

KARAKTERISTIK *TRYPsin* INHIBITOR DAN PENJAJAGAN SEBAGAI KOMPONEN MAKANAN FUNGSIONAL PENDERITA DIABETES (IIDM)

Characteristics Of Trypsin Inhibitors And Sounding Out As A Component of Functional Food For Diabetic (IIDM) Bayu Kanetro¹, Zuheid Noor², Sutardi², Retno Indrati²

ABSTRACT

Trypsin inhibitors (TI) are substances which, when added to a mixture of a trypsin and a substrate, bind to the enzyme and render it to decrease in the rate of substrate cleavage. These inhibitors are nonglycosylated, water-soluble (albumin) that account for about 0,2 – 2 % of the total soluble protein of the legume seeds. Two major families of trypsin inhibitors have been described in legumes: the Bowman-Birk-type (BBI) and the Kunitz-type inhibitors (KTI). They are distinct families of proteins, as evidenced by their molecular weights, compositions, and amino acid sequences.

Because of their unique pharmacological properties, these inhibitors hold considerable promise in clinical applications in their field of medicine. At least one inhibitor in soybeans, the BBI, has been shown to have clear anticarcinogenic activity in both in vitro and in vivo carcinogenic assay systems. Increasing need and awareness for functional food has motivated food scientists and industries to search functional food components and ingredients for certain target group, including functional food for diabetes.

Soy TI may enhance the production of more trypsin and probably insulin as well. The dietary TI evokes pancreatic enzyme secretion by forming inactive trypsin-TI complex. As the level of trypsin goes below a threshold level, the pancreas is induced to produce more enzymes. The mediating agent between the enzymes and the pancreas is cholecystokinin (CCK), which is released from the jejunal endocrine cells when the level of trypsin in the intestine becomes depleted. CCK is intestinal hormone which stimulate insulin secretion. TI regenerated β -cells which indicate the beneficial effect of TI on the insulin production of the pancreas. These novel findings provide evidence to support the potential utility of TI in the treatment of type 2 diabetes (IIDM/ Insulin-Independent Diabetic Mellitus). However, TI are also known as anti nutrient substances and to cause pancreatic hypertrophy.

Key words: trypsin inhibitors, insulin-independent diabetic mellitus, pancreatic secretion, cholecystokinin, β -cells, pancreatic hypertrophy.

PENDAHULUAN

Proteinase/protease inhibitor telah menarik banyak ilmuwan dari berbagai disiplin ilmu untuk diteliti. Ahli gizi menekankan penelitian tentang inhibitor ini dalam kaitannya dengan nilai gizi protein tanaman. Reaksi enzim – inhibitor ini juga telah digunakan sebagai model yang sederhana bagi ilmuwan protein untuk mempelajari interaksi protein-protein dan mekanisme enzim. Sifat-sifat inhibitor ini juga menarik ahli farmasi untuk mengaplikasikannya pada obat-obatan (Desphande, 2002).

Protease inhibitor adalah senyawa yang apabila ditambahkan dalam campuran enzim protease dan substrat akan mengikat enzim dan menurunkan kecepatan pemecahan substrat (Liu, 1999). Protease inhibitor dalam kedelai diketahui menghambat aktivitas enzim tripsin, sehingga dikenal sebagai trypsin inhibitor (TI) atau penghambat tripsin atau anti tripsin (Reseland dkk., 1996). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa TI dipercaya sebagai senyawa anti gizi dan tidak bermanfaat, bahkan berdasarkan pengujian secara in vivo diketahui bahwa TI kedelai dapat menyebabkan *pancreatic hypertrophy* (Tan dan Wong, 1982 dalam Su dan Chang, 2002). Namun penelitian-terakhir menyebutkan bahwa TI merupakan senyawa bioaktif yang memiliki kemampuan sebagai *anti-carcinogenic*, sehingga dikelompokkan dalam senyawa *phytochemical* (Kennedy, 1998 dalam Losso, 2002). Selain itu TI juga merupakan senyawa yang bersifat hipoglisemik, yaitu memiliki kemampuan menurunkan gula darah (Zuheid-Noor dkk., 2000).

TI telah diteliti memiliki kemampuan meningkatkan sekresi insulin secara in vitro (Henny-Krissetiana, 2000; Zuheid-Noor dkk., 2000). Penelitian yang membuktikan bahwa TI kedelai dapat digunakan untuk terapi diabetes secara in vivo memang belum ada, namun penggunaan *di-(2s,3s)-2-amino-3-methyl-pentanoic-1,3-thiazolidine fumarate (dipeptidyl peptidase IV inhibitor/DP IV inhibitor)* telah terbukti dapat menormalkan level insulin pada tikus yang diinduksi diabetes dengan *streptozotocin/STZ* (Pospisilik dkk., 2003). TI kedelai dan DP IV inhibitor merupakan inhibitor yang dikelompokkan dalam serin protease inhibitor (Whitaker, 1997 dan Pospisilik dkk., 2003). Hal tersebut membuka peluang penelitian tentang pemanfaatan TI kedelai untuk terapi diabetes.

¹ Staf pengajar F. TP Universitas Wangsa Manggala Yogyakarta

² Staf pengajar Jurusan Teknologi Pangan & Hasil Pertanian F. TP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Review ini mengungkap berbagai penelitian tentang tripsin inhibitor dari mulai proses pemisahan sampai karakterisasinya. Selain itu juga menelaah berbagai penelitian yang menunjukkan bahwa TI kedelai mampu meningkatkan sekresi enzim/hormon pankreatik khususnya tripsin dan insulin sehingga memiliki peluang untuk digunakan sebagai komponen makanan fungsional bagi penderita diabetes.

