

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan kumpulan penyakit metabolik dengan ciri keadaan kadar gula dalam darah yang tinggi (hiperglikemia) yang dikaitkan dengan ketidaknormalan sekresi insulin ataupun fungsi insulin. Keadaan hiperglikemia selalu berkaitan dengan terjadinya kerusakan atau tidak berfungsinya organ-organ tubuh dalam kurun waktu yang lama seperti mata, jantung, ginjal, pembuluh darah serta saraf. Diabetes melitus menjadi salah satu masalah penyakit terbesar di dunia. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan lebih dari 346 juta orang di seluruh dunia mengidap diabetes. Menurut *International Diabetes Federation* (IDF), sebanyak 537 juta orang dewasa dan 1 dari 10 orang di seluruh dunia mengidap diabetes. China, India, Pakistan, Amerika Serikat, dan Indonesia berada di peringkat 5 besar sebagai negara dengan jumlah populasi penderita diabetes melitus tertinggi di seluruh dunia (Hartono dan Ediyono, 2024). Diabetes Melitus menjadi masalah umum kesehatan masyarakat dimana terjadi peningkatan terus-menerus baik di dunia, di negara maju ataupun negara berkembang.

Tipe yang paling umum ditemui di masyarakat yaitu sekitar 80% dari semua kasus DM merupakan DMT2 yang sebagian besar ditandai dengan adanya kondisi hiperglikemia, resistensi insulin dan defisiensi relatif insulin. Diabetes melitus tipe ini umumnya terjadi pada orang dewasa, namun dalam dua tahun terakhir juga ditemukan pada anak usia 12–16 tahun, dengan kasus lebih banyak pada perempuan daripada laki-laki. Kadar gula darah yang tinggi pada diabetes dapat merusak lapisan dalam pembuluh darah (endotel) yang terjadi karena glukosa mengalami proses oksidasi yang membentuk radikal bebas, sehingga menyebabkan gangguan pada pembuluh darah besar maupun kecil. Kerusakan inilah yang kemudian memicu berbagai komplikasi dan meningkatkan angka kesakitan (morbiditas) serta kematian (mortalitas) pada penderita diabetes. Metabolisme glukosa merupakan pusat dari fungsi fisiologis normal pada orang sehat. Peningkatan glukosa intraseluler menyebabkan peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang melebihi kemampuan antioksidan sel untuk menetralkan senyawa tersebut (Suryadinata et al., 2021).

Sel-sel manusia juga secara rutin menghasilkan radikal bebas dan ROS sebagai bagian dari proses metabolisme. Radikal bebas di dalam tubuh manusia terbentuk dari produk metabolisme sel yang normal, tetapi juga dapat dihasilkan akibat



asap kendaraan, asap rokok, dan sumber lainnya. Radikal reaktif yang tinggi dan cenderung tidak stabil, yang dapat merusak struktur sel. Kelebihan radikal bebas yang melebihi kapasitas sistem antioksidan tubuh menyebabkan stres oksidatif yang mengganggu resistensi insulin pada penderita diabetes, sehingga untuk dapat mengelola radikal bebas diperlukan antioksidan. Antioksidan adalah suatu zat yang berada di dalam tubuh manusia secara alami, yang dapat

mendonorkan atom hidrogen kepada radikal bebas, sehingga menghentikan reaksi berantai dan mengubah radikal bebas menjadi bentuk yang stabil. Pemberian antioksidan merupakan usaha menghambat produksi radikal bebas intraseluler atau meningkatkan kemampuan enzim pertahanan terhadap radikal. Molekul dalam sistem non-enzimatik bekerja melalui berbagai mekanisme, seperti menghambat enzim, mengikat elemen yang berkontribusi pada produksi radikal bebas, menyerap spesies reaktif, serta mengaktifkan atau meningkatkan pertahanan melalui mekanisme antioksidan lainnya (Chaves et al., 2020).

Penanganan DMT2 dapat dilakukan melalui terapi non farmakologi, seperti perubahan gaya hidup, dan terapi farmakologi dengan obat antidiabetik oral. Salah satu obat yang sering digunakan adalah akarbosa, yang bekerja menghambat enzim α -amilase di usus halus sehingga memperlambat pemecahan dan penyerapan karbohidrat sehingga membantu menurunkan kadar gula darah, namun penggunaan akarbosa jangka panjang dapat menimbulkan efek samping seperti perut kembung, malabsorpsi, nyeri abdomen, dan diare. Oleh karena itu, terapi berbahan alam (herbal) semakin dipertimbangkan sebagai alternatif yang lebih aman dengan minimalnya efek samping yang diberikan.

