

## Pengembangan Biosensor Berbasis Plastik Zona Mikro untuk Skrining Aktivitas Antidiabetes pada Ekstrak Tanaman Obat

### *(Development of Plastic Microzone Plate Biosensor for Antidiabetic Activity Screening in Medicinal Plant Extract)*

**Indri Firma Wati, Bambang Kuswandi\*, Dwi Koko Pratoko**

Fakultas Farmasi Universitas Jember  
Jl. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto, Jember, 68121  
e-mail korespondensi: b.kuswandi@gmail.com

#### **Abstract**

Research on the diabetes mellitus (DM) treatment has recently been carried out, especially on discovering antidiabetic agents derived from plants. This study aims to determine the fabrication of microzone plastic-based biosensors, determine the optimal sensor conditions, analysis characteristics, and compare the biosensor with the UV-Vis spectrophotometric method. The results showed that the response time was 15 minutes, the linear range was 500-40000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $R = 0.9989$ ). The limit of detection (LOD) was 1109.6  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , and the limit of quantification (LOQ) was 3698.8  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Biosensor filled up the precision parameters with an RSD value of less than 3.7% and an accuracy with recovery in the range of 95-105%. The biosensor is stable in storage at 25 ° C for 270 minutes and at chiller temperature for three days. The antidiabetic activity of the biosensor was compared with the UV-Vis spectrophotometer using the Independent Sample T-test and showed insignificant differences between the two methods

**Keywords:** antidiabetic biosensor,  $\alpha$ -glucosidase enzyme, plastic microzone plate.

#### **Abstrak**

Penelitian mengenai pengobatan diabetes melitus (DM) saat ini telah banyak dilakukan terutama pada penemuan agen antidiabetes yang berasal dari tumbuhan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan fabrikasi biosensor berbasis plastik zona mikro, menentukan kondisi optimal sensor, karakteristik analisis, dan membandingkan metode biosensor dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil penelitian yang diperoleh diantaranya waktu respon 15 menit, linieritas biosensor berada pada rentang 500-40000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $R = 0,9989$ ). Nilai batas deteksi (LOD) sebesar 1109,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan batas kuantifikasi (LOQ) sebesar 3698,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Biosensor memenuhi parameter presisi dengan nilai RSD kurang dari 3,7% dan akurasi dengan perolehan kembali berada pada rentang 95-105%. Biosensor stabil dalam penyimpanan pada suhu 25°C selama 270 menit dan pada suhu *chiller* selama 3 hari. Aktivitas antidiabetes pada biosensor dibandingkan dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan uji *Independent Sample T-test* dan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kedua metode.

**Kata kunci:** biosensor antidiabetes, enzim  $\alpha$ -glukosidase, plat plastik zona mikro.

## Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa di atas batas normal. Meskipun tidak dapat disembuhkan, banyak cara dapat dilakukan dalam rangka pencegahan komplikasi DM yaitu dengan pengendalian asupan makanan, aktivitas fisik dan penggunaan obat-obatan [2]. Terkait pengobatan DM, saat ini banyak penelitian dilakukan untuk menemukan agen antidiabetes yang berasal dari tumbuhan yang diharapkan dapat mengatasi permasalahan efek samping dan harga obat sintetik yang relatif mahal [3,4].

Pada penelitian *in vitro*, inhibisi  $\alpha$ -glukosidase menjadi mekanisme pengujian yang telah banyak dilakukan dengan metode spektrofotometer UV-Vis [5–7]. Pengujian ini dilakukan dengan prinsip pengukuran kadar *p*-Nitrofenol (*p*-NP) yang merupakan produk hasil katalisis  $\alpha$ -glukosidase terhadap substrat *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) [9]. Produk ini akan membentuk warna kuning dan dideteksi oleh spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Meskipun telah banyak digunakan, metode spektrofotometri memiliki kekurangan seperti aktu pengerjaan yang lama, perlunya operator khusus, harga alat yang mahal serta membutuhkan reagen yang banyak.

