2004). Blois (1958) juga menyebutkan bahwa DPPH memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm. DPPH harus disimpan dalam wadah terbuat dari gelas yang dilapisi dengan aluminium foil. Pada kondisi dan keadaan yang telah ditentukan, aktivitas radikal bebas larutan DPPH dapat menurun sekitar 2-4% per minggu (Blois, 1958). Ketika larutan DPPH dicampur dengan suatu zat yang dapat menyumbangkan atom hidrogen, akan terjadi reaksi reduksi ditandai dengan perubahan warna ungu larutan DPPH menjadi DPPH-H berwarna kuning (Molyneux, 2004). Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Mekanisme reaksi radikal DPPH dengan antioksidan (Sumber: Molyneux, 2004)

Pada penelitian ini digunakan perbandingan larutan sampel dengan DPPH sebesar 1:1. Hal tersebut merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Tristantini dkk. (2016). Selain menggunakan perbandingan tersebut, pada beberapa

penelitian juga digunakan perbandingan larutan sampel dengan DPPH yang berbeda seperti menggunakan perbandingan 1:2 (Shah dkk., 2015), 1:10 (Alam dkk., 2012), 1:4 (Malangngi dkk., 2012), dan 1:7 (Handayani dkk., 2014).

2.4.4 Hubungan Polifenol dan Flavonoid dengan Aktivitas Antioksidan

Pada penelitian yang dilakukan Lin dkk. (2014) dengan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Aktivitas antioksidan meningkat ketika posisi C3', C4' dalam cincin B flavonoid digantikan oleh gugus hidroksil. Gugus hidroksil pada cincin B mampu menyumbangkan hidrogen dan sebuah elektron ke radikal hidroksil, peroksil, dan peroksinitrit, membentuk radikal flavonoid yang relatif stabil. Struktur heterosiklik flavonoid yang memiliki gugus hidroksil pada posisi C3 berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Selain itu, planaritas suatu senyawa juga berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan karena memungkinkan terjadinya konjugasi, dislokasi kation, dan meningkatkan stabilitas fenoksil radikal flavonoid (Heim dkk., 2002). Heim dkk. (2002) juga menyebutkan bahwa senyawa flavonoid dengan ikatan rangkap pada C2-C3 yang terhubung dengan C4-gugus karbonil menunjukkan nilai IC_{50} yang rendah. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa flavonoid tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Catherine dkk. (1995) dilaporkan bahwa struktur o-dihidroksi pada cincin B, memberikan stabilitas lebih tinggi pada radikal dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron.

2.5 Tinjauan Obesitas dan Diabetes Melitus

2.5.1 Pengertian Obesitas dan Diabetes Melitus

Obesitas didefinisikan sebagai kondisi akumulasi lemak berlebihan dalam jaringan adiposa yang bisa menyebabkan terjadinya gangguan kesehatan. Overweight dan obesitas adalah faktor risiko utama pengembangan resistensi insulin dan diabetes melitus tipe 2. Pada individu yang obesitas, jumlah asam lemak, gliserol, hormon, sitokin, molekul pro-inflamasi, dan zat lain yang terlibat dalam pengembangan resistensi insulin akan mengalami peningkatan (Saad dkk.,

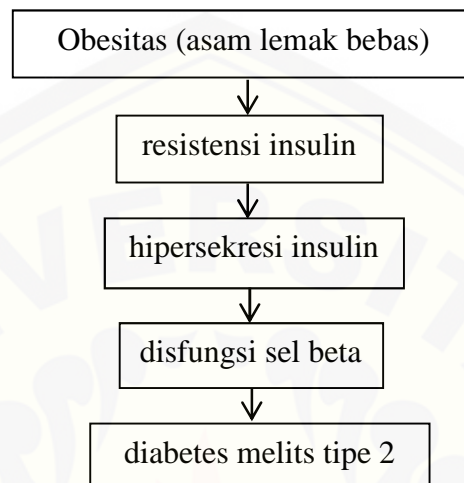
2017). Resistensi insulin bersamaan dengan disfungsi sel mengarah pada pengembangan diabetes melitus (Masi dan Oroh, 2018).

Diabetes merupakan penyakit gangguan metabolik akibat pankreas tidak mampu memproduksi insulin dengan cukup atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif (KemenKes RI, 2019). Terdapat 3 jenis diabetes melitus yang diketahui yaitu diabetes melitus tipe 1, tipe 2 dan diabetes gestasional (Saad dkk., 2017). Diabetes melitus tipe 1 ditandai dengan kurangnya produksi insulin. Diabetes melitus tipe 2 disebabkan oleh penggunaan insulin yang kurang efektif pada tubuh (KemenKes RI, 2014). Pada diabetes melitus tipe 2 sering dianggap sebagai penyakit yang berhubungan dengan obesitas. Semakin tinggi nilai BMI maka risiko diabetes tipe 2 meningkat (Saad dkk., 2017). Diabetes gestasional merupakan gangguan metabolisme berupa peningkatan kadar glukosa (hiperglikemia) yang terjadi pada masa kehamilan (KemenKes RI, 2014). Kondisi ini terjadi sekitar 2-10% dari semua masa kehamilan dan dapat menghilang setelah melahirkan. Setelah melahirkan, sekitar 5-10% dari wanita dengan diabetes gestasional ditemukan memiliki diabetes melitus tipe 2 (Saad dkk., 2017).

2.5.2 Patofisiologi terjadinya Obesitas dan Diabetes Melitus

Penyimpanan lemak berlebih dapat menyebabkan terjadinya obesitas dan meningkatkan pelepasan kadar asam lemak bebas (FFA) dari lipolisis. Pelepasan FFA kemudian menginduksi lipotoksisitas, seperti lipid dan metabolit lainnya menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada retikulum endoplasma dan mitokondria. Hal tersebut mengakibatkan jaringan adiposa dan non-adiposa mengalami disfungsi reseptor insulin dan terjadi resistensi insulin yang menyebabkan hiperglikemia dengan kompensasi glukoneogenesis di hati. Resistensi insulin adalah faktor yang menyebabkan terjadinya diabetes tipe 2. FFA mengurangi stimulasi insulin pada otot, dan menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Lipotoksisitas dari FFA yang berlebih juga menurunkan sekresi insulin pada sel pankreas. Kelebihan adiposit melepaskan *inflammatory adipokines* (TNF- α , IL-6, komplemen C3, leptin dan MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*)) dan asam lemak bebas (FFA). Adipokin viseral juga

berkontribusi terhadap kerusakan *inflammatory adipokines* yang menyebabkan terjadinya disfungsi sel pankreas, sehingga menurunkan sintesis dan sekresi insulin (Siddiqui, 2018). Hubungan antara obesitas dan diabetes melitus dapat diamati pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Hubungan antara obesitas dan diabetes melitus (Sumber: Siddiqui, 2018)

2.5.3 -amilase dan Obesitas

Karbohidrat merupakan sumber energi utama di dalam tubuh. -amilase dan -glukosidase merupakan enzim yang bertanggung jawab terhadap proses digesti karbohidrat. Dengan adanya enzim -amilase, karbohidrat akan dicerna menjadi oligosakarida, kemudian oligosakarida tersebut dicerna lebih lanjut menjadi monosakarida (glukosa) dengan bantuan enzim -glukosidase (Hanhineva dkk., 2010). Melalui proses glikolisis, glukosa akan dirubah menjadi ATP dan digunakan sebagai sumber energi di dalam tubuh (Wahjuni, 2013).

Peningkatan konsentrasi glukosa dalam darah menyebabkan terjadinya sekresi insulin dari sel langerhans di pankreas, insulin memediasi *uptake* glukosa dalam jaringan perifer termasuk otot, jaringan adiposa dan ginjal, serta menghambat lipolisis dalam jaringan adiposa. Gangguan metabolisme glukosa sering dikaitkan dengan peningkatan massa lemak, terutama di area perut (Hanhineva dkk., 2010).

2.5.4 Obesitas dan Stres Oksidatif

Obesitas ditandai dengan produksi adipokin yang irregular sehingga menginduksi terjadinya stres oksidatif. Sensitivitas CRP (*C-Reactive Protein*) dan

biomarker lain dari kerusakan oksidatif lebih tinggi pada individu yang mengalami obesitas. Hal ini berkorelasi langsung dengan BMI (*Body Mass Index*) dan persentase lemak pada tubuh, oksidasi LDL, dan level TG. Biomarker stres oksidatif, seperti MDA (malondialdehid) dan F-2 isoprostanes (F2-IsoPs), merupakan produk peroksidasi asam lemak tak jenuh. BMI secara signifikan berhubungan dengan konsentrasi F2-IsoPs. Biomarker stres oksidatif lainnya seperti 8-iso Prostaglandin F₂ (8-iso PGF₂) berhubungan dengan terjadinya obesitas dan resistensi insulin (Sanchez dkk., 2011).

2.5.5 Mekanisme Pembentukan Radikal Bebas pada Obesitas

a. Jaringan Adiposa

Peningkatan stres oksidatif pada obesitas terjadi karena adanya jaringan adiposa yang berlebihan. Adiposit dan preadiposit merupakan sumber proinflamasi sitokin, seperti TNF- α , IL-1, dan IL-6. Sitokin adalah stimulator potensial untuk memproduksi oksigen dan nitrogen reaktif oleh makrofag dan monosit. Oleh karena itu, peningkatan konsentrasi sitokin bertanggung jawab terhadap peningkatan stres oksidatif. TNF- α dapat menghambat aktivitas CRP dan menyebabkan peningkatan interaksi elektron dengan oksigen untuk menghasilkan anion superoksida. Jaringan adiposa memiliki kapasitas sekretori angiotensin II, yang mampu merangsang aktivitas NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) oksidase. NADPH oksidase merupakan rute utama produksi ROS dalam adiposit (Sanchez dkk., 2011).

b. Oksidasi Asam Lemak

Oksidasi mitokondrial dan peroxisomal dari asam lemak mampu menghasilkan radikal bebas di hati. Stres oksidatif dapat menyebabkan perubahan DNA mitokondria pada fosforilasi oksidatif, menyebabkan kelainan struktural dan penipisan *adenosine triphosphate* (ATP). Abnormalitas mitokondria juga memungkinkan produksi berlebih dari ROS (Sanchez dkk., 2011).

c. Akumulasi Kerusakan Selular

Akumulasi lemak yang berlebih dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel karena efek tekanan dari sel-sel lemak. Kerusakan sel menyebabkan produksi sitokin meningkat seperti TNF- α . TNF- α mampu menghasilkan ROS dalam

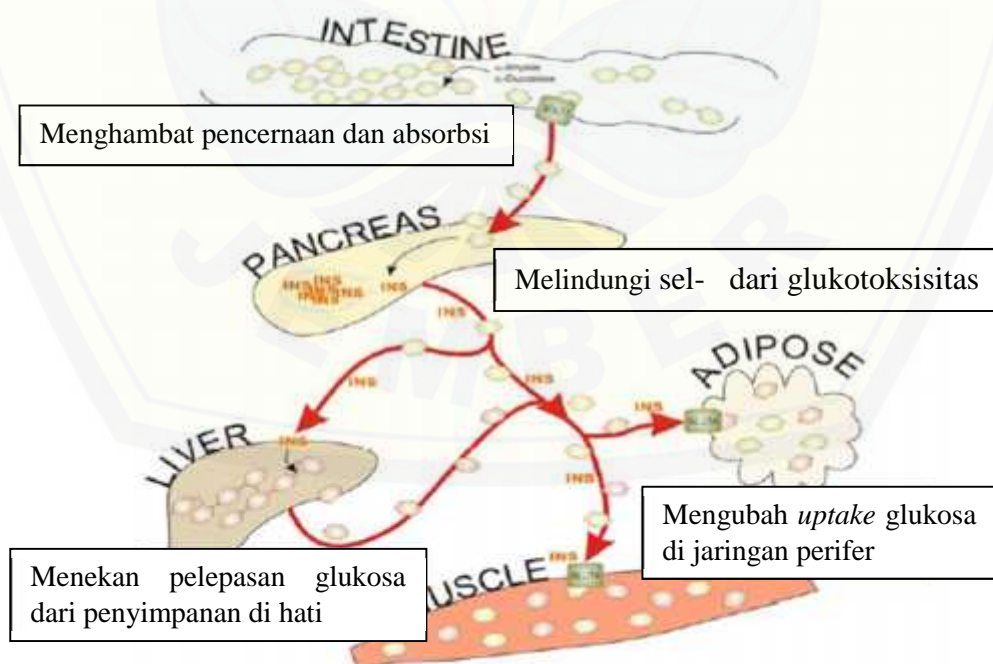
jaringan sehingga dapat meningkatkan level peroksidasi lipid (Sanchez dkk., 2011).

2.5.6 Obesitas dan Kapasitas Antioksidan

Ketika obesitas terjadi dalam jangka waktu yang lama, aktivitas sumber antioksidan dalam tubuh seperti enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), dan katalase (CAT) akan berkurang. Aktivitas superoksida dismutase dan glutathione peroxidase pada individu dengan obesitas secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan orang sehat. Pada penelitian yang dilakukan oleh Capel dkk., (1984) menunjukkan bahwa konsentrasi vitamin A lebih rendah pada tikus dengan obesitas jika dibandingkan dengan tikus yang tidak obesitas. Selain vitamin A, kadar antioksidan serum, seperti vitamin E, vitamin C, dan β -karoten, serta glutathione, mengalami penurunan pada obesitas (Sanchez dkk., 2011).

2.5.7 Hubungan Polifenol dengan Metabolisme Karbohidrat dan Homeostasis Glukosa

Hubungan polifenol dengan metabolisme karbohidrat dan homeostasis glukosa di dalam tubuh dapat dilihat pada gambar 2.8.