Indonesia adalah negara tropis yang memiliki kekayaan flora atau tumbuhan yang melimpah dan berdasarkan pengalaman dan pengamatan, beberapa dari tumbuhan tersebut dapat dimanfaatkan untuk pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit. Formula herbal yang beragam telah terbukti efektif dalam meredakan berbagai keluhan, mulai dari depresi ringan hingga gejala flu. *World Health Organization* sendiri telah membuat standar khusus untuk menilai keamanan, efektifitas, dan mutu dari pengobatan herbal dan diperkirakan sekitar 80% populasi dunia menjadikan ramuan herbal sebagai pilihan utama dalam menjaga kesehatan. Produk-produk herbal semakin populer karena khasiatnya sebagai agen anti-miroba, pencegah kehamilan, anti-diabetes, anti-reumatik, anti-penuaan, anti-depresan, penenang, pereda kejang, anti-kecemasan, anti-inflamasi, pereda nyeri, pelebar pembuluh darah, anti-HIV, pelindung hati, serta dalam pengobatan sirosis, jerawat, asma, menopause, impotensi, batu empedu, migrain, penyakit Alzheimer, kelelahan kronis, dan peningkatan daya ingat (Saggar et al., 2022).

Tanaman obat tersebut diketahui merupakan sumber yang kaya akan senyawa fitonutrien yang disintesis oleh tanaman itu sendiri. Zat bioaktif ini berperan penting dalam memberikan sifat antioksidan pada tanaman dan memiliki nilai pengobatan. Polifenol adalah senyawa kimia yang dihasilkan selama metabolisme sekunder pada tumbuhan, dan cenderung terkumpul di organ-organ tertentu seperti daun, buah, akar, batang dan sebagai kelompok besar senyawa bioaktif, polifenol memiliki



gis. Flavonoid yang merupakan senyawa fenolik, tersebar luas berpembuluh. Flavonoid dianggap sebagai suplemen makanan gi kesehatan dan pencegahan penyakit. Flavonoid saat ini penting dalam berbagai aplikasi, seperti nutrasetikal, farmasi, ik, dan lain-lain (Karak, 2020). Radikal bebas sering kali h, tetapi flavonoid dapat mencegah kerusakan ini dengan cara bebas secara langsung. Kebanyakan flavonoid memiliki gugus

hidroksil yang mampu menstabilkan atau menonaktifkan oksigen reaktif, sehingga menghilangkan efek berbahayanya. Flavonoid juga dapat menetralkan superoksida secara langsung, serta radikal turunan oksigen yang sangat reaktif yang disebut peroksininitrit. Diabetes melitus adalah penyakit kronis yang terjadi ketika tubuh kekurangan insulin, sehingga sel-sel tubuh kesulitan mendapatkan glukosa sebagai sumber energi. Jenis flavonoid salah satunya yaitu epikatekin memiliki kemampuan meniru fungsi insulin. Epikatekin bekerja dengan mengaktifkan reseptor insulin, sehingga membantu mengurangi dampak buruk diabetes. Ekstrak yang kaya akan tanin juga dapat menghambat enzim α -amilase (Patil dan Murumkar, 2024). Beberapa contoh tanaman yang sering dimanfaatkan secara turun temurun sebagai obat antidiabetes yaitu tanaman buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan biji kelor (*Moringa oleifera*), dimana kedua tanaman obat tersebut diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenolik, quercetin, dan asam klorogenat yang diketahui memiliki aktivitas penangkap radikal bebas yang kuat. Kandungan antioksidan yang tinggi ini membantu mengurangi stres oksidatif yang memicu kerusakan sel β pankreas dan resistensi insulin.

Dising dan Pasau (2022) dalam penelitiannya menyimpulkan ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, tanin, saponin dan flavonoid, yang kemudian diperkuat melalui penelitian Aljazzaf et al. (2023) yang membuktikan bahwa ekstrak biji kelor menunjukkan efek penurunan kadar glukosa pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan. Hasil ini menegaskan sifat antihiperglikemik biji kelor yang sebelumnya telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Tanaman obat herbal ini juga dapat memulihkan metabolisme glukosa normal di hati dan dapat mengurangi stres oksidatif. Gu et al. (2020) juga telah membuktikan dalam penelitiannya bahwa ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol menunjukkan tingkat penghambatan enzim α -glukosidase yang lebih tinggi dibandingkan akar bosa.

Penelitian yang dilakukan Nasution et al. (2022) untuk mahkota dewa membuktikan bahwa hanya buah mahkota dewa yang mengandung senyawa fenol, flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid dan tanin, sedangkan pada akar, batang, daun dan biji mahkota dewa mengandung senyawa fenol, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan tidak mengandung saponin, yang diperkuat penelitian Yuliana et al. (2020) membuktikan bahwa ekstrak etanol daging buah mahkota dewa mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Sakina (2022) memperkuat penemuan tersebut dengan menyimpulkan bahwa perbedaan rata-rata kadar gula darah responden sebelum diberikan seduhan rebusan mahkota dewa adalah 302,55 mg/dL sedangkan rata-rata kadar gula darah responden setelah diberikan seduhan rebusan mahkota dewa yaitu 268,83 mg/dL, berarti ada kadar gula darah penderita DM sebesar 11,15% sebelum dan sesudah pemberian seduhan rebusan mahkota dewa.



an tersebut, penggunaan ekstrak biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan mengombinasikan kedua ekstrak tersebut ke dalam formulasi yang belum banyak diteliti sebelumnya, di mana diharapkan memberikan efek sinergis dan saling melengkapi dari senyawa bioaktif tersebut sebagai terapi baru dalam meningkatkan aktivitas

antioksidan untuk menetralkan radikal bebas, serta penghambatan enzim α -amilase sehingga berpotensi menghasilkan agen antidiabetes yang lebih efektif dibandingkan penggunaan ekstrak tunggal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah adalah sebagai berikut:

