

Potensi Flavonoid dari Ekstrak Etil Asetat Daun Kembang Bulan (*Tithonia Diversifolia*) Sebagai *Inhibitor* α -Amilase: Studi *in Vitro* untuk Pengembangan Antidiabetes

Adelino Gusmao¹, Niken Luthfiyanti², Danang Raharjo³

^{1,2,3}Universitas Duta Bangsa Surakarta

Email: adelinogusmao44@gmail.com

Abstrak

Latar Belakang: diabetes melitus merupakan gangguan metabolit kronis yang ditandai peningkatan kadar glukosa darah akibat gangguan sekresi atau sensitivitas insulin. Penghambatan enzim α -Amilase dapat membantu mengendalikan peningkatan glukosa darah setelah makan melalui penghambatan pemecahan karbohidrat. Daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) mengandung metabolit sekunder, termasuk flavonoid, yang diduga berpotensi sebagai antidiabetes. Tujuan: Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi metabolit sekunder, menentukan kadar flavonoid total, serta mengetahui aktivitas ekstrak etil asetat daun kembang bulan dalam menghambat enzim α -Amilase secara *in Vitro*. Metode: Penelitian dilakukan secara eksperimental. Daun kembang bulan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat. Analisis meliputi skrining fitokimia, penetapan kadar flavonoid total dengan metode $AlCl_3$, menggunakan kuersetin sebagai pembanding, serta pengujian penghambatan α -Amilase menggunakan metode DNS dengan akarbose sebagai kontrol positif. Aktivitas ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} . Hasil: Skrining fitokimia menunjukkan adanya flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan terpenoid. Kadar flavonoid total diperoleh sebesar $32,120 \pm 2,245$ mg ekstrak. Ekstrak mampu menghambat aktivitas α -Amilase dengan nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm, yang termasuk kategori penghambatan kuat. Kesimpulan: Ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) menghambat α -Amilase yang kuat. Nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm menunjukkan bahwa ekstrak berpotensi dikembangkan sebagai sumber bahan alam kandidat antidiabetes.

Kata Kunci: *Tithonia Diversifolia*, Daun Kembang Bulan, Flavonoid Total, α -Amilase, IC_{50} , Antidiabetes

Abstract

*Background: Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder characterized by increased blood glucose levels due to impaired insulin secretion or insulin sensitivity. Inhibition of the α -amylase enzyme can help control postprandial blood glucose levels by inhibiting carbohydrate digestion. Kembang bulan leaves (*Tithonia Diversifolia*) contain secondary metabolites, including flavonoids, which are considered to have potential antidiabetic activity. Objective: This study aimed to identify secondary metabolites, determine the total flavonoid content, and evaluate the ability of ethyl acetate extract of kembang bulan leaves to inhibit α -amylase activity in Vitro. Methods: This experimental study used maceration with ethyl acetate as the extraction solvent. The analyses included phytochemical screening, determination of total flavonoid content using the $AlCl_3$ method with quercetin as a standard, and α -amylase inhibition testing using the DNS method with acarbose as a positive control. Inhibitory activity was determined based on the IC_{50} value. Results: Phytochemical screening showed the presence of flavonoids, alkaloids, saponins, tannins, and terpenoids. The total flavonoid content was 32.120 ± 2.245 mg QE/g extract. The extract inhibited α -amylase activity with an IC_{50} value of 76.59 ppm, which was categorized as strong inhibition. Conclusion: The ethyl acetate extract of kembang bulan leaves (*Tithonia Diversifolia*) contains several secondary metabolite groups and exhibits strong α -amylase inhibitory activity. The IC_{50} value of 76.59 ppm indicates that the extract has potential to be developed as a natural source for antidiabetic candidates.*

Keywords: Tithonia Diversifolia, Kembang Bulan Leaves, Total Flavonoids, α -Amylase, IC_{50} , Antidiabetic

1. PENDAHULUAN

Diabetes melitus adalah penyakit metabolik yang ditandai oleh tingginya kadar gula darah akibat gangguan produksi insulin, resistensi insulin, atau keduanya (Sundayana *et al.*, 2021). Saat ini, prevalensi DM terus meningkat secara signifikan, baik secara nasional maupun global. Apabila DM tidak ditangani dengan baik DM menjadi salah satu penyebab utama komplikasi kronis serius, seperti kronis neuropati, nefropati, retinopati, dan penyakit kardiovaskular. Diperlukan upaya berkelanjutan yang efektif untuk mencegah terjadinya komplikasi (Migdalís, 2024).

Mekanisme utama yang komplikasi DM dan stress oksidatif seluler terjadi ketika keseimbangan sel terganggu, sehingga menyebabkan radikal bebas yang dapat merusak sel jaringan. Hiperglikemia kronis turut mengaktifkan sistem kekebalan tubuh dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi serta spesifik. Oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species/ROS*), yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel. Kematian peningkatan ROS di mitokondria dan sitosol berkontribusi pada stress oksidatif melalui respirasi mitokondria aktivitas metabolisme alternatif, dan pembentukan produk akhir glikasi lanjutan (*Advanced Glycation End Products/AGEs*) (Chen *et al.*, 2024). Keberadaan ROS di mitokondria dan sitosol berkontribusi terhadap stress oksidatif melalui respirasi mitokondria, aktivasi metabolisme alternatif, dan pembentukan produk akhir glikasi lanjut (*AGEs*). Interaksi antara hiperglikemia, stress oksidatif dan peradangan membentuk kelompok patologis yang relative kuat, mengganggu resistensi insulin, dan merusak jaringan. Setiap individu ke organ target interaksi antara hiperglikemia, stress oksidatif, dan peradangan menghasilkan kelompok patologis yang relative kuat, mengganggu resistensi insulin dan merusak jaringan (Indri *et al.*, 2025).

Salah satu pendekatan penting dalam pengobatan diabetes melitus adalah kadar glukosa darah (postprandial), yaitu peningkatan glukosa darah setelah mengonsumsi makanan. Peningkatan glukosa postprandial yang tidak terkendali dapat menyebabkan hiperglikemia kronis dan meningkatkan risiko terjadinya berbagai komplikasi dalam jangka panjang (Shibib *et al.*, 2024). Dalam proses pencernaan karbohidrat, enzim α -Amilase memiliki peran penting dalam memecah pati menjadi oligosakarida dan gula sederhana yang kemudian diserap sebagai glukosa. Dengan demikian, penghambatan aktivitas enzim α -Amilase menjadi salah satu pendekatan terapeutik yang dapat digunakan untuk memperlambat pemecahan karbohidrat serta mengurangi lonjakan kadar glukosa darah setelah makan (Aleksandr P. Kalinovskii *et al.*, 2024).

Tanaman obat merupakan sumber bahan alami yang menjanjikan karena kaya akan metabolit sekunder dengan beragam aktivitas biologis. Beberapa golongan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin diketahui memiliki potensi farmakologis yang signifikan (Suherman *et al.*, 2022). Di antara senyawa tersebut, flavonoid tidak hanya berperan sebagai antioksidan alami yang efektif, tetapi juga memiliki kemampuan dalam menghambat kerja enzim yang terlibat dalam pencernaan karbohidrat. Oleh sebab itu, pemanfaatan dan eksplorasi tanaman lokal menjadi peluang yang besar dalam pengembangan terapi pendukung (komplementar) untuk penyakit diabetes (Saeful Amin & Setiawati, 2025).

Daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*), adalah memiliki potensi yang besar dan tanaman ini tumbuh yang luas di wilayah tropic dan telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional (Fitriyanto *et al.*, 2020). Sejumlah penelitian melaporkan bahwa daun kembang bulan mengandung flavonoid serta berbagai senyawa bioaktif lain yang menunjukkan aktivitas antioksidan dan antidiabetes. Meskipun demikian, penelitian yang lebih mendalam dan terfokus, khususnya terhadap potensi flavonoid dari tanaman ini, masih diperlukan untuk diteliti lebih lanjut (Pradiptha, 2025).

Penelitian sebelumnya telah memberikan dasar ilmiah mengenai potensi farmakologis daun Kembang Bulan (*Tithonia Diversifolia*). Penelitian yang dilakukan oleh Yazid *et al.*, (2021) melaporkan bahwa ekstrak kasar daun Kembang Bulan menunjukkan aktivitas

antidiabetes secara *in vivo*, yang ditandai dengan kemampuannya menurunkan kadar glukosa darah pada tikus yang diinduksi diabetes. Sejalan dengan penelitian Yazid *et al.*, (2021), ekstrak daun Kembang Bulan memiliki potensi antidiabetes yang signifikan, di mana dalam studinya secara *in vivo* terbukti mampu menurunkan glukosa darah puasa secara efektif. Melalui pengujian secara *in Vitro*, penelitian awal terhadap aktivitas antioksidan dan kemampuan penghambatan enzim α -Amilase dapat dilakukan secara efektif sebagai tahap skrining awal dalam pengembangan kandidat obat. Data yang diperoleh dari uji *in Vitro* tersebut selanjutnya dapat menjadi dasar ilmiah yang kuat untuk penelitian lanjutan secara *in vivo* (Nguyen *et al.*, 2026).

Penelitian ini terlekat pada integrasi antara aktivitas antioksidan dan kemampuan penghambatan enzim α -Amilase, keduanya memiliki peran penting dalam pengelolaan diabetes secara komprehensif. Flavonoid yang diperoleh dari ekstraksi daun kembang bulan memiliki potensi yang menjanjikan untuk dikembangkan sebagai agen antidiabetes alami. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan untuk menghasilkan bukti ilmiah yang sah sebagai dasar dalam pengembangan produk fitofarmaka antidiabetes berbasis bahan alam di masa depan.

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi metabolit sekunder, menentukan kadar flavonoid total, serta mengetahui aktivitas ekstrak etil asetat daun kembang bulan dalam menghambat enzim α -Amilase secara *in Vitro*.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium secara *in Vitro* yang bertujuan mengetahui potensi flavonoid dari ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) sebagai antioksidan dan *inhibitor* enzim α -Amilase.

Penelitian dilaksanakan pada April-Juni 2026 di Laboratorium Universitas Duta Bangsa Surakarta, dengan tahapan meliputi persiapan sampel, ekstraksi daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*), pemisahan ekstrak yang mengandung flavonoid, serta pengujian aktivitas antioksidan dan inhibisi enzim α -Amilase secara *in Vitro*.

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi tiga, yaitu variabel bebas, terikat, dan kontrol. Variabel bebas berupa perbedaan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Variabel terikat mencakup kadar flavonoid total, persentase penghambatan radikal bebas, serta persentase inhibisi enzim α -Amilase. Sementara itu, variabel kontrol meliputi kondisi yang dipertahankan tetap sama, seperti suhu, lama inkubasi, volume reagen, konsentrasi enzim dan substrat, serta panjang gelombang pada pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, blender, ayakan No. 40 mesh, gelas ukur, labu ukur, beaker gelas, erlenmeyer, pipet ukur, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vortex mixer, *water bath*, inkubator (37°C), corong, kertas saring, spatula, botol vial, serta spektrofotometer UV-Vis. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*), etil asetat, metanol, aquades, aluminium klorida (AlCl₃), natrium asetat, kalium persulfat (K₂S₂O₈), enzim α -Amilase, pati (starch), larutan buffer fosfat, reagen DNS (3,5-dinitrosalisilat), kuersetin, asam askorbat, dan akarbosa.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1). Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman sampel daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) yang diperoleh dari Desa Pancot, Kelurahan Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, determinasi dilakukan di Laboratorium UPH Yankestrad RSUP Dr. Saragito, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia. Tujuan dilakukan determinasi yaitu mengidentifikasi tanaman uji untuk mengetahui bahwa tanaman yang dilakukan adalah benar tanaman daun kembang bulan.