Gambar 2.8 Hubungan polifenol dengan metabolisme karbohidrat dan homeostasis glukosa (Hanhineva dkk., 2010)

Beberapa macam polifenol dapat menghambat pemecahan karbohidrat menjadi glukosa melalui aktivitas α -amilase dan α -glukosidase. Polifenol tersebut adalah flavonoid (antosianin, katekin, flavanon, flavonol, flavon, dan isoflavon), asam fenolat dan tanin (proantosianidin dan ellagitanin) (Hanhineva dkk., 2010).

Hasil pemecahan karbohidrat menjadi glukosa dengan bantuan enzim α -amilase dan α -glukosidase akan diabsorpsi di usus. Proses absorpsi glukosa di usus dapat terjadi karena adanya transportasi aktif dari natrium, transporter SGLT1 dan GLUT2. Pada sisi luminal membran usus, ion Na^+ berikatan dengan SGLT1 menghasilkan perubahan konformasi yang dapat mengikat glukosa. Glukosa akan dilepaskan dari enterosit melalui GLUT2 agar memasuki sirkulasi darah. Senyawa yang dapat menghambat pembentukan ikatan antara glukosa dengan Na^+ dan transporter SGLT1 adalah asam klorogenat, ferulat, kuersetin, monoglukosida, katekin, dan naringenin. Sedangkan senyawa yang dapat menghambat pelepasan glukosa melalui GLUT2 adalah kuersetin, mirisetin, apigenin dan katekin (Hanhineva dkk., 2010).

Konsentrasi glukosa darah yang tinggi dalam sirkulasi darah merespon sel-pankreas untuk meningkatkan sekresi insulin, proliferasi sel- dan pembentukan sel baru dari sel progenitor. Pelepasan insulin dari sel- terjadi ketika glukosa di lepaskan dalam sirkulasi darah melalui transporter GLUT2. Insulin dapat merangsang pengambilan glukosa pada otot rangka dan jaringan adiposa, serta menurunkan pelepasan glukosa hepatic dengan meningkatkan penyimpanan glukosa sebagai glikogen di hati. Polifenol yang berperan dalam fungsi pankreas dan sekresi insulin adalah isoflavonoid, genistein, dan daidzein (Hanhineva dkk., 2010).

2.6 Tinjauan Infusa

Infusa (infus) adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan pelarut air pada suhu 90°C selama 15 menit. Pembuatan infusa biasanya digunakan untuk membuat sediaan herbal dari bahan lunak seperti bunga dan daun. Kecuali dinyatakan lain dan tidak mengandung bahan berkhasiat

keras, maka infusa dapat dibuat dengan menggunakan 10% simplisia (BPOM RI, 2012).



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *true experimental laboratories*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antiamilase, aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan kadar fenol dan flavonoid total pada infusa daun Jati belanda.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2019 hingga selesai. Laboratorium yang digunakan adalah Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Kimia Analisis Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas, terikat dan terkontrol sebagai berikut:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah beberapa serial konsentrasi infusa daun Jati belanda.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antiamilase, aktivitas antioksidan, dan kadar fenol dan flavonoid total infusa daun Jati belanda.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah cara ekstraksi, waktu ekstraksi, preparasi sampel pengujian aktivitas antiamilase, aktivitas antioksidan, dan penetapan kadar fenol dan flavonoid total infusa daun Jati belanda.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800), sentrifus, mikropipet (Socorex), ultrasonik (Elmasonic), 96 *well-plates* (Nest Biotech), *mikroplate reader* (Dialab), corong buchner, *freeze dryer*, timbangan analitik, *hot plate*, pH meter (Eutech instrument), kuvet, *stopwatch*, kertas saring dan alat-alat gelas.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi simplisia daun Jati belanda (*Guazuma ulmifolia*), metanol pa, akuades, natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), natrium dihidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$), natrium hidroksida (NaOH), asam galat (Sigma-Aldrich), DNS/3,5-dinitrosalisilat (Sigma-Aldrich), DPPH/1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich), reagen Folin-Ciocalteu, kalium natrium tartrat, natrium karbonat, natrium nitrit (Merk), aluminium (III) klorida (Merk), kuersetin, etanol (Merk), *porcine pancreatic alpha amylase* (Sigma-Aldrich), pati (Merck KgaA) dan akarbosa (Sigma-Aldrich).

3.5 Rancangan Penelitian

3.5.1 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Daun Jati belanda yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari kawasan Taman Nasional Meru Betiri, Jember. Sampel tanaman tersebut dikumpulkan dan dilakukan determinasi oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur.
- b. Daun jati belanda dikumpulkan pada bulan November 2017. Bagian daun Jati belanda yang diambil adalah daun tua, dimulai dari posisi ke-5 atau 6 dari ujung ranting pohon dewasa.
- c. Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim α -amilase.
- d. Infusa yang digunakan dalam penelitian ini berupa hasil infusa daun Jati belanda dalam bentuk yang telah dikeringkan.

- e. Aktivitas antiamilase dan antioksidan dinyatakan dalam bentuk IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan aktivitas penghambatan suatu senyawa sebesar 50% terhadap fungsi biologis atau biokimia tertentu.

3.5.2 Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu:

- a. Pengeringan sampel daun Jati belanda menjadi simplisia dan dihaluskan menjadi serbuk simplisia.
- b. Pembuatan infusa daun Jati belanda.
- c. Pengujian aktivitas antiamilase dan antioksidan infusa daun Jati belanda.
- d. Penetapan kadar fenol dan flavonoid total infusa daun Jati belanda.

3.5.3 Alur Penelitian

Skema alur prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

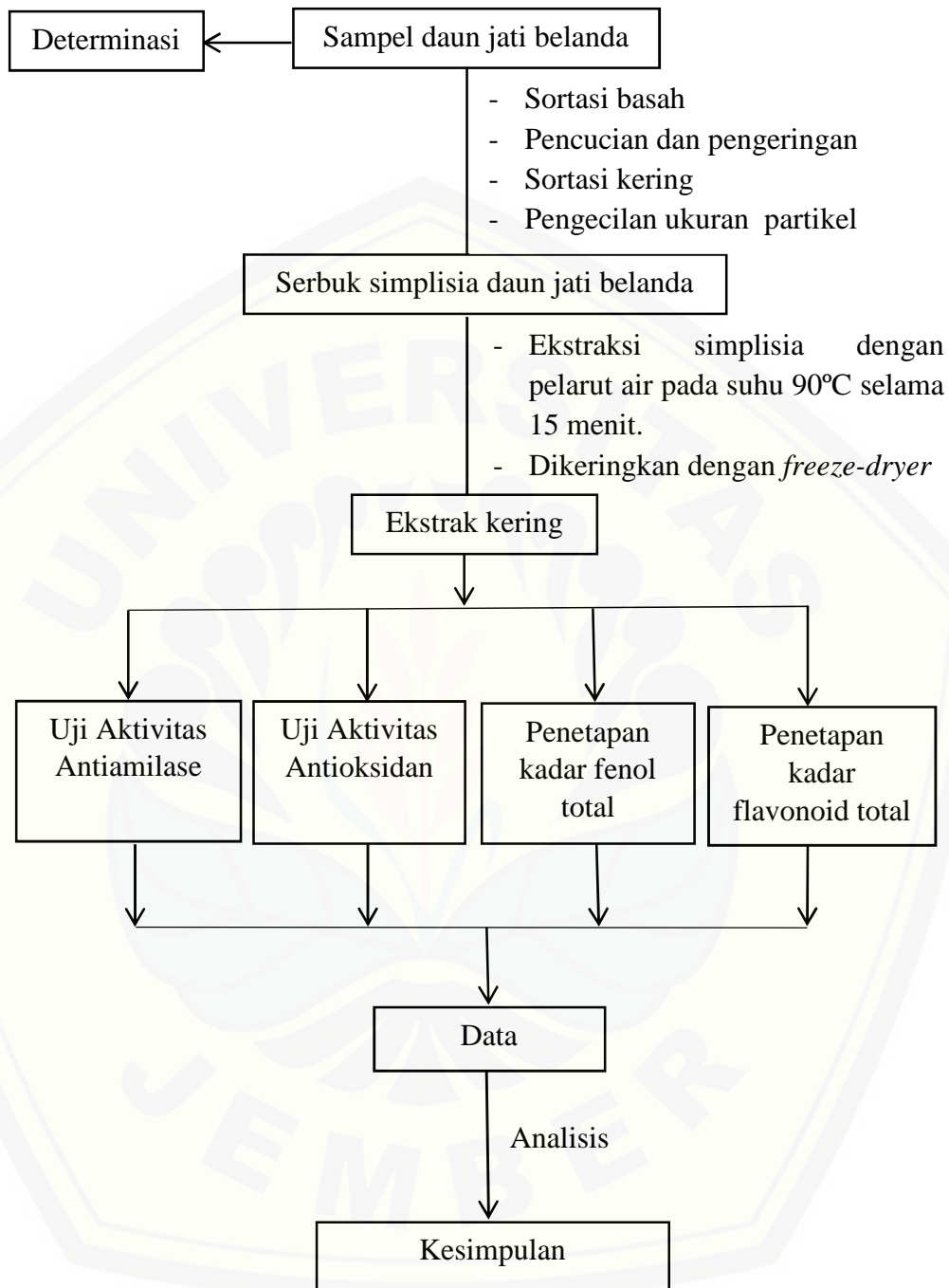
3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman Jati Belanda

Sampel daun tanaman Jati belanda yang telah didapatkan dilakukan determinasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur. Tujuan dilakukannya determinasi adalah untuk mengetahui identitas tanaman jati belanda berdasarkan taksonominya.

3.6.2 Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Jati Belanda

Sampel daun Jati belanda yang diperoleh dari kawasan Taman Nasional Meru Betiri, Desa Curahnongko, Jember, Jawa Timur dikeringkan dalam ruangan tanpa terkena sinar matahari secara langsung pada suhu ruang hingga diperoleh bentuk simplisia kering. Simplisia kering dipotong kecil-kecil dan kemudian dihaluskan dengan blender. Simplisia kemudian diayak untuk mendapatkan ukuran serbuk yang seragam.



Gambar 3.1 Diagram alur penelitian

3.6.3 Pembuatan Infusa Daun Jati Belanda

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode infusa. Serbuk daun Jati belanda sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam panci infus. Ditambahkan pelarut air hingga 100 ml dan dipanaskan pada suhu 90°C selama 15 menit. Setelah itu difiltrasi dengan menggunakan kain flanel hingga dihasilkan filtrat. Filtrat kemudian di keringkan dengan *freeze-dryer* hingga didapatkan ekstrak kering. Ekstrak yang diperoleh dihitung persen rendemennya menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

Ekstrak kering kemudian dimasukkan ke dalam vial dan disimpan dalam lemari pendingin.

3.6.4 Pengujian Aktivitas Antiamilase

Pengujian aktivitas antiamilase mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Khairunnisa (2017) yang telah dimodifikasi:

a. Pembuatan larutan dan reagen

Larutan dan reagen yang diperlukan dalam pengujian aktivitas antiamilase meliputi:

1) Larutan NaOH

Larutan dibuat dengan melarutkan 2 g NaOH dalam labu ukur 25 mL menggunakan akuabides hingga tepat tanda.

2) Larutan reagen DNS

Reagen DNS dibuat dengan membuat larutan 1 yang berisi 30 g kalium natrium tartrat yang dilarutkan dalam 20 mL NaOH 2M. Kemudian dibuat larutan 2 yang berisi 1,095 g DNS (3,5-dinitrosalisilat) dilarutkan dalam 50 mL akuabides. Kedua larutan tersebut kemudian diultrasonik untuk membantu menghomogenkan, kemudian dicampur dan ditambahkan akuabides hingga volume campuran mencapai 100 mL. Campuran larutan tersebut kemudian disaring menggunakan kertas saring.

3) Larutan dapar fosfat pH 6,9

Dapar fosfat dibuat dengan mencampurkan 1,1998 g NaH_2PO_4 dalam 100 mL akuabides dan 1,4196 g Na_2HPO_4 dalam 100 mL akuabides. Larutan tersebut kemudian disesuaikan pHnya menjadi 6,9 dan disaring menggunakan kertas saring.

4) Pembuatan enzim α -amilase

Preparasi pembuatan enzim α -amilase dilakukan dengan menimbang enzim sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,9 dalam labu ukur 10 mL hingga tepat tanda. Larutan enzim tersebut kemudian disimpan dalam lemari pendingin agar tetap stabil.

5) Substrat pati 0,5%

Substrat dibuat dengan melarutkan 0,05 g pati dengan dapar fosfat pH 6,9 dalam labu ukur 10 mL hingga tepat tanda dan dipanaskan diatas *hot plate* untuk mempercepat kelarutan pati.

6) Pembuatan larutan kontrol positif akarbosa

Larutan dibuat dengan melarutkan 5 mg akarbosa dengan dapar fosfat pH 6,9 dalam labu ukur 10 mL hingga tepat tanda dan didapatkan konsentrasi akarbosa sebesar 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan seri konsentrasi akarbosa sebesar 12,5; 25; 50; 100; dan 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7) Pembuatan larutan uji infusa daun Jati belanda

Larutan uji dibuat dengan melarutkan 100 mg sampel infusa dalam 1 mL DMSO kemudian divorteks dan disentrifugasi untuk mempercepat kelarutan sehingga didapatkan konsentrasi infusa sebesar 100.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan seri konsentrasi infusa sebesar 1.000; 2.000; 4.000; 6.000; 8.000; dan 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam dapar fosfat pH 6,9.

b. Pengujian aktivitas antiamilase infusa daun jati belanda

Pengujian aktivitas antiamilase dilakukan terhadap larutan sampel (infusa daun Jati belanda), kontrol positif (akarbosa), dan kontrol negatif (tanpa inhibitor). Masing-masing 100 μL larutan tersebut ditambahkan 30 μL larutan

enzim dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 15 menit. Sebanyak 250 µL substrat kemudian ditambahkan dan diinkubasi kembali pada suhu dan waktu yang sama. Selanjutnya reaksi enzimatik dihentikan dengan pemanasan selama 1 menit. Larutan tersebut kemudian diambil cuplikan sebanyak 160 µL, ditambahkan 80 µL reagen DNS dan selanjutnya dipanaskan di atas *hot plate* selama 5 menit. Ditunggu hingga dingin dan kemudian ditambahkan 720 µL akuabides. Preparasi larutan uji tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.1. Setelah dilakukan preparasi uji, sebanyak 100 µL dari masing-masing larutan tersebut ditambah dengan 100 µL akuabides dan dimasukkan ke dalam 96 *well-plates* kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan *microplate reader*.

