

Studi *In Silico* pada Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Menghambat α -Amylase dan α -Glukosidase sebagai Antidiabetes

Andini Novita Ramadhani¹, Fitri Amelia^{1*} dan Sherly Rahmayani¹

¹Program Studi Kimia, Universitas Negeri Padang, Padang, Indonesia

ABSTRAK

Diabetes melitus (DM) merupakan kelainan metabolisme glukosa yang ditandai dengan gangguan sekresi dan resistensi insulin. Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) dan komplikasinya merupakan penyakit tidak menular dengan angka kematian yang tinggi. Daun *A. muricata* dapat digunakan sebagai antidiabetes tipe 2. Daun sirsak mengandung senyawa aktif berupa senyawa alkaloid, karbohidrat, saponin, protein dan asam amino, fitosteroid, kumarin, quinon, minyak dan lemak, serta fenolik dan flavonoid yang dapat menurunkan kadar glukosa darah. Penelitian ini bertujuan untuk menghambat α -Amylase dan α -Glukosidase. Untuk mengetahui aktivitas penghambatannya, dilakukan molekuler docking menggunakan protein dengan PDB ID : 3BAJ dan PDB ID : 5NN5 yang akan diintegrasikan dengan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak metanol daun sirsak. Senyawa Octadecanoic acid dan Eicosanoic acid mempunyai afinitas pengikatan yang baik terhadap α -amilase. Sedangkan pada α -Glukosidase senyawa yang mempunyai afinitas pengikatan paling baik adalah n-Hexadecanoic acid. Senyawa asam n-Hexadecanoic acid berpotensi untuk dikembangkan sebagai antidiabetes.

Kata kunci: α – Amylase; α – Glukosidase; *Annona muricata*; antidiabetes; docking molekular

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a disorder of glucose metabolism characterized by impaired insulin secretion and resistance. Type 2 diabetes mellitus (DMT2) and its complications are non-communicable diseases with a high mortality rate. The leaves of A. muricata can be used as an antidiabetic type 2. Soursop leaves contain active compounds in the form of alkaloids, carbohydrates, saponins, proteins and amino acids, phytosteroids, coumarins, quinones, oils and fats, as well as phenolics and flavonoids compounds which can lower blood glucose levels. This study aims to inhibit α -Amylase and α -Glucosidase. To determine its inhibitory activity, molecular docking was carried out using proteins with PDB ID : 3BAJ and PDB ID : 5NN5 which interacted with the active compounds contained in the methanol extract of soursop leaves. Octadecanoic acid and Eicosanoic acid compounds have good binding affinity to α -Amylase. Whereas in α -Glucosidase the compound that has the best binding affinity is n-Hexadecanoic acid. The n-Hexadecanoic acid compound has the potential to be developed as an antidiabetic.

Keywords: α – Amylase; α – Glukosidase; antidiabetic; *Annona muricata*; molecular docking

Received: 08-01-2024, Accepted: 20-06-2025, Online: 13-10-2025

PENDAHULUAN

Diabetes merupakan penyakit yang dapat menyebabkan kematian. Pada tahun 2021, organisasi International Diabetes Federation (IDF) memperkirakan terdapat 537 juta orang pada usia 20-79 tahun di dunia menderita diabetes atau setara dengan angka prevalensi sebesar 10,5% dan akan terus meningkat hingga mencapai 643 juta di tahun 2030 dan 783 juta pada tahun 2045 (Magliano et al., 2021). Pada tahun 2021, prevalensi diabetes di Indonesia pada usia 20-79 tahun yaitu sebesar 10,6%. Diabetes adalah kondisi kronis yang terjadi ketika kadar

*Corresponding author:
fitriamelia@fmipa.unp.ac.id

glukosa darah tetap di atas batas normal dalam waktu yang lama. Tingginya kadar glukosa darah terjadi jika pankreas tidak menghasilkan hormon insulin (Diabetes Melitus Tipe 1) atau ketika tubuh tidak dapat menggunakan hormon insulin yang dihasilkannya secara efektif dan mengalami resistensi (Diabetes Melitus Tipe 2) (WHO, 2020), sehingga untuk mengatasi penyakit diabetes ini maka salah satu caranya adalah dengan menghambat penyerapan kadar glukosa darah. Penghambatan penyerapan kadar glukosa darah dapat dilakukan dengan menghambat kerja enzim α -amylase dan α -glukosidase.

Enzim α -amylase dan α -glukosidase merupakan enzim yang bertanggung jawab terhadap katabolisme pati menjadi gula sederhana. Enzim α -amylase menghidrolisis polisakarida menghasilkan oligosakarida dan disakarida di dalam mulut. Oligosakarida dan disakarida dihidrolisis lebih lanjut oleh enzim α -glukosidase menjadi monosakarida di usus halus dan kemudian diserap melalui usus halus ke dalam pembuluh darah (Mugiyanto et al., 2016). Penghambatan α -glukosidase dapat menunda pencernaan dan penyerapan karbohidrat sehingga menekan hiperglikemia setelah makan (postprandial).

Penyakit diabetes melitus karena glukosa darah yang tinggi dapat merusak organ dan jaringan di seluruh tubuh sehingga penyakit ini seringkali memiliki komplikasi dengan penyakit lain. Untuk itu, terapi obat pada pasien diabetes melitus sangat diperlukan (Padhi et al., 2020). Obat antidiabetes merupakan pilihan terapi yang paling banyak digunakan untuk mengurangi kadar glukosa di dalam darah. Beberapa obat yang biasa digunakan yaitu voglibose, acarbose, miglitol, dan metformin (Padhi et al., 2020). Andayani (2009) telah melakukan penelitian pengaruh kombinasi terapi sulfonilurea, metformin, dan acarbose pada pasien diabetes melitus tipe 2. Berdasarkan hasil penelitian penggunaan kombinasi sulfonilurea, metformin, dan acarbose pada pasien sudah tidak bisa mencapai target glikemia yang diharapkan, hal ini bisa disebabkan menurunnya fungsi sel beta-pankreas. Disamping itu, acarbose memberikan efek samping flatulensi dan gejala gastrointestinal serta mual, diare, dan nyeri efek samping dari penggunaan metformin (Andayani et al., 2009). Oleh karena itu, peneliti berusaha untuk mencari alternatif pengobatan melalui tumbuhan herbal. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai antidiabetes adalah daun sirsak (*Annona muricata* Linn).