Biosensor merupakan piranti yang dapat mengukur reaksi biologis dengan menghasilkan sinyal yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam suatu reaksi [10]. Biosensor memiliki kelebihan yaitu desain yang cenderung lebih sederhana, kemudahan pembuatan, penggunaan yang tidak memerlukan keterampilan khusus dan sensitivitasnya yang tinggi. Selain itu, biaya instrumentasi pada biosensor dapat lebih rendah [11]. Penelitian skrining potensi antidiabetes dengan biosensor menggunakan enzim  $\alpha$ -glukosidase telah dilakukan oleh Mohiuddin dkk secara elektrokimia [10]. Penelitian lain dilakukan oleh Guo dkk pada kertas dengan teknik 3D-printing kemudian dideteksi perubahan warna yang terjadi [11]. Warna yang dihasilkan dapat dikuantitasi dengan aplikasi pengukur intensitas warna digital yang memudahkan pemakaian dan biaya rendah.

Pada penelitian ini dikembangkan biosensor untuk skrining aktivitas antidiabetes pada ekstrak tanaman obat yang didesain dalam bentuk zona mikro pada plastik. Jenis plastik

yang digunakan dalam penelitian ini adalah polipropilen karena mudah dibentuk dan harganya relatif murah. Fabrikasi biosensor dilakukan dengan mengimobilisasi enzim  $\alpha$ -glukosidase pada permukaan area deteksi dan dikeringkan. Mekanisme yang digunakan berupa inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase dimana adanya senyawa yang berpotensi sebagai antidiabetes dalam suatu tumbuhan akan berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga jumlah PNPG yang diubah menjadi *p*-NP akan semakin sedikit. Hal inilah yang menyebabkan semakin besar potensi antidiabetes suatu tumbuhan, warna kuning yang seharusnya dihasilkan menjadi semakin memudar (pucat).

Biosensor berbasis plastik zona mikro untuk skrining aktivitas antidiabetes pada ekstrak tanaman obat diharapkan dapat menjadi alternatif pengganti metode penelitian antidiabetes *in vitro* dengan lebih efektif dan efisien.

## Metode Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, ultrasonik, mikropipet, pipet tetes, neraca analitik, *scanner* (Canon LiDE 120), oven, kulkas, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, *microtube*, *stopwatch*, setrika, pelubang kertas, termometer, pH meter, kuvet, spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800).

Bahan yang digunakan antara lain *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*Sigma-Aldrich*),  $\alpha$ -glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae* (*Sigma-Aldrich*), *steril water for irrigation*, *aqua destillata*, dapar fosfat pH 7 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, plastik laminasi (*Sakurai*), serbuk daun salam, serbuk daun sambiloto dan rimpang temulawak dari Materia Medika Batu Malang.

## Fabrikasi Biosensor

Biosensor dibuat dengan merekatkan 8 lapisan plastik dengan ukuran 1 x 3.5 cm menggunakan bantuan pemanasan. Tahap dilanjutkan dengan melubangi plastik membentuk lingkaran berdiameter 6 mm dengan pemberian jarak 0,5 cm antar setiap lubang untuk mencegah masuknya reagen antar lubang (area deteksi). Alas biosensor dibuat dengan merekatkan 1 lapisan plastik dengan cara yang sama.

## Optimasi Biosensor

Optimasi biosensor dilakukan untuk memperoleh hasil reaksi enzimatik yang optimum. Pada penelitian ini dilakukan optimasi yang meliputi penentuan volume biosensor, konsentrasi PNPG, konsentrasi  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan waktu inhibisi.