Berdasarkan hasil determinasi dengan No. pengujian: PE/IV/2026/104 pada lampiran no 4 menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian adalah benar tanaman daun kembang bulan, Famili: *Asteraceae*, Spesies: *Tithonia Diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, Sinonim: *Mirasolia diversifolia* Hemsl.

2). Standarisasi Simplisia

Pengambilan simplisia basah daun kembang bulan sebanyak 5000 gram, sampel kering setelah pemansan 1200 dan diperoleh serbuk daun kembang bulan sebanyak 600 gram dengan rendemen simplisia sebesar 24 %.

Hasil penetapan susut pengeringan simplisia diperoleh nilai sebesar 7,05%, hal ini menunjukkan bahwa hilangnya kandungan air dan senyawa yang terkandung dalam simplisia telah memenuhi syarat yaitu tidak lebih dari 10%, apabila susut pengeringan tinggi dapat mempermudah pertumbuhan jamur mikroba lainnya. Hasil susut pengeringan simplisia disajikan di Tabel 1.

Tabel 1. Susut Pengeringan Simplisia

Replikasi	Susut Pengeringan	Rata-Rata	Persyaratan (FHI, 2023)
1	7,55 %	7,05%	< 10%
2	6,95 %		
3	6,65 %		

Hasil penetapan kadar air simplisia daun kembang bulan sebesar 8,03% hasil tersebut telah memenuhi syarat ketetapan uji kadar air simplisia yaitu tidak lebih dari 10%. Terlalu tinggi kadar air terkandung dalam simplisia maka semakin mudah ditumbuhi jamur dan mikroba. Hasil kadar air simplisia disajikan di Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Kadar Air Simplisia

Replikasi	Kadar Air (%)	Rata-Rata (%)	Persyaratan (FHI, 2023)
1	7,76 %	8,03 %	< 10%
2	8,10 %		
3	8,24 %		

Hasil uji kadar abu simplisia daun kembang bulan diperoleh sebesar 2,93%, sehingga telah memenuhi syarat kadar abu menurut parameter standar yaitu tidak lebih dari 10%, semakin tinggi kadar abu yang diperoleh maka semakin tinggi juga kandungan mineral dalam simplisia. Hasil uji kadar abu simplisia disajikan di Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Kadar Abu Simplisia

Replikasi	Kadar Abu (%)	Rata-Rata (%)	Persyaratan (FHI, 2023)
1	3,15 %	2,93 %	< 10 %
2	2,5 %		
3	3,15 %		

3). Ekstraksi dan Standarisasi Ekstrak

Tabel 4. Hasil Rendemen Ekstrak

Pelarut	Berat Simplisia	Berat Ekstrak	Rendemen (%)
Etil Asetat	500 gr		

Ekstrak etil asetat diperoleh sebanyak 76 gram ekstrak kental dengan jumlah rendemen 15,2% hasil tersebut telah memenuhi syarat yang baik yaitu nilainya tidak kurang dari 10%.

Tabel 4. Hasil Uji Organoleptik

No.	Parameter	Hasil pengamatan
1.	Bentuk	Ekstrak kental.
2.	Warna	Hijau Kehitaman.
3.	Bau	Bau Khas aromatik daun kembang bulan.
4.	Rasa	Pahit.
5.	Konsistensi	Kental dan homogen.

Hasil uji organoleptik menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) berbentuk kental, berwarna hijau kehitaman, berbau khas, dan homogen. Karakteristik tersebut menunjukkan bahwa ekstrak memiliki kondisi fisik yang baik dan dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, steroid, dan triterpenoid. Keberadaan senyawa tersebut ditunjukkan melalui perubahan warna atau terbentuknya endapan setelah penambahan pereaksi spesifik, yang menunjukkan bahwa etil asetat mampu mengekstraksi berbagai metabolit sekunder dari daun kembang bulan.

Tabel 5. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil	Hasil
Alkaloid	Mayer.	+	Terbentuk endapan kuning pucat (kren).
	Wagner.	+	Endapan kuning kecoklatan hingga cokelat.
Flavonoid	Dragendorff.	+	Terbentuk endapan kemerahan.
	Serbuk Mg, HCL pekat dan mil alkohol.	-	Terbentuk Warna kuning.
Saponin	Aquades panas dan HCl 2 N.	+	Busa tetap bertahan selama 10 menit.
Fenolik	FeCl ₃ 1%.	+	Larutan berubah menjadi hijau kehitaman hingga hitam.
Terpenoid	Asam Asetat Anhidrat dan Asam Sulfat pekat.	-	tidak terbentuk cincin merah kecokelatan pada batas dua lapisan.

Keterangan:

(+): menunjukkan positif mengandung metabolit sekunder

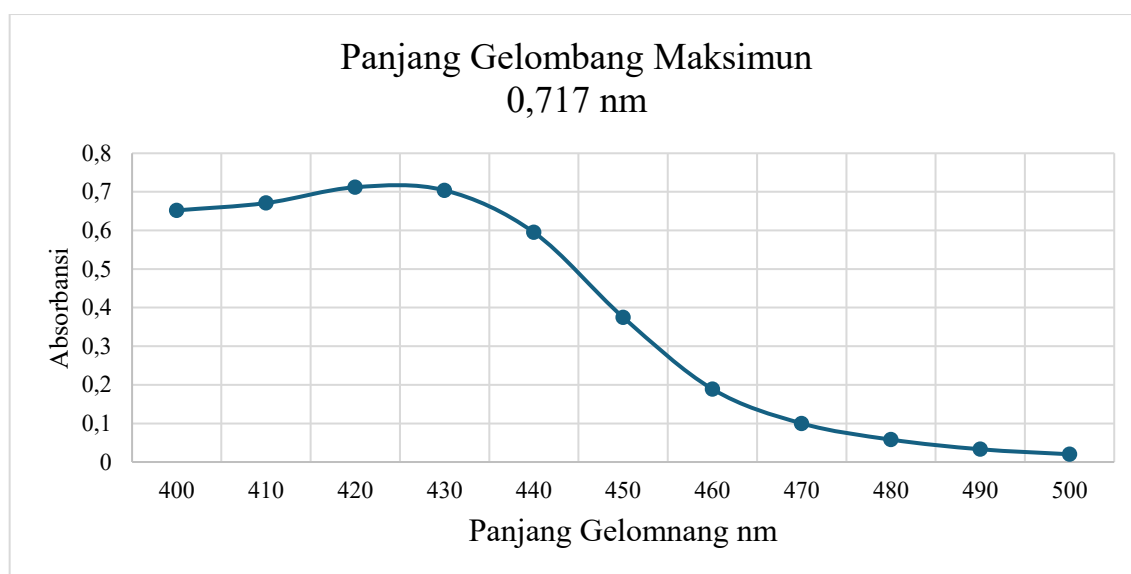
(-): menunjukkan negatif mengandung metabolit sekunder

4). Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etil Asetat Daun Kembang Bulan

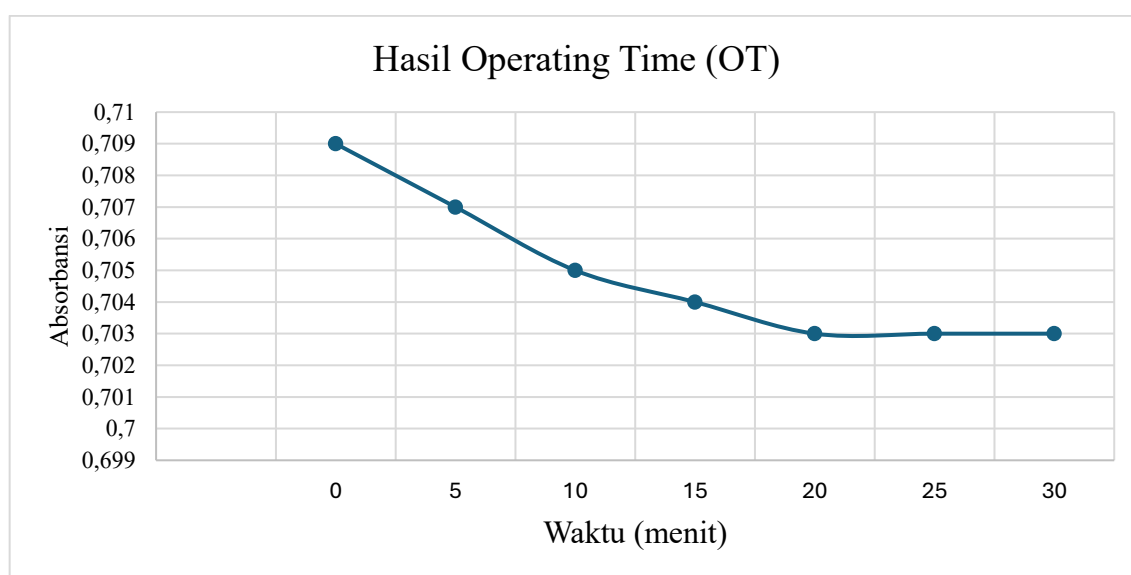
Penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) dilakukan menggunakan metode kolorimetri dengan spektrofotometri UV-Vis berdasarkan pembentukan kompleks berwarna antara senyawa flavonoid dan aluminium klorida ($AlCl_3$). Prinsip metode ini adalah terbentuknya kompleks stabil antara ion Al^{3+} dengan gugus hidroksil dan gugus keton pada struktur flavonoid sehingga menghasilkan warna kuning yang dapat menyerap cahaya pada daerah sinar tampak. Penambahan natrium asetat berfungsi menjaga kestabilan kompleks yang terbentuk sehingga menghasilkan serapan yang optimum selama proses pengukuran.

Kuersetin digunakan sebagai standar karena mampu membentuk kompleks stabil dengan $AlCl_3$. Larutan standar kuersetin dibuat dalam seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm untuk analisis kadar flavonoid total.

Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan pada rentang 400–500 nm setelah direaksikan dengan $AlCl_3$ dan natrium asetat. Hasil pemindaian menunjukkan puncak absorbansi pada 423–425 nm dengan nilai absorbansi 0,171, sehingga panjang gelombang tersebut digunakan sebagai panjang gelombang maksimum dalam analisis. Berdasarkan hasil tersebut, panjang gelombang 425 nm ditetapkan sebagai panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) untuk pengukuran kadar flavonoid total, karena pada daerah tersebut kompleks kuersetin- $AlCl_3$ memberikan serapan maksimum sehingga menghasilkan sensitivitas dan ketelitian analisis yang lebih baik. Selanjutnya, panjang gelombang tersebut digunakan untuk mengukur absorbansi larutan standar kuersetin maupun sampel ekstrak etil asetat daun kembang bulan. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Panjang Gelombang Maksimum

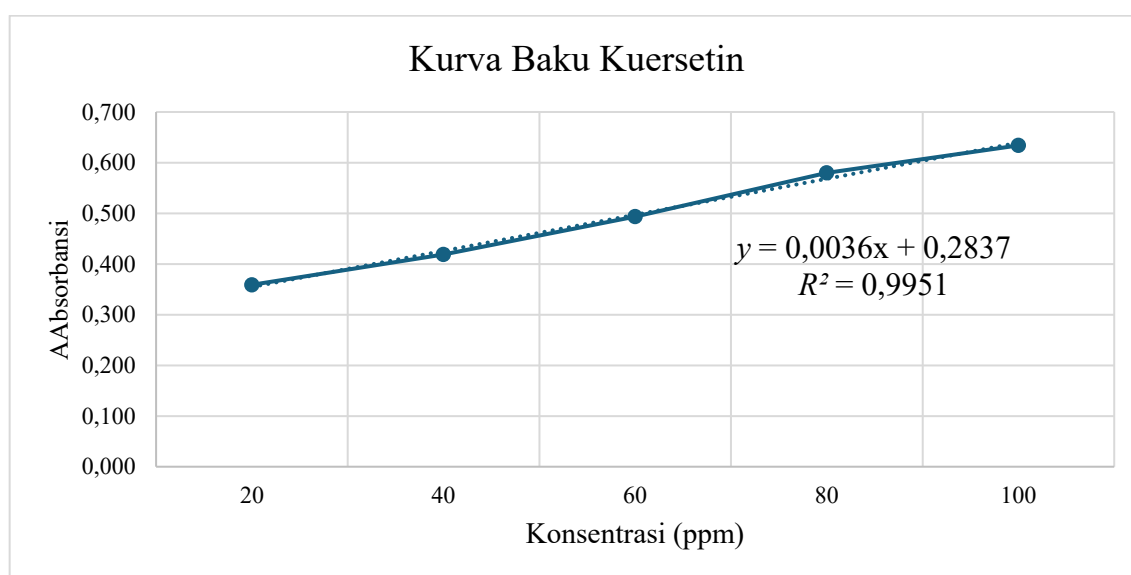


Gambar 2. Grafik Hasil *Operating Time* (OT)

Penentuan *Operating Time* dilakukan untuk mengetahui waktu kestabilan reaksi antara kuersetin, $AlCl_3$, dan natrium asetat. Pengukuran dilakukan selama 0–30 menit pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil menunjukkan absorbansi stabil pada menit ke-15 dengan nilai 0,704, sehingga waktu tersebut digunakan sebagai waktu inkubasi dalam penetapan kadar flavonoid total.

Penentuan kurva baku dilakukan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi kuersetin dan nilai absorbansi sebagai dasar perhitungan kadar flavonoid total. Kurva baku dibuat menggunakan larutan kuersetin dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Hasil pengukuran menunjukkan adanya hubungan linear antara peningkatan konsentrasi kuersetin dan nilai absorbansi. Kurva baku yang diperoleh disajikan pada Gambar 3.

Berdasarkan hasil analisis regresi linear, diperoleh persamaan $y = 0,0036x + 0,2837$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9951. Nilai R^2 tersebut menunjukkan bahwa 99,51% variasi nilai absorbansi dipengaruhi oleh perubahan konsentrasi larutan standar kuersetin, sedangkan 0,49% sisanya dipengaruhi oleh faktor lain, seperti kesalahan pengukuran atau variasi eksperimental. Nilai koefisien determinasi yang mendekati 1 menunjukkan bahwa kurva baku memiliki tingkat linearitas yang sangat baik, sehingga persamaan regresi tersebut layak digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total pada sampel ekstrak etil asetat daun kembang bulan. Dalam persamaan regresi tersebut, nilai y menyatakan absorbansi hasil pengukuran, sedangkan nilai x menyatakan konsentrasi flavonoid yang dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin. (mg QE/g) ekstrak.



Gambar 3. Grafik Kurva Baku Kuersetin

Tabel 6. Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kembang Bulan

Replikasi	Kadar Flavonoid (mg QE/g)	Rata-Rata Kadar Flavonoid (mg QE/g)
1	31,750	32,120 ± 2,245 mg QE/g
2	34,528	
3	30,083	

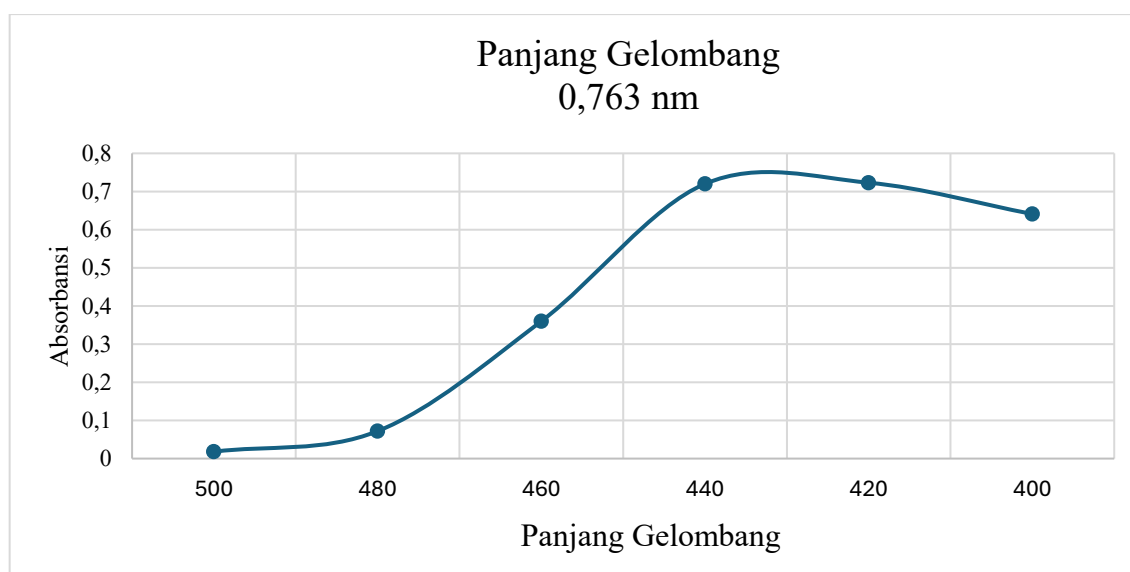
Pengukuran kadar flavonoid total dilakukan tiga kali replikasi dan dinyatakan dalam mg QE/g ekstrak. Hasilnya menunjukkan kadar flavonoid sebesar 31,750; 34,528; dan 30,083 mg QE/g pada masing-masing replikasi, dengan rata-rata 32,120 ± 2,245 mg QE/g ekstrak. Kadar flavonoid dihitung berdasarkan nilai absorbansi sampel yang dimasukkan ke dalam persamaan regresi kurva baku kuersetin.

5). Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase

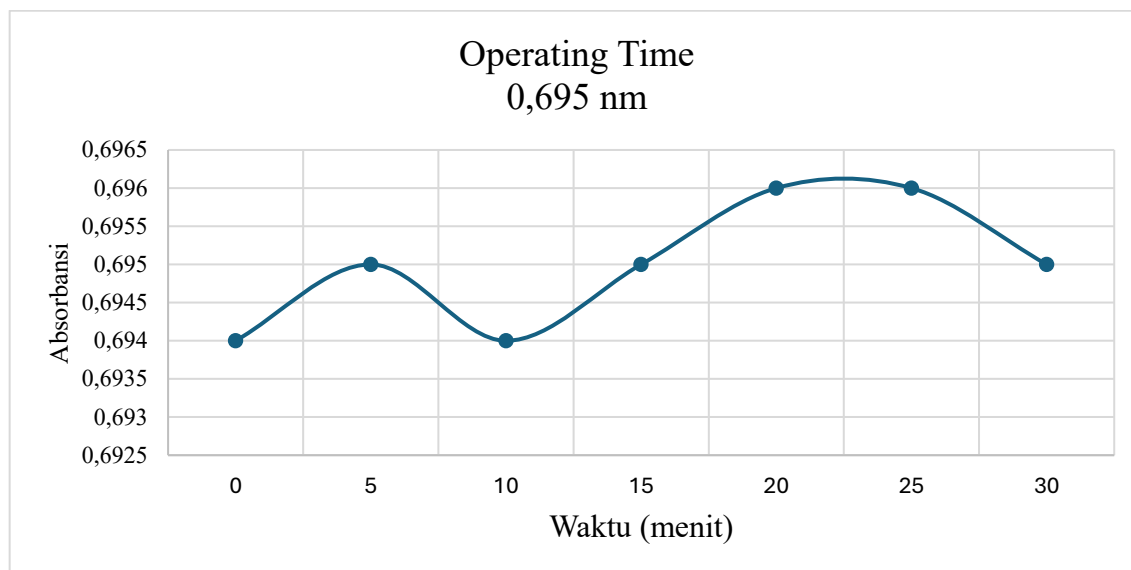
Penelitian ini bertujuan mengevaluasi potensi flavonoid ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) sebagai *inhibitor* enzim α -Amilase secara *in Vitro* menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pengujian didasarkan pada kemampuan senyawa aktif dalam ekstrak menghambat enzim α -Amilase sehingga hidrolisis pati menjadi gula pereduksi dapat berkurang. Semakin tinggi aktivitas penghambatan enzim, semakin sedikit gula pereduksi yang terbentuk aktivitas penghambatan enzim, semakin sedikit gula pereduksi yang terbentuk dan semakin besar potensi antidiabetes dari ekstrak yang diuji.

Pengujian dilakukan terhadap larutan blanko, kontrol blanko, kontrol sampel, sampel ekstrak etil asetat daun kembang bulan, serta akarbose sebagai kontrol positif. Akarbose digunakan sebagai pembanding karena merupakan *inhibitor* kompetitif enzim α -Amilase yang telah digunakan secara klinis dalam terapi diabetes melitus tipe 2. Penggunaan blanko, kontrol blanko, dan kontrol sampel bertujuan untuk mengoreksi absorbansi yang berasal dari reagen maupun warna ekstrak, sehingga nilai absorbansi yang diperoleh benar-benar mencerminkan aktivitas penghambatan enzim α -Amilase oleh sampel.

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas penghambatan enzim α -Amilase, terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) untuk memperoleh sensitivitas pengukuran yang optimal. Penentuan λ_{maks} dilakukan pada rentang panjang gelombang 400-500. Berdasarkan hasil pengukuran, absorbansi meningkat dari 0,641 pada 400 nm hingga mencapai nilai maksimum sebesar pada panjang gelombang 425 nm, kemudian mengalami penurunan pada panjang gelombang berikutnya. Oleh karena itu, 425 nm ditepkan sebagai gelombang maksimum yang digunakan pada seluruh pengukuran karena memberikan respons absorbansi tertinggi.