1. bagaimana profil senyawa metabolit yang terkandung pada ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) melalui uji fitokimia, analisis FTIR dan GC-MS?
2. bagaimana aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) serta kombinasi kedua ekstrak?
3. bagaimana aktivitas antidiabetes dari ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) serta kombinasi kedua ekstrak secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. menganalisis senyawa metabolit yang terdapat pada ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) melalui uji fitokimia, analisis FTIR dan GC-MS
2. menguji aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) serta kombinasi kedua ekstrak tersebut
3. menguji aktivitas antidiabetes dari ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) serta kombinasi kedua ekstrak tersebut secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang penemuan senyawa bioaktif dan sebagai sumber informasi mengenai inovasi dan pengembangan *herbal medicine* berbasis bahan alam, memberikan informasi tentang pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi mengenai potensi kombinasi ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan biji kelor (*Moringa oleifera*) sebagai antioksidan untuk menetralkan radikal bebas, serta mampu menghambat enzim α -amilase yang dapat berperan dalam antidiabetes.

1.5 Tinjauan Pustaka

1.5.1 Diabetes Melitus

Klasifikasi diabetes menurut *American Diabetes Association* 2018 dibagi dalam 4 melitus tipe 1, diabetes melitus tipe 2, diabetes melitus betes melitus spesifik lain.

tipe I (DMT1), biasanya terjadi pada anak-anak dan remaja *juvenile diabetes* yang artinya diabetes pada rentang usia ternyata DMT1 ini juga dapat terjadi pada orang dewasa maka nakai istilah diabetes tipe 1. Penderita DMT1 bergantung pada



pemberian insulin dari luar dengan cara disuntikkan oleh karena itu istilah yang dipakai di masa lalu adalah *Insulin Dependent Diabetes Melitus* (IDDM). Apabila insulin tidak segera diberikan, penderita dapat tidak sadarkan diri disebut juga koma ketoasidosis/koma diabetik. Jumlah kejadiannya hanya 1-10% dari semua diabetes. Faktor penyebab DMT1 adalah infeksi virus atau reaksi auto-imun (kerusakan sistem kekebalan tubuh) sehingga merusak sel-sel yang menghasilkan insulin, yaitu sel- β yang terdapat di pancreas sehingga membuat pancreas sama sekali tidak dapat menghasilkan insulin.

Diabetes melitus tipe II (DMT2), yang juga dikenal sebagai diabetes melitus resistan ketosis, terjadi ketika tubuh mengalami gangguan dalam menghasilkan hormon yang menurunkan kadar gula darah (disebut agen hipoglikemik) akibat adanya resistensi. Orang dengan diabetes tipe tersebut tidak merespons dengan baik terhadap obat-obatan penurun gula darah. Komplikasi jangka panjang yang memengaruhi pembuluh darah, ginjal, mata, dan saraf dapat terjadi pada kedua jenis diabetes dan menjadi penyebab utama penyakit serius dan kematian akibat diabetes. Faktor yang dapat menyebabkan DMT2, termasuk obesitas, gaya hidup kurang aktif, usia yang semakin bertambah, serta faktor genetik (Kumar et al., 2020).

Diabetes melitus gestasional, terjadi selama masa kehamilan. Kadar gula darah yang tinggi selama kehamilan dapat meningkatkan risiko masalah kesehatan bagi ibu, bayi dalam kandungan, dan bayi yang baru lahir. Risiko ini tetap ada, baik jika kadar gula darah tinggi tersebut sudah ada sebelum kehamilan atau baru muncul selama kehamilan. Bayi yang lahir dari ibu yang mengalami diabetes gestasional memiliki risiko lebih tinggi untuk terkena diabetes di kemudian hari. Komplikasi kehamilan seperti kelahiran prematur, bayi yang terlalu besar untuk usia kehamilan, berat badan bayi lahir yang berlebihan (di atas 4,5 kg), operasi caesar, dan preeklampsia lebih sering terjadi karena kadar gula darah yang tinggi selama kehamilan.

Diabetes melitus spesifik lain, terjadi akibat penyakit gangguan metabolik yang ditandai oleh kenaikan kadar glukosa darah akibat faktor genetik, penyakit pada pankreas, gangguan hormonal, penyakit lain atau pengaruh obat seperti glukokortikoid, pengobatan HIV/AIDS, atau antipsikotik atipikal (Antar et al., 2023).

1.5.2 Kelor

Kelor (*Moringa oleifera* L.) merupakan tanaman yang dapat mencapai ketinggian sekitar 7-11 meter. Pohon Kelor memiliki tajuk yang menyebar dengan cabang-cabang. Daunnya bersusun majemuk tripinatus yang tersusun berseling. Kelor dapat tumbuh di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia dengan suhu sekitar 25-35°C.



tanah berpasir atau lempung dengan pH yang sedikit asam serta curah hujan sekitar 250–3000 mm untuk mendukung ara optimal. Biji kelor akan berkecambah dalam waktu sekitar emai dan dapat ditanam pada kedalaman sekitar 2 cm di dalam aman kelor adalah sebagai berikut:

Plantae

Tracheobionta

Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dilleniidae
Ordo	: Capparales
Famili	: Moringaceae
Genus	: <i>Moringa</i>
Spesies	: <i>Moringa oleifera</i> L.