### Karakterisasi Biosensor

Karakterisasi biosensor dilakukan untuk untuk menilai kelayakan metode dalam analisis. Karakterisasi pada penelitian ini meliputi waktu respon, linieritas, batas kuantitasi dan batas deteksi, presisi, akurasi, dan waktu pakai

### Aplikasi Biosensor pada Sampel Nyata Dibandingkan Metode Spektrofotometri UV-Vis

Penentuan nilai % inhibisi sampel dilakukan dengan mengimobilisasikan 1,5  $\mu\text{L}$  sampel pada area deteksi dan diinkubasi selama 1 menit. Selanjutnya, dilakukan penambahan 3,7  $\mu\text{L}$  PNPG dengan cara yang sama dan diinkubasi selama 15 menit. Reaksi kemudian ditambahkan dengan 15  $\mu\text{L}$  larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Perubahan intensitas warna yang terjadi diukur dengan program *ImageJ*. Nilai *mean Blue* digunakan untuk menghitung nilai % inhibisi

Metode penentuan % inhibisi biosensor dibandingkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Prinsip dari metode ini adalah pengukuran kadar *p*-NP. Metode spektrofotometri dilakukan dengan mereaksikan 37  $\mu\text{L}$  PNPG 5 mM dan ditambahkan 438  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH 7. Kemudian campuran ditambahkan sebanyak 15  $\mu\text{L}$  larutan sampel dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 °C. Penambahan 10  $\mu\text{L}$  enzim (4 Unit/mL) dilakukan setelahnya dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 15 menit. Reaksi kemudian ditambahkan 500  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum 400 nm. Absorbansi ini kemudian digunakan untuk menghitung % inhibisi sampel Hasil % inhibisi yang didapatkan dengan metode spektrofotometri kemudian dibandingkan dengan biosensoryang selanjutnya dibandingkan dengan metode biosensor.

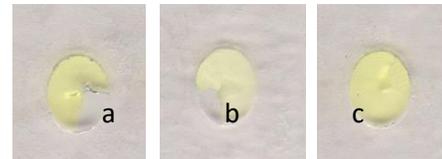
## Hasil Penelitian

### Optimasi Biosensor

#### a. Optimasi volume biosensor

Berdasarkan beberapa volume yang diujikan, volume 20  $\mu\text{L}$  mampu memenuhi seluruh area deteksi (Gambar 1). Hal ini

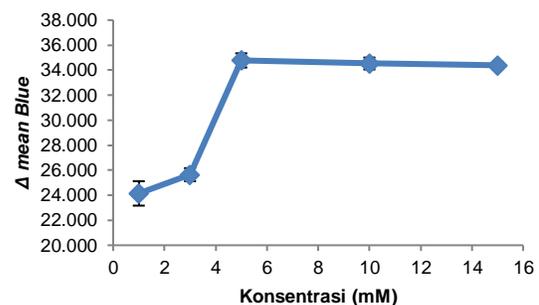
dilakukan untuk mencapai pemerataan warna disetiap bagian area deteksi sehingga terjadi keseragaman respon.



Gambar 1. Optimasi volume biosensor a) 15 $\mu\text{L}$ , b) 17 $\mu\text{L}$ , c) 20 $\mu\text{L}$

#### b. Optimasi konsentrasi PNPG

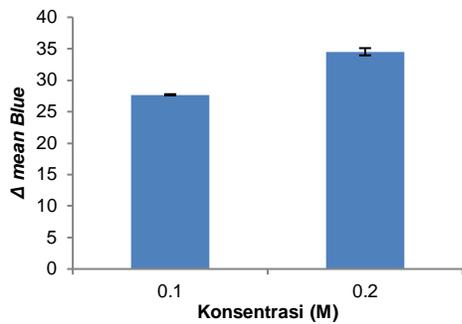
Optimasi ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi PNPG optimal pada 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, dan 15 mM. Pada konsentrasi optimal terjadi kejenuhan jumlah substrat yang menempati sisi aktif enzim sehingga meskipun jumlah substrat diperbanyak kecepatan reaksi akan tetap (*steady state*). Pada konsentrasi PNPG 1 sampai 5 mM terjadi kenaikan respon *mean Blue* yang menunjukkan masih adanya peningkatan laju reaksi enzimatik sedangkan pada konsentrasi 10 dan 15 mM menunjukkan respon *mean Blue* yang hampir sama dengan konsentrasi 5 mM (Gambar 2). Pada konsentrasi ini terjadi kejenuhan PNPG terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase sehingga pada penelitian ini dipilih konsentrasi PNPG 5 mM.