Tabel 3.1 Preparasi larutan uji

Larutan	Kontrol Positif	Blanko kontrol Positif	Sampel uji	Blanko sampel uji	Kontrol Negatif	Blanko kontrol Negatif
Akarbose (µl)	100	100	-	-	-	-
Ekstrak (µl)	-	-	100	100	-	-
Enzim (µl)	30	-	30	-	30	-
Dapar (µl)	-	30	-	30	100	130
Substrat (µl)	250	250	250	250	250	250
Aliquot (µl)	160	160	160	160	160	160
DNS (µl)	80	80	80	80	80	80
Akuabides (µl)	720	720	720	720	720	720

c. Perhitungan

Data absorbansi yang telah diperoleh pada masing-masing konsentrasi kemudian dihitung inhibisinya terhadap enzim -amilase menggunakan Persamaan 3.1.

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Abs kontrol negatif} - \text{Abs Sampel Uji}}{\text{Abs kontrol negatif}} \times 100\% \dots \dots \dots \text{(Persamaan 3.1)}$$

Nilai inhibisi -amilase digunakan sebagai sumbu y dan konsentrasi sampel sebagai sumbu x untuk membuat persamaan regresi. Persamaan regresi $y = bx + a$

digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} seperti pada Persamaan 3.2 dengan memasukkan nilai $y = 50$ pada persamaan regresi tersebut.

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

3.6.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan Infusa Daun Jati Belanda

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang didasarkan pada peredaman DPPH oleh infusa daun jati belanda. Pengujian aktivitas antioksidan ini dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu pembuatan larutan DPPH, penentuan panjang gelombang maksimum, penentuan waktu inkubasi, pembuatan larutan kontrol positif (kuersetin), pembuatan larutan infusa, pengujian aktivitas antioksidan, dan perhitungan.

a. Pembuatan larutan DPPH

Sebanyak 5 mg DPPH dilarutkan dalam 100 mL metanol pa sehingga diperoleh konsentrasi larutan DPPH sebesar 50 $\mu\text{g/mL}$. Larutan ini kemudian disimpan dalam botol gelap.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Sebanyak 0,5 mL larutan DPPH dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ ditambahkan dengan 0,5 mL metanol, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 15 menit ditempat gelap. Campuran larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-600 nm.

c. Penentuan waktu inkubasi

Sebanyak 0,5 mL larutan DPPH ditambahkan 0,5 mL larutan uji (kuersetin maupun infusa daun Jati belanda). Campuran larutan tersebut kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan dengan interval waktu 5 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

d. Pembuatan larutan kontrol positif kuersetin

Kuersetin sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 50 mL metanol pa sehingga diperoleh konsentrasi larutan kuersetin sebesar 100 $\mu\text{g/mL}$. Larutan tersebut

kemudian diencerkan hingga didapatkan seri konsentrasi kuersetin sebesar 2; 4; 6; 8; dan 10 $\mu\text{g/mL}$.

e. Pembuatan larutan infusa

Sampel infusa sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 25 mL metanol pa sehingga diperoleh konsentrasi larutan sampel sebesar 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan tersebut kemudian diencerkan hingga didapatkan seri konsentrasi sampel infusa sebesar 5; 10; 15; 20; dan 25 $\mu\text{g/mL}$.

f. Penentuan aktivitas antioksidan

Diambil 0,5 mL larutan uji pada masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan DPPH 50 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 0,5 mL. Campuran larutan tersebut didiamkan pada tempat gelap sesuai waktu inkubasinya dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

g. Perhitungan

Data absorbansi yang diperoleh pada masing-masing konsentrasi kemudian dihitung peredamannya terhadap DPPH menggunakan Persamaan 3.3.

$$\text{Peredaman DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs Sampel Uji}}{\text{Abs DPPH}} \times 100\% \dots\dots\dots (\text{Persamaan 3.3})$$

Nilai peredaman DPPH digunakan sebagai sumbu y dan konsentrasi sampel sebagai sumbu x untuk membuat persamaan regresi. Persamaan regresi $y = bx + a$ digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} seperti pada Persamaan 3.4 dengan memasukkan nilai $y = 50$ pada persamaan regresi tersebut.

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

3.6.6 Penetapan Kadar Fenol dan Flavonoid Total

a. Penetapan Kadar Fenol Total

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu pembuatan seri konsentrasi standar, pembuatan larutan infusa, dan penetapan kadar. Kadar fenol total infusa daun jati belanda ditentukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Standar yang digunakan dalam penetapan kadar senyawa fenol total adalah asam galat. Standar dibuat dengan menimbang 10 mg asam galat dan dilarutkan dalam 10 mL metanol hingga didapatkan konsentrasi asam

galat 1000 µg/mL. Sampel infusa daun Jati belanda dibuat dengan menimbang 25 mg ekstrak kering dan dilarutkan dalam 25 mL metanol.

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan mengambil cuplikan larutan infusa daun Jati belanda atau standar asam galat sebanyak 50 µL (31,89; 63,78; 127,56; 191,35; dan 255,13 µg/mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 1,25 mL reagen Folin-Ciocalteu yang sudah diencerkan 1/10 kali ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 6 menit. Larutan inkubasi kemudian ditambahkan 1,25 mL Na₂CO₃ 7% dan diinkubasi selama 60 menit kemudian dipindahkan ke dalam kuvet untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 725 nm.

Absorbansi yang didapatkan dari larutan standar asam galat dibuat persamaan regresi dengan konsentrasi asam galat (dalam kuvet). Persamaan regresi yang terbentuk digunakan untuk mencari kadar fenol total infusa daun Jati belanda dengan memasukkan absorbansi (sebagai y) dalam persamaan regresi. Konsentrasi yang didapatkan diubah dan dinyatakan sebagai kadar fenol total setara asam galat dalam ekstrak atau dalam mg *gallic acid equivalent* (GAE)/gram ekstrak.

b. Penetapan Kadar Flavonoid

Penetapan kadar flavonoid dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu pembuatan seri konsentrasi standar, pembuatan larutan infusa, dan pengujian kadar. Penetapan kadar flavonoid total infusa daun jati belanda dilakukan dengan metode kolorimetri AlCl₃ dengan kuersetin sebagai standar. Standar dibuat dengan menimbang 5 mg kuersetin dan dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga didapatkan konsentrasi kuersetin sebesar 500 µg/mL. Sampel infusa daun jati belanda dibuat dengan menimbang 25 mg sampel dan dilarutkan dalam 25 mL metanol.

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan dengan mengambil cuplikan larutan infusa daun Jati belanda atau standar kuersetin sebanyak 150 µL (34,65; 69,3; 138,6; 277,2; 420; dan 500 µg/mL) untuk dimasukkan ke dalam kuvet 1,5 mL, kemudian ditambahkan akuabides sebanyak 400 µL. Setelah itu ditambahkan 30 µL NaNO₂ 5% dan 30 µL AlCl₃ 10% kemudian diinkubasi selama 6 menit.

Sebanyak 200 μL NaOH 1N dan 240 μL akuabides ditambahkan ke dalam kuvet dan dihomogenkan kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 415 nm.

Absorbansi yang didapatkan dari larutan standar kuersetin kemudian dibuat persamaan regresi dengan konsentrasi kuersetin (dalam kuvet). Persamaan regresi yang terbentuk digunakan untuk mencari kadar flavonoid infusa dengan memasukkan absorbansi (sebagai y) dalam persamaan regresi. Konsentrasi yang didapatkan diubah dan dinyatakan sebagai kadar flavonoid setara kuersetin dalam ekstrak atau dalam mg *quercetin equivalent* (QE)/ gram ekstrak.

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini dilakukan analisis nilai IC_{50} yang menunjukkan aktivitas antiamilase dan antioksidan, serta dihitung kadar fenol dan flavonoid total infusa daun Jati belanda.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Infusa daun Jati belanda memiliki aktivitas penghambatan enzim α -amilase (antiamilase) dan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $261,030 \pm 6,829 \mu\text{g/mL}$ dan $6,853 \pm 0,504 \mu\text{g/mL}$.
2. Kadar fenol dan flavonoid total infusa daun Jati belanda yaitu sebesar $40,773 \pm 2,504 \text{ mg GAE/g}$ infusa dan $46,203 \pm 2,449 \text{ mg QE/g}$ infusa.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, diketahui bahwa infusa daun Jati belanda memiliki aktivitas antiamilase dan antioksidan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi senyawa yang berkontribusi dalam aktivitas penghambatan enzim α -amilase (antiamilase) dan antioksidan pada infusa daun Jati belanda.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiah, D. Sukandar, dan A. Muawanah. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Komponen Bioaktif Sari Buah Namnam. *Jurnal Kimia VALENSI: Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*. 1(2):130–136.
- Batubara, I., L. K. Darusman, dan T. Mitsunaga. 2017. Senyawa Penciri Ekstrak Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) Sebagai Anti-kolesterol. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 22(2):87–91.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant Determinations by The Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 181:1199–1200.
- BPOM RI. 2008. *Taksonomi Koleksi Tanaman Obat Kebun Tanaman Obat Citeureup*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- BPOM RI. 2012. *Acuan Sediaan Herbal*. Edisi 1. Jakarta: Direktorat Obat Asli Indonesia.
- Catherine, A., Rice-Evans, N. J, Miller, dan P. George. 1996. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acid. *Free Radical Biology & Medicine*. 20(7):933–956.
- DepKes RI. 1978. *Materia Medika Indonesia Jilid II*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Dontha, S. 2016. A Review on Antioxidant Methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 9(2):14–32.
- Etassala, N. G. E. ., J. A. Badmus, W. T. T, J. L. Marnewick, C. N. Cupido, A. A. Hussein, dan E. I. Iwuoha. 2019. Alpha-Glucosidase and Alpha-Amylase Inhibitory Activities of Novel Abietane Diterpenes From *Salvia africana-lutea*. *MDPI*. 8:1–12.
- Funke, I. dan M. F. Melzig. 2005. Effect of Different Phenolic Compounds on α -Amylase Activity: Screening by Microplate-Reader Based Kinetic Assay. *Pharmazie*. 60:796–797.
- Gondokesumo, M. E., H. S. W. Kusuma, dan W. Widowati. 2017. α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activities of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Ethanol Extract. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*. 1(1):34-40.
- Gu, H.-F., C.-M. Li, Y. Xu, W. Hu, dan M. Chen. 2008. Structural Features and Antioxidant Activity of Tannin From *Persimmon pulp*. *Food Research International*. 41:208–217.
- Hanhineva, K., R. Törrönen, I. Bondia-pons, J. Pekkinen, M. Kolehmainen, H. Mykkanen, dan K. Poutanen. 2010. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *International Journal of Molecular Science*.

11:1365–1402.

- Haryoto dan E. Priyanto. 2018. *Potensi Buah Salak: Sebagai Suplemen Obat dan Pangan*. Surakarta: Muhammadiyah University Press.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, dan D. J. Bobilya. 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 572–584.
- Intregated Taxonomic Information System (ITIS). 2011. *Guazuma ulmifolia* La. <http://www.itis.gov/> [diakses 8 Oktober 2019, 16:20 WIB].
- Kato, C. G., G. D. A. Gonçalves, R. A. Peralta, F. A. Seixas, A. B. De Sakananishi, L. Bracht, J. F. Comar, A. Bracht, dan R. M. Peralta. 2017. Inhibition of α -Amylases by Condensed and Hydrolysable Tannins : Focus on Kinetics and Hypoglycemic Actions. *Enzyme Research*. 1–12.
- Kazeem, M. I., S. G. Abimbola, dan A. O. T. Ashafa. 2013. Inhibitory Potential of *Gossypium aboreum* Leaf Extracts on Diabetes Key Enzymes, α -Amylase and α -Glucosidase. *Bangladesh J Pharmacol*. 8: 149-155.
- Khairunnisa. 2017. Pengembangan dan Validasi Metode Uji Aktivitas Inhibitor Enzim α -amilase dari Ekstrak Metanol Daun Kopi secara In Vitro. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Kumar, S dan A. K Pandey. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 1-16.
- Lin, C.-Z., C.-C. Zhu, M. Hu, A.-Z. Wu, Z.-D. Bairu, dan S.-Q. Kangsa. 2014. Structure-Activity Relationships of Antioxidant Activity *In Vitro* About Flavonoids Isolated From *Pyrethrum tatsienense*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 3(3):123–127.
- Martsolich, K. A. 2007. Potensi Antioksidasi Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol 70% Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.). *Skripsi*. Bogor: Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J.Sci.Technol*. 26(2):211–219.
- Morais, S. M., J. T. Calixto-júnior, L. M. Ribeiro, H. A. Sousa, A. A. S. Silva, F. G. Figueiredo, E. F. F. Matias, A. A. Boligon, M. L. Athayde, M. F. B. Morais-braga, dan H. D. M. Coutinho. 2016. Phenolic Composition and Antioxidant, Anticholinesterase and Antibiotic-Modulating Antifungal Activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) Ethanol Extract. *South African Journal of Botany*. 1–7.
- Mukono. 2011. *Aspek Kesehatan Pencemaran Udara*. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan Universitas Airlangga.

