

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Secara ilmiah, tanaman sambiloto diklasifikasikan ke dalam kingdom *Plantae* sebagai tumbuhan tingkat tinggi yang memiliki pembuluh (*Tracheobionta*) dan berkembang biak dengan biji (*Spermatophyta*). Sebagai bagian dari divisi *Magnoliophyta*, tanaman ini termasuk dalam kelompok tumbuhan berbunga yang memiliki biji berkeping dua atau kelas *Magnoliopsida*. Dalam hirarki yang lebih spesifik, sambiloto berada di bawah subkelas *Asteridae* dan ordo *Scrophulariales*. Tanaman ini merupakan anggota dari famili *Acanthaceae*, yang dikenal memiliki ciri khas batang beruas dan bunga yang unik. Secara spesifik, sambiloto termasuk dalam genus *Andrographis* dengan nama spesies *Andrographis paniculata* (*A. paniculata*). Tanaman yang sering dijuluki sebagai *King of Bitters* ini sangat dikenal dalam dunia pengobatan herbal karena kandungan senyawa andrografolida yang memberikan rasa pahit yang kuat namun memiliki khasiat medis yang tinggi (Lestari et al., 2025).



Gambar 1. Tanaman Sambiloto (*A. paniculata*)

Tanaman ini umum dibudidayakan di India, Tiongkok, dan diberbagai negara lainnya untuk dimanfaatkan sebagai obat tradisional (Thakur et al., 2015). *A. paniculata* diakui luas dalam pengobatan tradisional khususnya di beberapa negara seperti India, Tiongkok, dan Thailand untuk sifat terapeutiknya dalam mengobati berbagai penyakit dan secara resmi disebutkan dalam *Indian Pharmacopoeia*. Ekstrak mentah tanaman ini dilaporkan memiliki berbagai sifat obat, termasuk analgesik, antikanker, antidiabetes, antifertilitas, antiinflamasi, antimalaria, antimikroba, antioksidan, antipiretik, antiretroviral, antiracun ular, kardioprotektif, hepatoprotektif, dan imunomodulator (Kumar et al., 2024).

Daun, batang dan akar dari *A. paniculata* dilaporkan mengandung berbagai fitokonstituen, termasuk ent-labdane diterpenoid, flavonoid, asam kinat, xanton, dan noriridoid. Andrografolida, sebuah diterpen siklik- γ -laktone, adalah konstituen utama *A. paniculata* dan mencakup 1% dari berat kering herba ini. Kandungan andrografolida tertinggi ditemukan pada daun (2,39%) dan paling sedikit pada biji. Andrografolida menjadi fitokonstituen utama dan paling melimpah yang bertanggung jawab atas

sebagian besar bioaktivitas yang dilaporkan pada *A. paniculata* (Malik et al., 2021). Sambiloto sering dimanfaatkan karena kandungan andrografolida yang tinggi. Andrografolida memiliki aktivitas biologis yang luas, termasuk efek antiinflamasi, antioksidan, antiangiogenik, antidiabetik, antifertilitas, antivirus, antibakteri, kardioprotektif, nefroprotektif, dan hepatoprotektif.

Beberapa penelitian mengenai ekstrak sambiloto dalam penghambatan enzim alfa-amilase telah dilakukan. Ekstrak air dan etanol dari sambiloto menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim alfa-amilase. Aktivitas inhibisi ekstrak air *A. paniculata* (IC_{50} 14,203 $\pm$ 0,112 mg/mL) lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak etanol (IC_{50} 9,253 $\pm$ 0,116 mg/mL) (Hartini et al., 2021). Penelitian (Ajayi et al., 2021) mengungkapkan bahwa ekstrak dan senyawa terisolasi dari *A. paniculata* memiliki aktivitas antidiabetes yang relatif kuat. Hasil uji inhibisi aktivitas alfa-amilase mendukung potensi penggunaan ekstrak/senyawa terisolasi *A. paniculata* dalam pengelolaan diabetes melitus. Penghambatan aktivitas kerja enzim terkait metabolisme karbohidrat seperti enzim alfa-amilase dan enzim alfa-glukosidase merupakan salah satu usaha untuk mengontrol kadar glukosa postprandial dalam upaya mengatasi DM, enzim ini berperan penting dalam proses metabolisme karbohidrat dengan mengatalisis reaksi hidrolisis karbohidrat kompleks menjadi unit yang lebih kecil seperti amilum bahkan unit-unit yang lebih sederhana, termasuk glukosa (Fitrianingsih et al., 2016).