Gambar 4. Grafik Hasil Panjang Gelombang Maksimum Enzim α -Amilase



Gambar 5. Hasil Grafik Operating Time (OT) Enzim α -Amilase

Selanjutnya dilakukan penentuan *Operating Time* (OT) untuk mengetahui waktu ketika reaksi telah mencapai kondisi stabil sehingga pengukuran absorbansi dapat dilakukan secara konsisten. Pengamatan dilakukan selama 30 menit dengan interval 5 menit. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa absorbansi mengalami penurunan tertahap dari 0,134 pada menit ke-0. Penurunan absorbansi relatif kecil pada setiap interval pengamatan, dan pada menit ke-20 absorbansi mencapai 0,695 serta mulai menunjukkan kondisi yang stabil. Oleh karena itu, menit ke-20 ditetapkan sebagai *Operating Time* (OT) dan digunakan sebagai waktu inkubasi pada seluruh pengujian aktivitas penghambatan enzim α -Amilase.

Tabel 7. Hasil % Penghambatan Acarbose dan Ekstrak

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Penghambatan	IC_{50}
Acarbose	0,625	34,20	2,41
	1,25	46,39	
	2,5	57,75	
	5	65,21	
	10	78,34	
Ekstrak Etil Asetat Daun Kembang Bulan	12,5	22,72	76,59
	25	35,74	
	50	47,46	
	100	65,21	
	200	80,12	

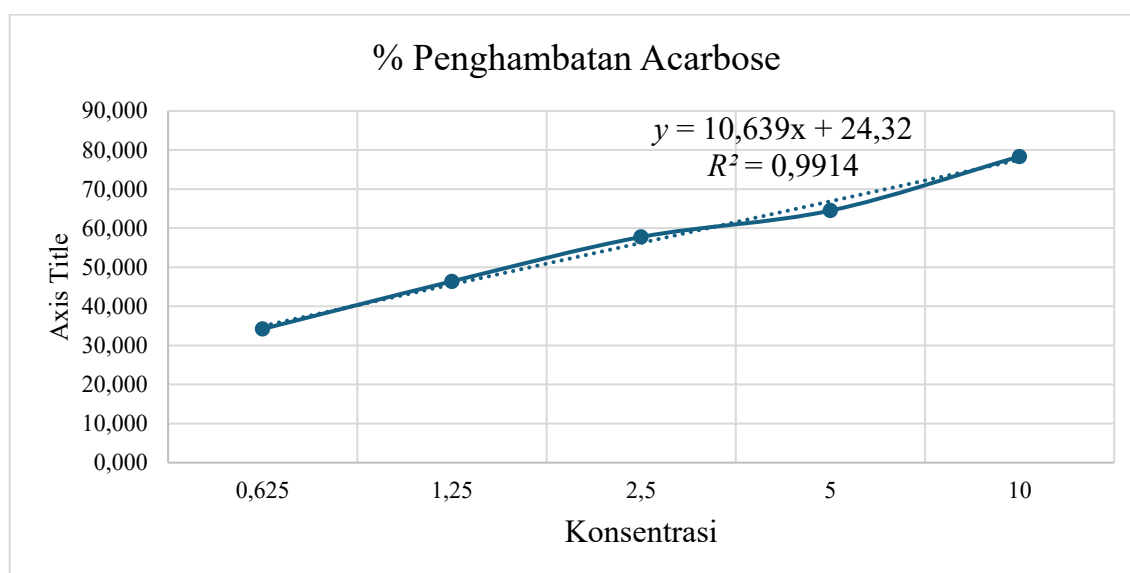
Berdasarkan Tabel 8. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa nilai absorbansi akarbose mengala penurunan sering dengan peningkatan konsentrasi. Semakin rendah nilai absorbansi yang diperoleh, semakin sedikit gula pereduksi yang terbentuk, sehingga menunjukkan bahwa aktivitas enzim α -Amilase semakin terhambat. Data absorbansi tersebut kemudian digunakan sebagai dasar untuk menghitung persentase penghambatan (inhibisi) serta menentukan nilai IC_{50} akarbose yang berfungsi sebagai kontrol positif dalam pengujian aktivitas penghambatan enzim α -Amilase.

Nilai persentase Penghambatan akarbose menunjukkan kecenderungan meningkat sering dengan bertambahnya konsentrasi yang diberikan Pada konsentrasi 0,625 ppm diperoleh persentase inhibisi sebesar 34,201%, kemudian meningkat menjadi 46,391% pada konsentrasi 1,25 ppm, 57,751% pada konsentrasi 2,5 ppm, 65,207% pada konsentrasi 5 ppm, dan mencapai

78,343% pada konsentrasi 10 ppm. Peningkatan konsentrasi akarbose meningkatkan kemampuan menghambat enzim α -Amilase, sehingga pembentukan gula pereduksi dan nilai absorbansi menjadi lebih rendah. Data persentase inhibisi selanjutnya digunakan untuk membuat kurva regresi linear dan menentukan nilai IC_{50} akarbose sebagai kontrol positif.

Berdasarkan Gambar 4.6, hubungan antara konsentrasi akarbose dengan penghambatan α -Amilase menghasilkan persamaan regresi linear $y = 10,639x + 24,32$ dengan nilai koefisien determinasi $R^2 = 0,9914$. Nilai koefisien determinasi tersebut menunjukkan bahwa 99,14% variasi persentase penghambatan enzim α -Amilase dapat dijelaskan oleh perubahan konsentrasi akarbose, sedangkan 0,86% sisanya dipengaruhi oleh faktor lain di luar model regresi. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan adanya hubungan yang sangat kuat antara konsentrasi dengan persentase penghambatan α -Amilase.

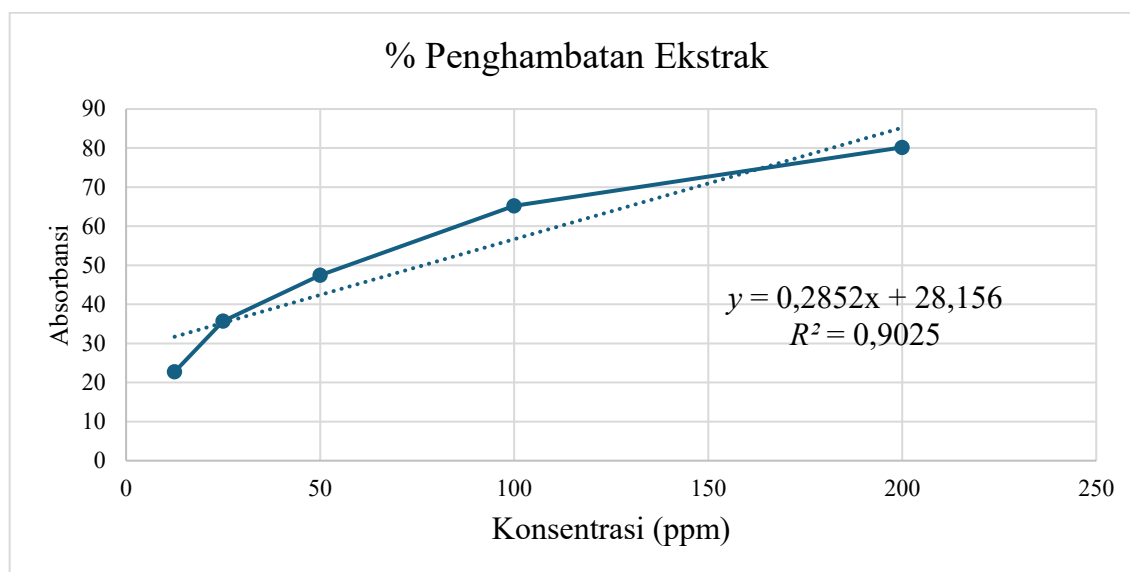
Berdasarkan persamaan regresi tersebut, diperoleh nilai IC_{50} akarbose sebesar 2,41 ppm. Nilai IC_{50} tersebut menunjukkan bahwa akarbose memiliki aktivitas penghambatan enzim α -Amilase yang sangat kuat digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian aktivitas penghambatan enzim α -Amilase. Hasil % penghambatan akarbose disajikan di Gambar 6.



Gambar 6. Hasil Grafik % Penghambatan Acarbose

Hasil pengujian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) menyebabkan penurunan nilai absorbansi, dari 0,261 pada konsentrasi 12,5 ppm menjadi 0,103 pada 200 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin besar aktivitas penghambatan terhadap enzim α -Amilase.

Hasil persentase penghambatan ekstrak etil asetat daun kembang bulan terdapat aktivitas enzim α -Amilase pada berbagai konsentrasi. Berdasarkan hasil pengujian, terlihat adanya peningkatan persentase inhibisi seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang digunakan. Persentase inhibisi bertambah dari 13,00% pada konsentrasi 12,5 ppm menjadi 65,67% pada konsentrasi 200 ppm. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa kemampuan ekstrak etil asetat dalam menghambat aktivitas enzim α -Amilase meningkat sejalan dengan kenaikan konsentrasi, sehingga menunjukkan adanya hubungan yang bergantung pada konsentrasi antara ekstrak dan aktivitas penghambatan enzim.



Gambar 7. Hasil Grafik % Penghambatan Ekstrak

Berdasarkan Gambar 7, hubungan antara konsentrasi akarbouse dengan persentase inhibisi α -Amilase menunjukkan persamaan regresi linear $y = 0,2852x + 28,156$ dengan nilai koefisien determinasi $R^2 = 0,9025$. Nilai R^2 tersebut mengindikasikan bahwa 90,25% variasi persentase inhibisi enzim α -Amilase dapat dijelaskan oleh perubahan konsentrasi akarbouse, sedangkan 9,75% sisanya dipengaruhi oleh faktor-faktor lain di luar model regresi. Nilai koefisien determinasi yang mendekati 1 menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi akarbouse dan persentase inhibisi memiliki tingkat linearitas yang baik. Berdasarkan persamaan regresi tersebut, diperoleh nilai IC_{50} akarbouse sebesar 76,66 ppm. Nilai IC_{50} tersebut menunjukkan bahwa akarbouse memiliki aktivitas penghambatan yang kuat terhadap enzim α -Amilase, sehingga digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian aktivitas penghambatan enzim α -Amilase pada penelitian ini.

B. Pembahasan

1). Standarisasi

Standarisasi simplisia merupakan tahapan awal yang sangat penting untuk menjamin mutu bahan baku sebelum dilakukan proses ekstraksi. Kualitas simplisia akan memengaruhi mutu ekstrak yang dihasilkan, termasuk kandungan metabolit sekunder serta aktivitas biologisnya. Simplisia tidak memenuhi standar mutu berpotensi mengalami perubahan komposisi kimia akibat aktivitas enzim, oksidasi, maupun kontaminasi mikroorganisme selama penyimpanan sehingga dapat menurunkan kadar senyawa aktif yang terkandung di dalamnya (Demkes RI, 2000; WHO, 2011). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan standarisasi simplisia daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) melalui pengujian rendemen simplisia, susut pengeringan, kadar air, dan kadar abu sebagai parameter mutu bahan baku.

Berdasarkan Tabel 1, sebanyak 5000 gram daun segar menghasilkan 1200 gram daun kering, kemudian diperoleh 600 gram serbuk simplisia, sehingga rendemen simplisia yang dihasilkan sebesar 24%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa selama proses pengolahan terjadi penurunan bobot yang cukup besar akibat berkurangnya kandungan air dalam jaringan daun selama proses pengeringan. Daun segar pada umumnya memiliki air tinggi sehingga sebagian besar berat awal akan hilang setelah proses pengeringan hingga diperoleh simplisia yang stabil. Selain kehilangan air, penurunan bobot juga dipengaruhi oleh proses sortasi, penghalusan, dan pengayakan yang menyebabkan sebagian kecil bahan tidak digunakan. Rendemen simplisia sebesar 24% menunjukkan bahwa proses preparasi berlangsung dengan baik sehingga masih diperoleh bahan kering dalam jumlah yang memadai untuk proses ekstraksi selanjutnya.