Annona muricata Linn (sirsak) adalah spesies tumbuhan yang termasuk dalam famili Annonaceae yang banyak ditemukan di daerah tropis dan terkenal dengan berbagai aktivitas biologis. Semua bagian tanaman sirsak memiliki aktivitas farmakologis sebagai obat herbal. Berdasarkan hasil penelitian pada tahun 2019 diketahui bahwa daun sirsak memiliki kandungan senyawa aktif seperti alkaloid, karbohidrat, saponin, protein dan asam amino, fitosteroid, kumarin, quinon, minyak dan lemak, serta fenolik dan flavonoid (Naik & Sellappan, 2019). Justino, AB (2018) telah melakukan pengujian antioksidan dan penghambatan terhadap α -amylase, α -glukosidase, lipase, glikasi non-enzimatik dan peroksidasi lipid pada ekstrak daun sirsak menggunakan beberapa pelarut yang digunakan adalah etanol, fraksi heksana, diklorometana, etil asetat, n-butanol, dan air. Berdasarkan penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa pada fraksi etil asetat dan n-butanol daun sirsak memiliki kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan tertinggi, namun aktivitas penghambatan terhadap α -amylase, α -glukosidase, lipase pankreas, pembentukan produk akhir glikasi dan peroksidasi lipid dan sitotoksitas lebih rendah dibandingkan dengan fraksi lainnya (Justino et al., 2018). Agu (2019) telah melakukan ekstraksi pada daging buah, daun, kulit batang dan kulit akar dari daun sirsak menggunakan pelarut metanol, etil asetat, dan diklorometana. Penelitian ini melakukan pengujian aktivitas penghambatan α -amylase secara in vivo, in vitro dan in silico, sedangkan α -glukosidase secara in vitro dan in silico. Pengujian in silico dilakukan pada senyawa 15-acetyl guanacone hasil isolasi kromatografi kolom dari buah sirsak. Protein yang digunakan pada proses dockingnya yaitu 4GL7. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa buah dan daun sirsak memiliki kemampuan yang sangat tinggi untuk menghambat α -amylase dan α -glukosidase serta senyawa 15-acetyl guanacone menunjukkan afinitas pengikatan yang lebih baik dibandingkan obat standar (Agu et al., 2019). Namun, pada penelitian ini belum dilakukan karakterisasi lebih lanjut untuk mengetahui senyawa aktif yang terdapat pada daun sirsak. Olasehinde (2022) telah melakukan karakterisasi senyawa menggunakan GC-MS pada fraksi metanol daun sirsak dan penghambatan pada enzim α -amylase dan α -glukosidase secara in vitro. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa fraksi metanol daun sirsak memiliki aktivitas

penghambatan pada enzim α -amylase dan α -glukosidase (Olasehinde et al., 2022). Namun, pada penelitian tersebut belum dilakukan studi secara *in silico* terhadap senyawa aktif yang dihasilkan pada karakterisasi GC-MS. Pada penelitian ini dilakukan studi *in silico* pada ekstrak metanol daun sirsak (*A. muricata*) dari hasil karakterisasi GC-MS penelitian sebelumnya. Untuk mengetahui aktivitas penghambatan ekstrak daun sirsak pada α -amylase dan α -glukosidase maka dilakukan molekular docking.

Molekular docking digunakan untuk mempercepat pemilihan senyawa yang akan diisolasi dengan mengidentifikasi dan optimasi suatu senyawa dalam penemuan obat (Kumar, 2022). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat aktivitas penghambatan senyawa aktif yang berasal dari ekstrak metanol daun sirsak terhadap enzim α -amylase dan α -glukosidase serta penentuan sifat ADMET dan analisis fisikokimia.

METODE PENELITIAN

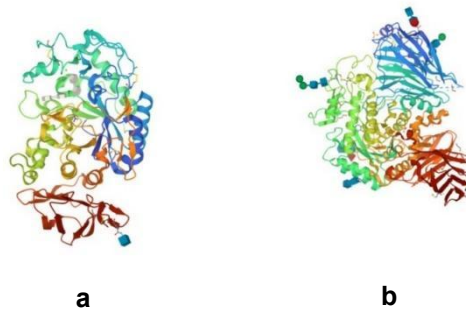
Persiapan Sampel

Senyawa bioaktif (Tabel 1) yang terkandung dalam *Annona muricata* Linn. diperoleh dari penelitian sebelumnya (Olasehinde et al., 2022) dan kontrol positif acarbose. Struktur 3D dan canonical SMILES dari suatu senyawa didapatkan dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (A. Fitri et al., 2021).

Tabel 1. Senyawa Aktif Ekstrak Metanol dari Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Hasil Karakterisasi menggunakan GC-MS (Olasehinde et al., 2022)

No Ligan	Senyawa Aktif	Pengkelompokan Senyawa
1	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	Fenolik
2	Benzene, (ethenyloxy)-	Fenolik
3	2-Methoxy-4-vinylphenol	Fenolik
4	Butylated Hydroxytoluene	Fenolik
5	Quercetin, 5TMS derivative	Flavonoid
6	Hydroxylamine, O-decyl-	Organooxygen
7	Bis(2-Ethylhexyl)phthalate	Asam karboksilat
8	Caryophyllene	Sesquiterpenoids
9	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	Diterpenoids
10	β -Sitosterol	Sterol lipid (steroids)
11	1-Hexadecanol	Fatty alcohols
12	n-Hexadecanoic acid	Asam lemak
13	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	Asam lemak
14	Oleic Acid	Asam lemak
15	Eicosanoic acid	Asam lemak
16	Octadecanoic acid	Asam lemak
17	Hexadecanoic acid, ethyl ester	Asam lemak etil ester
18	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	Asam lemak metil ester
19	5,8,11-Heptadecatrienoic acid, methyl ester	Asam lemak metil ester
20	Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester	Asam lemak metil ester
21	Oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-	Asam lemak metil ester
22	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester	Asam lemak metil ester

Protein yang digunakan pada penelitian ini adalah α -amylase (PDB ID : 3BAJ) dan α -glukosidase (PDB ID : 5NN5) diunduh dari website RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Preparasi ligan dilakukan dengan menggunakan software MOE 2009.10. Protein 3BAJ (α -amylase) dan 5NN5 (α -glukosidase) serta ligan dihilangkan dari molekul air. Parameter lain yang harus dilakukan, yaitu *wash ligan*, *partial charge*, dan *energy minimize* menggunakan perangkat lunak MOE 2009.10 (Amelia et al., 2023).



