

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperglikemia merupakan suatu kondisi medis yang terjadi ketika kadar glukosa dalam darah mengalami peningkatan secara signifikan hingga melebihi batas normal yang seharusnya. Kondisi ini tidak hanya mencerminkan adanya gangguan pada mekanisme pengaturan gula darah dalam tubuh, tetapi juga sering menjadi indikator utama munculnya berbagai penyakit metabolik. Salah satu penyakit yang paling erat kaitannya dengan hiperglikemia adalah diabetes melitus, meskipun diabetes melitus juga dapat ditemukan pada berbagai gangguan kesehatan lainnya. Diabetes melitus (DM) telah berkembang menjadi permasalahan kesehatan global dengan prevalensi yang terus meningkat di berbagai negara, sehingga memerlukan perhatian serius baik dari segi pencegahan, diagnosis dini, maupun penanganan yang berkelanjutan (Soelistijo et al., 2019). Di Indonesia, diabetes melitus menempati peringkat ketiga sebagai penyebab kematian tertinggi setelah *stroke* dan penyakit jantung. Kondisi ini semakin memprihatinkan karena masih banyak penderita diabetes yang tidak terdiagnosis sejak tahap awal. Akibatnya, penyakit ini kerap disebut sebagai *silent killer*, karena sering berkembang tanpa menimbulkan gejala yang jelas hingga akhirnya memicu berbagai komplikasi serius yang membahayakan kesehatan dan bahkan mengancam jiwa (Safitri et al., 2024). Menurut data dari *International Diabetes Federation* (2021), jumlah pengidap diabetes melitus diperkirakan akan meningkat secara drastis, bahkan pada tahun 2045 diprediksi mencapai 783 juta orang secara global. Indonesia sendiri menempati peringkat kelima dengan jumlah penderita diabetes terbanyak di dunia.

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit kronis yang ditandai oleh peningkatan kadar glukosa dalam darah yang melebihi batas normal. Kondisi ini terjadi akibat adanya gangguan pada proses metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang dipicu oleh kekurangan hormon insulin, baik secara relatif maupun absolut. Apabila tidak dikelola dan dikendalikan dengan baik, diabetes melitus berpotensi menimbulkan berbagai komplikasi, baik berupa gangguan metabolik akut maupun komplikasi vaskular jangka panjang yang dapat berdampak serius terhadap kualitas hidup. Diabetes melitus yang tidak terkontrol akan menimbulkan berbagai komplikasi, baik jangka pendek (akut) seperti hipoglikemia dan ketoasidosis, maupun jangka panjang (kronis) yang dapat mempengaruhi fungsi organ-organ tubuh seperti mata, jantung, ginjal, kulit, saluran pencernaan, dan saraf (Febrinasari et al., 2020).

Diabetes melitus diklasifikasikan ke dalam beberapa tipe berdasarkan faktor penyebab dan mekanisme terjadinya, yaitu diabetes melitus tipe 1, diabetes melitus tipe 2, diabetes melitus gestasional yang muncul selama masa kehamilan, serta beberapa tipe lainnya yang disebabkan oleh kondisi tertentu. Diabetes melitus tipe 1 terjadi akibat kerusakan sel-sel β pankreas yang dipicu oleh respons autoimun, sehingga menyebabkan produksi insulin menurun secara drastis bahkan berhenti sama sekali, yang mengakibatkan kekurangan insulin secara total dalam tubuh (Cheng et al., 2024). Sementara itu, diabetes tipe 2 dipicu oleh kombinasi antara faktor genetik dan juga faktor lingkungan (Febriana et al., 2024). Diabetes melitus gestasional (DMG) merupakan

kondisi hiperglikemia yang muncul selama kehamilan (Olli et al., 2024). Dengan mempertimbangkan berbagai potensi efek samping yang dapat timbul dari penggunaan terapi konvensional, pemanfaatan tanaman herbal sebagai alternatif dalam pengobatan diabetes menjadi salah satu pendekatan yang dinilai cukup menjanjikan. Tanaman obat diketahui mengandung berbagai senyawa aktif yang berpotensi membantu menurunkan kadar glukosa darah, sehingga dapat menjadi pilihan terapi pendukung yang lebih alami dan relatif aman (Solikhah et al, 2020).