Tanaman kelor di Indonesia dimanfaatkan sebagai tanaman pagar dan pemanfaatannya belum optimal. Secara ilmiah, semua bagian dari tanaman kelor dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk produk yang bermanfaat. Salah satu bagian yang dapat dimanfaatkan adalah bijinya. Biji kelor mengandung minyak nabati tinggi dan memiliki berbagai manfaat, terutama untuk kesehatan. Biji kelor dapat digunakan sebagai obat penurun kolesterol, mengurangi risiko penyakit jantung koroner, sebagai bahan tambahan dalam kosmetik, maupun sebagai obat diabetes (Minakshi et al., 2021).

1.5.3 Mahkota Dewa

Tanaman mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) secara ilmiah berasal dari Pulau Papua, Indonesia, dan tumbuh di daerah beriklim tropis. Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan tanaman perdu, habitatnya adalah daerah dengan ketinggian 10 – 1200 meter dari permukaan laut. Tumbuhan mahkota dewa dapat mencapai 5 meter, serta umurnya produktif berkisar antara 10-20 tahun (Kalusalingam et al., 2024). Taksonomi buah mahkota dewa adalah sebagai berikut:

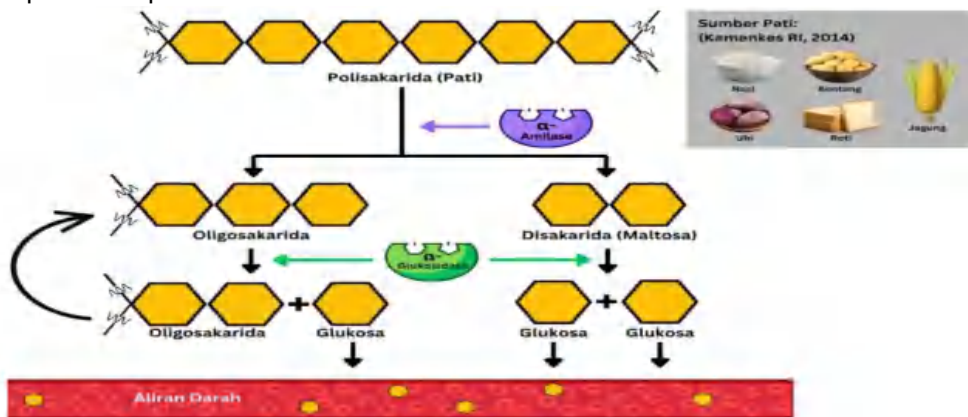
Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Myrtales
Famili	: Thymelaeaceae
Genus	: <i>Phaleria</i>
Spesies	: <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff) Boerl.

Secara kualitatif, mahkota dewa mengandung beberapa zat aktif seperti, alkaloid yang bersifat detoksifikasi sehingga dapat menetralkan racun didalam tubuh; saponin sebagai antibakteri dan virus, mengurangi kadar gula darah, dan nyalan darah; flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan; dan antihistamin (Ahmad et al., 2023).



se

Enzim α -amilase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosida secara acak di dalam molekul, baik pada amilosa maupun amilopektin, dan menghasilkan glukosa sebagai produk akhirnya. Kelompok enzim ini memiliki banyak variasi dalam aktivitasnya, sangat spesifik, tergantung pada tempatnya bekerja. Seiring dengan penemuan-penemuan baru mengenai enzim amilase, kelompok dari amilase semakin bertambah. Beberapa kelompok dari enzim amilase adalah α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase. Enzim α -amilase juga dikenal sebagai *α -retaining double displacement*. Enzim ini dibagi menjadi dua kategori: termostabil (tahan panas) dan termolabil (tidak tahan panas). α -amilase termostabil dapat diperoleh dari *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, dan *Bacillus amyloliquefaciens*, sedangkan α -amilase termolabil dihasilkan dari jamur seperti *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger*. Proses hidrolisis pati oleh enzim α -amilase dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Skema hidrolisis pati dengan α -amilase (Maulana et al., 2024)

Enzim α -amilase yang dimodifikasi dapat berfungsi pada suhu hingga 105-110°C dengan kisaran pH 5,1-5,6 selama 60-180 menit. Aktivitas enzim ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk pH dan suhu. Kondisi optimum untuk α -amilase adalah pada suhu 90-105°C dengan pH 5,6-6,0. Suhu yang terlalu tinggi dari kondisi optimum dapat mengganggu dan merusak struktur dan aktivitas enzim, sementara suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan gelatinisasi pati tidak sempurna. Proses hidrolisis pati oleh enzim α -amilase dapat menghasilkan gula reduksi dalam jumlah yang tinggi yang berpotensi meningkatkan risiko terjadinya penyakit diabetes mellitus. Obat yang memiliki aktivitas penghambatan α -amilase berfungsi menghambat pencernaan karbohidrat kompleks (amilum) menjadi glukosa, sehingga mengurangi peningkatan kadar glukosa setelah makan pada penderita diabetes



penghambatan enzim α -amilase terjadi ketika suatu senyawa sebagai inhibitor non kompetitif, memungkinkan substrat untuk si ikatan yang berbeda, sehingga enzim α -amilase tidak dapat imal (Melinda et al., 2023).