Gambar 1. (a) Struktur protein 3BAJ (α -amylase) dan (b) 5NN5 (α -glukosidase)

Analisis Fisikokimia

Sifat fisikokimia pada senyawa bioaktif yang terkandung pada *Annona muricata* Linn. diprediksi sesuai dengan *Lipinski's rule of five*, aturan ini memiliki lima parameter indikator yaitu massa molekul < 500 Dalton, $\text{LogP} < 5$, donor ikatan hidrogen (HBD) < 5 , akseptor ikatan hidrogen (HBA) < 10 , dan refraksi molar $40 - 130$. Analisis lipinski ini menggunakan server SCFBio (<http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>). Semua ligan dianalisis lebih lanjut farmakokinetik parameter absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas (ADMET). Prediksi ADMET dilakukan menggunakan web server pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>) dengan cara menginputkan canonical SMILES (Amelia et al., 2023).

Aktivitas Biologis

Aktivitas biologis senyawa bioaktif diprediksi menggunakan web server PASS (<http://www.way2drug.com/passonline/>) dengan cara menginputkan canonical SMILES. Nilai yang diperoleh yaitu nilai P_a (*Probability Active*) dan P_i (*Probability Inactive*). Nilai standar P_a antidiabetes, yaitu $P_a > 0,3$ karena nilai tersebut menunjukkan bukti komputasinya, sedangkan nilai P_a harus lebih tinggi dari P_i (Kharisma et al., 2022).

Interaksi Molekular Docking

Molekular docking dilakukan dengan menggunakan software MOE 2009.10 dengan menggunakan parameter seperti *triangle matcher* dengan 2.500.000 iterasi untuk penempatan, 100 pengulangan untuk penahan awal, dan *force field*, serta penilaian ulang satu kali London dG. Interaksi ikatan kimia yang terbentuk pada kompleks molekul ligan-protein dapat divisualisasikan (Amelia et al., 2023).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Fisikokimia

Penentuan sifat fisikokimia bertujuan untuk memprediksi kemungkinan suatu senyawa menjadi obat oral berdasarkan *Lipinski's rule of five*. Lima parameter dalam penentuan sifat fisikokimia, yaitu massa molekul < 500 Dalton, $\text{LogP} < 5$, donor ikatan hidrogen (HBD) < 5 , akseptor ikatan hidrogen (HBA) < 10 , dan refraksi molar $40 - 130$. Hasil prediksi fisikokimia menggunakan server SCFBio didapatkan 15 dari 22 senyawa aktif yang memenuhi persyaratan dari *Lipinski's rule of five* (Tabel 2). Senyawa aktif yang memenuhi aturan yaitu 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-, benzene, (ethenyloxy)-, 2-methoxy-4-vinylphenol, butylated hydroxytoluene, hydroxylamine, O-decyl-, caryophyllene, 1-Hexadecanol, n-hexadecanoic acid, eicosanoic acid, octadecanoic acid, hexadecanoic acid, ethyl ester, pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester, 5,8,11-heptadecatrienoic acid, methyl ester, oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-, dan 9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester. Semakin sedikit fase air yang dipartisi ke dalam membran lipid melalui difusi pasif, semakin banyak ikatan hidrogen yang ada. Nilai log P yang negatif menunjukkan bahwa senyawa memiliki afinitas lebih tinggi terhadap fasa air dan memiliki kelarutan lebih tinggi dalam air (Amelia et al., 2023).

Tabel 2. Hasil Prediksi dari *Drug-likeness*

Ligan	MW (< 500 Dalton)	Log P (< 5)	HBA (< 10)	HB D (< 5)	MR (40-130)
Acarbose	645	-8.564	19	14	138.92607
1	144	4	4	2	1
2	120	-0.263	1	0	32.294594
3	150	2.208	2	1	37.266994
4	220	2.043	1	1	44.749794
5	682	4.295	7	0	70.243774
6	173	6	2	2	194.04480
7	390	4.954	4	0	0
8	204	3.017	0	0	52.749382
9	296	4	1	1	121.07197
10	414	5.910	1	1	6
11	242	8	1	1	77.397766
12	256	4.725	2	1	77.947777
13	294	2	2	0	91.373970
14	282	6.364	2	1	87.087776
15	312	1	2	1	110.12828
16	284	8.024	2	1	99.194283
17	284	8	2	0	99.668983
18	270	5.460	2	0	82.257973
19	278	5.552	2	0	86.662979
20	284	3	2	0	86.874969
21	312	5.972	3	0	102.93748
22	292	9	2	0	91.279968

Keterangan : MW = Molecular Weight, HBA = Hydrogen Bond Acceptor, HBD = Hydrogen Bond Donor, MR = Molecular Refractivity.

Penentuan ADMET (Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicology) dilakukan untuk mengetahui sifat fisikokimia serta toksisitas dari senyawa aktif (Tabel 3) serta untuk mengurangi kemungkinan adanya kegagalan dalam pengembangan obat. Untuk mengembangkan suatu obat yang harus diperhatikan yaitu aspek penyerapan, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas sebelum dilakukan uji klinis. Parameter adsorpsi didapatkan nilai kelarutan dalam air dan Caco-2, parameter distribusi berdasarkan nilai BBB

(*Blood-Brain Barrier*), parameter metabolisme berdasarkan aktivitas CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4. Parameter toksisitas berdasarkan potensi mutagenik dan karsinogenik dari masing-masing senyawa uji (Sagitasa et al., 2021).

Berdasarkan parameter adsorpsi dapat diketahui senyawa mana saja yang bisa diserap dalam usus manusia. Senyawa yang dapat diserap oleh usus yaitu acarbose, benzene, (ethenyloxy)-, bis(2-Ethylhexyl)phthalate, β -sitosterol, 5,8,11-heptadecatrienoic acid, methyl ester, dan oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-. Parameter distribusi dapat dilihat dari nilai VDss (human) yaitu kemampuan obat terdistribusi di dalam tubuh. Semakin tinggi nilai VDss maka semakin banyak obat yang didistribusikan di jaringan dibandingkan plasma. Dapat diketahui bahwa senyawa butylated hydroxytoluene, quercetin, 5TMS derivative, dan caryophyllene. *Total clearance* adalah parameter farmakokinetik yang mewakili laju pengeluaran obat dari tubuh. Senyawa yang memiliki *total clearance* tertinggi yaitu 9,12-octadecadienoic acid, methyl ester, eicosanoic acid, 5,8,11-heptadecatrienoic acid, methyl ester, dan 9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester. Parameter toksisitas bertujuan untuk mengetahui apakah senyawa yang diuji memiliki sifat toksik terhadap tubuh dapat dilihat melalui Tes Ames. Berdasarkan tes ames yang bersifat toksik yaitu 4H- pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-, 2-methoxy-4-vinylphenol, dan hydroxylamine, O-decyl-.