Kuersetin adalah flavonoid bebas karbohidrat, metabolit sekunder yang ditemukan dalam flora, termasuk buah-buahan dan sayuran khususnya pada sayuran tomat, buah beri dan brokoli (Bhat dan Bhat, 2021). Senyawa ini memiliki rasa pahit dan tergolong sebagai aglikon, yaitu struktur tanpa kandungan karbohidrat, yang berperan memberikan pigmen warna pada berbagai jenis bunga (Batiha et al., 2020). Senyawa kuersetin memiliki berbagai sifat medis, meliputi efek antialergi, antiinflamasi, antikanker, proteksi kardiovaskular, antitumor, antivirus, antidiabetes, imunomodulatori, antihipertensi, dan gastroprotektif (Taïlé et al., 2020; Saeedi-Boroujeni et al., 2021; González-Serrano et al., 2022). Potensi kuersetin dalam mencegah diabetes telah ditunjukkan dalam beberapa penelitian, kuersetin secara signifikan ditemukan mampu menghambat aktivitas enzim alfa-amilase dan alfa-glukosidase secara bergantung pada konsentrasi, serta mencegah oksidasi lipid dalam homogenat jaringan pankreas. Hasilnya menunjukkan bahwa kuersetin sangat efektif menghambat alfa-amilase, dengan nilai IC_{50} 0,008 mg/mL, yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan inhibitor sintesis akarbosa (IC_{50} = 0,213 mg/mL) (Huang et al., 2024). Kuersetin dapat berinteraksi dengan pati sehingga mengurangi kemudahan pati dicerna oleh tubuh. Senyawa ini juga meningkatkan pembentukan pati resisten, yaitu jenis pati yang tidak mudah dicerna, sehingga membantu menurunkan indeks glikemik makanan. Selain itu, kuersetin menghambat kerja enzim-enzim yang berperan dalam pencernaan. Penelitian menunjukkan bahwa efek kuersetin pada pati berbeda-beda, tergantung pada kadar kuersetin dan jenis patinya. Kuersetin yang ditambahkan ke dalam makanan, seperti roti atau pasta, dapat secara signifikan mengurangi pemecahan pati menjadi gula. Penambahan kuersetin pada makanan berpotensi

untuk mengembangkan produk pangan fungsional yang dapat membantu mengendalikan kadar gula darah (Günel-Köroğlu et al., 2024).

Ekstrak tumbuhan telah dimanfaatkan tidak hanya dalam formulasi tunggal, namun juga dalam kombinasi dengan tujuan meningkatkan efikasi serta meminimalkan efek samping yang ditimbulkan (Sekar et al., 2024). Studi mengenai kombinasi ekstrak antar tanaman yang memiliki karakteristik serupa semakin banyak dilakukan, dengan tujuan pemanfaatannya sebagai minuman kesehatan yang lebih praktis dan ekonomis. Sebagai contoh, kombinasi antara *Limonium algarvense* dan *Camellia sinensis* L., serta kombinasi teh hitam *C. sinensis* dan *Averrhoa bilimbi* L. telah diteliti. Kombinasi-kombinasi tersebut terbukti mampu meningkatkan aktivitas masing-masing tanaman secara individual (Rodrigues et al., 2019).

Pendekatan kombinatorial ini terbukti memberikan kontrol glikemik yang efektif dalam pengobatan diabetes melitus. Kombinasi dua atau lebih ekstrak kerap kali menghasilkan efek farmakologis yang bersifat sinergistik (Putra et al., 2022). Penelitian kombinasi ekstrak tanaman sambiloto telah dilakukan dalam beberapa penelitian. Hasil penelitian Aprillia dan Safitri (2020) menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol 96% sambiloto dan daun sirih hijau dapat menurunkan kadar glukosa darah hingga 76%, sedikit lebih tinggi dibandingkan masing-masing ekstrak tunggal (72,7% dan 74,6%). Hal ini mengindikasikan adanya efek sinergis ringan hingga sedang, diduga karena adanya interaksi antara flavonoid, tanin, dan andrografolida dalam meningkatkan sensitivitas insulin. Sementara itu, penelitian Nugroho et al. (2011) menemukan bahwa kombinasi ekstrak terpurifikasi sambiloto dan pegagan (*Centella asiatica*) secara signifikan meningkatkan translokasi protein GLUT-4 pada jaringan otot tikus diabetes melitus tipe 2, menunjukkan adanya efek sinergis kuat melalui kerja dua jalur molekuler berbeda, yakni AMPK dan PI3K–Akt.