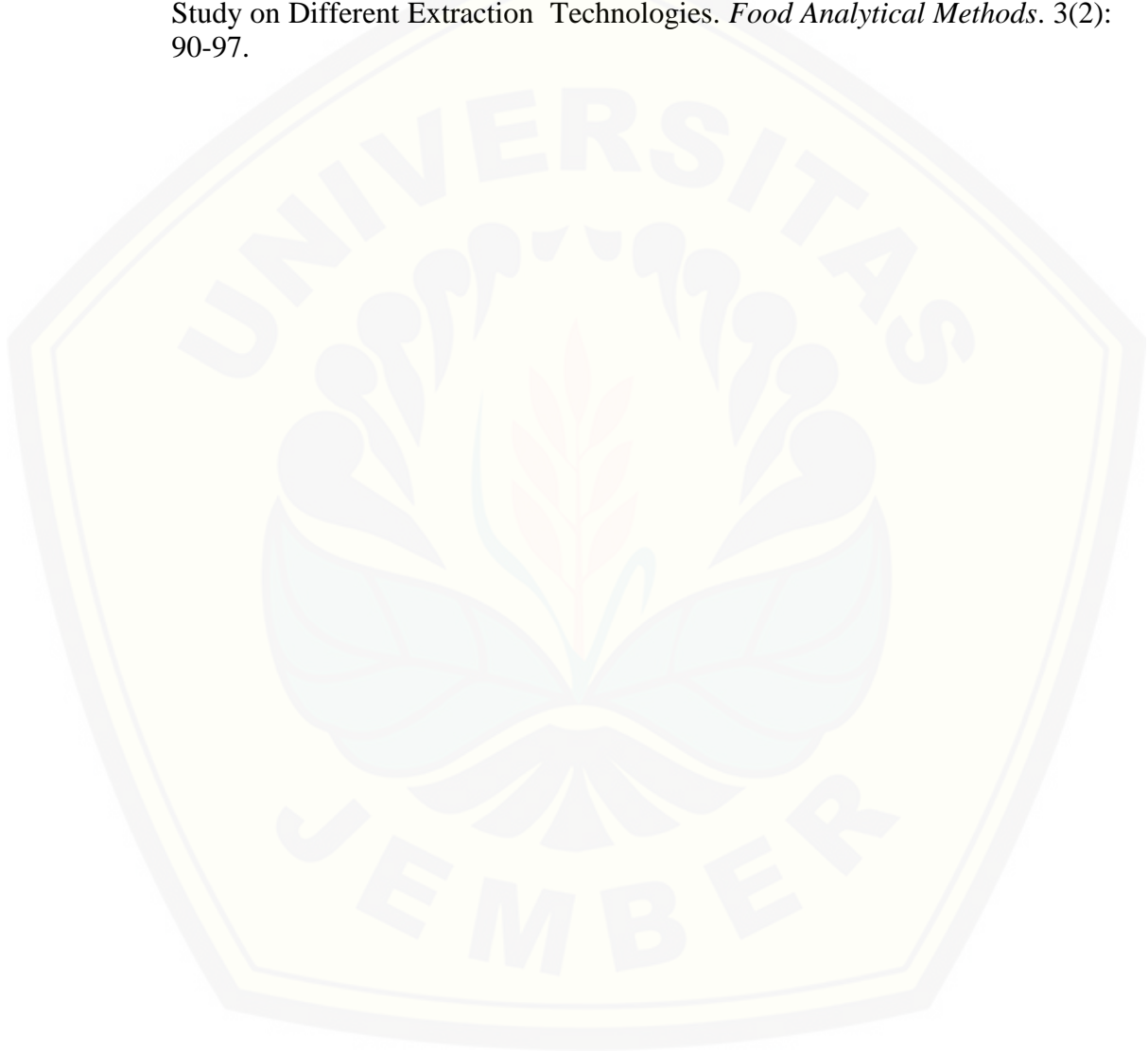
- Murakami, Y., A. Kawata, S. Ito, T. Katayama, dan S. Fujisawa. 2015. Radical-Scavenging and Anti-Inflammatory Activity of Quercetin and Related Compounds and Their Combinations Against Raw 264.7 Cells Stimulated With Porphyromonas *Gingivalis fimbriae*. Relationships Between Anti-Inflammatory Activity and Quantum Chemical. *International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research*. 29:701–710.
- Na'im, F. 2016. Aktivitas Ekstrak Daun Jati Belanda terhadap Kadar Kolesterol HDL dan LDL pada Tikus Hiperkolesterolemia. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- Nazaruk, J. dan M. Borzym-kluczyk. 2015. The Role of Triterpenes in The Management of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Phytochemistry Reviews*. 14:675–690.
- Pekal, A dan K. Krystyna. 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods*. 7: 1776-1782.
- Piparo, E. Lo, H. Scheib, N. Frei, G. Williamson, M. Grigorov, dan C. J. Chou. 2008. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human α -Amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 51(12):3555–3561.
- Rachmi, F. I. 2016. Potensi Ekstrak Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lam.) sebagai Antidiabetes dan Antioksidan Metode Penghambatan enzim α -Glukosidase dan DPPH In Vitro. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Rijai, A. J., A. G. Suganda, dan E. Y. Iskandar. 2018. Aktivitas Inhibitor α -Amilase Beberapa Tumbuhan Obat Indonesia. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 1(10): 517-524.
- Saad, B., H. Zaid, S. Shanak, dan S. Kadan. 2017. *Anti-Diabetes and Anti-Obesity Medicinal Plants and Phytochemicals*. Springer International Publishing.
- Sales, P. M. de, P. M. de Souza, L. A. Simeoni, P. de O. Magalhães, dan D. Silveira. 2012. α -Amylase Inhibitors A Review of Raw Material and Isolated Compounds From Plante Source. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 15(1):141–183.
- Sai, Kusum., R. Thapa, H. P. Devkota, dan K. R. Joshi. 2010. Phytochemical Screening, Free Radical Scavenging and α -Amylase Inhibitory Activities of Selected Medicinal Plants from Western Nepal. *Medicines*. 6: 1-9.
- Sanchez, A. F., E. M. Santillan, M. Bautista, J. E. Soto, A. M. Gonzales, C. E. Chirino, I. D. Montiel, G. S. Rivera, C. V. Vega, dan J. A. M. Gonzalez. 2011. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*. 6(12):3117–3132.

- Santos, J. M. D., T. M. Alfredo, K. A. Antunes, J. D. S. M. D. Cunha, E. M. A. Costa, E. S. Lima, D. B. Silva, C. A. Carollo, W. O. Schmitz, A. P. D. A. Boleti, E. L. D. Santos, dan K. D. P. Souza. 2018. *Guazuma ulmifolia* Lam. Decreases Oxidative Stress in Blood Cells and Prevents Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-16.
- Siddiqui, S. 2018. Obesity and diabetes: Interrelationship. *Advance in Obesity Weight Management & Control*. 8(2):155–158.
- Singleton, V.L. dan J. A. Rossi. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Suharmiati dan H. Maryani. 2003. *Khasiat & Manfaat Jati Belanda Si Pelangsing Tubuh & Peluruh Kolesterol*. Agromedia Pustaka.
- Sukandar, E. Y., K. K. Farmakologi, F. Klinik, dan S. Farmasi. 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) Terhadap Kadar Lipid Darah Pada Tikus Jantan. *JKM*. 8(2):102–115.
- Tadera, K., Y. Minami, K. Takamatsu, dan Matsuoka. Tomoko. 2006. Inhibition of Alpha-Glucosidase and Alpha-Amylase by Flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol*. 52:149–153.
- Thao, N. P., P. T. Binh, N. T. Luyen, T. M. Hung, N. H. Dang, dan N. T. Dat. 2018. -Amylase and -Glucosidase Inhibitory Activities of Chemical Constituents from *Wedelia chinensis* (Osbeck.) Merr. Leaves. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 1–8.
- Tristantini, D., A. Ismawati, B. T. Pradana, J. G. Jonathan. 2016. Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L). *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*. Yogyakarta. Program Studi Teknik Kimia, FTI, UPN "Veteran".
- Tursiman, P. Ardianingsih, dan R. Nofiani. 2012. Total Fenol Fraksi Etil Asetat dari Buah Asam Kandis (*Garcinia dioicicia* Blume). *JKK*. 1(1): 45-48.
- Wahjuni, S. 2013. *Metabolisme Biokimia*. Denpasar: Udayana University Press.
- Wang, T., Q. Li, dan K. Bi. 2018. Bioactive Flavonoids in Medicinal Plants : Structure, Activity and Biological Fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13:12–23.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Yuslianti, E. R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Edisi Edisi 1. Yogyakarta: Deepublish.
- Zain, A. F. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetes Daun Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Secara *In Vitro* Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas

Jember.




Zhang, B., Y. Xing, C. Wen, X. Yu, W. Sun, Z. Xiu, dan Y. Dong. 2017. Pentacyclic Triterpenes as α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitors: Structure-Activity Relationships and The Synergism With Acarbose. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 27:5065–5070.

Zhu, H., Y. Z. Wang, Y. X. Liu, dan Y. L. Xia. 2009. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Analytical Methods*. 3(2): 90-97.



LAMPIRAN

Lampiran 4.1 Hasil Determinasi *Guazuma ulmifolia*

	LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA (INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES) UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA PURWODADI	 <small>CERT. NO. 1105.001.01.14 001/001/2008</small>	 <small>Kelembagaan Akademik dan Inovasi Lembaga Kerjasama Sistem Bilik USM-045-04</small>
	LIPI Telp. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046, Faks. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046 website: http://www.krpurwodadi.lipi.go.id		
SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI No. 162/APH.06/HM/XI/2015			
Kepala UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :			
<u>Nuri, S.Si., Apt., M.Si, NIM : 196904122001121007</u>			
Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 17 Nopember 2015, berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan R.C. Bakhuizen van den Brink jr., volume 1, tahun 1963, halaman 408 dan PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 12 (2) ; Medicinal and poisonous plants 2, editor J.L.C.H van Valkenburg dan Bunyaphrathasara, tahun 2002, halaman 286 nama ilmiahnya adalah :			
Genus	: <i>Guazuma</i>		
Species	: <i>Guazuma ulmifolia</i> Lmk.		
Adapun menurut buku An Integrated System of Classification of Flowering plants, karangan Arthur Cronquist tahun 1981, halaman XIV adalah sebagai berikut :			
Divisio	: <i>Magnoliophyta</i>		
Class	: <i>Magnoliopsida</i>		
Subclass	: <i>Dilleniidae</i>		
Ordo	: <i>Malvales</i>		
Family	: <i>Sterculiaceae</i>		
Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.			
Purwodadi, 23 Nopember 2015 An. Kepala Kepala Seksi Konservasi Ex-situ,			
 Deden Madiana, S.Hut, M.Si			

Lampiran 4.2 Data Rendemen Infusa Daun Jati Belanda

Sampel	Berat simplisia (gram)	Berat ekstrak kering (gram)
	10,0400	0,9483
Daun jati belanda	10,0028	0,8713
	10,0034	0,8717

$$\text{Berat simplisia} = \frac{10,0400 \text{ g} + 10,0028 \text{ g} + 10,0034 \text{ g}}{3} = 10,0154 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak kering} = \frac{0,9483 \text{ g} + 0,8713 \text{ g} + 0,8717 \text{ g}}{3} = 0,8971 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak kering} = \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,8971 \text{ g}}{10,0154 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 8,9572 \%$$

Lampiran 4.3 Pembuatan Dapar Fosfat, Reagen DNS, dan Enzim α -amilase

1. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 6,9

a. Perhitungan NaH_2PO_4 0,1M

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

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

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

$$\text{massa} = 1,1998 \text{ g}$$

Penimbangan: 1,1998 g NaH_2PO_4 dalam 100 mL akuabides

b. Perhitungan Na_2HPO_4

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

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

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

$$\text{massa} = 1,4196 \text{ g}$$

Penimbangan: 1,4196 g Na_2HPO_4 dalam 100 mL akuabides

2. Pembuatan Reagen DNS

a. Pembuatan Larutan NaOH 2M

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

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

$$\text{massa} = \frac{2 \times 40 \times 25}{1000}$$

$$\text{massa} = 2 \text{ g}$$

Penimbangan: 2 g NaOH dalam 25 mL akuabides

- b. Kalium natrium tartrat ditimbang sebanyak 30 g dalam 20 mL NaOH 2M, kemudian ditimbang DNS 1,095 g dalam 50 mL akuabides. Kedua larutan tersebut dicampur dan ditambahkan akuabides hingga 100 mL.