Tabel 3. Hasil Analisis ADMET pada Ekstrak Senyawa Aktif dari Daun Sirsak

Parameters	Acarbose	Ligan											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Absorption	Water solubility	-1.361	-0.699	-2.029	-1.958	-4.834	-6.863	-3.825	-6.47	-5.555	-7.554	-6.773	-6.889
	Caco-2 permeability	-0.717	0.476	1.525	1.499	1.741	1.227	-3.825	1.408	1.423	1.515	1.201	1.464
	Intestinal absorption (human)	0	83.475	95.542	91.965	91.904	88.01	91.605	92.45	94.845	90.71	94.464	89.803
	Skin Permeability	-2.735	-3.722	-1.723	-2.262	-2.474	-2.738	-1.862	-2.67	-1.58	-2.576	-2.783	-2.461
	P-glycoprotein substrate	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	P-glycoprotein I inhibitor	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
	P-glycoprotein II inhibitor	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No
Distribution	VDss (human)	-0.833	0.017	0.182	0.118	0.932	0.758	0.227	0.36	0.652	0.468	0.193	0.476
	Fraction unbound (human)	0.569	0.833	0.359	0.322	0	0.077	0.368	0	0.263	0	0	0.108
	BBB permeability	-1.841	-0.3	0.487	0.289	0.434	-1.914	-0.019	-0.175	0.733	0.806	0.781	0.798
	CNS permeability	-6.183	-3.03	-1.89	-2.042	-1.015	-2.495	-2.183	-2.213	-2.172	-1.563	-1.705	-1.737
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	CYP3A4 substrate	No	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
	CYP1A2 inhibitor	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No	Yes
	CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No
	CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No
	CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No
Excretion	Total Clearance	0.619	0.505	0.277	0.233	0.775	-0.771	1.781	1.898	1.088	1.686	0.628	1.872
	Renal OCT2 substrate	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No

	AMES toxicity	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No	No	No	No	No
	Max. tolerated dose (human)	0.613	1.507	1.141	1.067	0.256	0.616	0.455	1.393	0.351	0.05	-0.621	0.029
	hERG I inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	hERG II inhibitor	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2.673	1.395	1.985	2.076	2.586	3.006	1.611	1.451	1.617	1.607	2.552	1.574
	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	4.466	2.662	2.105	2.019	1.387	0.151	1.974	2.535	1.416	1.043	0.855	1.139
	Hepatotoxicity	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No
	Skin Sensitisation	No	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
	<i>T.Pyiformis</i> toxicity	0.285	0.11	0.043	0.071	1.017	0.296	0.828	0.779	1.401	1.884	0.43	2.056
	Minnow toxicity	16.853	2.771	1.336	1.957	-0.381	-1.903	0.617	-2.266	0.504	-1.504	-1.802	-0.929

Tabel 3 (Lanjutan)

Parameters	Ligan											
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Water solubility	-5.562	-7.343	-5.924	-6.171	-5.973	-7.141	-6.932	-6.905	-7.258	-5.678	-7.232	
Caco-2 permeability	1.558	1.612	1.563	1.554	1.556	1.596	1.616	1.62	1.615	1.443	1.619	
Intestinal absorption (human)	92.004	92.66	91.823	90.63	91.317	91.916	92.48	93.51	92.137	93.369	93.166	
Skin Permeability	-2.717	-2.719	-2.725	-2.731	-2.726	-2.682	-2.556	-2.55	-2.683	-4.116	-2.675	
P-glycoprotein substrate	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	
P-glycoprotein I inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	
P-glycoprotein II inhibitor	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	
VDss (human)	-0.543	0.272	-0.558	-0.532	-0.528	0.373	0.284	0.251	0.282	0.164	0.246	
Fraction unbound (human)	0.101	0.028	0.052	0.021	0.051	0.058	0.057	0.053	0.031	0.065	0.029	
BBB permeability	-0.111	0.767	-0.168	-0.279	-0.195	0.759	0.748	0.738	0.767	-0.123	0.757	
CNS permeability	-1.816	-1.463	-1.654	-1.598	-1.707	-1.777	-1.448	-1.464	-1.394	-2.043	-1.41	

Metabolism	CYP2D6 substrate	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	CYP3A4 substrate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	CYP1A2 inhibitor	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
	CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Excretion	Total Clearance	1.763	2.032	1.884	1.9	1.832	1.912	1.708	2.054	1.742	1.729	2.086
	Renal OCT2 substrate	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Toxicity	AMES toxicity	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	Max. tolerated dose (human)	-0.708	-0.019	-0.81	-0.817	-0.791	0.199	0.151	-0.03	0.104	0.242	-0.078
	hERG I inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	hERG II inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	1.44	1.617	1.417	1.381	1.406	1.664	1.606	1.57	1.62	1.582	1.596
	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	3.181	3.004	3.259	3.483	3.33	3.019	2.98	2.856	3.054	2.597	2.932
	Hepatotoxicity	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No
	Skin Sensitisation	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>T.Pyriformis</i> toxicity	0.84	1.603	0.676	0.487	0.65	1.837	1.933	1.909	1.7	1.836	1.668	
Minnow toxicity	-1.083	-1.6	-1.438	-2.046	-1.565	-1.538	-1.415	-1.232	-1.655	-1.17	-1.473	

Aktivitas Biologis

Uji PASS ini dilakukan berdasarkan hubungan struktur senyawa dengan aktivitas biologisnya atau SAR (Structure Activity Relationship). Uji probabilitas senyawa memberikan gambaran umum tentang potensi senyawa ketika masuk ke dalam tubuh. Nilai Pa dan Pi bervariasi dari 0,000 hingga 1,000 yang menunjukkan probabilitas senyawa masing-masing menjadi aktif atau tidak aktif. Hasil analisis aktivitas biologis menggunakan web server PASS yang memenuhi persyaratan nilai Pa > 0,3 dan nilai Pa > Pi diperoleh 7 senyawa yaitu 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, n-hexadecanoic acid, 9,12-octadecadienoic acid, methyl ester, eicosanoic acid, octadecanoic acid, hexadecanoic acid, ethyl ester dan 9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester. Secara keseluruhan senyawa yang berasal dari ekstrak metanol daun sirsak memiliki aktivitas sebagai anti-diabetes kecuali senyawa quercetin, 5TMS derivative dan β -sitosterol. Semakin besar nilai Pa maka semakin besar kemungkinan senyawa tersebut memblokir reseptor pada percobaan di laboratorium.