Selain aktivitas antidiabetes, kombinasi sambiloto juga menunjukkan potensi dalam bidang antitumor dan antikanker. Penelitian Sukardiman (2012) melaporkan bahwa kombinasi ekstrak terpurifikasi sambiloto dan kencur (*Kaempferia galanga*) mampu menghambat ekspresi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) yang berperan dalam proliferasi sel kanker kolon, menunjukkan adanya efek sinergis moderat hingga kuat. Efek sinergis juga dilaporkan pada kombinasi ekstrak sambiloto dengan 5-fluorourasil, yang menunjukkan aktivitas antikanker kuat pada sel T47D dan WiDr pada konsentrasi kombinasi rendah ($1/8$ IC₅₀) (Novitasari, 2015). Demikian pula, penelitian Ramadhani (2014) melaporkan bahwa kombinasi sambiloto dan doksorubisin memberikan efek sinergis kuat pada sel kanker HeLa dengan indeks kombinasi (CI) < 0,9. Penelitian Rachmawati (2014) menemukan bahwa fraksi etil asetat sambiloto yang dikombinasikan dengan vinkristin menunjukkan efek sinergis kuat pada sel T47D.

Penelitian mengenai kombinasi kuersetin dengan berbagai agen antidiabetes telah menunjukkan variasi efek sinergis. Hasil penelitian Hendrawati dan Sulistyoningrum (2025) melaporkan bahwa kombinasi kuersetin dan *glibenclamide* mampu meningkatkan ekspresi gen PPAR- γ pada jaringan jantung tikus diabetes tipe 2 secara lebih tinggi dibandingkan pemberian tunggal, menandakan peningkatan sensitivitas insulin melalui aktivasi reseptor nuklir tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat sinergisme yang terjadi terutama pada tingkat molekuler. Penelitian Eraky et

al. (2022) menemukan bahwa kombinasi kuersetin dan *liraglutide* memberikan efek sinergis kuat melalui aktivasi jalur TXNIP/IRS-1/PI3K, yang berperan dalam peningkatan sensitivitas insulin, penurunan stres oksidatif, serta perbaikan profil lipid.

Efek sinergis juga dilaporkan oleh Chellian et al. (2022) pada kombinasi kuersetin dan metformin, yang mampu menurunkan kadar glukosa darah. Kombinasi ini memperbaiki struktur vaskular dan jaringan pankreas, menandakan efek protektif terhadap komplikasi vaskular diabetes. Penelitian Eitah et al. (2019) juga memperlihatkan bahwa kombinasi kuersetin dan sitagliptin menghasilkan sinergisme paling kuat dengan perbaikan menyeluruh terhadap kadar glukosa. Kombinasi ini juga meningkatkan aktivitas antioksidan (SOD dan GSH) serta memulihkan struktur dan fungsi sel β pankreas melalui mekanisme ganda, yaitu inhibisi DPP-IV oleh sitagliptin dan efek antiinflamasi serta antioksidan kuersetin.

Kombinasi kuersetin dengan berbagai senyawa selain sebagai antidiabetes juga telah dilakukan dalam beberapa penelitian, penelitian Liu et al. (2020) mengombinasikan kuersetin dan doxorubicin sebagai antitumor meningkatkan efisiensi penargetan tumor secara *in vivo* 1,57 kali lebih tinggi daripada Doxorubicin tunggal. Penelitian Mansourizadeh et al. (2020) mengombinasikan kuersetin dan kurkumin sebagai antikanker payudara yang meningkatkan efek sitotoksik sinergis antara keduanya dengan meningkatkan bioavailabilitas dan penargetan efektif sel kanker payudara manusia MCF7. Kombinasi antara gliklazida dan kuersetin terbukti mampu menormalisasi homeostasis glukosa, profil lipid, dan status inflamasi, disertai dengan peningkatan aktivitas antioksidan (Abdelkader et al., 2020).