Besarnya rendemen simplisia dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain umur tanaman, tingkat kematangan daun, kondisi lingkungan, metode pengeringan, serta waktu panen. Daun yang dipanen pada kondisi fisiologis optimum umumnya memiliki kandungan bahan kering lebih tinggi sehingga menghasilkan rendemen yang lebih besar. Selain itu, pengeringan secara tidak langsung di bawah sinar matahari membantu mempertahankan kandungan metabolit sekunder, terutama flavonoid, karena paparan suhu tinggi dan sinar ultraviolet secara langsung dapat mempercepat degradasi senyawa fenolik melalui proses tidak hanya mencerminkan efisiensi proses pengeringan, tetapi juga tidak hanya mencerminkan efisiensi preparasi yang digunakan mampu mempertahankan kualitas bahan baku sebelum memasuki tahap ekstraksi.

Hasil uji susut pengeringan menunjukkan nilai rata-rata sebesar 6,93%, sehingga memenuhi batas yang ditetapkan. Nilai tersebut menunjukkan bahwa sebagian besar komponen yang mudah menguap, terutama air, telah berkurang selama proses pengeringan dan simplisia memiliki stabilitas yang cukup baik. Kondisi tersebut penting untuk menghambat aktivitas enzim endogen dan pertumbuhan mikroorganisme yang dapat menyebabkan degradasi metabolit sekunder selama penyimpanan (Demkes RI, 2002). Nilai susut pengeringan sebesar 6,93% menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan telah memenuhi persyaratan mutu dan layak digunakan sebagai bahan baku penelitian.

Selain itu, metode pengeringan yang diterapkan juga mampu mempertahankan struktur jaringan tanaman sehingga kerusakan fisik simplisia dapat diminimalkan. Pengeringan secara bertahap memungkinkan air menguap secara perlahan tanpa merusak struktur sel secara berlebihan. Kondisi tersebut penting karena kerusakan jaringan dapat meningkatkan kontak antara senyawa fenolik lainnya (Harbone, 1998). Dengan hasil susut pengeringan tidak banyak menunjukkan keberhasilan dalam menurunkan kadar air, tetapi juga menggambarkan bahwa proses pengeringan berlangsung secara optimal.

Berdasarkan Tabel 3, hasil penetapan kadar air simplisia menunjukkan nilai rata-rata sebesar 8,03%, yang masih memenuhi persyaratan mutu berada di bawah batas maksimum 10%. Nilai tersebut memperkuat hasil pengujian susut pengeringan bahwa simplisia memiliki kandungan air yang cukup rendah sehingga relatif stabil selama penyimpanan. Kadar air merupakan salah satu parameter yang sangat menentukan mutu simplisia karena berkaitan langsung dengan kestabilan fisik, kimia, dan mikrobiologi. Kandungan air yang rendah akan memperlambat reaksi hidrolisis maupun oksidasi yang dapat merusak metabolit sekunder sehingga flavonoid dan senyawa fenolik lebih mampu dipertahankan hingga tahap ekstraksi (WHO, 2011). Oleh karena itu, kadar air sebesar 8,03% menunjukkan bahwa simplisia telah memenuhi standar mutu sebagai bahan baku penelitian.

Jika dikaitkan dengan hasil penelitian selanjutnya, kadar air yang memenuhi standar diduga turut berkontribusi terhadap keberhasilan proses ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat sehingga diperoleh kadar flavonoid total sebesar $32,120 \pm 2,245$ mg QE/g ekstrak. Hasil tersebut dilihat pada Tabel 7 simplisia dengan kadar air yang rendah memungkinkan pelarut etil asetat berpentasi sekunder berlangsung lebih optimal. Dengan demikian, mutu simplisia yang baik menjadi salah satu faktor yang mendukung keberhasilan ekstraksi flavonoid.

Hasil penetapan kadar abu yang ditampilkan pada Tabel 4 menunjukkan rata-rata 2,93%. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa kandungan mineral maupun cemaran anorganik dalam simplisia relatif rendah. Kadar abu yang rendah menunjukkan bahwa proses pencucian, sortasi, dan penanganan pascapanen telah dilakukan dengan baik sehingga kontaminasi oleh tanah, pasir, debu, maupun bahan anorganik lainnya dapat diminimalkan. Parameter kadar abu digunakan sebagai indikator tingkat kemurnian simplisia karena semakin tinggi kadar abu maka semakin besar mutu simplisia maupun hasil analisis (Demkes RI, 2000). Oleh sebab itu, kadar abu sebesar 2,93% menunjukkan bahwa simplisia memiliki tingkat kemurnian yang baik dan layak digunakan sebagai bahan baku penelitian.

Secara keseluruhan, berdasarkan hasil yang disajikan pada Tabel 1 hingga Tabel 4, seluruh parameter standarisasi simplisia telah memenuhi persyaratan mutu. Rendemen simplisia sebesar 24%, susut pengeringan 6,93%, kadar air 8,03%, dan kadar abu 2,93% menunjukkan bahwa simplisia daun kembang bulan memiliki kualitas yang baik, stabil selama penyimpanan, serta memiliki tingkat kemurnian yang memadai. Kondisi tersebut mendukung keberhasilan ekstraksi karena simplisia yang memenuhi standar dapat membantu mempertahankan kandungan metabolit sekunder, sehingga menghasilkan ekstrak dengan kualitas dan aktivitas biologis yang baik.

2). Ekstraksi dan Standarisasi

Standarisasi dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat

Ekstraksi merupakan salah satu tahapan penting dalam penelitian bahan alam karena bertujuan untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder dari jaringan tanaman sehingga diperoleh ekstrak yang kaya akan senyawa bioaktif. Keberhasilan proses ekstraksi dipengaruhi oleh metode yang digunakan, jenis pelarut, lama ekstraksi, rasio bahan terhadap pelarut, serta proses Pemekatan ekstrak. Faktor-faktor tersebut akan menentukan jumlah maupun jenis metabolit sekunder yang berhasil diekstraksi sehingga berpengaruh terhadap aktivitas biologis ekstrak (Harborne, 1998; Demkes RI, 2000).

Pada penelitian ini digunakan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan simplisia dan pelarut sebesar 1:10 (b/v), yaitu 500 gram serbuk simplisia diekstraksi menggunakan 5 liter etil asetat selama 3 x 24 jam, kemudian dilanjutkan dengan *remaserasi* selama 2 x 24 jam menggunakan pelarut baru. Metode maserasi dipilih karena berlangsung pada suhu sehingga sesuai untuk mengekstraksi senyawa yang mudah mengalami kerusakan akibat pemanasan, seperti flavonoid. Pengadukan secara berkala selama proses maserasi juga membantu meningkatkan lebih optimal. Selain itu, *remaserasi* dilakukan untuk memperoleh senyawa aktif yang kemungkinan masih tertinggal pada ampas setelah proses maserasi pertama (Harborne, 1998).

Pemilihan etil asetat sebagai pelarut didasarkan pada sifatnya yang semipolar sehingga mampu melarutkan senyawa semipolar seperti flavonoid aglikon, fenolik, dan beberapa metabolit sekunder lain yang diduga berperan sebagai *inhibitor* enzim α -Amilase. Dibandingkan pelarut yang lebih polar, etil asetat cenderung menghasilkan ekstrak yang lebih selektif karena tidak banyak melarutkan senyawa polar seperti gula dan protein. Selektifitas tersebut diharapkan dapat meningkatkan proporsi senyawa bioaktif dalam ekstrak sehingga aktivitas biologinya menjadi lebih baik (Harborne, 1998; WHO, 2011).

Berdasarkan Tabel 5, proses ekstraksi terhadap 500 gram serbuk simplisia menghasilkan 76 gram ekstrak kental dengan rendemen sebesar 15,2%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa sebagian komponen yang bersifat larut dalam etil asetat berhasil dipisahkan dari simplisia selama proses maserasi. Rendemen ekstrak tidak selalu menggambarkan kualitas ekstrak yang lebih baik apabila nilainya tinggi, karena tujuan utama penelitian ini adalah memperoleh ekstrak yang kaya akan senyawa bioaktif, khususnya flavonoid. Oleh karena itu, rendemen sebesar 15,2% menunjukkan bahwa proses ekstraksi berlangsung cukup selektif terhadap metabolit sekunder yang memiliki afinitas terhadap etil asetat.

Besarnya rendemen ekstrak dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti ukuran partikel simplisia, jenis pelarut, rasio pelarut terhadap bahan, lama ekstraksi, serta kandungan metabolit sekunder tanaman. Simplisia yang digunakan telah dihaluskan menjadi serbuk sehingga luas permukaan kontak dengan pelarut meningkat dan mempercepat proses difusi senyawa aktif. Selain itu, rasio pelarut 1:10 memberikan jumlah pelarut yang cukup untuk mempertahankan gradien konsentrasi sehingga proses perpindahan massa cukup mempertahankan gradien konsentrasi sehingga proses perpindahan massa berlangsung lebih optimal (Demkes RI, 2000).

Tahap Pemekatan ekstrak dilakukan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu sekitar 65°C yang dilanjutkan dengan *water bath* pada suhu 60°C. penggunaan *rotary evaporator* memungkinkan pelarut diuapkan pada tekanan rendah sehingga proses penguapan berlangsung lebih cepat tanpa menggunakan suhu tinggi. Kondisi tersebut membantu mempertahankan kestabilan flavonoid yang relatif sensitif terhadap panas dan oksidasi (Harborne, 1998).

Karakteristik organoleptik ekstrak yang ditampilkan pada Tabel 6 menunjukkan bahwa ekstrak berbentuk kental, berwarna hijau kehitaman, dan memiliki bau khas daun kembang bulan. Jika disajikan dalam dokumentasi penelitian, bentuk ekstrak juga dapat dilihat pada Gambar 1 warna hijau kehitaman diduga berasal dari klorofil yang masih ikut terekstraksi karena memiliki afinitas terhadap pelarut semipolar. Karakteristik tersebut menunjukkan bahwa proses ekstraksi berlangsung dengan baik tanpa menimbulkan perubahan fisik yang mengindikasikan kerusakan ekstrak.

Hasil standarisasi ekstrak pada Tabel 6 menunjukkan nilai susut pengeringan telah memenuhi persyaratan mutu ekstrak. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa sebagian besar pelarut etil asetat telah berhasil dihilangkan selama proses Pemekatan sehingga residu pelarut dalam ekstrak relatif rendah. Rendahnya kandungan pelarut sisa penting untuk menjaga kestabilan ekstrak selama penyimpanan serta mencegah terjadinya degradasi metabolit sekunder yang dapat memengaruhi hasil analisis berikutnya (Demkes RI, 2000).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia pada Tabel 7, ekstrak etil asetat daun kembang bulan mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan fenolik, sedangkan golongan terpenoid tidak terdeteksi. Keberadaan flavonoid dan fenolik menunjukkan bahwa etil asetat mampu mengekstraksi senyawa yang berpotensi memberikan aktivitas antidiabetes melalui mekanisme penghambatan enzim α -Amilase. Flavonoid diketahui dapat berinteraksi dengan residu asam amino pada sisi aktif maupun sisi alosterik enzim sehingga menghambat pembentukan kompleks enzim-substrat, sedangkan senyawa fenolik juga berkontribusi melalui pembentukan ikatan hidrogen dengan protein enzim (Harbone, 1998).