3. Pembuatan Larutan Enzim 0,6 U/mL

1 mg enzim α -amilase setara dengan 10 unit (U)

Penimbangan: 20 mg enzim dilarutkan dalam dapar fosfat ad 10 mL

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

$$\begin{aligned}\text{Jika konsentrasi enzim yang diinginkan } 0,6 \text{ U/mL: } &\frac{20 \text{ U}}{1000 \mu\text{L}} = \frac{0,6 \text{ U}}{x} \\ &x = 30 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Jadi 0,6 U setara dengan 30 μL

4. Pembuatan Substrat Pati 0,5%

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

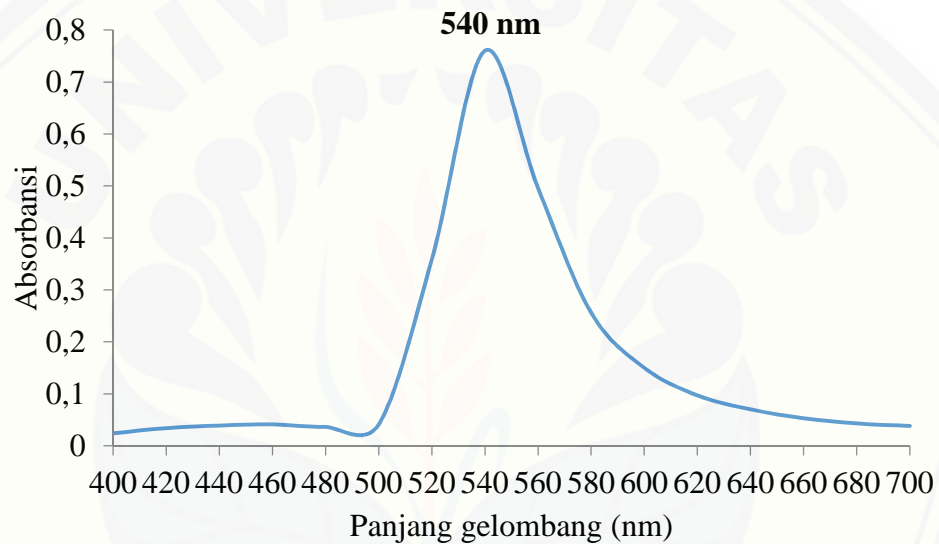
Penimbangan: 0,05 g pati dalam 10 mL dapar fosfat

Lampiran 4.4 Penentuan Panjang Gelombang 3,5-dinitrosalisilat

Berdasarkan hasil optimasi dari Khairunisa (2017)

a. Grafik

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



b. Data Absorbansi

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
400	0,024	555	0,575
405	0,034	560	0,496
410	0,034	565	0,422
415	0,034	570	0,358
420	0,034	575	0,301
425	0,024	580	0,256
430	0,045	585	0,217
435	0,036	590	0,192
440	0,039	595	0,168
445	0,035	600	0,150
450	0,047	605	0,133
455	0,047	610	0,119
460	0,041	615	0,108
465	0,041	620	0,097

470	0,047	625	0,089
475	0,039	630	0,082
480	0,036	635	0,075
485	0,033	640	0,070
490	0,045	645	0,065
495	0,043	650	0,061
500	0,041	655	0,056
505	0,056	660	0,053
510	0,091	665	0,049
515	0,195	670	0,047
520	0,358	675	0,044
525	0,528	680	0,043
530	0,667	685	0,039
535	0,740	690	0,038
540	0,760	695	0,038
545	0,720	700	0,038
550	0,656		

Lampiran 4.5 Perhitungan Larutan Uji Aktivitas Antiamilase

1. Infusa Daun Jati Belanda

$$\text{Larutan induk} : \frac{101,1 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = 101.100 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Seri konsentrasi:

$$\checkmark \frac{0,8 \text{ ml}}{8 \text{ ml}} \times 101.100 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10.110 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{4,0 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 10.110 \text{ } \mu\text{g/mL} = 8.088 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{3,0 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 8.088 \text{ } \mu\text{g/mL} = 6.066 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{2,0 \text{ ml}}{3 \text{ ml}} \times 6.066 \text{ } \mu\text{g/mL} = 4.044 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{1,50 \text{ mL}}{3 \text{ ml}} \times 4.044 \text{ } \mu\text{g/mL} = 2.022 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{1,0 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 2.022 \text{ } \mu\text{g/mL} = 1.011 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

2. Akarbosa

$$\text{Larutan induk} : \frac{5,1 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 510 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Seri konsentrasi:

$$\checkmark \frac{25 \text{ } \mu\text{L}}{1.000 \text{ } \mu\text{L}} \times 510 \text{ } \mu\text{g/mL} = 12,75 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{50 \text{ } \mu\text{L}}{1.000 \text{ } \mu\text{L}} \times 510 \text{ } \mu\text{g/mL} = 25,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{100 \text{ } \mu\text{L}}{1.000 \text{ } \mu\text{L}} \times 510 \text{ } \mu\text{g/mL} = 51 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{200 \text{ } \mu\text{L}}{1.000 \text{ } \mu\text{L}} \times 510 \text{ } \mu\text{g/mL} = 102 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{300 \text{ } \mu\text{L}}{1.000 \text{ } \mu\text{L}} \times 510 \text{ } \mu\text{g/mL} = 153 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 4.6 Data Absorbansi % Penghambatan α -amilase dan Persamaan Regresi

1. Infusa Daun Jati Belanda

- Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam <i>microplate reader</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Δ absorbansi kontrol	Δ Absorbansi sampel	% Penghambatan α -amilase	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
2001.78	87.797		0,394	20,618	
4003.56	175.595		0,286	42,377	
6066	266.053	0,496	0,220	55,675	254,050
8088	354.737		0,197	60,309	
10110	443.422		0,100	79,852	

Persamaan regresi $y = 0,1531x + 11,105$ dengan nilai $R^2 = 0,9606$ digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC₅₀ (dimana $y = 50$):

$$50 = 0,1531x + 11,105$$

$$x = \frac{(50-11,105)}{0,1531}$$

$$x = 254,050 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 254,050 \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam <i>microplate reader</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Δ absorbansi kontrol	Δ Absorbansi sampel	% Penghambatan α -amilase	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
2001.78	87.797		0,422	14,976	
4003.56	175.595		0,316	36,333	
6066	266.053	0,496	0,208	58,093	267,697
8088	354.737		0,193	61,115	
10110	443.422		0,111	77,636	

Persamaan regresi $y = 0,1686x + 4,8663$ dengan nilai $R^2 = 0,9526$ digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC₅₀ (dimana $y = 50$):

$$50 = 0,1686x + 4,8663$$

$$x = \frac{(50-4,8663)}{0,1686}$$

$$x = 267,697 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 267,697 \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam <i>microplate reader</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Δ absorbansi kontrol	Δ Absorbansi akarbosa	% Penghambatan -amilase	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
2001.78	87.797		0,405	18,402	
4003.56	175.595		0,297	40,161	
6066	266.053	0,496	0,224	54,869	261,342
8088	354.737		0,179	63,936	
10110	443.422		0,120	75,823	

Persamaan regresi $y = 0,1557x + 9,309$ dengan nilai $R^2 = 0,9711$ digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC_{50} (dimana $y = 50$):

$$50 = 0,15574x + 9,309$$

$$x = \frac{(50 - 9,309)}{0,1557}$$

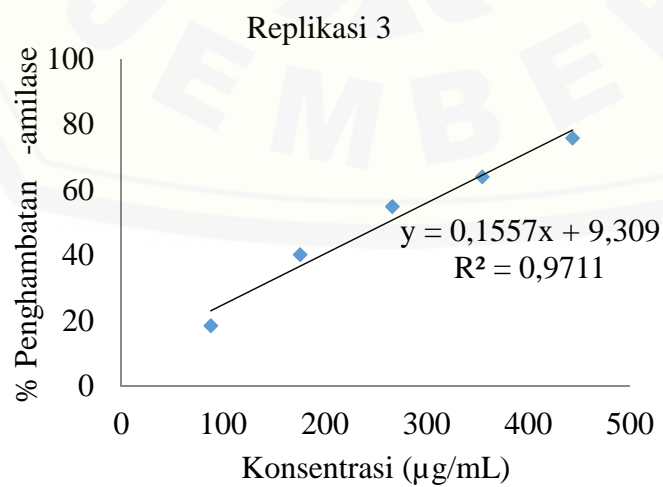
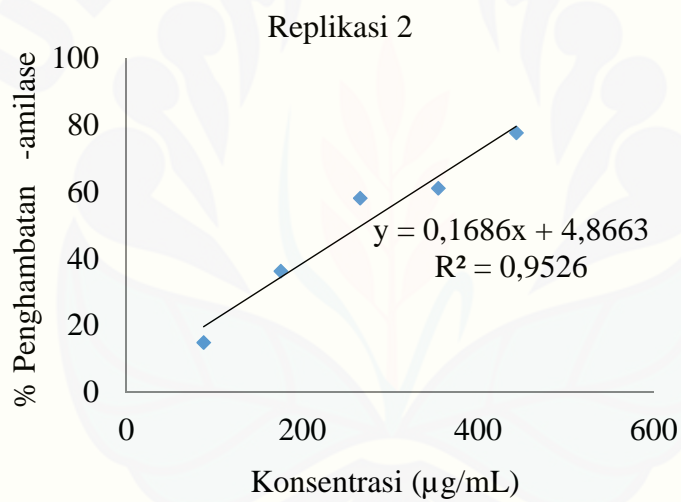
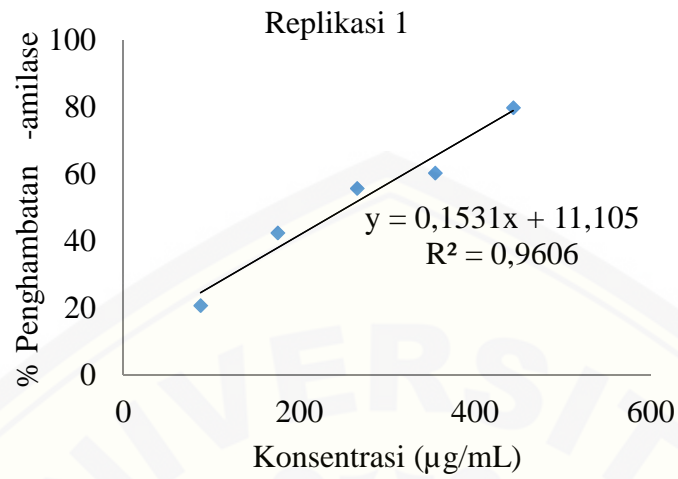
$$x = 261,342 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 261,342 \mu\text{g/mL}$$

- Nilai Rata-rata IC_{50} dan SD

IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Replikasi	Rata-rata \pm SD
254,050	
267,697	261,030 \pm 6,829
261,342	

- Regresi Linier IC₅₀ Infusa Daun Jati Belanda



2. Akarbosa

• Replikasi 1

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi dalam <i>microplate reader</i> (µg/mL)	Rata-rata Δ absorbansi kontrol	Δ Absorbansi akarbosa	Inhibisi -amilase (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
12,75	0,559		0,692	10,671	
25,50	1,119		0,574	25,904	
51,00	2,237	0,775	0,426	45,009	3,988
102,0	4,474		0,320	58,692	
153,0	6,711		0,249	67,857	

Persamaan regresi $y = 8,6489x + 15,507$ dengan nilai $R^2 = 0,8863$ digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC₅₀ (dimana $y = 50$):

$$50 = 8,6489x + 15,507$$

$$x = \frac{(50-15,507)}{8,6489}$$

$$x = 3,988 \text{ µg/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 3,988 \text{ µg/mL}$$

• Replikasi 2

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi dalam <i>microplate reader</i> (µg/mL)	Rata-rata Δ absorbansi kontrol	Δ Absorbansi akarbosa	Inhibisi -amilase (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
12,75	0,559		0,671	13,382	
25,50	1,119		0,572	26,162	
51,00	2,237	0,775	0,413	46,687	3,617
102,0	4,474		0,300	61,274	
153,0	6,711		0,198	74,441	

Persamaan regresi $y = 9,4012x + 15,997$ dengan nilai $R^2 = 0,9247$ digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC₅₀ (dimana $y = 50$):

$$50 = 9,4012x + 15,997$$

$$x = \frac{(50-15,997)}{9,4012}$$

$$x = 3,617 \text{ µg/mL}$$

$$IC_{50} = 3,617 \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam <i>microplate reader</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Δ absorbansik kontrol	Δ Absorbansi akarbosa	Inhibisi -amilase (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
12,75	0,559		0,560	27,711	
25,50	1,119		0,559	27,840	
51,00	2,237	0,775	0,405	47,719	3,223
102,0	4,474		0,293	62,177	
153,0	6,711		0,184	76,248	