Tabel 4. Hasil Analisis Aktivitas Biologis

Ligan	Aktivitas Biologis	Nilai Pa	Nilai Pi
Acarbosa	Antidiabetic	0,515	0,021
1	Antidiabetic	0,214	0,147
2	Antidiabetic (type 1)	0,130	0,093
3	Antidiabetic symptomatic	0,179	0,164
4	Antidiabetic	0,275	0,097
5	-	-	-
6	Antidiabetic (type 1)	0,149	0,054
7	Antidiabetic (type 2)	0,229	0,048
8	Antidiabetic (type 1)	0,129	0,096
9	Diabetic neuropathy treatment	0,349	0,112
10	-	-	-
11	Antidiabetic	0,238	0,124
12	Antidiabetic	0,323	0,070
13	Antidiabetic symptomatic	0,400	0,013
14	Antidiabetic	0,243	0,119
15	Antidiabetic	0,323	0,070
16	Antidiabetic	0,323	0,070
17	Antidiabetic	0,305	0,080
18	Antidiabetic (type 1)	0,164	0,037
19	Antidiabetic (type 1)	0,159	0,042
20	Antidiabetic (type 1)	0,164	0,037
21	Antidiabetic	0,187	0,181
22	Antidiabetic (type 2)	0,357	0,023

Keterangan : Pa = Probability Active
Pi = Probability Inactive

Interaksi Molekular Docking

Hasil dari penambatan 15 senyawa aktif dari ekstrak daun *A. muricata* dan acarbosa dengan protein α -amylase (Tabel 5). Semua senyawa dapat berinteraksi dengan protein α -amylase. Acarbosa memiliki nilai energi pengikatan sebesar -10.6566 kcal/mol yang berperan sebagai kontrol positif. Jika dilihat dari nilai energi pengikatan terdapat empat senyawa yang nilainya hampir berdekatan dengan pembanding acarbosa yaitu octadecanoic acid, eicosanoic acid, n-hexadecanoic acid, dan 2-methoxy-4-vinylphenol. Senyawa aktif dari daun sirsak yang memiliki nilai energi pengikatan dengan nilai masing-masing yaitu - 9.6362 kcal/mol, - 8.8877 kcal/mol, -8.3340 kcal/mol, dan -8.1752 kcal/mol.

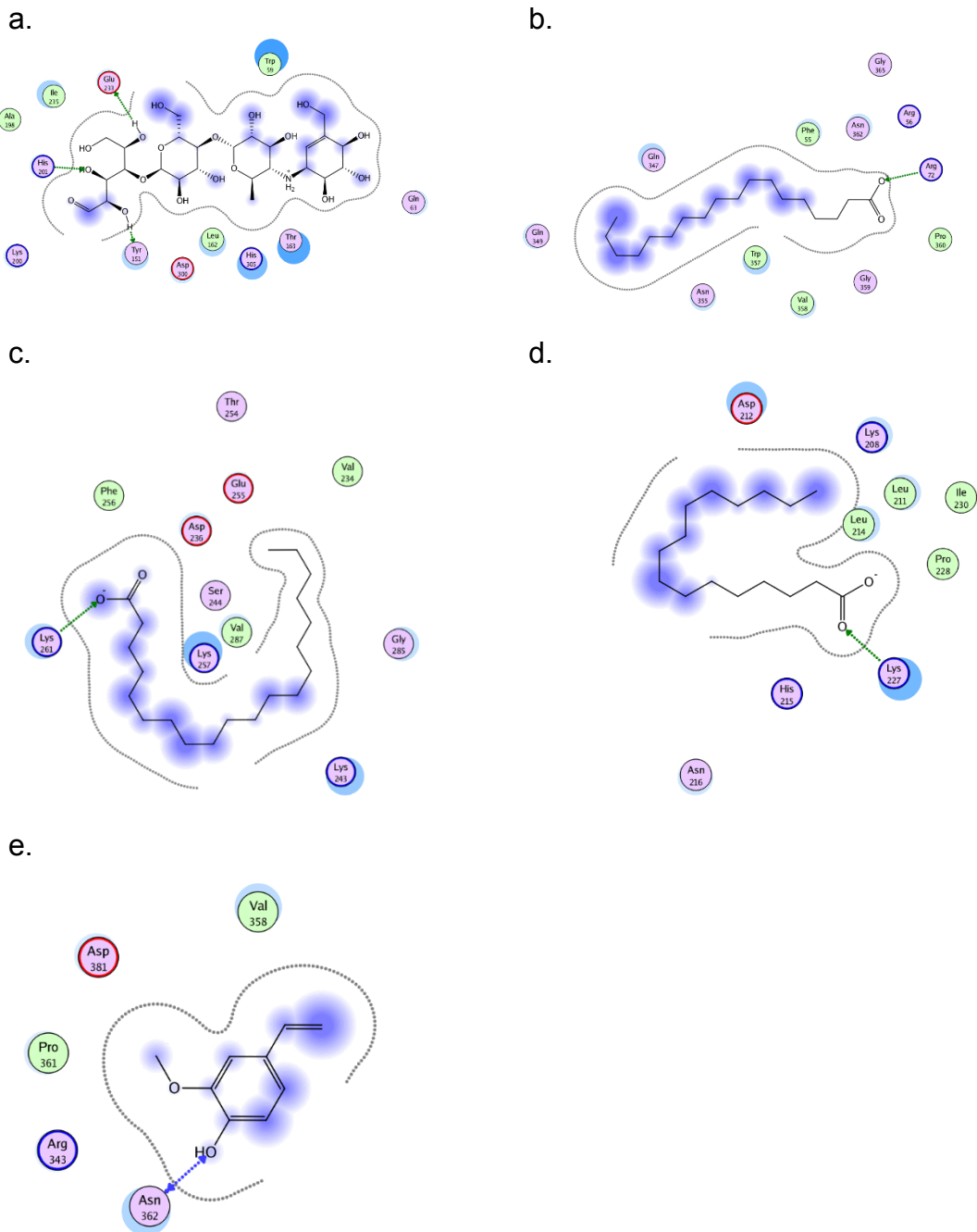
Penambatan 15 senyawa aktif yang terseleksi dari ekstrak daun *A. muricata* dan acarbosa dengan protein α -glukosidase (Tabel 5) yang diinteraksikan hanya 12 senyawa yang dapat berinteraksi dengan protein α -glukosidase dan kontrol yaitu acarbosa. Acarbosa memiliki nilai energi pengikatan sebesar -10.2776 kcal/mol yang berperan sebagai kontrol positif. Dilihat