Oleh karena itu, berdasarkan latar belakang tersebut dilakukanlah penelitian yang belum pernah dilakukan sebelumnya mengenai efek kombinasi ekstrak sambiloto dan kuersetin terhadap aktivitas antidiabetes melalui mekanisme penghambatan enzim alfa-amilase. Dalam penelitian dilakukan evaluasi efek pemberian tunggal dan kombinasi ekstrak sambiloto dengan kuersetin terhadap aktivitas enzim alfa-amilase.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apa saja jenis senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun *A. paniculata* berdasarkan hasil analisis fitokimia dan GC-MS?
2. Bagaimana toksisitas sambiloto, kuersetin, dan kombinasi sambiloto/kuersetin berbagai perbandingan?
3. Bagaimana aktivitas sambiloto, kuersetin, dan kombinasi sambiloto/kuersetin berbagai perbandingan dalam menghambat enzim alfa amilase secara *in vitro*?
4. Berapa dan bagaimana indeks kombinasi sambiloto/kuersetin terhadap sifat toksisitas dan aktivitas inhibisi enzim alfa amilase?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana formulasi dan bioaktivitas kombinasi ekstrak sambiloto dan kuersetin dalam menghambat enzim alfa amilase

1.3.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengidentifikasi jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak sambiloto berdasarkan hasil analisis fitokimia dan GC-MS
2. Menganalisis sifat toksisitas sambiloto, kuersetin, dan kombinasi sambiloto/kuersetin
3. Menganalisis aktivitas sambiloto, kuersetin, dan kombinasi sambiloto/kuersetin dalam menghambat enzim alfa amilase secara *in vitro*
4. Menghitung dan menentukan indeks kombinasi sambiloto/kuersetin terhadap sifat toksisitas dan aktivitas inhibisi enzim alfa amilase

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk mengembangkan alternatif terapi diabetes berbasis bahan alam melalui kombinasi ekstrak sambiloto dan kuersetin. Kombinasi ini berpotensi menghasilkan efek sinergis dalam aktivitas antioksidan dan penghambatan enzim alfa amilase, yang berperan dalam pengendalian kadar gula darah. Selain itu, penelitian ini mendukung inovasi interdisipliner di bidang kimia bahan alam, biokimia, farmasi, dan kedokteran dalam pencarian kandidat obat herbal yang efektif dan aman.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni sampel sambiloto, kuersetin murni, etanol p.a. 96% (*Merck*), kertas saring, akuades, H₂SO₄ 98% (*Merck*), HCl 37% (*Merck*), serbuk Mg, NH₄OH 65% (*Merck*), FeCl₃, plat KLT, DMSO, larva udang, metanol, enzim alfa-amilase, substrat p-nitrofenil-alfa-D-glukopiranosida, buffer posfat pH 7, kuersetin, pH indikator, dan kertas saring *Whatman* no.41.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yakni peralatan gelas, neraca analitik, GC-MS Thermo Fischer Scientific, Hahnvapor evaporator, *smart* evaporator Biochromato, Grinder FW 400A, Amara aerator, lampu pijar Philipps, *hotplate stirrer IKA Type-7*, *waterbath Memmert*, oven Memmert dan inkubator Memmert Excellent INE 6000

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei hingga bulan Oktober 2025 yang berlokasi di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Biokimia Departemen Kimia, Universitas Hasanuddin dan Pengujian GC-MS pada Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat Makassar.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel

Sampel tanaman sambiloto diambil secara menyeluruh, mencakup seluruh tahapan usia tanaman (muda hingga tua). Bagian yang dikumpulkan meliputi batang, akar, daun, serta bunga untuk memastikan representasi seluruh komponen tanaman lalu dicuci dengan air, kemudian dikeringanginkan selama 48 jam. Setelah kering, sampel kemudian dipotong menjadi potongan kecil yang selanjutnya dihaluskan menggunakan *grinder* sehingga menjadi serbuk herba sambiloto, kemudian diayak menggunakan *mesh* 60 (Lukito et al., 2024)

2.4.2 Ekstraksi Sampel

Sebanyak 200 g serbuk simplisia sambiloto diekstraksi terlebih dahulu menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol p.a 96% sebanyak 2000 mL selama 3 x 24 jam pada suhu ruang dan terlindung dari sinar matahari. Ekstrak yang dihasilkan kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 41 yang steril. Setelah itu, ekstrak yang diperoleh digabungkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dan *smart evaporator* (Lukito et al., 2024).