Berbagai jenis tumbuhan telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk membantu menurunkan kadar glukosa darah, karena tanaman herbal diketahui mengandung senyawa aktif yang memiliki efek antidiabetes yang dapat menjadi alternatif dari obat-obatan sintetik seperti akarbosa yang jika dikonsumsi dalam jangka waktu yang lama akan menimbulkan efek samping seperti diare, mual, pusing, hingga gangguan saraf. Senyawa alami seperti terpenoid, senyawa fenolik, tanin, dan alkaloid yang terkandung dalam tanaman herbal diyakini mampu menurunkan kadar gula darah yang tinggi (Alia & Sholih, 2024). Salah satu tumbuhan yang telah diteliti memiliki potensi antidiabetes adalah daun mangga (*Mangifera indica* L.) (Na'imah et al., 2023). Salah satu jenis varietasnya adalah tanaman mangga apel (*Mangifera indica* L. var. Apel), yang diketahui memiliki beragam manfaat kesehatan serta nilai gizi yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan beberapa varietas mangga lainnya. Buah ini mengandung protein sebesar 4,85% dan serat sebanyak 7,92%, serta mineral penting seperti kalsium sebesar 48,05 mg per 100 g dan seng sebesar 4,42 mg per 100 g. Selain itu, mangga apel juga kaya akan senyawa antioksidan, terutama vitamin C dengan kandungan mencapai 75,81 mg per 100 g dan vitamin A sebesar 10,12 mg per 100 g. Keberadaan antioksidan tersebut berperan penting dalam menangkal kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas, sekaligus membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Mbusa et al., 2023). Kandungan metabolit sekunder tanaman mangga apel memiliki potensi yang cukup besar terhadap pengobatan (Rahmawati dan Rini, 2021). Tanaman ini mengandung berbagai metabolit sekunder yang dapat digunakan sebagai bahan dasar obat, seperti alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid (Ayyun et al., 2023). Senyawa-senyawa ini bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim yang terlibat pada proses pemecahan karbohidrat, khususnya enzim α -amilase dan α -glukosidase (Alia & Sholih, 2024).



(a)



(b)

Gambar 1. (a). Pohon mangga apel (*Mangifera indica* L. var. Apel) (b). Daun mangga apel (*Mangifera indica* L. var. Apel) (Rosyid, 2022)

Ekstrak etanol daun mangga Okrong menunjukkan aktivitas antidiabetik dengan menghambat enzim α -glukosidase dan α -amilase yang dilakukan secara *in vitro*, serta memiliki potensi sitotoksik terhadap beberapa garis sel kanker. Nilai IC_{50} terhadap α -glukosidase dilaporkan sekitar 0,0503 mg/mL untuk ekstrak daun, sedangkan mangiferin menunjukkan IC_{50} sekitar 0,5813 mg/mL yang menandakan kemampuan penghambatan enzim yang signifikan (Ganogpichayagrai et al. 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Mistry et al (2023), Uji *in vivo* pada tikus diabetes terinduksi alloxan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit mangga dan mangiferin mampu menurunkan kadar glukosa darah puasa secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol diabetes. Perlakuan juga memperbaiki berat badan dan profil lipid, yang menunjukkan adanya perbaikan kondisi metabolik. Mangiferin menunjukkan efek hipoglikemik yang lebih kuat dan mendekati obat antidiabetes standar, sementara ekstrak kulit mangga tetap memberikan aktivitas antioksidan senyawa fenolik yang mampu menurunkan stres oksidatif serta melindungi sel β pankreas dari kerusakan alloxan, sehingga mendukung pemulihan metabolisme glukosa.

Pembuktian ilmiah tanaman obat atau herbal dapat dilakukan dengan memanfaatkan teknologi komputer, salah satunya melalui kajian *in silico* yang merupakan pendekatan komputasional yang menggunakan perangkat lunak untuk menganalisis dan mengintegrasikan data biologis dan medis dari berbagai sumber. Kajian ini bertujuan untuk meningkatkan efisiensi proses perancangan obat (*drug design*) dengan menghubungkan basis data struktur molekul yang relevan pada target protein. Selain itu, metode *in silico* juga memungkinkan pembuatan model dan simulasi komputasi yang mendukung prediksi, pengembangan hipotesis, dan penemuan baru dalam pengembangan obat-obatan (Klara et al., 2023). Daun mangga apel kaya akan senyawa bermanfaat seperti flavonoid dan fenol. Senyawa ini memberikan efek antioksidan dan dapat meningkatkan sensitivitas insulin dengan mengaktifkan protein GLUT4 (Oyejide et al., 2020). Kajian *in silico* yang dilakukan oleh Tasnim dan Mahmud (2022), menunjukkan bahwa fitokimia dari *Mangifera indica*, seperti mangiferin, kuersetin, dan kaempferol, memiliki potensi antidiabetes tipe 2 melalui mekanisme penghambatan multi-target. *Molecular docking* memperlihatkan bahwa mangiferin, kuersetin, dan kaempferol berkaitan stabil dengan enzim kunci seperti α -glukosidase, α -amilase, PTP1B, dan DPP-4, dengan nilai energi ikat negatif yang kompetitif dibandingkan ligan pembanding yang didukung oleh pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi π - π pada sisi aktif enzim.