dari nilai energi pengikatannya terdapat satu senyawa yang nilainya lebih kecil dari acarbose yaitu n-hexadecanoic acid dengan nilai energi pengikatannya sebesar - 11.3319 kcal/mol. Kemudian, ada 3 senyawa aktif dari daun sirsak yang memiliki nilai energi pengikatan yang hampir berdekatan dengan nilai kontrol acarbose yaitu eicosanoic acid, oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-, dan octadecanoic acid dengan nilai energi pengikatan masing-masing yaitu - 9.4243 kcal/mol, - 9.0101 kcal/mol, dan - 8.8952 kcal/mol. Semakin kecil nilai energi bebas ikatan menunjukkan kekuatan ikatan dan kestabilan ikatan yang semakin stabil. Nilai tersebut dipengaruhi oleh berbagai interaksi ligan-reseptor.

Selain itu, parameter yang dianalisis yaitu energi bebas ikatan, ikatan hidrogen, pola interaksi lain dengan residu asam amino pada sisi aktif reseptor. Pengamatan interaksi residu asam amino bertujuan untuk mengidentifikasi interaksi yang terjadi antara ligan dan reseptor. Ikatan hidrogen adalah interaksi yang dapat menstabilkan ikatan ligan dengan reseptor. Jika interaksi ikatan hidrogen antara ligan uji dengan dengan residu asam amino yang sama dengan ligan alami menunjukkan kemiripan jenis interaksi (Nursamsiar et al., 2020).

Tabel 5. Hasil Docking serta Interaksi antara ligan dan protein 3BAJ dan 5NN5

α -amylase				α -glukosidase			
Ligan	Binding Energy	Interaksi Asam Amino	Jenis Interaksi	Ligan	Binding Energy	Interaksi Asam Amino	Jenis Interaksi
Acarbosa	-10.6566	TYR_151 HIS_201 GLU_233	Hydrogen bond	12	- 11.3319	LYS_903	Hydrogen bond
16	- 9.6362	ARG_72	Hydrogen bond	Acarbosa	-10.2776	HIS_395 GLU_781 GLN_827 GLU_835 GLN_839 GLN_902	Hydrogen bond
15	- 8.8877	LYS_261	Hydrogen bond	15	- 9.4243	-	-
12	- 8.3340	LYS_227	Hydrogen bond	21	- 9.0101	ILE_780	Hydrogen bond
3	- 8.1752	ASN_362	Hydrogen bond	16	- 8.8952	LYS_697	Hydrogen bond
4	-6.9265	-	-	11	- 8.3037	TYR_703 SER_836	Hydrogen bond
11	-6.8715	ARG_56	Hydrogen bond	17	- 8.1275	-	-
6	-6.8547	LYS_273 TYR_276	Hydrogen bond	6	-7.9258	LYS_697 GLN_776	Hydrogen bond
17	-6.7545	-	-	18	- 7.7070	-	-
21	-6.6675	LYS_368	Hydrogen bond	4	- 7.3677	LYS_903	Hydrogen bond
19	-6.3952	HIS_201	Hydrogen bond	22	- 7.3376	GLU_795	Hydrogen bond
18	-6.2013	ASN_362	Hydrogen bond	19	- 6.8695	-	-
22	-6.1123	-	-	3	- 6.2916	-	-
8	-5.4463	-	-				
1	-5.0768	ASP_188 SER_219	Hydrogen bond				
2	-4.6824	HIS_201	Arene-cation				

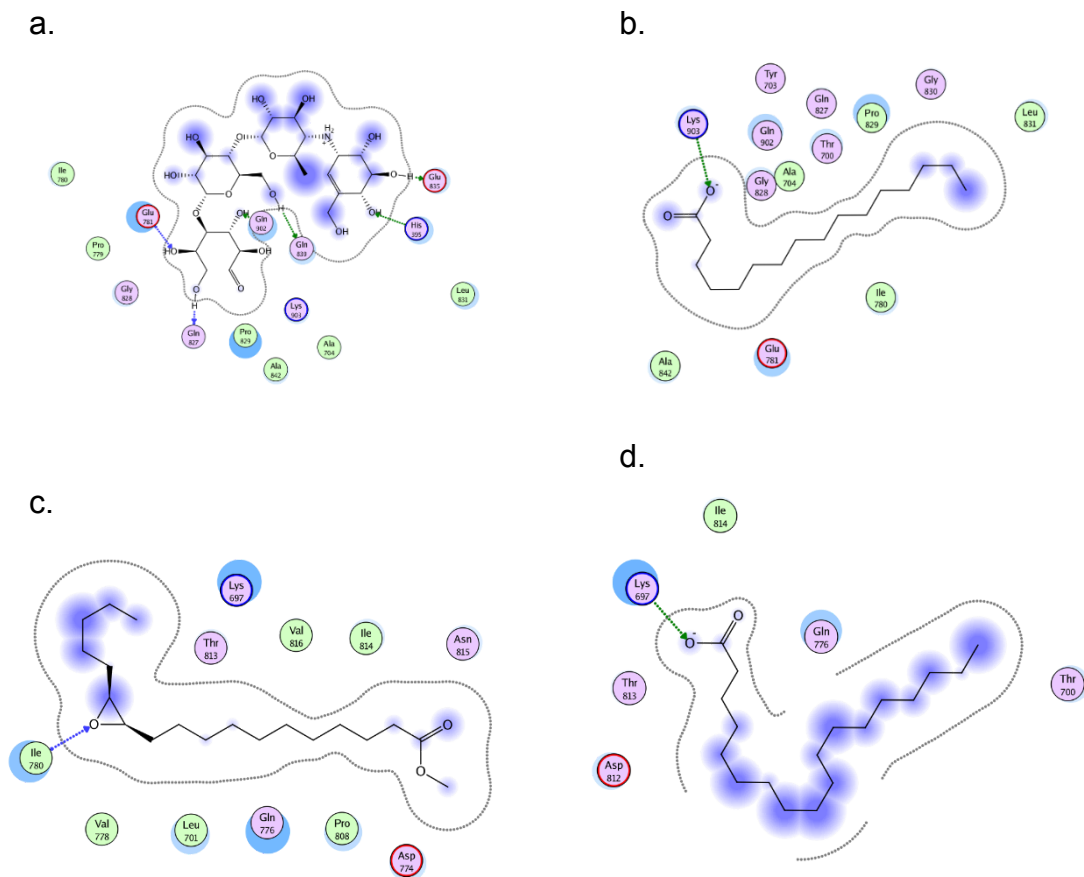


Gambar 2. Hasil docking senyawa dan visualisasi 2D dengan protein 3BAJ (α -amylase). a. Acarbose, b. Octadecanoic acid, c. Eicosanoic acid, d. n-Hexadecanoic acid, e. 2-Methoxy-4-vinylphenol.