tian

Berdasarkan rumusa masalah, hipotesis penelitian adalah sebagai berikut:

1. profil senyawa metabolit dari ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat diketahui melalui uji fitokimia, analisis FTIR dan GC-MS
2. aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) serta kombinasi kedua ekstrak dapat dianalisis
3. aktivitas antidiabetes dari kombinasi ekstrak etanol biji kelor (*Moringa oleifera*) dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) serta kombinasi kedua ekstrak dapat dianalisis secara *in vitro*.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel berupa buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan biji kelor (*Moringa oleifera*), etanol 96%, serbuk Mg (Merck), HCl 37% (Merck), FeCl₃ (Merck), H₂SO₄ (Merck), pereaksi Dragendorff, KH₂PO₄ (Merck), K₂HPO₄ (Merck), tablet akarbosa (Generic), reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (Sigma), amilum (Merck), ekstrak kasar enzim α -amilase, K-Na tartrat (Merck), NaOH (Merck), asam askorbat (Merck), reagen 2,2 Azinobis (3-Etilbenzotiazolin)-6-Asam Sulfonat (ABTS) (Sigma), kalium persulfat (Sigma), metanol p.a (Merck), etanol p.a (Merck), kuersetin (Sigma), AlCl₃ (Merck), kalium asetat (Merck), asam galat (Merck), pereaksi Folin-Ciocalteu, Na₂CO₃ (Merck), akuades dan kertas saring *whatman* no. 42.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium, ayakan 80 *mesh*, oven, blender, *vortex*, neraca analitik (*ohaus*), wadah maserasi, cawan petridis, mikropipet (1000 μ L), *rotary evaporator*, *autoclave* (Model 8000 *DNE Napco*), inkubator, *hotplate magnetic stirrer*, seperangkat penyaring *Buchner*, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu, GC-MS *Thermo Scientific* ISQ 7000, dan FTIR *spectrometers* Shimadzu.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – September 2025. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang dan Laboratorium Riset Universitas Islam Negeri Makassar.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Ekstraksi Biji Kelor (EBK) (Sutrisna et al., 2020)

Sampel biji kelor dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dihaluskan lalu diayak menggunakan ayakan 80 *mesh*. Serbuk biji kelor ditimbang sebanyak 200 g lalu dimasukkan kedalam bejana untuk proses maserasi menggunakan 2 liter pelarut etanol 96% (1:10). Sampel direndam dan dibiarkan hingga tersari sempurna di ruangan dengan suhu kamar/tidak terkena matahari langsung selama $\pm$ 24 jam dan diaduk menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 78°C hingga diperoleh ekstrak kental. Sampel biji kelor terlampir pada Lampiran 2. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan menggunakan rumus:



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

2.4.2 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa (EMD) (Sutrisna et al., 2020)

Sampel buah mahkota dewa dicuci bersih, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan, lalu dihaluskan. Serbuk buah mahkota dewa ditimbang sebanyak 200 g lalu dimasukkan kedalam bejana untuk dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan 2 liter pelarut etanol 96% (1:10). Sampel direndam dan dibiarkan hingga tersari sempurna di ruangan dengan suhu kamar/tidak terkena matahari langsung selama $\pm$ 24 jam dan diaduk menggunakan spatula. Ekstrak disaring menggunakan *vacuum Buchner* untuk memperoleh filtrat pertama dan simplisia. Simplisia kemudian diekstrak kembali menggunakan pelarut etanol 96% dan didiamkan sambil sesekali diaduk. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam. Langkah selanjutnya dilakukan evaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 78°C hingga diperoleh ekstrak kental. Bagan kerja ekstraksi sampel buah mahkota dewa terlampir pada Lampiran 2. Kemudian dilakukan perhitungan rendemen ekstrak dengan menggunakan rumus (1).

2.4.3 Skrinning Fitokimia

2.4.3.1 Alkaloid (Firmansyah dan La, 2022)

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan beberapa tetes HCl 1%, setelah larut kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi *Mayer* kemudian dihomogenkan. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau larutan yang berubah menjadi keruh. Bagan kerja uji alkaloid terlampir pada lampiran 2.

2.4.3.2 Flavonoid (Firmansyah dan La, 2022)

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan dengan 100 mL akuades panas, kemudian dididihkan selama 5 menit, dan selanjutnya disaring. Filtrat diukur sebanyak 5 mL kemudian ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, selanjutnya dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan larutan menjadi warna merah, kuning atau jingga. Bagan kerja uji flavanoid terlampir pada lampiran 2.

2.4.3.3 Saponin (Firmansyah dan La, 2022)

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan dengan 10 mL akuades, kemudian dikocok selama 1 menit, selanjutnya ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Bila busa yang terbentuk tetap stabil $\pm$ 7 menit, maka ekstrak menunjukkan hasil positif mengandung saponin. Bagan kerja uji saponin terlampir pada lampiran 2.