2.4.3 Uji Fitokimia Ekstrak Sambiloto

a. Uji Flavonoid

Ekstrak sambiloto sebanyak 2 mL ditambahkan serbuk Magnesium sebanyak 1 gram kemudian ditambahkan HCl pekat beberapa tetes, kemudian dihomogenkan. Perubahan warna menjadi hijau kehitaman menandakan positif senyawa flavonoid (Hariharan et al., 2021).

b. Uji Alkaloid

Ekstrak sambiloto sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam klorida kemudian ditambahkan masing-masing tabung pereaksi dragendorff dan Meyer. Adanya alkaloid ketika terbentuknya warna larutan orange kecoklatan atau endapan merah bata (Kartikasari et al., 2022).

c. Uji Saponin

Ekstrak sambiloto sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 5 mL air panas dan dikocok kuat. Adanya buih yang stabil menunjukkan adanya saponin (Nurjannah et al., 2022).

d. Uji Tanin

Ekstrak sambiloto sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan larutan FeCl_3 10%. Uji positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru kehijauan menandakan positif tanin (Hariharan et al., 2021).

e. Uji Steroid dan Terpenoid

Ekstrak sambiloto sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 1 mL kloroform dan 1 mL asam asetat anhidrat. Lalu ditetesi dengan 1 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Uji positif steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Uji positif terpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecokelatan (Rubianti et al., 2022).

2.4.4 Analisis GC-MS Ekstrak Sambiloto

Analisis senyawa kimia dilakukan menggunakan instrumen *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS) untuk mengidentifikasi komponen aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol tanaman *A. paniculata* (sambiloto). Komponen penyusun sampel diidentifikasi dengan membandingkan waktu retensi masing-masing senyawa terhadap senyawa acuan yang telah dilaporkan dalam literatur, serta dengan data spektra massa yang diperoleh dari perpustakaan National Institute of Standards and Technology (Chau et al., 2024).

2.4.5 Formulasi Kombinasi Ekstrak Sambiloto/Kuersetin

Formulasi kombinasi ekstrak sambiloto dengan kuersetin dibuat dengan perbandingan 1:1, 1:2 dan 2:1 (b/b) (Rudiana dan Indriatmoko, 2021).

2.4.6 Uji Toksisitas

Pengujian efek toksisitas dari sambiloto, kuersetin dan kombinasi beberapa formulasi, dilakukan melalui penentuan nilai LC_{50} terhadap *Artemia salina*. Prosedur dilakukan dengan cara membuat pengenceran berseri dua kali lipat dari masing-masing sampel hingga diperoleh rentang konsentrasi 15,625-1000 mg/L. Sebanyak larva udang *Artemia salina* yang baru menetas dalam campuran air laut dan air suling (perbandingan 1:1) kemudian dimasukkan ke dalam setiap tabung uji, serta disiapkan tabung kontrol negatif yang berisi larutan garam fisiologis dan DMSO 5%. Volume total larutan dalam setiap tabung diatur menjadi 4 mL agar diperoleh konsentrasi akhir yang sesuai untuk masing-masing senyawa. Setelah 24 jam inkubasi, jumlah larva *Artemia salina* yang mati dihitung. Seluruh pengujian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan (triplo) untuk memastikan keakuratan hasil (Pal dan Tripathi, 2020). Persentase kematian larva kemudian ditentukan dengan menghitung perbandingan jumlah larva yang mati dengan jumlah larva total. Nilai toksisitas dinyatakan dengan nilai LC_{50} yang ditentukan dengan menggunakan analisis probit (Cahya et al., 2022). Perhitungan nilai LC_{50} berdasarkan persamaan garis lurus yang diperoleh pada kurva kematian (%) vs log konsentrasi sampel. Prosedur analisis ini secara umum mengacu pada Meyer et al. (1982) dengan beberapa modifikasi.