Berdasarkan beberapa uraian dalam latar belakang, penelitian ini dilaksanakan untuk mengeksplorasi potensi daun mangga apel sebagai agen antidiabetes. Penelitian dilakukan secara *in vitro* dengan pendekatan penghambatan enzim α -amilase, yaitu enzim yang berperan penting dalam proses pemecahan karbohidrat, menggunakan ekstrak etanol daun mangga apel. Enzim α -amilase digunakan karena berperan di awal pencernaan, tidak seperti enzim α -glukosidase yang bekerja di usus besar. Etanol digunakan karena sifat polarnya agar dapat menarik senyawa-senyawa polar yang terdapat pada daun mangga apel (Sukhikh et al, 2023). Pengujian mencakup perhitungan persen inhibisi (% inhibisi) serta nilai IC_{50} . Namun, mekanisme interaksi antara senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun mangga apel dan enzim target hingga saat ini masih belum sepenuhnya dipahami. Salah satu metode yang efektif untuk

memprediksi kemungkinan interaksi antara senyawa bioaktif dan protein target secara molekuler adalah studi *in silico* (Khanal et al., 2019). Dalam studi ini, prediksi penghambatan enzim α -amilase dilakukan dengan menganalisis skor afinitas dari interaksi senyawa utama dalam ekstrak terhadap enzim α -amilase sebagai target ligan, dengan menggunakan teknik *molecular docking*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka rumusan masalah penelitian ini yaitu:

1. senyawa metabolit sekunder apa yang terdapat pada ekstrak etanol daun mangga apel (*Mangifera indica* L. var. Apel)?
2. bagaimana aktivitas penghambatan ekstrak etanol daun mangga apel terhadap enzim α -amilase secara *in vitro*?
3. bagaimana interaksi penghambatan senyawa utama dalam ekstrak etanol daun mangga apel terhadap reseptor α -amilase secara *in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari Penelitian ini adalah untuk:

1. mengekstraksi dan menganalisis senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol daun mangga apel dengan skrining fitokimia, FTIR, dan LC-MS.
2. menentukan aktivitas penghambatan ekstrak etanol p.a dan teknis daun mangga apel terhadap enzim α -amilase secara *in vitro*,
3. menganalisis interaksi penghambatan senyawa utama dalam ekstrak etanol daun mangga apel terhadap reseptor α -amilase secara *in silico*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi terkait pengembangan ilmu dan teknologi mengenai potensi ekstrak etanol daun mangga apel sebagai antidiabetes yang mampu menghambat enzim α -amilase dan memberikan informasi mengenai penemuan senyawa bioaktif dan sebagai sumber informasi mengenai inovasi pengembangan *herbal medicine* berbasis bahan alam.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu daun mangga apel (*Mangifera indica* L. var. Apel), akuades, etanol p.a (Merck), etanol teknis (Onemed), enzim α -amilase (Sigma-Aldrich), plat KLT, serbuk DNS (Merck), DMSO (Merck), Buffer fosfat pH 7 (Merck), NaOH (Merck), HCl pekat (Merck), pati (Stärke löslich), KNa tartrat (Merck), tablet akarbosa, FeCl_3 (Merck), H_2SO_4 pekat (Merck), serbuk Mg (Merck), pereaksi Dragendorff (Merck), dan CH_3COOH (Merck).

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas umum yang digunakan di laboratorium, ayakan 60 *mesh*, spektrofotometer UV-Vis (Pg Instrumen T60), spektrofotometer FTIR (Shimadzu IRPrestige-21), LC-MS (QP2010 Shimadzu), *vacum evaporator* (Hahnvapor HS-2005S), oven, timbangan analitik, pipet mikro, *hotplate*, dan *vortex*.