Gambar 2. Optimasi konsentrasi PNPG

#### c. Optimasi konsentrasi $\text{Na}_2\text{CO}_3$

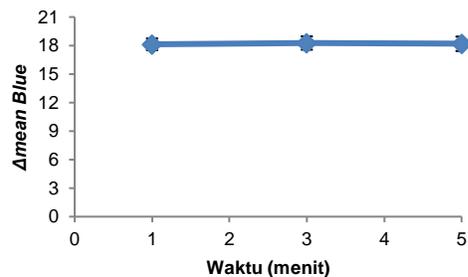
Optimasi konsentrasi  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilakukan dengan membuat konsentrasi 0,1 M dan 0,2 M.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  merupakan larutan basa yang digunakan untuk mendeprotonisasi *p*-NP sehingga menghasilkan warna kuning yang semakin cerah. Konsentrasi  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M menunjukkan respon *mean Blue* yang lebih besar dari 0,1 M sehingga pada penelitian ini digunakan konsentrasi  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M (Gambar 3).



Gambar 3. Optimasi konsentrasi Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

d. Optimasi waktu inhibisi

Optimasi waktu inhibisi dilakukan pada menit ke-1, 3 dan 5. Pada penelitian ini digunakan waktu inkubasi 1 menit karena Δmean Blue yang dihasilkan cenderung sama dengan Δmean Blue pada inkubasi menit ke-5 (Gambar 4).



Gambar 4. Optimasi waktu inhibisi

Fabrikasi Biosensor

Biosensor berukuran 1 x 3,5 cm dengan diameter area deteksi 6 mm. imobilisasi enzim dilakukan pada bagian alas. Antar area deteksi diberi jarak 0,5 cm untuk mencegah saling masuknya reagen dalam area deteksi. Desain biosensor dapat dilihat pada Gambar 5. Biosensor dibuat dengan mengimobilisasikan 1 μL enzim α-glukosidase 4 Unit/mL kemudian dikeringkan dan direaksikan dengan 1,5 μL larutan uji; 3,7 μL PNPG; dan 15 μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Total volume yang dapat ditampung oleh biosensor adalah 20 μL. Respon biosensor terhadap adanya senyawa yang berpotensi menghambat enzim α-glukosidase ditunjukkan dengan memudarnya warna kuning yang seharusnya dihasilkan akibat reaksi enzim-substrat dan menghasilkan warna menuju putih.