Persamaan regresi $y = 8,1992x + 23,577$ dengan nilai $R^2 = 0,963$ digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC_{50} (dimana $y = 50$):

$$50 = 8,1992x + 23,577$$

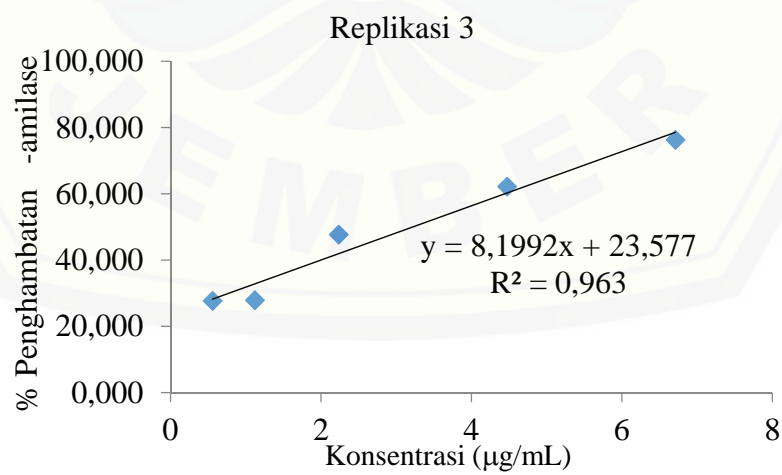
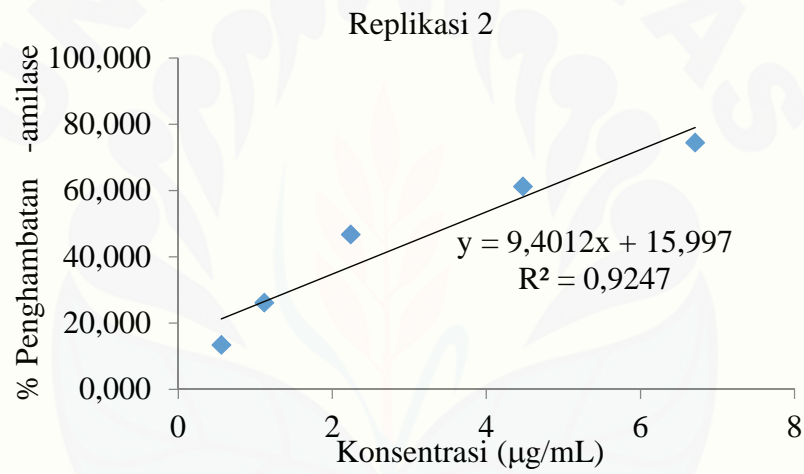
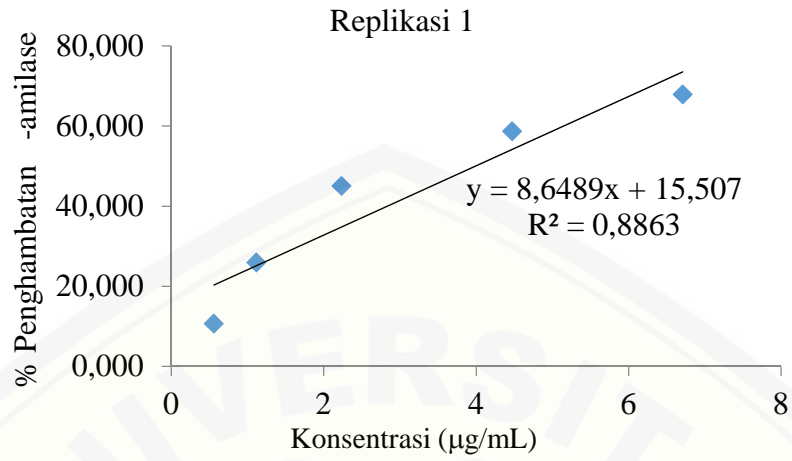
$$x = \frac{(50 - 23,577)}{8,1992}$$

$$x = 3,233 \mu\text{g/mL}$$

- Nilai Rata-rata IC_{50} dan SD

IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Replikasi	Rata-rata \pm SD
3,988	
3,617	3,609 \pm 0,383
3,223	

- Regresi Linier IC₅₀ Akarbosa



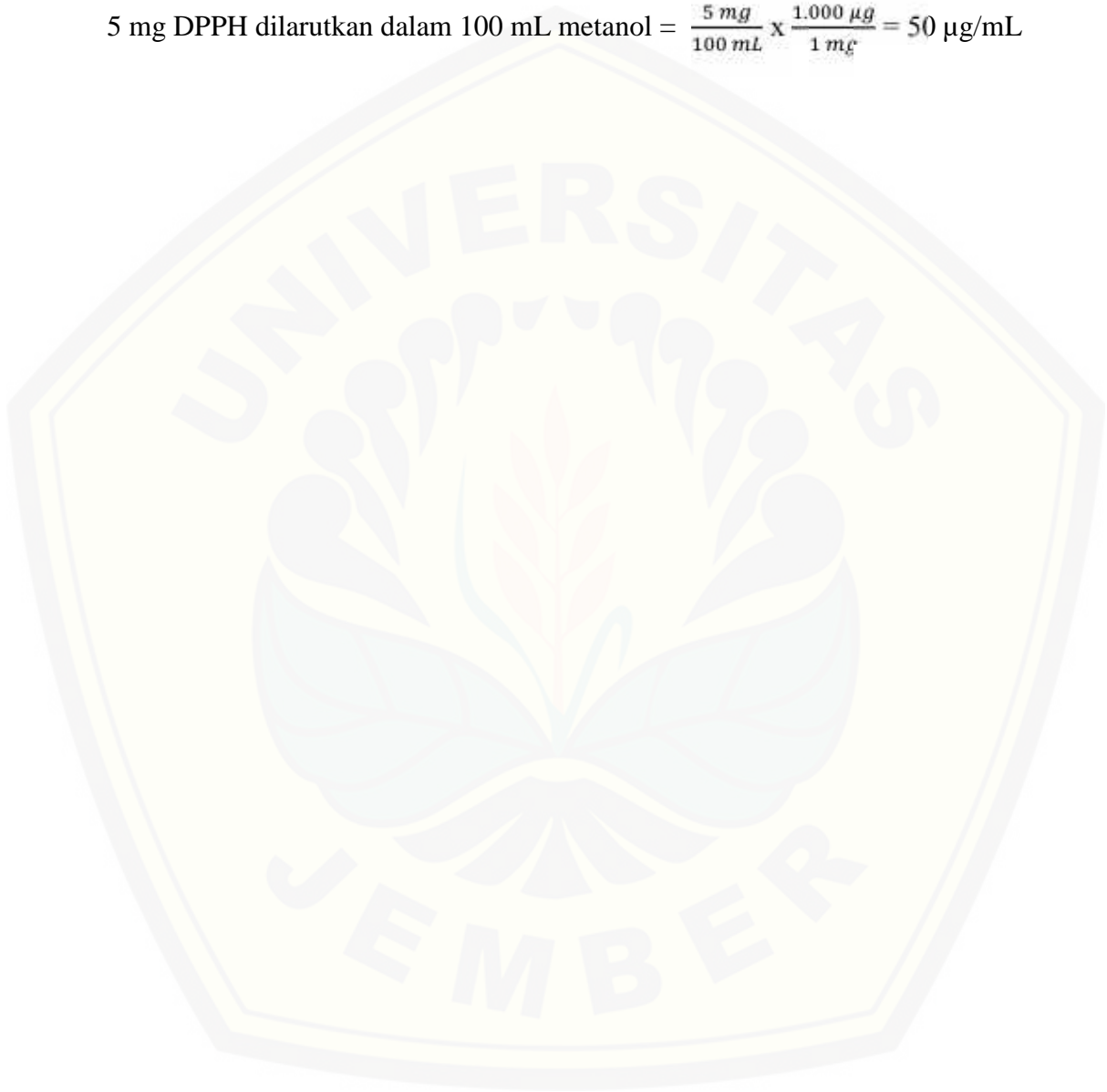
Lampiran 4.7 Pembuatan Larutan DPPH

Konsentrasi DPPH yang dibuat = 50 µg/mL (0,127 mM)

Mr DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) = 394,33 (Molyneux, 2004)

Penimbangan:

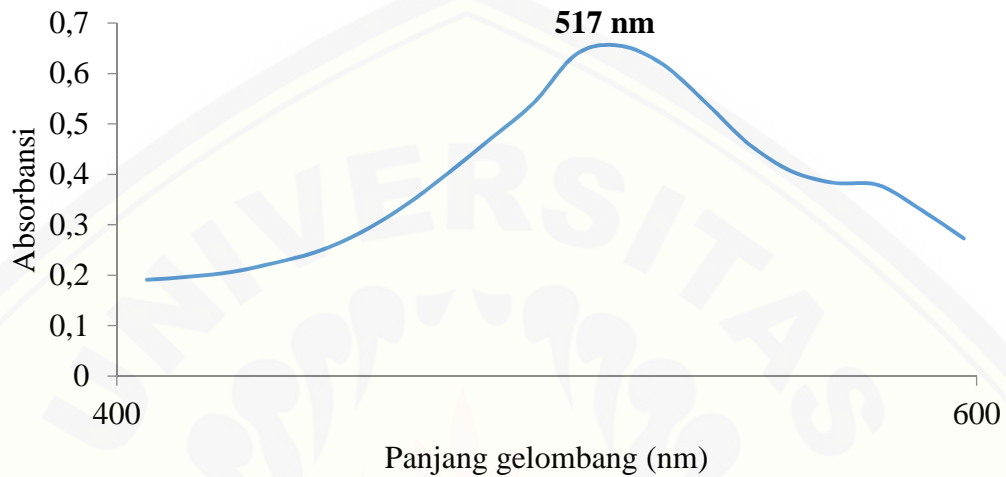
5 mg DPPH dilarutkan dalam 100 mL metanol = $\frac{5 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \times \frac{1.000 \text{ } \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$



Lampiran 4.8 Penentuan Panjang Gelombang DPPH dan Waktu Optimum**Sampel dapat Bereaksi Sempurna dengan DPPH**

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

1. Grafik



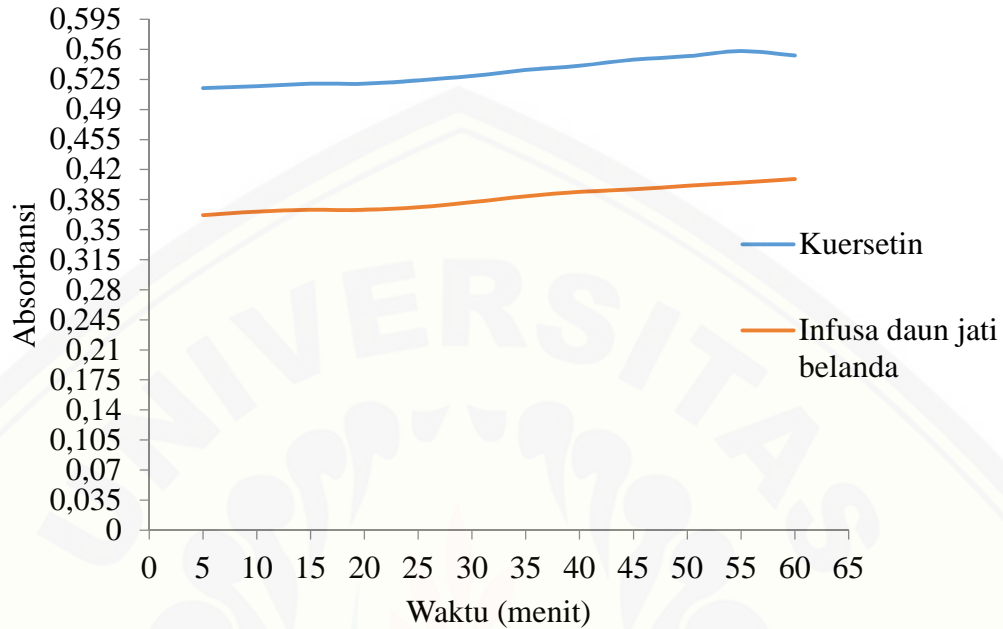
2. Data absorbansi

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
401	0,191	501	0,565
402	0,191	502	0,570
403	0,191	503	0,576
404	0,191	504	0,581
405	0,191	505	0,631
406	0,191	506	0,635
407	0,191	507	0,639
408	0,191	508	0,643
409	0,191	509	0,646
410	0,192	510	0,649
411	0,192	511	0,650
412	0,193	512	0,650
413	0,194	513	0,651
414	0,194	514	0,652
415	0,195	515	0,653
416	0,196	516	0,654
417	0,197	517	0,655
418	0,197	518	0,654
419	0,198	519	0,652
420	0,199	520	0,650
421	0,200	521	0,647

422	0,201	522	0,644
423	0,202	523	0,639
424	0,204	524	0,633
425	0,205	525	0,628
426	0,206	526	0,623
427	0,207	527	0,618
428	0,209	528	0,611
429	0,210	529	0,605
430	0,212	530	0,597
431	0,214	531	0,590
432	0,215	532	0,583
433	0,217	533	0,575
434	0,219	534	0,567
435	0,221	535	0,559
436	0,223	536	0,550
437	0,225	537	0,542
438	0,226	538	0,533
439	0,228	539	0,525
440	0,230	540	0,516
441	0,232	541	0,507
442	0,235	542	0,498
443	0,237	543	0,489
444	0,240	544	0,481
445	0,242	545	0,473
446	0,245	546	0,466
447	0,248	547	0,460
448	0,251	548	0,453
449	0,254	549	0,445
450	0,257	550	0,438
451	0,260	551	0,432
452	0,264	552	0,426
453	0,269	553	0,421
454	0,273	554	0,416
455	0,277	555	0,412
456	0,282	556	0,409
457	0,286	557	0,406
458	0,291	558	0,403
459	0,296	559	0,400
460	0,300	560	0,397
461	0,305	561	0,394
462	0,310	562	0,392
463	0,316	563	0,389
464	0,321	564	0,387
465	0,327	565	0,386
466	0,332	566	0,384
467	0,338	567	0,383

468	0,344	568	0,382
469	0,350	569	0,381
470	0,356	570	0,380
471	0,362	571	0,380
472	0,369	572	0,380
473	0,375	573	0,380
474	0,382	574	0,381
475	0,389	575	0,380
476	0,395	576	0,379
477	0,402	577	0,379
478	0,408	578	0,378
479	0,415	579	0,376
480	0,421	580	0,373
481	0,428	581	0,370
482	0,435	582	0,366
483	0,443	583	0,359
484	0,450	584	0,351
485	0,457	585	0,344
486	0,464	586	0,337
487	0,471	587	0,330
488	0,478	588	0,323
489	0,485	589	0,316
490	0,492	590	0,309
491	0,500	591	0,302
492	0,507	592	0,296
493	0,514	593	0,290
494	0,522	594	0,284
495	0,529	595	0,280
496	0,536	596	0,276
497	0,542	597	0,273
498	0,548	598	0,271
499	0,554	599	0,273
500	0,560	600	0,290

b. Penentuan waktu optimum sampel dapat bereaksi sempurna dengan DPPH



Menit ke-	Absorbansi	
	Kuersetin (15,3 µg/mL)	Infusa daun jati belanda (1,06 µg/mL)
5	0,515	0,367
10	0,517	0,371
15	0,52	0,373
20	0,52	0,373
25	0,524	0,376
30	0,529	0,382
35	0,536	0,389
40	0,541	0,394
45	0,548	0,397
50	0,552	0,401
55	0,558	0,405
60	0,553	0,409