Berdasarkan hasil visualisasi 2D, dapat diketahui bahwa senyawa aktif dari daun sirsak mampu berinteraksi dengan sisi aktif enzim α -amylase. Acarbose sebagai kontrol positif membentuk ikatan hidrogen dengan residu TYR151, HIS201, dan GLU233. Sedangkan pada senyawa yang memiliki nilai energi pengikatan yang hampir berdekatan dengan acarbose tidak ada yang memiliki residu ikatan hidrogen yang sama. Senyawanya yaitu octadecanoic acid dan eicosanoic acid. Pada senyawa octadecanoic acid membentuk ikatan hidrogen dengan residu ARG72. Sedangkan pada senyawa eicosanoic acid membentuk ikatan hidrogen dengan residu LYS_261. Untuk senyawa n-hexadecanoic acid membentuk residu dengan ikatan hidrogen LYS_227 dan senyawa 2-methoxy-4-vinylphenol membentuk residu dengan ikatan hidrogen ASN_362.

Sedangkan, hasil dari visualisasi 2D interaksi antara ligan dan protein dapat dilihat pada Gambar 3. Untuk interaksi acarbose sebagai kontrol positif membentuk ikatan hidrogen dengan

residu HIS395, GLU781, GLN827, GLU835, GLN839, GLN902. Pada senyawa n-hexadecanoic acid membentuk ikatan hidrogen dengan residu LYS903. Pada senyawa eicosanoic acid tidak ada membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino dari protein α -glukosidase. Pada senyawa oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis- membentuk ikatan hidrogen dengan residu ILE780. Sedangkan pada senyawa octadecanoic acid membentuk ikatan hidrogen dengan residu LYS697. Semua senyawa yang dapat berinteraksi dengan α -glukosidase tidak ada yang memiliki ikatan hidrogen dengan residu yang sama. Tetapi, senyawa n-hexadecanoic acid memiliki potensi sebagai antidiabetes karena dari semua senyawa yang telah berinteraksi, senyawa n-hexadecanoic acid yang memiliki nilai energi pengikatan terkecil.



Gambar 3. Hasil docking senyawa dan visualisasi 2D dengan protein 5NN5 (α -glukosidase) a. Acarbose, b. n-Hexadecanoic acid, c. Oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-, d. Octadecanoic acid.

Senyawa n-hexadecanoic acid, eicosanoic acid, octadecanoic acid, oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-, dan 2-methoxy-4-vinylphenol memiliki aktivitas anti-diabetes yang paling baik dibandingkan senyawa lain pada penelitian ini. Selain berdasarkan hasil docking pada penelitian ini, senyawa n-hexadecanoic acid, eicosanoic acid, dan octadecanoic acid memiliki aktivitas antidiabetes yang baik berdasarkan hasil analisis aktivitas biologis (Tabel 4). Senyawa n-hexadecanoic acid atau asam palmitat merupakan asam lemak jenuh dengan 16 rantai karbon. Dalam penelitian Agada, Reuben *dkk* (2021) fraksi ekstrak biji pepaya (*Carica papaya*) yang mengandung senyawa n-heksadecanoic acid memiliki aktivitas penghambatan pada enzim α -amylase dan α -glukosidase yang diuji secara *in vitro* (Agada et al., 2021). Penelitian Lutfiyah, K (2022) senyawa n-hexadecanoic acid dari tumbuhan dewandru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki aktivitas penghambatan pada enzim α -amylase (Lutfiyah et al., 2022). Selain itu, penelitian Siregar *dkk* (2022) senyawa n-hexadecanoic acid serta kelompok asam

oleat, asam isoplatat, dan palmitin yang diperoleh dari ekstrak jamur endofit pada tanaman raru (*Cotylelobium melanoxyton*) memiliki aktivitas penghambatan pada enzim α -amilase (Siregar et al., 2022).

Penelitian Fitri, Y (2023) pada tumbuhan *Nypa fruticans* berdasarkan hasil GC-MS mengandung senyawa octadecanoic acid yang berfungsi sebagai antidiabetes karena hasil pengujian in vivo menunjukkan bahwa tumbuhan ini dapat meningkatkan perbaikan pulau langerhans dan meningkatkan sel beta sebagai indikator peningkatan fungsi insulin yang diproduksi oleh sel beta (Y. Fitri et al., 2023). Penelitian Abirami, D (2022) mengenai kandidat obat diabetes dari tumbuhan *Tecoma stans* dilakukan secara in silico. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa salah satu kandungan senyawa dari tumbuhan ini yaitu senyawa octadecanoic acid memiliki aktivitas hipokolesterolemia (Abirami & Gomathi, 2022).

Penelitian Mhya, D (2021) pada daun *Balanites aegyptiaca* yang dilakukan secara in silico salah satu senyawanya yaitu 2-methoxy-4-vinylphenol memiliki aktivitas penghambatan pada enzim α -glukosidase (Mhya et al., 2021). Ojo, Oluwafemi (2018) telah melakukan pengujian aktivitas penghambatan enzim α -amilase dan α -glukosidase secara in vitro dari ekstrak tumbuhan *Blighia sapida*. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa tumbuhan tersebut memiliki aktivitas antidiabetes serta mengandung senyawa 2-methoxy-4-vinylphenol dari hasil GC-MS (Ojo et al., 2018).

SIMPULAN

Secara umum, senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak metanol daun sirsak memiliki aktivitas antidiabetes melalui penghambatan aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase. Senyawa Octadecanoic acid dan Eicosanoic acid memiliki kemampuan pengikatan yang baik pada α -amilase. Sedangkan pada α -glukosidase senyawa yang memiliki kemampuan pengikatan yang paling baik yaitu senyawa n-Hexadecanoic acid karena memiliki nilai energi pengikatan yang lebih kecil dari kontrol. Senyawa n-Hexadecanoic acid berpotensi dikembangkan sebagai antidiabetes.