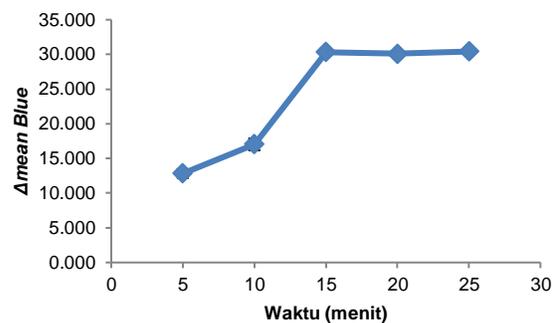


Gambar 5. Desain biosensor

Karakteristik Biosensor

a. Waktu respon

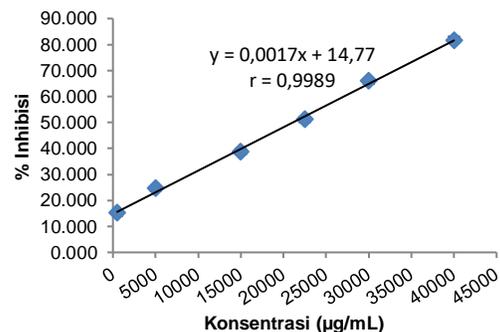
Uji waktu respon dilakukan pada menit ke-5, 10, 15, 20, dan 25. Intensitas warna (Δmean Blue) pada menit ke-0 sampai menit ke-15 mengalami peningkatan yang ditunjukkan dengan respon Δmean Blue yang semakin tinggi sedangkan pada menit ke-15 sampai menit ke-25 menunjukkan intensitas warna kuning dengan respon Δmean Blue yang relatif stabil (steady state) oleh karena itu waktu respon pada menit ke-15 digunakan sebagai waktu respon untuk aplikasi sampel berikutnya. Grafik waktu respon dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Waktu respon biosensor

b. Linieritas

Adanya respon inhibisi standar akarbose ditunjukkan dari konsentrasi 500 μg/mL sampai 40000 μg/mL dengan terjadinya perubahan warna dari kuning menjadi putih. Berdasarkan kurva linieritas antara konsentrasi akarbose dan % inhibisi diperoleh persamaan regresi linier, yaitu  $y = 0,0017x + 14,77$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r = 0,9989$ ) (Gambar 7). Nilai tersebut menunjukkan adanya hubungan yang linier antara konsentrasi akarbose dengan respon dimana terjadi peningkatan nilai mean Blue sebanding dengan konsentrasi akarbose yang digunakan.



Gambar 7. Kurva linieritas biosensor

c. Batas kuantitasi dan batas deteksi

Pada penelitian ini, konsentrasi LOD/batas deteksi biosensor adalah 1109,6 µg/mL dan konsentrasi LOQ/batas kuantitasi biosensor 3698,8 µg/mL.

d. Presisi

Pengukuran presisi dilakukan dengan pengukuran sampel sebanyak 6 kali replikasi. Hasil pengukuran presisi *repeatability* pada biosensor dengan standar akarbose 2000 µg/mL dan sampel daun sambiloto 5000 µg/mL berturut-turut adalah 2,695% dan 1,634%. Pada hasil pengukuran presisi antara, pengujian dilakukan dengan prosedur yang sama namun dilakukan pada tiga hari yang berbeda dengan RSD 2,916% dan 1,658%. Hasil ini memenuhi persyaratan presisi dengan nilai RSD <3,7 [12].

e. Akurasi

Nilai % recovery dari adisi sampel 30%,45% dan 60% berturut-turut adalah 99,628%; 104,191%; dan 101,953%. Hasil tersebut dapat dikatakan memenuhi syarat akurasi yang berada pada rentang 95-105% [12].

f. Waktu pakai

Pada biosensor dengan penyimpanan di suhu ruang ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), terjadi penurunan intensitas warna (*mean Blue*) sebesar 15,234% pada menit ke-270 sedangkan pada suhu *chiller* penurunan sebesar 15,732% terjadi pada hari ke-3.

**Aplikasi Sampel dan Perbandingan Metode**

Tabel 1. Hasil perbandingan metode

Sampel	% Inhibisi	
	Spektro	Biosensor
Sambiloto	25,645±2,758	25,593±0,876
Salam	65,931±0,954	66,444±0,537
Temulawak	16,135±1,772	16,551±0,487
Campuran	28,582±2,389	28,297±0,996

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan uji *independent t-test* dapat diketahui bahwa kedua metode yang digunakan tidak berbeda signifikan. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai signifikansi yang diperoleh > 0,05.