2.3 Tempat dan Waktu Penelitian

2.3.1 Tempat dan Waktu Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Mei 2025 di perkebunan Desa Pattallasang, Kecamatan Pattallasang, Kabupaten Gowa, Provinsi Sulawesi Selatan.

2.3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2025 hingga bulan Januari 2026 di Laboratorium Kimia Dasar, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Kimia Organik, dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, dan Pusat Laboratorium Forensik Bogor.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel

Daun mangga apel sebanyak 5 kg pertama-tama dibersihkan, kemudian daun mangga apel tersebut dikeringkan di dalam oven pada suhu 50 °C hingga kering dan diperiksa secara berkala. Setelah kering, daun mangga apel dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk daun mangga apel kemudian diayak dengan ayakan 60 *mesh* untuk mendapatkan serbuk daun mangga apel yang halus (Wulandari et al., 2021). Serbuk yang diperoleh selanjutnya akan diekstraksi.

2.4.2 Ekstraksi Daun Mangga Apel dengan Etanol

Serbuk daun mangga apel ditimbang 250 g dimaserasi dalam 500 mL etanol teknis dan p.a pada suhu ruang selama 3 x 24 jam dengan pergantian pelarut setiap harinya kemudian disaring hingga diperoleh filtrat. Filtrat kemudian diuapkan dengan *vacum evaporator* pada suhu 40 °C sampai volumenya berkurang 80% dari volume awal (Nurhasnawati et al., 2017). Ekstrak kental yang dihasilkan, yaitu ekstrak etanol p.a daun mangga apel (EPDMA) dan ekstrak etanol teknis daun mangga apel (ETDMA), dihitung rendemennya menggunakan rumus pada persamaan (1).

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

Selanjutnya ekstrak EPDMA dan ETDMA akan diuji secara fitokimia dan pengujian dengan instrumen FTIR dan LC-MS.

2.4.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak EPDMA dan ETDMA (Wahid dan Safwan, 2019).

Uji Flavonoid. Ekstrak EPDMA dan ETDMA masing-masing sebanyak 2 mL dicampur dengan 0,5 g serbuk magnesium dan 3-5 tetes HCl. Hasil uji positif dari uji flavonoid ini adalah ditandai dengan perubahan warna merah, kuning, atau jingga.

Uji Tanin. Ekstrak EPDMA dan ETDMA masing-masing sebanyak 2 mL dicampur dengan besi (III) klorida (FeCl_3) 1% sebanyak 2 tetes. Hasil uji positif dari uji tanin ini adalah ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman.

Uji Alkaloid. Ekstrak EPDMA dan ETDMA masing-masing sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dicampur dengan 1 tetes HCl pekat dan 3 tetes pereaksi Dragendroff. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya endapan merah jingga.

Uji Saponin. Ekstrak EPDMA dan ETDMA masing-masing sebanyak 2 mL lalu dicampur dengan 4 mL akuades lalu dikocok. Uji positif ditandai dengan adanya buih yang stabil selama kurang lebih 5 menit.

Uji Steroid dan Terpenoid. Ekstrak EPDMA dan ETDMA masing-masing sebanyak 2 mL dicampur dengan CH_3COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan, kemudian dibiarkan selama beberapa menit. Hasil uji positif steroid ditandai dengan perubahan larutan menjadi warna hijau dan hasil uji positif terpenoid ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah kecoklatan.

2.4.4 Analisis Gugus Fungsi Ekstrak EPDMA dan ETDMA dengan FTIR

Ekstrak EPDMA dan ETDMA ditetaskan sebanyak $\pm 0,5$ mL di atas pelet KBr, lalu dianalisis menggunakan instrumen FTIR. Setelah itu, akan diperoleh puncak-puncak berbeda yang memberikan informasi terkait gugus fungsi pada sampel yang dianalisis (Kurrey et al., 2019).

2.4.5 Analisis Senyawa Kimia Ekstrak EPDMA dengan LC-MS

Ekstrak EPDMA yang telah diperoleh dari hasil ekstraksi diidentifikasi senyawanya menggunakan LC-MS. Untuk analisis, sebanyak 2 μ L ekstrak EPDMA dipipet dan diinjeksikan ke dalam instrumen LC-MS sesuai dengan parameter kerja baku alat tersebut. Penentuan senyawa pada ekstrak EPDMA dilakukan dengan mencocokkan bobot molekul dan pola fragmentasi dari senyawa pada ekstrak dengan senyawa pada library sistem LC-MS. Dengan demikian, dapat diperoleh informasi tentang komposisi kimia ekstrak EPDMA, termasuk identifikasi senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya (Kartini et al., 2019). Data yang diperoleh kemudian akan dilakukan uji *in silico*.