2.4.3.4 Terpenoid (Firmansyah dan La, 2022)



Ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan menggunakan akuades ekstrak yang sudah larut diambil sebanyak 2 mL lalu ditambahkan pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan merah atau ungu. Bagan kerja uji terpenoid terlampir pada lampiran

2.4.3.5 Tanin (Firmansyah dan La, 2022)

Sebanyak 40 mg ekstrak di larutkan dengan 4 mL akuades, selanjutnya ekstrak yang sudah larut diambil sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan 1 mL FeCl_3 10% dan dihomogenkan. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan. . Bagan kerja uji tanin terlampir pada lampiran 2.

2.4.4 Uji FTIR (Auha dan Alauhdin, 2021)

Analisis spektrum FTIR dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FTIR) SHIMADZU. Pengujian ini dilakukan dengan cara membuat pelat KBr dengan menggerus sampel ekstrak etanol biji kelor dan buah mahkota dewa yang telah dikeringkan dalam oven bersama dengan KBr dengan perbandingan 1:10 lalu dimasukkan kedalam cetakan KBr. Pelet dimasukkan kedalam *compartment* sampel pada alat FTIR kemudian dianalisis dan diamati spektrum yang terbentuk antara bilangan gelombang dan transmittan hingga dapat diketahui gugus fungsi yang terdapat dalam sampel. Bagan kerja analisis FTIR terlampir pada Lampiran 2.

2.4.5 Uji GC-MS (Ayu et al., 2024)

Analisis komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak biji kelor dan buah mahkota dewa dilakukan dengan *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS) merk *Thermo Scientific* ISQ 7000 dengan cara menginjeksi sebanyak 2 μL sampel ekstrak etanol biji kelor dan buah mahkota dewa dan senyawa diidentifikasi menggunakan detektor MS. Pengujian ini menghasilkan kromatogram dan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol buah mahkota dewa dan biji kelor. Bagan kerja analisis GC-MS terlampir pada Lampiran 2.

2.4.6 Penentuan Kadar Total Flavonoid

2.4.6.1 Pembuatan Larutan Standar Kuersetin (Wibowo et al., 2020)

Kuersetin ditimbang sebanyak 0,0001 g dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 10 ppm. Larutan tersebut dipipet sebanyak 0,025; 0,1; 0,2; 0,3 dan 0,4 mL lalu dicukupkan volumenya dengan etanol p.a hingga 5 mL sehingga diperoleh konsentrasi 0,05; 0,2; 0,4; 0,6 dan 0,8 ppm. Larutan tersebut ditambahkan 3 mL etanol p.a, 0,2 mL AlCl_3 10%, 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan dicukupkan dengan akuades hingga volume 10 mL. Larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (443 nm). Bagan kerja pengukuran larutan standar kuersetin terlampir pada Lampiran 2.



Kadar Total Flavonoid Buah Mahkota Dewa dan Biji wo et al., 2020)

ekstrak EBK masing-masing ditimbang sebanyak 0,001 g lalu mL etanol p.a. Larutan sampel tersebut masing-masing dipipet tambahkan 3 mL etanol p.a, 0,2 mL AlCl_3 10%, 0,2 mL kalium asetat

1 M, dan dicukupkan dengan akuades hingga volume 10 mL. Larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (443 nm). Sampel diuji secara triplo untuk setiap analisis. Bagan kerja penetapan kadar flavanoid ekstrak buah mahkota dewa dan biji kelor terlampir pada Lampiran 2. Kadar flavonoid dihitung dengan menggunakan persamaan (2).

$$F = \frac{C \times V \cdot fp}{m} \quad (2)$$

Keterangan:

F : Flavonoid total (mg QE/g ekstrak)

C : Konsentrasi kuesetin (mg/L)

V : Volume ekstrak (L)

m : Berat ekstrak (g)

fp : Faktor pengenceran

2.4.7 Penentuan Kadar Total Fenolik

2.4.7.1 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat (Lenny et al., 2025)

Asam galat ditimbang sebanyak 0,0001 g dan dilarutkan dalam etanol p.a hingga volume 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 10 ppm. Larutan tersebut dipipet sebanyak 0,05; 0,2; 0,4; 0,6 dan 0,8 mL lalu dicukupkan dengan etanol p.a hingga volume 5 mL sehingga diperoleh konsentrasi 0,1; 0,4; 0,8; 1,2 dan 1,6 ppm. Larutan tersebut kemudian masing-masing ditambahkan dengan 0,4 mL pereaksi Folin-Ciocalteu, dikocok dan didiamkan selama 4-8 menit, lalu ditambahkan 3 mL Na₂CO₃ 7% kemudian ditambahkan akuades hingga volume 10 mL. Larutan tersebut didiamkan selama 2 jam pada suhu ruangan. Diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum (758 nm). Bagan kerja pengukuran larutan standar asam galat terlampir pada Lampiran 2.