Lampiran 4.9 Perhitungan Larutan Uji Aktivitas Antioksidan

1. Infusa Daun Jati Belanda

$$\text{Larutan induk} : \frac{25,5 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 1020 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Seri konsentrasi:

$$\checkmark \frac{25 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 1020 \text{ } \mu\text{g/mL} = 5,1 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{50 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 1020 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10,2 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{75 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 1020 \text{ } \mu\text{g/mL} = 15,3 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{100 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 1020 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20,4 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{125 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 1020 \text{ } \mu\text{g/mL} = 25,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

2. Kuersetin

$$\text{Larutan induk} : \frac{5,3 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} \times \frac{1.000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 106 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Seri konsentrasi:

$$\checkmark \frac{12,5 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 106 \text{ } \mu\text{g/mL} = 0,265 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{25 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 106 \text{ } \mu\text{g/mL} = 0,53 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{50 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 106 \text{ } \mu\text{g/mL} = 1,06 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{100 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 106 \text{ } \mu\text{g/mL} = 2,12 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{200 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 106 \text{ } \mu\text{g/mL} = 4,24 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{300 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 106 \text{ } \mu\text{g/mL} = 6,36 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 4.10 Data Absorbansi Peredaman DPPH dan Persamaan Regresi

1. Infusa Daun Jati Belanda

- Replikasi 1

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi dalam kuvet (µg/mL)	Abs K(-)	Abs sampel	% Peredaman DPPH	IC ₅₀ (µg/mL)
5,100	2,550		0,525	15,05	
10,200	5,100		0,374	39,48	
15,300	7,650	0,618	0,262	57,61	7,362
20,400	10,200		0,193	68,77	
25,500	12,750		0,137	77,83	

Persamaan regresi $y = 6,0727x + 5,2913$ dengan nilai $R^2 = 0,9585$ digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC₅₀ (dimana $y = 50$):

$$50 = 6,0727x + 5,2913$$

$$x = \frac{(50 - 5,2913)}{6,0727}$$

$$x = 7,362 \text{ µg/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 7,362 \text{ µg/mL}$$

- Replikasi 2

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi dalam kuvet (µg/mL)	Abs K(-)	Abs sampel	% Peredaman DPPH	IC ₅₀ (µg/mL)
5,100	2,550		0,522	15,53	
10,200	5,100		0,371	39,97	
15,300	7,650	0,618	0,239	61,33	6,843
20,400	10,200		0,149	75,89	
25,500	12,750		0,093	84,95	

Persamaan regresi $y = 6,8532x + 3,1068$ dengan nilai $R^2 = 0,9678$ digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC₅₀ (dimana $y = 50$):

$$50 = 6,8532x + 3,1068$$

$$x = \frac{(50 - 3,1068)}{6,8532}$$

$$x = 6,843 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 6,843 \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam kuvet ($\mu\text{g/mL}$)	Abs K(-)	Abs sampel	% Peredaman DPPH	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
5,100	2,550		0,522	15,53	
10,200	5,100		0,306	50,49	
15,300	7,650	0,618	0,224	63,75	6,355
20,400	10,200		0,138	77,67	
25,500	12,750		0,096	84,47	

Persamaan regresi $y = 6,4725x + 8,8673$ dengan nilai $R^2 = 0,9143$ digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC_{50} (dimana $y = 50$):

$$50 = 6,4725x + 8,8673$$

$$x = \frac{(50 - 8,8673)}{6,4725}$$

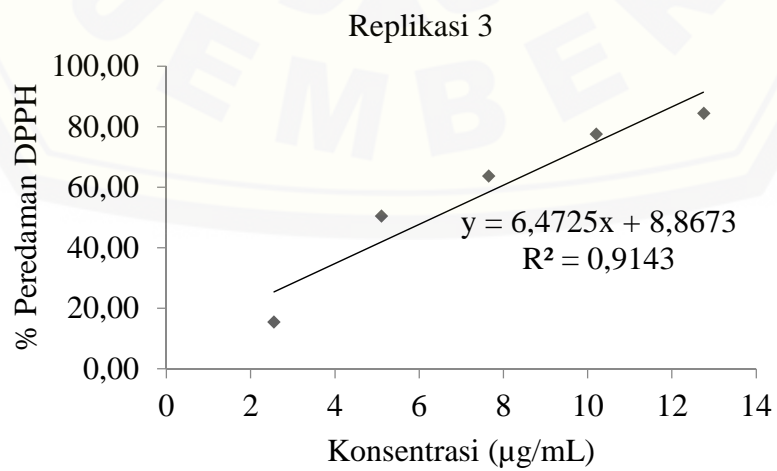
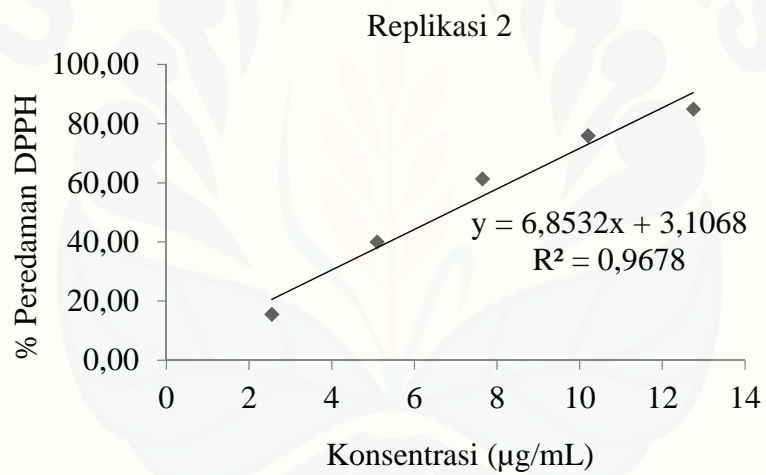
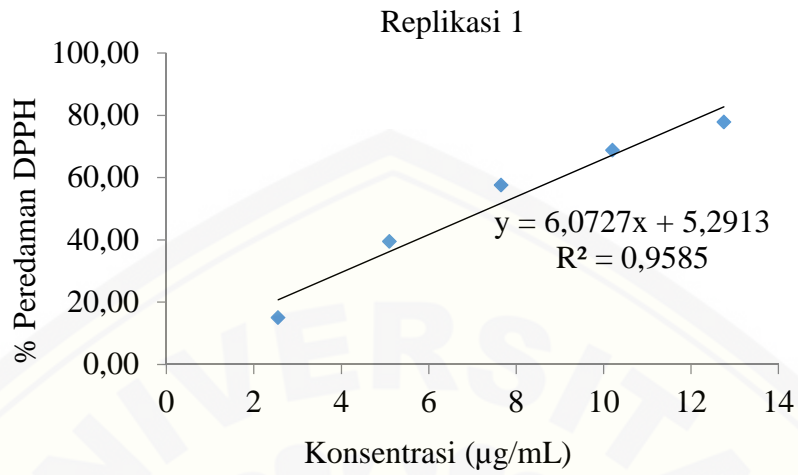
$$x = 6,355 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 6,355 \mu\text{g/mL}$$

- Rata-rata Nilai IC_{50} dan SD

IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Replikasi	Rata-rata \pm SD
7,362	
6,843	6,853 \pm 0,504
6,355	

- Regresi Linier IC₅₀ Infusa Daun Jati Belanda



2. Kuersetin

• Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam kuvet ($\mu\text{g/mL}$)	Abs K(-)	Abs sampel	% Peredaman DPPH	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
0,265	0,133		0,572	7,44	
0,53	0,265		0,523	15,37	
1,06	0,530	0,618	0,513	16,99	1,922
2,12	1,060		0,430	30,42	
4,24	2,120		0,298	51,78	
6,36	3,180		0,120	80,58	

Persamaan regresi $y = 22,631x + 5,2792$ dengan nilai $R^2 = 0,9823$ digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC_{50} (dimana $y = 50$):

$$50 = 22,631x + 5,2792$$

$$x = \frac{(50 - 5,2792)}{22,631}$$

$$x = 1,922 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 1,922 \mu\text{g/mL}$$

• Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam kuvet ($\mu\text{g/mL}$)	Abs K(-)	Abs sampel	% Peredaman DPPH	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
0,265	0,133		0,573	7,28	
0,53	0,265		0,530	14,24	
1,06	0,530	0,618	0,516	16,50	1,947
2,12	1,060		0,435	29,61	
4,24	2,120		0,304	50,81	
6,36	3,180		0,121	80,42	

Persamaan regresi $y = 22,721x + 4,6111$ dengan nilai $R^2 = 0,9839$ digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC_{50} (dimana $y = 50$):

$$50 = 22,721x + 4,6111$$

$$x = \frac{(50-4,6111)}{22,721}$$

$$x = 1,947 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 1,947 \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam kuvet ($\mu\text{g/mL}$)	Abs K(-)	Abs sampel	% Peredaman DPPH	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
0,265	0,133		0,574	7,12	
0,53	0,265		0,537	13,11	
1,06	0,530	0,618	0,517	16,34	1,964
2,12	1,060		0,437	29,29	
4,24	2,120		0,307	50,32	
6,36	3,180		0,123	80,10	

Persamaan regresi $y = 22,743x + 4,0746$ dengan nilai $R^2 = 0,9382$ digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dengan menghitung nilai x dengan cara mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut.

Perhitungan IC_{50} (dimana $y = 50$):

$$50 = 22,743x + 4,0746$$

$$x = \frac{(50-4,0746)}{22,743}$$

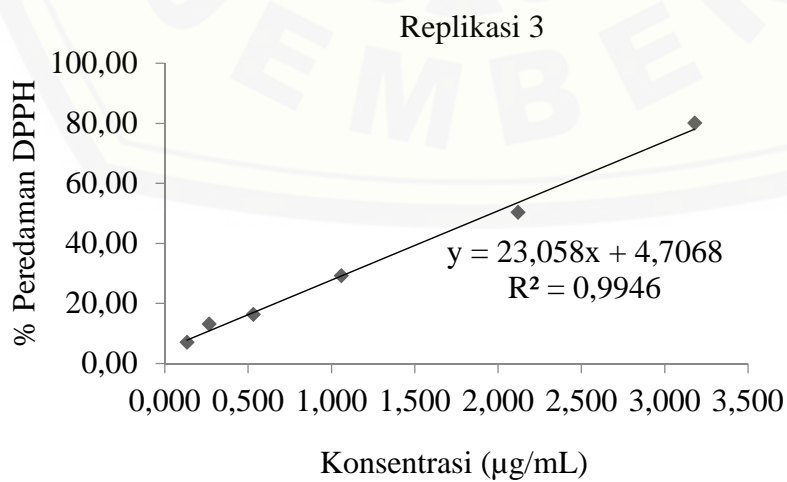
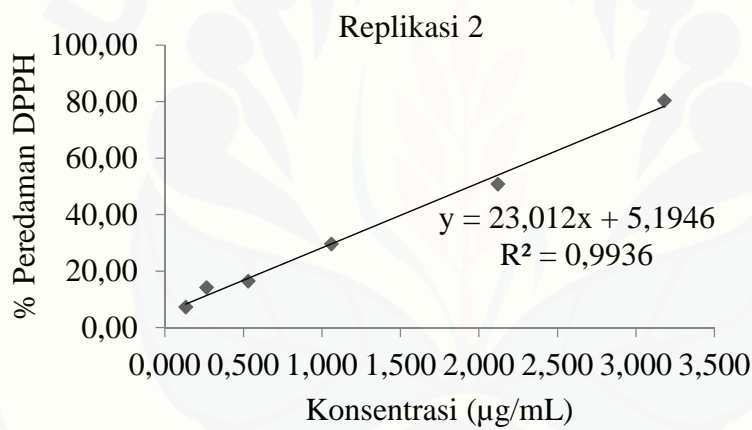
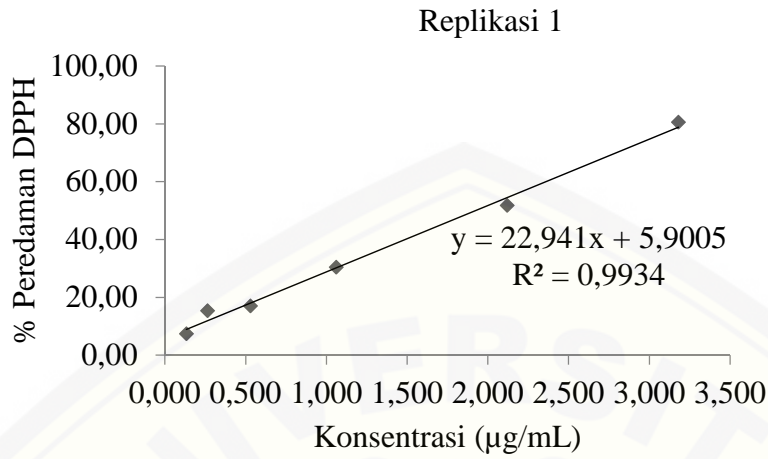
$$x = 1,964 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 1,964 \mu\text{g/mL}$$

- Rata-rata Nilai IC_{50} dan SD

IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Replikasi	Rata-rata \pm SD
1,922	
1,947	1,945 \pm 0,021
1,964	

- Regresi Linier IC₅₀ Infusa Kuersetin



Lampiran 4.11 Perhitungan Bahan Penetapan Kadar Fenol Total Infusa Daun Jati Belanda

1. Pembuatan Reagen

- Folin-Ciocalteu (1:10)

1 mL reagen Folin-Ciocalteu dilarutkan dalam 10 mL akuades.