2.4.6 Penyiapan Larutan Pereaksi

Larutan enzim α -amilase. Ekstrak kasar enzim α -amilase diencerkan dengan cara memipet 1 mL enzim ke dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya, ditambahkan buffer fosfat pH 7 hingga tanda batas, kemudian dihomogenkan. Dengan demikian, diperoleh larutan enzim α -amilase dengan pengenceran 10 kali.

Reagen DNS. Dinitrosalisilat (DNS) sebanyak 1 g dilarutkan dalam 5 mL akuades. Selanjutnya, 30 g KNa tartrat dilarutkan dalam 20 mL NaOH 2 M, kemudian dipanaskan hingga larut. Setelah itu, larutan DNS dan Ka Na tartrate dicampur hingga homogen. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas (Wulandari et al., 2021). Pembuatan reagen DNS terlampir pada Lampiran 2.

Larutan substrat pati. Substrat pati dibuat pada konsentrasi 1% dibuat dengan menimbang amilum sebanyak 0,1 g dan dilarutkan dengan 10 mL akuades, lalu dipanaskan. Bagan kerja pati terlampir pada Lampiran 2.

2.4.7 Uji In Vitro

Uji aktivitas inhibisi α -amilase dilakukan terhadap larutan kontrol negatif (larutan tanpa sampel/standar), larutan kontrol positif (larutan akarbosa) dan larutan sampel uji (EPDMA dan ETDMA).

Penyiapan larutan standar glukosa. Glukosa monohidrat ditimbang sebanyak 0,01 g dan dilarutkan dalam 10 mL akuades sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk glukosa 1000 ppm. Larutan induk glukosa 1000 ppm dipipet sebanyak 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 mL ke dalam tabung reaksi yang berbeda, kemudian dicukupkan volumenya dengan

akuades hingga 1,5 mL, sehingga diperoleh deret konsentrasi 25; 50; 100; 200; 400 ppm.

Pengukuran standar glukosa. Tabung reaksi yang berisi larutan blanko, dan larutan standar dengan konsentrasi 25; 50; 100; 200; 400 ppm dengan volume 1,5 mL. Kemudian ditambahkan 1,5 mL reagen DNS ke dalam masing-masing tabung reaksi, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 10 detik. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi, dimasukkan ke dalam penangas air dan dididihkan selama 10 menit, kemudian didinginkan. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 517 \text{ nm}$).

Penyiapan larutan induk akarbosa. Penyiapan larutan induk akarbosa dibuat dengan menimbang 0,005 g akarbosa kemudian dilarutkan menggunakan 1 mL buffer fosfat pH 7 dan HCl 2 N. Selanjutnya dicukupkan dengan akuades hingga volume 10 mL sehingga diperoleh larutan induk akarbosa dengan konsentrasi 500 ppm.

Akarbosa sebagai kontrol positif. Larutan akarbosa 500 ppm dipipet sebanyak 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; 2,56 mL ke dalam vial yang berbeda dan dicukupkan volumenya dengan buffer fosfat pH 7 hingga 4 mL, sehingga diperoleh deret konsentrasi 10, 20, 40, 80, 160, 320 ppm. Dipipet 1 mL masing-masing konsentrasi ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Kemudian direaksikan dengan 0,5 mL enzim α -amilase, lalu diinkubasi menggunakan inkubator selama 10 menit dengan suhu 37 °C, setelah itu ditambahkan pati 1% sebanyak 0,1 mL dan diinkubasi lagi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Kemudian ditambahkan 0,75 mL reagen DNS dan dipanaskan selama 10 menit. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 510 \text{ nm}$).

Enzim α -amilase sebagai kontrol negatif. Campuran 1 mL buffer fosfat pH 7 dengan 0,5 mL enzim α -amilase diinkubasi di inkubator selama 10 menit pada suhu 37 °C, lalu ditambahkan 0,1 mL pati 1%. Selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C, Kemudian ditambahkan 0,75 mL reagen DNS dan dipanaskan selama 10. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 510 \text{ nm}$). Untuk larutan blanko tidak menggunakan enzim. Aktivitas enzim amilase dihitung menggunakan rumus pada persamaan (2) (Arfah, 2016) sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{[\text{glukosa}]}{\text{BM} \times V \times t} \times \text{FP} \quad (2)$$

Keterangan: [Glukosa] = kadar glukosa (ppm)
 FP = faktor pengenceran
 BM = bobot molekul glukosa
 V = volume enzim yang digunakan dalam mL
 t = waktu inkubasi dalam satuan menit

Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit/mL, dengan satu unit α -amilase diartikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol glukosa/menit pada kondisi tertentu.