Tidak terdeteksinya golongan terpenoid menunjukkan bahwa pada kondisi ekstraksi yang digunakan, etil asetat lebih selektif dalam mengekstraksi metabolit semipolar dibandingkan senyawa bersifat lebih nonpolar. Selektivitas tersebut diduga berkontribusi terhadap tingginya kandungan flavonoid dalam ekstrak yang selanjutnya memberikan aktivitas penghambatan α -Amilase yang baik.

Secara keseluruhan, hasil ekstraksi dan standarisasi menunjukkan bahwa metode maserasi menggunakan etil asetat berhasil menghasilkan ekstrak mutu yang baik. Berdasarkan Tabel 5 hingga Tabel 7, ekstrak memiliki rendemen 15,2%, karakteristik organoleptik yang sesuai, susut pengeringan yang memenuhi persyaratan, serta mengandung flavonoid dan fenolik sebagai metabolit sekunder utama. Kualitas ekstrak tersebut menjadi dasar keberhasilan pada tahapan berikutnya, yaitu penetapan kadar flavonoid total disajikan pada Tabel 8 sebesar $32,120 \pm 2,245$ mg QE/g ekstrak, serta pengujian aktivitas penghambatan enzim α -Amilase yang menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm, sehingga ekstrak etil asetat daun kembang bulan termasuk memiliki aktivitas penghambatan yang kuat.

3) Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kembang Bulan

Penentuan kadar flavonoid total penting dilakukan untuk mengetahui kandungan flavonoid yang diduga berkontribusi terhadap aktivitas penghambatan enzim α -Amilase. Analisis dilakukan dengan metode kolorimetri $AlCl_3$ menggunakan kuersetin sebagai standar, berdasarkan pembentukan kompleks berwarna antara ion aluminium dan gugus fungsional flavonoid yang dapat diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Chang *et al.*, 2002; Harbone, 1998).

(a). Panjang Gelombang Maksimum Dan *Operating Time* (OT)

Hasil penentuan panjang gelombang maksimum menunjukkan bahwa kompleks kuersetin- AlCl_3 memiliki serapan maksimum pada 425 nm, sedangkan *Operating Time* optimum diperoleh pada menit ke-15. Hasil tersebut disajikan pada Gambar 2 untuk panjang gelombang maksimum dan Gambar 3 untuk *Operating Time*. Penentuan kedua parameter tersebut sangat penting karena akan memengaruhi ketepatan dan sensitivitas pengukuran kadar flavonoid. Pengukuran pada panjang gelombang maksimum memberikan absorbansi yang paling tinggi sehingga perubahan konsentrasi flavonoid dapat terdeteksi secara lebih akurat (Rohman, 2019).

Operating Time selama 15 menit menunjukkan bahwa pada waktu tersebut proses pembentukan kompleks antara flavonoid dengan ion aluminium telah mencapai kondisi yang stabil. Pengukuran yang dilakukan sebelum waktu optimum berpotensi menghasilkan absorbansi yang lebih rendah karena reaksi kompleksasi belum berlangsung sempurna, sedangkan pengukuran yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan kestabilan kompleks akibat oksidasi atau perubahan struktur kimia. Oleh karena itu, seluruh larutan standar maupun sampel diukur pada *Operating Time* yang sama agar hasil analisis memiliki tingkat presisi yang baik (Chang *et al.*, 2002).

Keberhasilan penentuan panjang gelombang maksimum dan *Operating Time* menunjukkan bahwa metode analisis telah dioptimasi sebelum digunakan untuk mengukur sampel. Dengan demikian, kadar flavonoid yang diperoleh diharapkan benar-benar mencerminkan kandungan flavonoid dalam ekstrak dan bukan dipengaruhi oleh variasi proses analisis.

(b). Kurva Baku Kuersetin

Kurva baku kuersetin yang ditampilkan pada Gambar 4 menghasilkan persamaan regresi $y = 0,0036x + 0,2837$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9951. Nilai tersebut menunjukkan hubungan linear yang sangat kuat antara konsentrasi kuersetin dengan nilai absorbansi. Artinya, sekitar 99,51% variasi absorbansi dapat dijelaskan oleh perubahan konsentrasi kuersetin, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain seperti variasi alat maupun kesalahan eksperimental. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi memiliki tingkat linearitas yang sangat baik sehingga layak digunakan dalam menghitung kadar flavonoid total sampel (ICH, 2005).

Linearitas merupakan salah satu parameter penting dalam validasi metode analisis karena menunjukkan kemampuan metode menghasilkan respon yang sebanding dengan konsentrasi analit. Oleh sebab itu, nilai R^2 sebesar 0,9951 memberikan tingkat kepercayaan yang tinggi terhadap hasil penetapan kadar flavonoid total pada penelitian ini (Rohman, 2019).

(c). Hasil Kadar Flavonoid Total

Hasil penetapan kadar flavonoid total menunjukkan nilai sebesar 31,750; 34,528; dan 30,083 mg QE/g pada replikasi pertama, kedua, dan ketiga, dengan rata-rata $32,120 \pm 2,245$ mg QE/g ekstrak. Perbedaan antarhasil replikasi relatif kecil, sehingga menunjukkan bahwa pengukuran memiliki tingkat presisi yang baik. Variasi antar replikasi merupakan hal yang umum dalam analisis kuantitatif dan dapat dipengaruhi oleh homogenitas larutan, ketelitian pipet, maupun variasi pembacaan absorbansi oleh instrumen. Namun demikian, simpangan baku yang diperoleh masih menunjukkan bahwa hasil pengukuran cukup konsisten sehingga nilai rata-rata dapat mewakili kandungan flavonoid dalam ekstrak (ICH, 2005).

Kadar flavonoid total sebesar 32,120 mg QE/g ekstrak menunjukkan bahwa pelarut etil asetat mampu mengekstraksi flavonoid dalam jumlah yang cukup tinggi. Hasil tersebut berkaitan dengan sifat etil asetat sebagai pelarut semipolar yang memiliki afinitas terhadap flavonoid aglikon dan senyawa fenolik. Selama proses maserasi, pelarut berdifusi ke dalam

jaringan simplisia, melarutkan metabolit sekunder, kemudian membawa senyawa tersebut keluar hingga tercapai keseimbangan konsentrasi. Proses *remaserasi* yang dilakukan setelah maserasi pertama juga meningkatkan efisiensi ekstraksi karena senyawa aktif yang masih tertinggal pada ampas dapat terekstraksi kembali (Harbone, 1998).

Selain dipengaruhi oleh jenis pelarut, kadar flavonoid juga dipengaruhi oleh mutu simplisia yang digunakan. Berdasarkan Tabel 1 hingga Tabel 4, simplisia memiliki rendemen sebesar 24% susut pengeringan 6,93%, kadar air 8,08%, dan kadar abu 2,93%, yang menunjukkan bahwa bahan baku telah memenuhi persyaratan mutu. Kandungan air yang rendah berperan dalam menjaga kestabilan flavonoid karena dapat menghambat aktivitas enzim hidrolitik serta pertumbuhan mikroorganisme yang berpotensi menyebabkan degradasi metabolit sekunder (WHO, 2011). Dengan demikian, keberhasilan memperoleh kadar flavonoid sebesar 32,120 mg QE/g ekstrak tidak hanya dipengaruhi oleh proses proses ekstraksi, tetapi juga oleh kualitas simplisia yang digunakan.

Apabila dibandingkan dengan penelitian terdahulu, kadar flavonoid total daun kembang bulan dapat menunjukkan variasi meskipun menggunakan spesies tanaman yang sama. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti lokasi tumbuh, kondisi tanah, intensitas cahaya, umur tanaman, musim panen, metode pengeringan, jenis pelarut, serta metode analisis yang digunakan. Biosintesis flavonoid diketahui sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sehingga tanaman yang mengalami cekaman, seperti paparan cahaya matahari tinggi atau kekeringan, umumnya menghasilkan flavonoid dalam jumlah lebih besar sebagai mekanisme perlindungan terhadap stres oksidatif (Taiz *et al.*, 2015).

Keberadaan flavonoid dalam jumlah yang cukup tinggi memiliki hubungan dengan aktivitas biologis ekstrak. Flavonoid mampu berinteraksi dengan residu asam amino pada enzim α -Amilase melalui ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, maupun interaksi π - π sehingga menghambat proses hidrolisis pati menjadi gula sederhana. Oleh karena itu, kadar flavonoid total sebesar $32,120 \pm 2,245$ mg QE/g ekstrak yang diperoleh pada penelitian ini diduga berkontribusi terhadap aktivitas penghambatan enzim α -Amilase yang ditunjukkan oleh nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm, sebagaimana disajikan pada Gambar 5. meskipun demikian, aktivitas tersebut kemungkinan juga dipengaruhi oleh senyawa metabolit sekunder lain seperti fenolik, alkaloid, dan saponin yang terdeteksi pada skrining fitokimia (Tabel 7), sehingga mekanisme penghambatan yang terjadi diduga merupakan hasil sinergisme antar senyawa aktif.

4) Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase

Pengujian aktivitas penghambatan enzim α -Amilase dilakukan untuk mengevaluasi potensi ekstrak etil asetat daun kembang bulan sebagai kandidat antidiabetes secara *in Vitro*. Enzim α -Amilase berperan dalam memecah pati menjadi oligosakarida dan maltosa yang selanjutnya menghasilkan glukosa. Penghambatan enzim ini dapat memperlambat pencernaan karbohidrat dan membantu mengurangi peningkatan kadar glukosa darah setelah makan, sehingga berpotensi dalam pengendalian diabetes melitus tipe 2 (American Diabetes Association, 2024; Kumar *et al.*, 2011).

(a). Pengaruh Konsentrasi Ekstrak terhadap Persentase Inhibisi

Hasil pengujian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak etil asetat daun kembang bulan diikuti dengan meningkatnya persentase penghambatan enzim α -Amilase. Pola tersebut menunjukkan adanya hubungan ekstrak yang digunakan, semakin besar pula kemampuan ekstrak dalam menghambat aktivitas enzim.

Peningkatan aktivitas penghambatan tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak senyawa metabolit sekunder yang tersedia untuk berinteraksi dengan enzim α -Amilase. Interaksi tersebut dapat terjadi pada sisi aktif maupun sisi alosterik enzim sehingga mengurangi kemampuan enzim dalam menghidrolisis pati menjadi gula pereduksi. Demikian, peningkatan

persentase inhibisi pada setiap kenaikan konsentrasi menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak bersifat *concentration-dependent*, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar efek penghambatan yang dihasilkan (Kumar *et al.*, 2011).