$$\% \text{ Kematian Larva} = \frac{\text{Jumlah larva yang hidup}}{\text{Jumlah larva awal}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.7 Uji Aktivitas Antidiabetes secara *In Vitro*

a. Pembuatan Reagen DNS

Serbuk DNS ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dengan 5 mL akuades. Selanjutnya, Na-K-Tartrat sebanyak 30 gram dilarutkan dalam 20 mL NaOH 2 M dipanaskan hingga larut. Larutan DNS dan Na-K-Tartrat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas, kemudian dihomogenkan (Wahyudi et al., 2022).

b. Pembuatan Larutan Akarbosa 1000 mg/L

Akarbosa tablet digerus dan ditimbang sebanyak 5 mg ke dalam labu ukur 5 mL ditambahkan dengan 0,005 mL DMSO. Larutan tersebut kemudian ditambahkan buffer fosfat pH 6,9 sampai tanda batas. Larutan akarbosa dibuat dengan deret konsentrasi 5, 10, 20, 40 dan 80 mg/L (Wahyudi et al., 2022).

c. Pembuatan Larutan Sampel dengan Variasi Konsentrasi

Ekstrak sambiloto, kuersetin dan Kombinasi Ekstrak Sambiloto/Kuersetin tiap perbandingan ditimbang sebanyak 5 mg ke dalam labu ukur 5 mL lalu ditambahkan dengan 0,005 mL DMSO murni. Larutan tersebut kemudian ditambahkan buffer posfat pH 6,9 sampai tanda batas. Larutan sampel dibuat dengan deret konsentrasi (25-400 mg/L) (Wahyudi et al., 2022).

d. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim alfa-amilase

Ekstrak sambiloto, Kuersetin dan Kombinasi Ekstrak Sambiloto/Kuersetin tiap perbandingan masing-masing sebanyak 0,5 mL ditambahkan larutan enzim alfa-amilase dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Larutan tersebut kemudian ditambahkan larutan amilum 1% sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian ditambahkan reagen DNS sebanyak 1,5 mL lalu dihomogenkan. Tabung reaksi tersebut dimasukkan ke dalam penangas dan dipanaskan selama 10 menit lalu didinginkan di dalam penangas es. Absorbansi tiap larutan diukur pada panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Perlakuan yang sama terhadap larutan blanko (tanpa penambahan enzim alfa-amilase), kontrol negatif (tanpa zat penghambat), dan kontrol positif akarbosa (Wahyudi et al., 2022). Perhitungan persen penghambatan enzim alfa amilase dihitung menggunakan persamaan(1).

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{\text{Absorbansi (Kontrol)} - \text{Absorbansi (Sampel)}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\% \quad (2)$$

Nilai IC_{50} dihitung sebagai besarnya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim alfa-amilase dengan menggunakan persamaan regresi linear ($y = ax + b$) dengan konsentrasi sampel sebagai x dan nilai % penghambatan sebagai y . Penentuan nilai IC_{50} dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (2) sebagai berikut (Wulandari et al., 2020).

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad (3)$$

Keterangan: IC_{50} = *Inhibition Concentration* 50%; a = *slope*; b = *Intercept*

2.4.8 Penentuan Indeks Kombinasi Ekstrak Sambiloto/Kuersetin

Analisis efek sinergis antara kuersetin dan ekstrak etanol sambiloto dilakukan menggunakan metode *Response Additivity* dengan pendekatan *Combination Index* (CI). Prinsip metode ini adalah membandingkan nilai hasil kombinasi aktual dengan nilai hasil yang diharapkan (*expected output*) dari kedua senyawa. Interpretasi nilai CI ditentukan berdasarkan kriteria: $CI < 1$ menunjukkan efek sinergis, $CI = 1$ menunjukkan efek aditif, dan $CI > 1$ menunjukkan efek antagonis (Duarte dan Vale, 2022).

$$LC_{50} \text{ expected} = E_A - E_B \quad (4)$$

$$CI_{\text{toksisitas}} = \frac{E_A - E_B}{E_{AB}} \quad (5)$$

Keterangan:

E_A = LC_{50} Kuersetin

E_B = LC_{50} Ekstrak Sambiloto

$$IC_{50} \text{ expected} = E_A - E_B \quad (6)$$

$$CI_{\text{antidiabetes}} = \frac{1}{\frac{E_A - E_B}{E_{AB}}} \quad (7)$$

Keterangan:

E_A = IC_{50} Ekstrak Sambiloto

E_B = IC_{50} Kuersetin