Tabel 2. Ekuivalensi hasil inhibisi sampel terhadap akarbose

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	Akarbose Ekuivalen (µg/mL)
Sambiloto	5000	6366,47
Salam	2500	30396,47
Campuran	5000	7957,058
Temulawak	7500	1047,647

**Pembahasan**

Berdasarkan Tabel 1, hasil % inhibisi biosensor menunjukkan perbedaan yang signifikan antara sampel tunggal dan campuran. Perbedaan ini dapat dikarenakan adanya interaksi pada sampel campuran. Komponen senyawa dalam sediaan ekstrak tanaman obat sendiri terdiri atas senyawa aktif utama yang memiliki aktivitas dominan, senyawa sampingan, dan senyawa ikutan (seperti selulosa, amilum, gula, dll). Pengaruh-pengaruh golongan senyawa lain dapat memperkuat atau memperlemah efek akhir secara keseluruhan. Menurut Caesar dan Cech, interaksi antar komponen senyawa pada campuran ekstrak dapat terjadi secara sinergi, aditif/non-interaktif maupun antagonis. Interaksi sinergis dan aditif menunjukkan bahwa efek kombinasi dari masing-masing ekstrak adalah murni penjumlahan sedangkan interaksi antagonis menunjukkan efek yang berlawanan sehingga hasil yang didapatkan dapat lebih rendah dari interaksi aditif [13]. Berdasarkan penelitian Berawi dkk, sampel tunggal sambiloto dan salam memiliki potensi menurunkan kadar glukosa darah pada tikus lebih tinggi dibandingkan kombinasi ekstrak dari keduanya [14]. Potensi yang sama juga dilaporkan Widharna dkk yang menunjukkan bahwa potensi penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase pada sampel tunggal daun salam lebih besar dari campuran salam-sirsak maupun salam-pegagan [15].

Pada penelitian ini digunakan jenis plastik polipropilen dengan diameter 6 mm sebagai area deteksi. Jika dibandingkan dengan *microplate*, biosensor ini memiliki beberapa keunggulan diantaranya harganya yang lebih terjangkau, pemakaiannya yang sederhana, dan analisisnya mudah bila menggunakan *scanner* karena bentuknya yang tipis. Menurut Lu dkk penggunaan *microplate* standar dengan diameter 6,5 mm, diperlukan volume cairan setidaknya 80 µL untuk menutup seluruh permukaan dasar

microplate sedangkan pada penelitian ini menggunakan volume akhir yang lebih sedikit yaitu 20  $\mu$ L [16]. Biosensor ini juga dapat digunakan secara berulang dengan mencuci biosensor kemudian mengganti lapisan alas dengan lapisan plastik yang baru. Bentuk biosensor didesain menjadi tiga area deteksi (tiga replikasi) sehingga jumlah (baris) biosensor dapat disesuaikan dengan variasi konsentrasi yang digunakan dalam penelitian.

Obat pembanding yang digunakan pada penelitian ini adalah akarbose yang memiliki mekanisme penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase secara kompetitif. Berdasarkan Tabel 2. diketahui bahwa urutan sampel yang memiliki nilai akarbose ekuivalen terbesar berturut-turut adalah salam, campuran, sambiloto dan temulawak. Pada penelitian ini, perolehan nilai akarbose ekuivalen sampel tergolong besar khususnya sampel salam yang menunjukkan nilai 30396,47  $\mu$ g/mL. Besarnya nilai ini diperoleh dari interpolasi regresi linieritas dimana rentang konsentrasi akarbose yang dibutuhkan cukup besar untuk menghasilkan % inhibisi tertentu. Hal ini diduga disebabkan oleh penurunan aktivitas standar akarbose yang hampir mendekati masa kadaluarsa yaitu jpada Desember 2020.

## Simpulan dan Saran

Biosensor berbasis plastik zona mikro yang dikembangkan menunjukkan bahwa pengujian beberapa parameter yang telah dilakukan memenuhi persyaratan sehingga biosensor ini dapat digunakan sebagai alternatif untuk skrining aktivitas antidiabetes pada ekstrak tanaman obat. Penelitian yang perlu dikembangkan selanjutnya berkaitan dengan cara ekstraksi sehingga tidak mengganggu respon biosensor selain itu teknik immobilisasi juga perlu dikembangkan sehingga stabilitas enzim dapat terjaga lebih lama.