DAFTAR RUJUKAN

- Abirami, D., & Gomathi, R. (2022). Target and Candidate Agents for Diabetes Treatment in the Framework of the Food Nexus. *Energy Nexus*, 5(October 2021), 100041. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100041>
- Agada, R., Thagriki, D., Esther Lydia, D., Khusro, A., Alkahtani, J., Al Shaqha, M. M., Alwahibi, M. S., & Soliman Elshikh, M. (2021). Antioxidant and Anti-diabetic Activities of Bioactive Fractions of Carica Papaya Seeds Extract. *Journal of King Saud University - Science*, 33(2), 101342. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101342>
- Agu, K. C., Eluehike, N., Ofeimun, R. O., Abile, D., Ideho, G., Ogedengbe, M. O., Onose, P. O., & Elekofehinti, O. O. (2019). Possible Anti-diabetic Potentials of *Annona muricata* (soursop): Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase activities. *Clinical Phytoscience*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40816-019-0116-0>
- Amelia, F., Hidayat, B., Iryani, I., Iswendy, I., Yansen, F., & Putra, R. F. (2023). The Significance of Serine of NTD-NPC1L1 for Cholesterol Binding with Compounds in Traditional Spices. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, Vol. 13 (2).
- Andayani, T. M., Ibrahim, M. I. M., & Asdie, A. H. (2009). Pengaruh Kombinasi Terapi Sulfonilurea, Metformin, dan Acarbose pada Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2. *The Journal of Chemical Physics*, 45(2), 499–508. <https://doi.org/10.1063/1.1727597>
- Fitri, A., Basultan, H., & Iryani. (2021). Hydrophobic Pocket of SARS-Cov-2 Spike Glycoprotein are Potential as Binding Pocket. *Journal of Physics: Conference Series*, 1788(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1788/1/012021>
- Fitri, Y., Yusni, Y., Suryadi, T., & Mudatsir, M. (2023). Characteristic and Bioactivities Value of *Nypa fruticans* from Coastal area in West Aceh District, Indonesia as a candidate antidiabetic agent. *Biodiversitas*, 24(10), 5260–5269. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d241006>
- Justino, A. B., Miranda, N. C., Franco, R. R., Martins, M. M., Silva, N. M. da, & Espindola, F. S. (2018). *Annona muricata* Linn. Leaf as a Source of Antioxidant Compounds with In Vitro

- Antidiabetic and Inhibitory Potential Against α -Amylase, α -Glucosidase, Lipase, Non-Enzymatic Glycation and Lipid Peroxidation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 100(January), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>
- Kharisma, V. D., Agatha, A., Nur, A., Ansori, M., & Widyananda, M. H. (2022). *Herbal Combination from Moringa oleifera Lam . and Curcuma longa L . as SARS-CoV-2 Antiviral Via Dual Inhibitor Pathway : A viroinformatics approach*. 10(1), 138–146.
- Kumar, T. D. A. (2022). Molecular Docking. *Drug Design: A Conceptual Overview*, 243–270. <https://doi.org/10.1201/9781003298755-8>
- Lutfiyah, K., Pujiyanto, S., & Jannah, S. N. (2022). Production of α -Amylase Inhibitors of Aspergillus RD2 from Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) as Diabetes Drug. *Biosaintifika*, 14(3), 340–347. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v14i3.39334>
- Magliano, D. J., Co-chair, Boyko, E. J., & Co-chair. (2021). *IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee* (10th editi). IDF DIABETES ATLAS.
- Mhya, D. H., Nuhu, A. A., & Mankilik, M. M. (2021). In-silico Discovery of Antidiabetic Drug Potential of Balanites Aegyptiaca Leaf's Phenolic Compounds. *Natural Resources for Human Health*, 1(2), 91–97. <https://doi.org/10.53365/nrfhh/142375>
- mugiyanto, E., simanjuntak, P., setyahadi, S., Tinggi Ilmu Kesehatan Pekajangan Pekalongan, S., Biologi LIPI Cibinong Bogor, P., & Puspitek Serpong, B. (2016). Aktivitas Inhibisi Enzim Alfa Amylase dan Alfa Glukosidase Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn.) secara Invitro. *The 4th Univesity Research Coloquium* , 475–484.
- Naik, A. V., & Sellappan, K. (2019). Physicochemical and Phytochemical Analysis of Different Plant Parts of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Pharmaceutical Methods*, 10(2), 70–78. <https://doi.org/10.5530/phm.2019.2.13>
- Nursamsiar, N., M. Mangande, M., Awaluddin, A., Nur, S., & Asnawi, A. (2020). In Silico Study of Aglycon Curculigoside A and Its Derivatives as α -Amilase Inhibitors. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 7(1), 29. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v7i1.23062>
- Ojo, O. A., Ajiboye, B. O., Debbie Imiere, O., Adeyonu, O., Olayide, I., & Fadaka, A. (2018). Antioxidative Properties of *Blighia sapida* k.d. koenig Stem Bark Extract and Inhibitory Effects on Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes Associated with Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus. *Pharmacognosy Journal*, 10(2), 376–383. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.2.63>
- Olasehinde, O. R., Afolabi, O. B., Owolabi, O. V., Akawa, A. B., & Omiyale, O. B. (2022). GC–MS Analysis of Phytochemical Constituents of Methanolic Fraction of *Annona muricata* Leaf and its Inhibition Against Two Key Enzymes Linked to Type II Diabetes. *Scientific African*, 16, e01178. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01178>
- Padhi, S., Nayak, A. K., & Behera, A. (2020). Type II Diabetes Mellitus: A Review on Recent Drug Based Therapeutics. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131, 110708. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708>
- Sagitasa, S., Elizabeth, K., Sulaeman, L. I., Rafasafly, A., Syafra, D. W., Kristande, A., & Mughtaridi, M. (2021). *Chimica et Natura Acta Studi In Silico Senyawa Aktif Daun Singawalang (Petiveria alliacea)*. 9(2), 58–66.
- Siregar, P. I., Pujiyanto, S., & Lunggani, A. T. (2022). Inhibitory Activity of Endophytic Fungi Against Alpha-Amylase Isolated from Raru (*Cotylelobium melanoxyton*). *Berkala Penelitian Hayati*, 28(1), 44–50. <https://doi.org/10.23869/bphjbr.28.1.20227>
- WHO. (2020). *Quick facts What are the causes/risk factors for diabetes? What are the symptoms of diabetes?*