Selain itu, pola peningkatan inhibisi yang relatif konsisten juga menunjukkan bahwa proses ekstraksi dan standarisasi ekstrak mampu mempertahankan stabilitas metabolit sekunder yang berperan sebagai *inhibitor α -Amilase*. Apabila terjadi degradasi senyawa aktif selama proses ekstraksi maupun Pemekatan, peningkatan konsentrasi belum tentu menghasilkan peningkatan aktivitas yang teratur. Oleh karena itu, hasil ini secara tidak langsung mendukung kualitas ekstrak yang telah diperoleh pada tahap standarisasi.

(b). Analisis Regresi dan Nilai IC_{50}

Hubungan antara konsentrasi ekstrak dan persentase inhibisi dianalisis menggunakan regresi linear yang hasilnya ditampilkan pada Gambar 5. Analisis tersebut menghasilkan persamaan regresi $y = 0,299x + 27,123$ dengan nilai koefisien sekitar 90,25% variasi aktivitas penghambatan enzim dapat dijelaskan oleh perubahan konsentrasi ekstrak, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain, seperti variasi biologis enzim, ketelitian analisis, maupun keberadaan metabolit sekunder lain yang turut berkontribusi terhadap aktivitas penghambatan.

Berdasarkan persamaan regresi tersebut diperoleh nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm. Hasil perhitungan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan parameter yang umum digunakan untuk menggambarkan potensi suatu *inhibitor*, yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat 50% aktivitas enzim. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin kuat kemampuan suatu senyawa atau ekstrak dalam menghambat aktivitas enzim karena konsentrasi yang dibutuhkan relatif lebih rendah (Molynux, 2004).

Nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun kembang bulan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim *α -Amilase*. Aktivitas tersebut menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak yang berpotensi berinteraksi dan menghambat aktivitas enzim *α -Amilase*, terutama flavonoid dan senyawa fenolik yang telah teridentifikasi pada hasil skrining fitokimia Tabel 7 serta memiliki kadar flavonoid total sebesar $32,1120 \pm 2,245$ mg QE/g ekstrak.

(c). Perbandingan dengan Akarbose

Sebagai pembanding, penelitian ini menggunakan akarbose sebagai kontrol positif karena merupakan obat antidiabetes yang telah terbukti bekerja melalui mekanisme penghambatan enzim *α -Amilase*. Hasil pengujian aktivitas akarbose. Akarbose menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat daun kembang bulan. Hasil tersebut sesuai dengan karakteristik akarbose sebagai senyawa murni yang memiliki afinitas tinggi terhadap sisi aktif enzim *α -Amilase* sehingga mampu menghasilkan efek inhibisi yang lebih besar dibandingkan ekstrak kasar yang masih mengandung berbagai metabolit sekunder.

Meskipun demikian, kemampuan ekstrak menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm menunjukkan bahwa ekstrak memiliki potensi sebagai sumber *inhibitor α -Amilase* alami. Penggunaan bahan alam sebagai kandidat antidiabetes menjadi menarik karena berpotensi memberikan efek samping yang lebih rendah dibandingkan obat sintesis, meskipun masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan keamanan dan efektivitasnya melalui pengujian *in vivo* maupun uji klinis (American Diabetes Association, 2024).

Aktivitas ekstrak yang lebih rendah dibandingkan akarbose juga menunjukkan bahwa tidak seluruh senyawa dalam ekstrak berperan sebagai *inhibitor*. Sebagian metabolit sekunder kemungkinan tidak memiliki aktivitas atau bahkan dapat memengaruhi efektivitas senyawa aktif melalui interaksi antasenyawa. Oleh karena itu, proses fraksinasi maupun isolasi senyawa aktif berpotensi meningkatkan aktivitas penghambatan dibandingkan ekstrak kasar.

(d). Faktor yang Memengaruhi Aktivitas Penghambatan

Aktivitas penghambatan enzim α -Amilase pada penelitian ini dipengaruhi oleh berbagai faktor, tidak hanya kadar flavonoid tetapi juga jenis flavonoid, struktur kimia, jumlah gugus hidroksil, serta keberadaan metabolit sekunder lain seperti fenolik, alkaloid, dan saponin yang telah teridentifikasi pada Tabel 7. Senyawa-senyawa tersebut diduga bekerja secara sinergis dalam menghambat aktivitas enzim sehingga menghasilkan efek penghambatan yang cukup tinggi.

Selain faktor kandungan senyawa aktif, aktivitas penghambatan juga dipengaruhi oleh metode ekstraksi, jenis pelarut, waktu maserasi, suhu Pemekatan, serta kondisi penyimpanan ekstrak. Perbedaan nilai IC_{50} apabila dibandingkan dengan penelitian lain juga dapat dipengaruhi oleh asal tanaman, umur daun, kondisi lingkungan, waktu panen, maupun metode analisis yang digunakan. Oleh karena itu, perbandingan seluruh kondisi penelitian yang memengaruhi kandungan metabolit sekunder (Harborne, 1998).

Secara keseluruhan, berdasarkan hasil yang disajikan pada Gambar 5, ekstrak etil asetat daun kembang bulan menunjukkan kemampuan menghambat aktivitas enzim α -Amilase secara bergantung pada konsentrasi (*concentration-dependent*) dengan nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm yang termasuk potensi sebagai kandidat antidiabetes berbasis bahan alam. Namun demikian, karena penelitian ini masih menggunakan ekstrak kasar dan dilakukan secara *in Vitro*, diperlukan penelitian lanjutan berupa fraksinasi, identifikasi senyawa aktif, uji *in vivo*, serta uji toksisitas untuk memastikan keamanan dan efektivitasnya sebelum dikembangkan menjadi sediaan fitofarmaka.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini yang telah dilakukan mengenai potensi flavonoid dalam ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) sebagai *inhibitor* α -Amilase secara *in Vitro*, dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut:

- Ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) mengandung berbagai metabolit sekunder, yaitu flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan terpenoid, berdasarkan hasil skrining fitokimia;
- Ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) memiliki kadar flavonoid total sebesar $32,120 \pm 2,245$ mg QE/g ekstrak, yang ditetapkan menggunakan metode kolorimetri aluminium klorida ($AlCl_3$) dengan kuersetin sebagai standar;
- Ekstrak etil asetat daun kembang bulan (*Tithonia Diversifolia*) memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -Amilase dengan nilai IC_{50} sebesar 76,59 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak memiliki potensi sebagai bahan alam untuk mendukung pengembangan kandidat antidiabetes melalui mekanisme penghambatan enzim α -Amilase.

5. DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Abdullah, N., Ischak, N. I., Alio, L., Salimi, Y. K., Aman, L. O., & 6, A. K. K. (2025). *Inhibisi Enzim α -Glukosidase dan α -Amilase dari Ekstrak Metanol Daun Buhu (Garuga floribunda Decne) Sebagai Antidiabetes.pdf*.
- [2]. Aleksandr P. Kalinovskii, 2, O. V. S., & Irina N. Gladkikh 2 and Elena V. Leychenko 2. (2024). *Natural Inhibitors of Mammalian α -Amylases as Promising*.
- [3]. Almayda, N., Arraihan, N. P., Alfira, D., Masruri, M., Susanti, E., & Safitri, A. (2025). Phytochemical Compositions, Microencapsulation, and Antioxidant Activity of Aqueous Extract from *Tithonia Diversifolia* Leaves. *Trends in Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.48048/tis.2025.10306>

- [4]. Amanda, C., Ngola, D., Madoung, A. M., Tedonzang, S. P., Sylvanie, A., Lekefack, M., Noubissi, Y. N., Kone, J. A., Pinlap, B. R., & Kamdem, B. P. (2023). *In Vitro Antibacterial Activity of Crude Extracts from Tithonia Diversifolia (Asteraceae) and Solanum torvum (Solanaceae) against Selected Shigella Species*. 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.14218/JERP.2025.00052>
- [5]. Amanda Putri, A., Sitinjak, J. M., Rizki Ndraha, A. H., Herlinawati, E. N., Ana, M., Turrahmi, A., Diansari Marbun, E., & Thaib, C. M. (2025). STANDARISASI SIMPLISIA HERBA CIPLUKAN (*Physalis angulata* L.). *Jurnal Teknologi Kesehatan Dan Ilmu Sosial (Tekesnos)*, 7(1), 65–79. <https://doi.org/10.51544/tekesnos.v7i1.6205>
- [6]. Ambarwati, N. S. S., Sukma, N. T., Yesi Desmiaty, A. A., Setia Budi, M. A., & Ahmad, I. (2024). peel extract : Secondary metabolite composition , antioxidant , and elastase inhibitory activity evaluation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 15(1), 8–12. <https://doi.org/10.4103/japtr.japtr>
- [7]. Atmaja *et al.*, 2021. (2021). Jurnal Farmasi Dan Kesehatan Indonesia. *Jurnal Farmasi Dan Kesehatan Indonesia*, 2(September), pp.
- [8]. Barreto-Cruz, O. T., Henao Zambrano, J. C., Ospina Barrero, M. A., & Castañeda-Serrano, R. D. (2024). Effects of *Tithonia Diversifolia* Extract as a Feed Additive on Digestibility and Performance of Hair Lambs. *Animals*, 14(24). <https://doi.org/10.3390/ani14243648>
- [9]. Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., & Chen, X. (2023). A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules*, 28(13), 1–27. <https://doi.org/10.3390/Molecules28134982>
- [10]. Chen, Y., Meng, Z., Li, Y., Liu, S., Hu, P., & Luo, E. (2024). Advanced glycation end products and reactive oxygen species: uncovering the potential role of ferroptosis in diabetic complications. *Molecular Medicine*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s10020-024-00905-9>
- [11]. Dinnar Latiefah, N. (2022). Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Alfa Amilase Ekstrak dan Fraksi Daun Binahong Merah (*anredera cordifolia* (ten.) Steenis). *Jurnal Indonesia Sosial Sains*, 3(10), 1361–1376. <https://doi.org/10.36418/jiss.v3i10.718>
- [12]. Djamil, R., Rahmat, D., Azkia, H., Pratami, D. K., & Swandiny, G. F. (2022). Standardization and a-Glycosidase Inhibition of Extracts and Nanoparticle Extract of Kembang Bulan Leaves (*Tithonia Diversivolia* (Hamsley) a. Gray). *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 14(Special Issue 3), 51–54. <https://doi.org/10.22159/ijap.2022.v14s3.10>
- [13]. Doloking, H., Tahar, N., Mukhriani, & Surya Ningsi. (2022). Flavonoids: A Review On Extraction, Identification, Quantification, and Antioxidant Activity. *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1). <https://doi.org/10.24252/djps.v5i1.29329>
- [14]. Dwiyantri, A. B., & Ferdinand, D. N. P. (2025). Review Metode Ekstraksi : Maserasi, Perkolasi, Infusa, Soxhlet, Refluks, Ultrasonic Assisted Extraction (UAE), dan Microwave Assisted Extraction (MAE). *Jurnal Riset Rumpun Ilmu Kedokteran*, 4(3), 31–49. <https://prin.or.id/index.php/JURRIKE>
- [15]. Egbule, D. K., Oji, A. P., & Nnadi, C. O. (2023). *Sub-Chronic Toxicological Evaluation of the Sesquiterpene Lactone-Enriched Fraction of Tithonia Diversifolia (Hemsley) A. Gray in Experimental Rats*. 1. <https://doi.org/10.3390/iect2023-14801>
- [16]. Fauziyah, Y., Nasution, S. D., Asfur, R., & Triwibowo, C. (2024). Potensi Daun *Tithonia Diversifolia* sebagai Antihiperqlikemia pada Diabetes Mellitus. *Jurnal Implementa Husada*, 5(2), 105–112.