2.4.7.2 Penetapan kadar Total Fenolik Buah Mahkota Dewa dan Biji Kelor (Lenny et al., 2025)

Ekstrak EMD dan ekstrak EBK masing-masing ditimbang sebanyak 0,001 g dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Larutan sampel tersebut masing-masing dipipet sebanyak 5 mL kemudian ditambahkan pereaksi Folin-Ciocalteu sebanyak 0,4 mL, lalu dikocok dan didiamkan selama 4-8 menit. Larutan tersebut kemudian ditambahkan 3 mL Na₂CO₃ 7% dan dikocok hingga homogen lalu dicukupkan volumenya hingga 10 mL dengan akuades. Campuran didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (758 nm). Sampel diuji secara triplo. Bagan kerja penetapan kadar fenolik total terlampir pada Lampiran 2. Penentuan kadar total fenolik dihitung dengan persamaan (3).



$$F = \frac{C \times V \cdot fp}{m} \quad (3)$$

Keterangan:

F : Fenolik total (mg GAE/g ekstrak)

C : Konsentrasi asam galat (mg/L)

V : Volume ekstrak (L)

m : Berat ekstrak (g)

fp : Faktor pengenceran

2.4.8 Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Reagen ABTS

2.4.8.1 Pembuatan Larutan ABTS (Sami et al., 2020)

Serbuk ABTS sebanyak 7,1 mg dan kalium persulfat ($K_2S_2O_8$) sebanyak 3,5 mg masing-masing dilarutkan dalam 5 mL akuades. Kedua larutan tersebut dicampurkan dalam labu ukur 25 mL. larutan diinkubasi selama 12 jam dalam ruangan gelap kemudian dihipitkan sampai tanda batas dengan metanol p.a. Bagan kerja pembuatan larutan ABTS terlampir pada Lampiran 2.

2.4.8.2 Pembuatan Larutan Pembanding Asam Askorbat (Vitamin C) (Sakka dan Muin, 2022)

Asam askorbat (Vitamin C) ditimbang sebanyak 0,5 mg dan dilarutkan dengan metanol p.a kemudian volume akhir dicukupkan hingga 50 mL dalam labu ukur, sehingga diperoleh konsentrasi larutan baku pembanding asam askorbat 10 ppm. Larutan tersebut dipipet masing-masing 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 dan 1,6 mL kemudian dihipitkan dengan metanol p.a sampai tanda batas sehingga dihasilkan larutan dengan masing-masing konsentrasi 0,5; 1; 2; 4 dan 8 ppm. Bagan kerja pembuatan larutan pembanding asam askorbat terlampir pada Lampiran 2.

2.4.8.3 Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (EMD) dan Biji Kelor (EBK) (Sakka dan Muin, 2022)

Ekstrak EMD dan EBK masing-masing ditimbang sebanyak 25 mg dan dilarutkan dengan metanol p.a kemudian volume akhir dicukupkan hingga 50 mL dalam labu ukur, sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 500 ppm. Larutan tersebut dipipet masing-masing 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 dan 0,64 mL kemudian dihipitkan dengan metanol p.a sampai tanda batas sehingga dihasilkan larutan sampel dengan masing-masing konsentrasi 10; 20; 40; 80 dan 160 ppm. Bagan kerja penyiapan larutan ekstrak sampel terlampir pada Lampiran 2.

2.4.8.4 Pembuatan Larutan Sampel Kombinasi Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (EMD) dan Biji Kelor (EBK) (Sakka dan Muin, 2022)



Optimized using
trial version
www.balesio.com

ekstrak EBK masing-masing ditimbang sebanyak 25 mg dan etanol p.a kemudian volume akhir dicukupkan hingga 50 mL dalam labu ukur, sehingga diperoleh larutan sampel dengan masing-masing konsentrasi 500 ppm. Larutan tersebut dipipet masing-masing dengan perbandingan EBK : EMD yaitu 3 : 0,16; (0,16 : 0,08)mL; (0,08 : 0,32) mL dan (0,32 : 0,08) mL kemudian dihipitkan dengan metanol p.a sampai tanda batas sehingga dihasilkan larutan sampel dengan masing-masing konsentrasi perbandingan EBK : EMD yaitu 1:1 (20 : 20)

ppm; 1:2 (20 : 40) ppm; 2:1 (40 : 20) ppm; 1:4 (20 : 80) ppm dan 4:1 (80: 20) ppm. Bagan kerja penyiapan larutan kombinasi ekstrak sampel terlampir pada Lampiran 2.

2.4.8.5 Penetapan Aktivitas Antioksidan dengan Reagen ABTS (Sami et al., 2020)

Larutan pembanding asam askorbat, larutan kontrol negatif (tanpa sampel atau standar), dan larutan sampel (EMD, EBK dan Kombinasi EBK : EMD) dari masing-masing larutan ditambahkan 2 mL larutan ABTS lalu dihomogenkan menggunakan *vortex*. Larutan kemudian diinkubasi pada tempat gelap selama 30 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (740 nm). Bagan kerja penetapan aktivitas abtioksidan terlampir pada Lampiran 2. Persentase pengikat radikal bebas dapat dihitung menggunakan persamaan (4).

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\% \quad (4)$$

Konsentrasi sampel dan persen inhibisinya dibuat dalam kurva absorbansi sampel kemudian diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk mengetahui nilai IC_{50} dari masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang diperoleh adalah nilai IC_{50} .