## Daftar Pustaka

1. PERKENI. Konsensus pengelolaan dan pencegahan diabetes mellitus tipe 2 di Indonesia 2015. Jakarta: PB. PERKENI; 2015. 11–14 p.
2. Novia Pegin Wardani. Uji Aktivitas Anti Diabetes Ekstrak Kering Biji Mahoni Terstandar (Swietenia mahagoni Jack) Pada Mencit Yang Diinduksi Aloksan. Skripsi. 2010;(050710106).

3. Marriane, Yuandani, Rosnani. Antidiabetic Activity from Ethanol Extract of Kluwih's Leaf (Artocarpus camansi). J Nat. 2011;11(2):64–8.
4. Hadiarti D. Inhibisi  $\alpha$ -Glukosidase Ekstrak Etanol Buas-Buas (Premna serratifolia) secara In Vitro. Maj Obat Tradis. 2017;22(2):80.
5. Holiday D, Yasmin, Christianty FM. Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Teh Hitam dan Teh Hijau secara In Vitro Menggunakan Metode Inhibisi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase ( In Vitro Antidiabetic Activity of Black Tea and Green Tea Extracts by Inhibition of  $\alpha$ -Glukosidase Method ). e-Jurnal Pustaka Kesehatan. 2018;6(2):235–9.
6. Mahargyani W. Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak n-Heksan Kulit Buah Naga Merah (Hylocereus polyrhizus). EduChemia (Jurnal Kim dan Pendidikan). 2019 Jan 31;4(1):13–23.
7. Ariani N, Kartika IR, Kurniadewi F. Uji Aktivitas Inhibisi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase secara In Vitro dari Ekstrak Metanol Daun Cryptocarya densiflora Blume dan Fraksi-Fraksinya Nurul. 2017;7(1):1–6.
8. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. Essays Biochem. 2016;60(1):1–8.
9. Kawamura A, Miyata T. Biosensors: An Overview. In: Biomaterials Nanoarchitectonics. Osaka: Kansai University; 2016. p. 157–76.
10. Mohiuddin M, Arbain D, Islam AKMS, Ahmad MS, Ahmad MN. Alpha-Glukosidase Enzyme Biosensor for the Electrochemical Measurement of Antidiabetic Potential of Medicinal Plants. Nanoscale Res Lett. 2016;11(1):1–12.
11. Guo S, Lin X, Wang Y, Gong X. Fabrication of paper-based enzyme immobilized microarray by 3D-printing technique for screening  $\alpha$ -glukosidase inhibitors in mulberry leaves and lotus leaves. Chinese Med (United Kingdom). 2019;14(1):1–11.
12. Yuwono M, Indrayanto G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. Profiles Drug Subst Excipients Relat Methodol. 2005;32(05):241–60.
13. Caesar LK, Cech NB. Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. Nat Prod Rep. 2019;36(6):869–88.
14. Berawi KN, Shidarti L, Nurdin SU, Lipoeto NI, Wahid I, Sari J, et al. Comparison effectiveness of antidiabetic activity extract

- herbal mixture of soursop leaves(*annona muricata*), bay leaves(*syzygium polyanthum*) and pegagan leaves(*centella asiatica*). *Biomed Pharmacol J.* 2017;10(3):1481–8.
15. Widharna R, Ferawati, Tamayanti W, Hendriati L, Hamid I, Widjakusuma E. Antidiabetic Effect of the Aqueous Extract Mixture of *Andrographis paniculata* and *Syzygium polyanthum* Leaf. *European J Med Plants.* 2015;6(2):82–91.
16. Lu G, Tan HY, Neild A, Liew OW, Yu Y, Ng TW. Liquid filling in standard circular well microplates. *J Appl Phys.* 2010;108(12).