- [17]. Hu, Y., Feng, Y., Lu, H., Luo, Y. H., & Zhang, M. (2025). Fractional extraction of phenolics from seedless chestnut rose fruit: effects of solvent polarity on polyphenol composition and *in Vitro* bioactivities. *International Journal of Food Properties*, 28(1). <https://doi.org/10.1080/10942912.2025.2479040>
- [18]. Ina 'Corkovi' c 1, Dajana Gašo-Soka' c 1, Anita Pichler 1, J. Š. 2 and M. K. 1, & 1. (2025). *Dietary Polyphenols as Natural Inhibitors of α -Amylase.pdf*.
- [19]. Indri, N., Sebesi, P., & Lampung, K. B. (2025). *Jurnal Kesehatan dan Agromedicine The Role of Natural Antioxidants in Inhibiting Oxidative Stress as a Preventive Effort Against Type 2 Diabetes Mellitus Complications : A Narrative Review*. 12(2), 28–35.
- [20]. Indrisari, M., Khairi, N., Muslimin, L., Aksa, R., Rahimah, S., & Rahayu, R. (2025). Anti-inflammatory Potential of *Tithonia Diversifolia* Leaves in Carrageenan-Induced Edema Model in Mice (Mus Musculus) Maulita. *Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 53–59. <https://doi.org/10.24252/djps.v8i1.56230>
- [21]. Ismirza, U., Azizah, Z., Zulharmita, Z., & Yeni, C. F. (2025). Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Air Dari Daun Kersen (Muntingia calabura L.). *Jurnal Farmasi Higea*, 17(2), 163. <https://www.jurnalfarmasihigea.org/index.php/higea/article/view/745>
- [22]. Istikharah, R., Nugrahaningsih, D. A. A., Sadewa, A. H., & Wahyuningsih, M. S. H. (2022). Standardised Ethanol Extract of *Tithonia Diversifolia* (Hemsley) A Gray Leaves Improve Insulin Sensitivity and Increase Mitochondrial DNA Copy Numbers in Skeletal Muscles of Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Rats. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 29(3), 43–53. <https://doi.org/10.21315/mjms2022.29.3.5>
- [23]. Jimoh, M., Enikuomelin, O. A., Afolabi, C. G., & Olowe, V. I. O. (2021). Improving the efficacy of *Tithonia Diversifolia* extract in management of foliar diseases of sesame intercropped with maize under tropical conditions . *Agricultura Tropica et Subtropica*, 54(1), 165–173. <https://doi.org/10.2478/ats-2021-0017>
- [24]. Kour, L., Shabnam, Sutee, A., & Singh, R. D. (2023). Alpha amylase inhibitor as an Anti-diabetic potential from medicinal plants: A Review. *International Journal of Ayurvedic Medicine*, 13(4), 925–932. <https://doi.org/10.47552/ijam.v13i4.2836>
- [25]. Melati dkk. (2022). Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Serta Fenolik Total Ekstrak Daun Insulin (. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 03(01), 8–18.
- [26]. Migdalís, I. N. (2024). Chronic Complications of Diabetes: Prevalence, Prevention, and Management. *Journal of Clinical Medicine*, 13(23), 15–17. <https://doi.org/10.3390/jcm13237001>
- [27]. Mulilya, Q. M. (2025). *Antimicrobial activity and Effects on Innate Immune Responses of Coleus Lanuginosus (Hochst. Ex Benth.) and Microglossa Pyrifolia (Lam. Kuntze.) in BALB/c Mice*. [http://ir.jkuat.ac.ke/handle/123456789/6795%0Ahttp://ir.jkuat.ac.ke/bitstream/handle/123456789/6795/Mulilya%2C M. Q. MSc Thesis%2C 2025 %281%29.pdf?sequence = 1&isAllowed = y](http://ir.jkuat.ac.ke/handle/123456789/6795%0Ahttp://ir.jkuat.ac.ke/bitstream/handle/123456789/6795/Mulilya%2C%20M.%20Q.%20MSc%20Thesis%202025%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [28]. Nafiisah, A., Purnamasari, R., & Mudalianah, S. (2024). Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder pada Ekstrak Etanol Daun Binahong. *Jurnal Sosial Dan Sains*, 4(11), 1093–1106. <https://doi.org/10.59188/jurnalsosains.v4i11.27922>
- [29]. Nguyen, T., Quy, D. Q., Tung, N. T., Huyen, N. T., & Minh, P. Le. (2026). *Beyond α -Glucosidase and α -Amylase Inhibition : Integrated In Vitro and Multi-Scale In Silico Insights into the Antidiabetic and Antioxidant Mechanisms of Oxalis corniculata L . Aerial Parts*. 1–31.

- [30]. Ningsih, A. W., Jihan Fahiroh Nur Arifin, Retno Wulan Devitri, Rusdiana Tri Septiarini, Elvira Silvany Zahara, Vira Maulidya, Yasmine Eka Maulidya, Elly Eka Rahmawati, Zakkiya Sabila, Zahratul Humaidah, & Ivan Charles S.Klau. (2025). Tinjauan Literatur: Efektivitas Maserasi sebagai Metode Ekstraksi Fitokimia. *OBAT: Jurnal Riset Ilmu Farmasi Dan Kesehatan*, 3(6), 228–242. <https://doi.org/10.61132/obat.v3i6.1927>
- [31]. Nintowati, P. D. (2024). Analisis Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Daun Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Berdasarkan Perbedaan Pendahuluan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) merupakan salah satu jenis kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia dan menjadi salah satu komoditas. *Jurnal Ilmiah Biologi*, 12(2), 2317–2333.
- [32]. Philip, C., Tompene, E. S. M., Edwin, E. F., & Ikegbuna, M. R. (2025). Targeted therapeutic management of diabetes using phytoconstituents: molecular mechanisms, evidence map (2015–2025), and translational outlook. *Exploration of Drug Science*, 4, 1–25. <https://doi.org/10.37349/eds.2026.1008139>
- [33]. Pradiptha, K. (2025). Eksplorasi Potensi Tanaman Kipahit (*Tithonia Diversifolia*) sebagai Terapi Alternatif Diabetes Mellitus. *Sciences and Clinical Pharmacy Research Journal*, 2(2), 11. <https://doi.org/10.47134/scpr.v2i2.4527>
- [34]. Putri1, H. A., Nurnawati2, E., & Widjajanti2*, H. (2024). *Antidiabetic Activity of Endophytic Fungi Extract from Leaves of Kembang bulan(Tithonia Diversifolia(Hemsley) A. Gray) Through?-Amylase Enzyme Inhibition.pdf*.
- [35]. Rahman, N. F., Nursamsiar, N., Megawati, M., Handayani, H., & Soares, C. A. M. (2022). Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Kembang Bulan Leaves (*Tithonia Diversifolia* (Hemsley) A. Gray). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 1(1), 57. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v1i1.36900>
- [36]. Rinawati, R., Suharyanto, E., & Wijayanti, N. (2023). The Effect of *Tithonia Diversifolia* (Hemsl.) A. Gray Leaf Decoction Extract on Blood Glucose Levels. *BIOTIK: Jurnal Ilmiah Biologi Teknologi Dan Kependidikan*, 7(1), 41.
- [37]. Saeful Amin, & Setiawati, D. E. (2025). Pendekatan in Silico terhadap Senyawa Flavonoid Sebagai *Inhibitor* Enzim Diabetes. *Journal of Public Health Science*, 2(2), 189–196. <https://doi.org/10.70248/jophs.v2i2.2215>
- [38]. Sakkas, L., Lekaki, E., & Moatsou, G. (2022). Whey Protein Hydrolysates of Sheep/Goat Origin Produced by the Action of Trypsin without pH Control: Degree of Hydrolysis, Antihypertensive Potential and Antioxidant Activities. *Foods*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/foods11142103>
- [39]. Salim, R., Taslim, T., Selonni, F., Verawaty, V., & Dewi, I. P. (2025). Decoction of *Cocos nucifera* Linn.: Antioxidant Activity, Total Phenolics, and Flavonoids Contents. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 12(2), 129–136. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v12i2.450>
- [40]. Sati, D. A. D. L., Rahmadiano, H., Kuncoro, P. T., Widiartini, C., Arjadi, F., Krisniawati, N., Fauziyah, Y., & Wahyuningsih, M. S. H. (2022). The effect of *Tithonia Diversifolia* extract against the level of nitric oxide in streptozotocin-nicotinamide-induced rats model. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, 5, 243–250. <https://doi.org/10.20885/jkki.vol13.iss3.art4>
- [41]. Shafras, M., Sabaragamuwa, R., & Suwair, M. (2024). Role of dietary antioxidants in diabetes: An overview. *Food Chemistry Advances*, 4(June 2023), 100666. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100666>

- [42]. Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Shah, S. A. A., Sarian, M. N., Khattak, M. M. A. K., Khatib, A., Sabere, A. S. M., Yusoff, Y. M., & Latip, J. (2022). Flavonoids as Antidiabetic and Anti-Inflammatory Agents: A Review on Structural Activity Relationship-Based Studies and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012605>
- [43]. Shibib, L., Al-Qaisi, M., Guess, N., Miras, A. D., Greenwald, S. E., Pelling, M., & Ahmed, A. (2024). Manipulation of Post-Prandial Hyperglycaemia in Type 2 Diabetes: An Update for Practitioners. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 17(July), 3111–3130. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S458894>
- [44]. Thongsom, M., Chunglok, W., Kuanchuea, R., & Tangpong, J. (2023). Antioxidant and hypoglycemic effects of *Tithonia Diversifolia* aqueous leaves extract in alloxan-induced diabetic mice. *Advances in Environmental Biology*, 7(9), 2116–2125.
- [45]. Triyanti, S. B., Lestari, F. P., Fitriana, P. A. N., Rostiana, H. R., Silalahi, D. D., Syalsabina, T. D., Putri, R. Y., & Saputra, I. S. (2025). Pengaruh Metode Ekstraksi Maserasi, Sonikasi, dan Sokletasi terhadap Nilai Rendemen Sampel Kulit Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Sains Dan Edukasi Sains*, 8(1), 71–78. <https://doi.org/10.24246/juses.v8i1p71-78>
- [46]. Upa, N. F. P., Kolobani, M. N., Wardani, N. P. R. ., Kale, M. L. F. P., & Tunggal, D. (2024). Effect of Oven Drying Temperature on The Tanin Content of Bungur (*Lagerstroemia speciosa* Auct. non (L.) Pers) Leaves. *Golden Ratio of Data in Summary*, 4(1), 144–152. <https://doi.org/10.52970/grdis.v4i1.1001>
- [47]. Yazid, F., Salim, S. O., Rahmadika, F. D., Rosmalena, R., Artanti, N., Sundowo, A., & Prasasty, V. D. (2021). Antidiabetic Effects of *Tithonia Diversifolia* and *Malus domestica* Leaf Extracts in Alloxan-Induced Sprague Dawley Rats. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 12(1), 1630–1638.