Penyiapan larutan sampel uji. Sampel ekstrak EPDMA dan ETDMA ditimbang sebanyak 0,005 g, kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO dan dicukupkan volumenya hingga 10 mL, maka diperoleh konsentrasi sampel uji ekstrak EPDMA dan ETDMA dengan konsentrasi 500 ppm. Larutan induk sampel uji 500 ppm dipipet sebanyak 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; dan 2,56 mL ke dalam vial yang berbeda, kemudian dicukupkan volumenya dengan buffer fosfat hingga 4 mL, sehingga diperoleh larutan induk deret konsentrasi sampel uji 10; 20; 40; 80; 160; dan 320 ppm.

Pengujian Antidiabetes (IC₅₀) Larutan Sampel Uji. Deret konsentrasi 10, 20, 40, 80, 160, dan 320 ppm. Larutan induk yang telah dibuat dipipet masing-masing 1 mL ke dalam tabung reaksi berbeda, kemudian direaksikan dengan 0,5 mL enzim α -amilase, lalu diinkubasi menggunakan inkubator selama 10 menit dengan suhu 37 °C. Kemudian ditambahkan 0,1 mL pati 1%, lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Setelah itu, ditambahkan 0,75 mL reagen DNS dan dipanaskan selama 10 menit, lalu didinginkan. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 510 \text{ nm}$) Wulandari et al. (2020). Perhitungan % penghambatan enzim dapat dihitung menggunakan persamaan (3).

$$\% \text{Penghambatan} = 1 - \frac{\text{Aktivitas enzim dengan inhibitor}}{\text{Aktivitas enzim tanpa inhibitor}} \times 100\% \quad (3)$$

IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan regresi linear ($y = bx + a$), dimana konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan %penghambat sebagai sumbu y. Penentuan nilai IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan (4)

$$\text{IC}_{50} = \frac{50 - a}{b} \quad (4)$$

2.4.8 Uji In Silico

Preparasi protein α -Amilase dan ligan standar. Struktur tiga dimensi protein α -amilase (2QV4) diunduh melalui laman protein data bank (<https://www.rscb.org/structure>). Semua residu pada struktur protein dihilangkan dan dipreparasi menggunakan software Chimera dan ligan standar dari struktur kompleks protein diambil kemudian dipreparasi dengan metode yang sama dengan protein. protein dan ligan yang telah dipreparasi kemudian disimpan dalam format.pdb (Reynaldi, 2021).

Preparasi Ligan Senyawa Hasil LC-MS dan Akarbosa sebagai pembanding. Struktur tiga dimensi senyawa dominan dari ekstrak EPDMA diunduh pada laman PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ligan tersebut kemudian disimpan dalam format .pdb. Prosedur yang sama dilakukan pada ligan akarbosa (Reynaldi, 2021).

Analisis ADME. (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*) dilakukan menggunakan laman Swissadme (<http://www.swissadme.ch>). Analisis ini digunakan untuk mengetahui sifat farmakokinetika dari senyawa yang diuji (Sulfahri, 2019).

Molecular docking. Proses *molecular docking* dilakukan menggunakan *software* AutoDock 4.2. Setiap ligan ditambatkan pada sisi aktif protein. Parameter *docking* dibuat dengan mengukur grid box sebesar 50 x 50 x 50 Å dan spacing sebesar 0,375 Å lalu disimpan dalam format .gpf. Proses *docking* diatur menjadi 10 konformasi. Algoritma sampling yang digunakan adalah *Lamarckian genetic algorithm* untuk memperoleh data energi ikatan (ΔG) dan memprediksi konstanta inhibisi (K_i). Validasi dari hasil docking ditentukan dengan mengamati nilai RMSD dari proses redocking ligan standar pada sisi aktif protein dengan nilai yang tidak lebih dari 2 Å. Visualisasi hasil docking kemudian diamati menggunakan *software Discoveri Studio Visualizer* (Reynaldi, 2021).