2.4.9 Penentuan Aktivitas Antidiabetes melalui Inhibisi Enzim α -Amilase

2.4.9.1 Pembuatan Reagen DNS (Wulandari et al.,2021)

Serbuk asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 20 mL larutan NaOH 2 N dan 50 mL akuades dalam labu ukur. Ka-Na tartrat ($KNaC_4H_4O_6$) ditimbang sebanyak 30 g dan ditambahkan ke dalam larutan DNS kemudian diaduk dengan magnetik *stirrer*. Volume akhir dikenakan dengan akuades hingga 100 mL. Bagan kerja pembuatan reagen DNS terlampir pada Lampiran 2.

2.4.9.2 Pembuatan Larutan Standar Akarbosa (Wulandari et al.,2021)

Tablet akarbosa 50 mg digerus dan ditimbang sebanyak 0,005 g lalu dilarutkan dengan sedikit DMSO 1% kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volume akhir dengan dapar fosfat pH 7 sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan induk akarbosa konsentrasi 500 ppm. Dihomogenkan hingga larut sempurna, lalu disaring. Larutan tersebut dipipet masing-masing 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 dan 1 mL dan dicukupkan volume dengan dapar fosfat pH 7 hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan standar akarbosa konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50 dan 100 ppm. Bagan kerja pembuatan larutan standar akarbosa terlampir pada Lampiran 2.



Larutan Sampel Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (EMD) dan K (Wulandari et al.,2021)

3K masing-masing ditimbang sebanyak 0,0005 g dan dilarutkan 1% lalu dicukupkan volume akhir dengan dapar fosfat pH 7 dalam ngga diperoleh larutan EMD konsentrasi 50 ppm. Larutan tersebut ng sebanyak 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 dan 1,25 mL dan dicukupkan

volume dengan dapar fosfat pH 7 sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan EMD konsentrasi 1; 2,5; 5; 7,5 dan 12,5 ppm. Bagan kerja pembuatan larutan sampel ekstrak buah mahkota dewa dan biji kelor terlampir pada Lampiran 2.

2.4.9.4 Pembuatan Larutan Sampel Kombinasi Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (EMD) dan Biji Kelor (EBK) (Wulandari et al.,2021)

Ekstrak EMD dan ekstrak EBK masing-masing ditimbang sebanyak 0,0005 g dan dilarutkan dengan 1 mL DMSO 1% kemudian volume akhir dicukupkan dengan dapar fosfat pH 7 hingga 10 mL dalam labu ukur, sehingga diperoleh larutan sampel dengan masing-masing konsentrasi 50 ppm. Larutan tersebut dipipet masing-masing dengan perbandingan EBK : EMD yaitu (0,5 : 0,5) mL; (0,5 : 0,1) mL; (0,1 : 0,5) mL; (0,5 : 1,5) mL dan (1,5 : 0,5) mL kemudian dihipitkan dengan dapar fosfat pH 7 sampai tanda batas sehingga dihasilkan larutan sampel dengan masing-masing konsentrasi perbandingan EBK : EMD yaitu 1:1 (5 : 5) ppm; 1:2 (5 : 10) ppm; 2:1 (10 : 5) ppm; 1:3 (5 : 15) ppm dan 3:1 (15 : 5) ppm. Bagan kerja pembuatan larutan kombinasi sampel ekstrak buah mahkota dewa dan biji kelor terlampir pada Lampiran 2.

2.4.9.5 Penentuan *Operating Time* Enzim α -Amilase (Wahyudi et al., 2022)

Penentuan *operating time* enzim α -amilase untuk waktu inkubasi dilakukan dengan mengambil 0,5 mL dapar fosfat pH 7 dan ditambah 0,5 mL ekstrak kasar enzim α -amilase kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Larutan tersebut ditambahkan 0,5 mL larutan pati 0,5% dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 0; 5; 10; 15; 20; 25; dan 30 menit kemudian ditambahkan 1,5 mL larutan DNS lalu dipanaskan diatas penangas air. Penentuan *operating time* waktu inkubasi dilakukan dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 514 nm (λ maks). Bagan kerja penentuan OT enzim α -amilase terlampir pada Lampiran 2.

2.4.9.6 Uji Aktivitas Inhibisi Enzim α -Amilase (Kusmiyati et al.,2023)

Uji dilakukan dengan kontrol positif (akarbosa), kontrol negatif (tanpa sampel atau standar), dan larutan sampel (EBK, EMD, kombinasi EBK : EMD) dari masing-masing larutan ditambah 0,5 mL ekstrak kasar enzim α -amilase dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Larutan kemudian ditambahkan 0,5 mL substrat pati 0,5% lalu diinkubasi kembali sesuai *operating time* pada suhu 37°C. Tahap selanjutnya larutan ditambahkan 1,5 mL DNS dan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit di atas *hotplate*. Larutan didinginkan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (514 nm) dengan 3 kali replikasi. Bagan kerja penetapan aktivitas inhibisi enzim α -amilase terlampir pada Lampiran 2. Nilai % inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut:



$$= \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\% \quad (5)$$

ig menggunakan rumus persamaan regresi linear $y=ax+b$, dimana i (x) dengan % inhibisi (y). Perhitungan IC₅₀ dihitung menggunakan

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad (6)$$