- Larutan Na_2CO_3 7,5%

$$\frac{x \text{ g}}{50 \text{ mL}} \times 100\% = 7,5\%$$

$$x = \frac{7,5\% \times 50}{100\%} = 3,75 \text{ g}$$

Na_2CO_3 yang ditimbang adalah 3,75 g

2. Pembuatan Standar Asam Galat

Larutan induk yang dibuat adalah 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$\frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 1000 \mu\text{g/mL}$$

Penimbangan asam galat = 10,7 mg

$$\text{Larutan induk} = \frac{10,7 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 1070 \mu\text{g/mL}$$

Sebanyak 10,7 mg asam galat dilarutkan dalam 10 mL metanol hingga didapatkan konsentrasi 1070 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Pengenceran larutan induk:

$$\checkmark \frac{0,064 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 1070 \mu\text{g/mL} = 34,089 \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{0,128 \text{ mL}}{\text{mL}} \times 1070 \mu\text{g/mL} = 68,372 \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{0,255 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 1070 \mu\text{g/mL} = 136,744 \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{0,382 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 1070 \mu\text{g/mL} = 204,617 \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{0,51 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 1070 \mu\text{g/mL} = 272,989 \mu\text{g/mL}$$

3. Pembuatan Larutan Uji Infusa Daun Jati Belanda

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 1000 \mu\text{g/mL}$$

Sebanyak 25 mg ekstrak kering infusa daun jati belanda dilarutkan dalam 25 mL metanol hingga didapatkan konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Lampiran 4.12 Perhitungan Kadar Fenol Total Infusa Daun Jati Belanda

1. Asam Galat

• Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam kuvet ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi sampel
34,089	0,67	0,146
68,372	1,34	0,238
136,744	2,68	0,502
204,617	4,01	0,677
272,989	5,35	0,975

• Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam kuvet ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi sampel
34,089	0,67	0,142
68,372	1,34	0,226
136,744	2,68	0,48
204,617	4,01	0,635
272,989	5,35	0,965

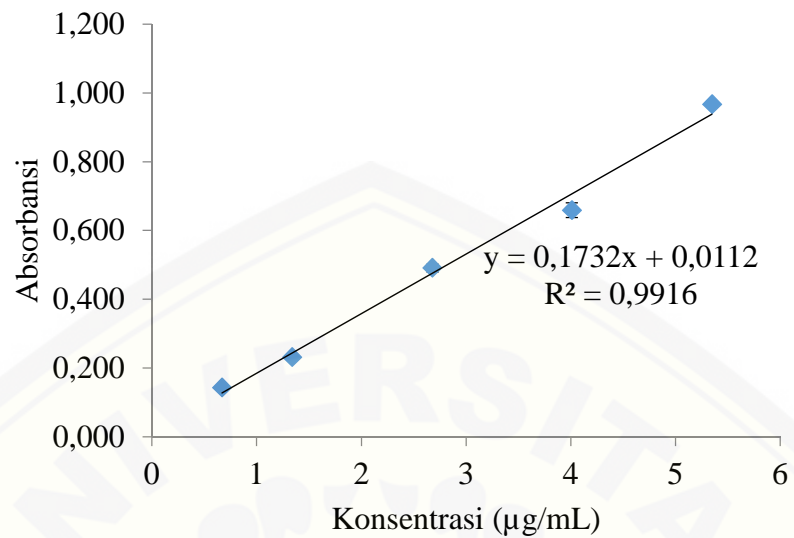
• Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam kuvet ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi sampel
34,089	0,67	0,141
68,372	1,34	0,228
136,744	2,68	0,49
204,617	4,01	0,664
272,989	5,35	0,961

• Rata-rata Nilai Absorbansi dan SD

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi dalam kuvet ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata absorbansi \pm SD
34,089	0,67	0,143 \pm 0,003
68,372	1,34	0,231 \pm 0,006
136,744	2,68	0,491 \pm 0,011
204,617	4,01	0,659 \pm 0,022
272,989	5,35	0,967 \pm 0,007

- Regresi Linier Rata-rata Nilai Absorbansi vs Konsentrasi Asam Galat

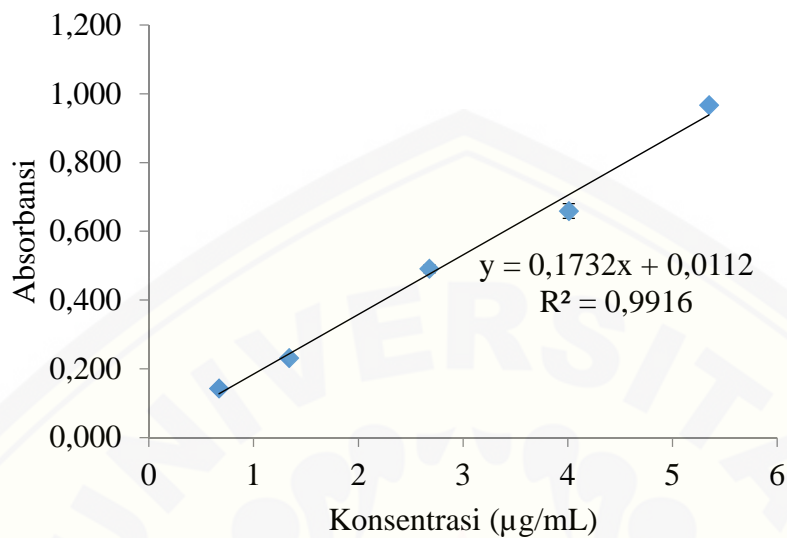


2. Infusa Daun Jati Belanda

- Hasil Penetapan Kadar Fenol Total

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi	Kadar (mg GAE/g infusa)	Rata-rata kadar ±SD (mg GAE/g infusa)
1000	0,153	41,754	46,203±2,504
	0,156	42,637	
	0,140	37,926	

Lampiran 4.13 Contoh Perhitungan Penetapan Kadar Fenol Total Infusa Daun Jati Belanda



Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh yaitu: $y = 0,1732x + 0,0112$ ($R^2 = 0,9916$). Berdasarkan persamaan yang didapatkan, dapat diketahui nilai x atau kandungan fenol total larutan infusa daun jati belanda ekivalen kuersetin dengan memasukkan nilai absorbansi sampel infusa daun jati belanda ke y .

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi
1000	0,153

Berikut contoh perhitungannya:

$$y = 0,1732x + 0,0112$$

$$0,153 = 0,1732x + 0,0112$$

$$0,1732x = 0,153 - 0,0112$$

$$x = 0,819 \mu\text{g GAE/mL}$$

$$\text{Kadar Fenol} = \frac{\text{konsentrasi yang didapat} \times \text{volume dalam kuvet} \times \text{volume awal}}{\text{volume pengambilan cuplikan} \times \text{berat ekstrak}}$$

$$= \frac{0,819 \mu\text{g} \frac{\text{GAE}}{\text{mL}} \times 2,55 \text{ mL} \times 25 \text{ mL}}{50 \mu\text{L} \times 25 \text{ mg}}$$

$$= 41,754 \text{ mg GAE/ g infusa}$$

Lampiran 4.14 Perhitungan Bahan Penetapan Kadar Flavonoid Total Infusa Daun Jati Belanda

1. Pembuatan Larutan AlCl_3 10%

Larutan dibuat dengan menimbang AlCl_3 sebanyak 2,5 g dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 25 mL hingga tepat tanda.

2. Pembuatan Larutan NaNO_2 5%

Larutan dibuat dengan menimbang NaNO_2 sebanyak 500 mg dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL hingga tepat tanda.

3. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Larutan induk yang dibuat adalah 500 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{5 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 500 \mu\text{g/mL}$$

Penimbangan kuersetin = 5,0 mg

$$\text{Larutan induk} = \frac{5 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 500 \mu\text{g/mL}$$

Sebanyak 5,0 mg kuersetin dilarutkan dalam 10 mL metanol hingga didapatkan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$.

Pengenceran larutan induk:

$$\checkmark \frac{0,139 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/mL} = 34,65 \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{0,277 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/mL} = 69,3 \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{0,56 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/mL} = 138,6 \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{1,11 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/mL} = 277,2 \mu\text{g/mL}$$

$$\checkmark \frac{1,68 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/mL} = 420 \mu\text{g/mL}$$

4. Pembuatan Larutan Uji Infusa Daun Jati Belanda

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 1000 \mu\text{g/mL}$$

Sebanyak 25 mg ekstrak kering infusa daun jati belanda dilarutkan dalam 25 mL metanol hingga didapatkan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Lampiran 4.15 Perhitungan Kadar Flavonoid Total Infusa Daun Jati Belanda

1. Kuersetin

- Replikasi 1

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi dalam kuvet (µg/mL)	Absorbansi sampel
34,65	4,95	0,178
69,3	9,9	0,194
138,6	19,8	0,439
277,2	39,6	0,673
420	60	0,948
500	71,43	1,107

- Replikasi 2

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi dalam kuvet (µg/mL)	Absorbansi sampel
34,65	4,95	0,181
69,3	9,9	0,205
138,6	19,8	0,357
277,2	39,6	0,674
420	60	0,967
500	71,43	1,129

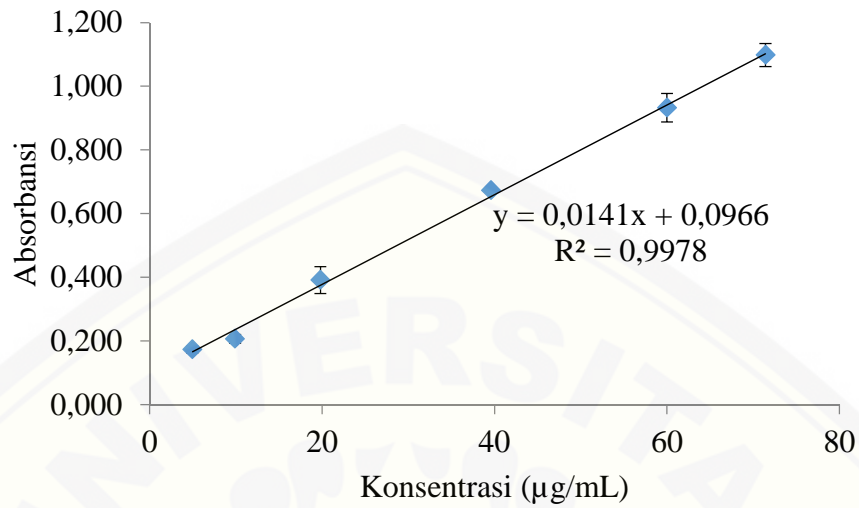
- Replikasi 3

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi dalam kuvet (µg/mL)	Absorbansi sampel
34,65	4,95	0,161
69,3	9,9	0,221
138,6	19,8	0,378
277,2	39,6	0,673
420	60	0,882
500	71,43	1,058

- Rata-rata Nilai Absorbansi dan SD

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi dalam kuvet (µg/mL)	Rata-rata absorbansi±SD
34,65	4,95	0,173±0,011
69,3	9,9	0,207±0,014
138,6	19,8	0,391±0,043
277,2	39,6	0,673±0,001
420	60	0,932±0,045
500	71,43	1,098±0,036

- Regresi Linier Rata-rata Nilai Absorbansi vs Konsentrasi Kuersetin

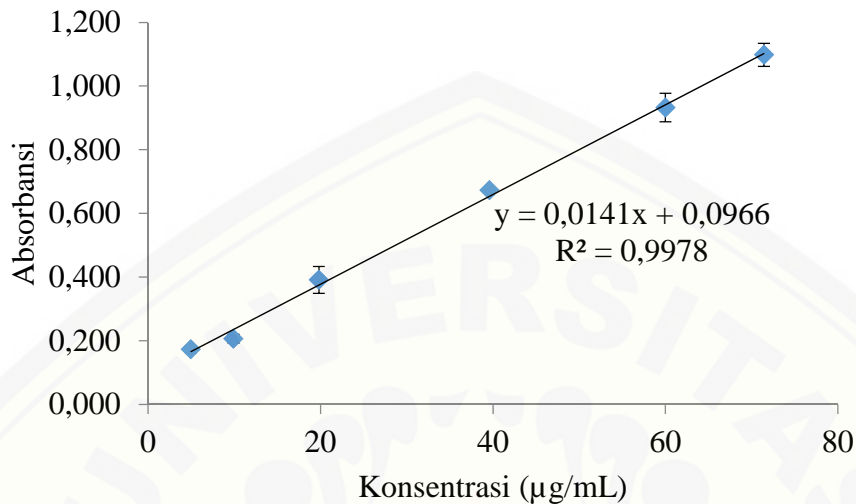


2. Infusa Daun Jati Belanda

- Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi	Kadar (mg QE/g infusa)	Rata-rata kadar ±SD (mg QE/g infusa)
1000	0,184	43,390	46,203±2,449
	0,192	47,362	
	0,184	47,856	

Lampiran 4.16 Contoh Perhitungan Penetapan Kadar Flavonoid Total Infusa Daun Jati Belanda



Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh yaitu: $y = 0,0141x + 0,0966$ ($R^2 = 0,9978$). Berdasarkan persamaan yang didapatkan, dapat diketahui nilai x atau kandungan flavonoid total larutan infusa daun jati belanda ekivalen kuersetin dengan memasukkan nilai absorbansi sampel infusa daun jati belanda ke y .

Konsentrasi sampel (µg/mL)	Absorbansi
1000	0,184

Berikut contoh perhitungannya:

$$y = 0,0141x + 0,0966$$

$$0,184 = 0,0141x + 0,0966$$

$$0,0141x = 0,184 - 0,0966$$

$$x = 6,199 \mu\text{g QE/mL}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar Flavonoid} &= \frac{\text{konsentrasi yang didapat} \times \text{volume dalam kuvet} \times \text{volume awal}}{\text{volume pengambilan cuplikan} \times \text{berat ekstrak}} \\ &= \frac{6,199 \mu\text{g}_{\text{QE}}^{\text{mL}} \times 1,05 \text{ mL} \times 25 \text{ mL}}{150 \mu\text{L} \times 25 \text{ mg}} \\ &= 43,390 \text{ mg QE/ g infusa} \end{aligned}$$