Pemurnian *trypsin inhibitor*/TI dan karakteristik kimia

Proteinase inhibitor merupakan protein larut air dan menyusun 0,2 - 2 % dari total protein kacang-kacangan yang larut air (Desphande dan Damodaran, 1990 dalam Desphande, 2002). Adanya aktivitas anti proteolitik dari senyawa ini pertama kali ditemukan oleh Reed dan Haas pada tahun 1938 yang melaporkan bahwa ekstrak tepung kedelai dalam air menghambat tripsin dalam menghidrolisis gelatin sehingga *proteinase inhibitor* kedelai dikenal sebagai *trypsin inhibitor*/TI (Desphande, 2002). Sumber TI yang berpotensi untuk dikembangkan adalah kedelai karena diantara jenis kacang-kacangan, kedelai mengandung aktivitas TI yang paling tinggi (Boisen, 1989) dan telah diketahui memiliki sifat hipoglisemik. Aktivitas TI kedelai, kacang hijau dan jenis kacang-kacangan lain berturut-turut 15,77; 2,37; dan kurang dari 12 mg inhibitor/g sampel (Saini, 1989).

Ekstraksi TI pertama kali ditemukan oleh Bowman pada tahun 1944 yang mengemukakan bahwa dalam suspensi kedelai mentah terdapat faktor yang menghambat aktivitas tripsin dalam mencerna kasein secara *in vitro*. Aktivitas faktor tersebut hilang jika dipanaskan, mengendap dalam aseton, dan jika dilarutkan dalam larutan pH 4 maka hampir semua aktivitasnya mengumpul dalam larutan tersebut. Perkembangan selanjutnya diketahui sifat TI larut dalam air dan basa tetapi tidak larut dalam pelarut organik. TI terdiri berbagai fraksi dengan BM berkisar 8000 - 24000 Da dan titik isoelektrik 3,5 - 8,5. Seperti pada umumnya protein, TI bersifat amfoter karena memiliki gugus NH₂ dan COOH yang dapat bereaksi dengan asam atau basa (Hilyati dan Sri-Benti, 1991).

Henny-Krissetiana (2000) juga telah mengekstraksi fraksi TI kedelai dengan pengaturan pH. Pada tahap awal dilakukan pengaturan pH suspensi tepung kedelai dalam air sebesar pH 4. Supernatan yang diperoleh dari sentrifugasi selanjutnya diatur pH 3. Endapan yang diperoleh merupakan fraksi TI kasar dan bisa dikeringkan dengan *freeze dryer*.

Pengamatan karakteristik protease inhibitor kacang-kacangan harus diawali dengan pemurnian inhibitor tersebut, seperti yang telah dilakukan oleh Ferrason dkk. (1997) pada *protease inhibitor* kacang polong (pea seeds). Tahap-tahap pemurnian/purifikasi *protease inhibitor* tersebut adalah isolasi *crude inhibitor*, pemurnian menggunakan kromatografi gel, dan pemisahan fraksi *inhibitor* menggunakan kromatografi pertukaran ion. Hasilnya disajikan pada Tabel 1, Gambar 1, dan 2.

Table 1. Purification of Pea Seeds Trypsin Inhibitor/PSTI (a)

	Protein (mg)	TUI x 1000	Recovery yield (%)	Tripsin inhib.sp. ac. (TUI/mg)
ground seeds	55500	2745	100.0	49
crude protein	12000	2480	90.3	206
extrac				
crude inhibitor	7300	2350	85.6	321
preparation				
G75 inhibitor	1950	2250	81.9	1153
fraction				
Ion exchange				
fraction (b):				
DE-PSTI I	66	135	4.9	2045
PSTI I				3350
DE-PSTI II	225	550	20.0	2444
PSTI II				3280
DE-PSTI III	87	216	7.8	2482
PSTI III				2980
DE-PSTI IV	254	651	23.7	2563
DE-PSTI V	48	83	3.0	1729
PSTI V				3050

(a) From 300 g of seeds. (b) DE-PSTI refer to DEAE-Sephacrose fractions. (Ferrason dkk., 1997)

Susunan asam amino pada protein *protease inhibitor* untuk jenis yang sama pada berbagai jenis kacang-kacangan menunjukkan sedikit perbedaan. Namun perbedaan susunan asam amino tersebut, pada umumnya tidak mengakibatkan perbedaan jenis asam amino pada sisi aktif. Oleh karena itu susunan asam amino protein dan sisi aktifnya dapat digunakan sebagai petunjuk untuk menentukan jenis *protease inhibitor*. Hal ini seperti telah dilakukan oleh Ferrason dkk. (1997) dalam mengidentifikasi jenis *protease inhibitor* (Gambar 3).

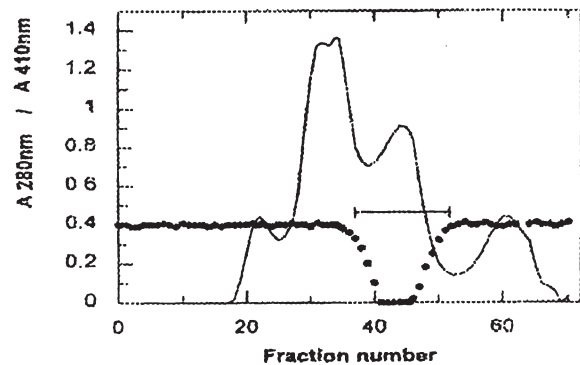


Figure 1. Separation of ammonium sulfate precipitated protein by size exclusion chromatography on a Shephadex G-75 column. The solid line shows absorbance at 280 nm. The dots indicate the absorbance at 410 nm of TI assays on every fraction. Control trypsin reaction (without pea protein fractions) gave an A 410 nm. (Ferrason dkk., 1997)

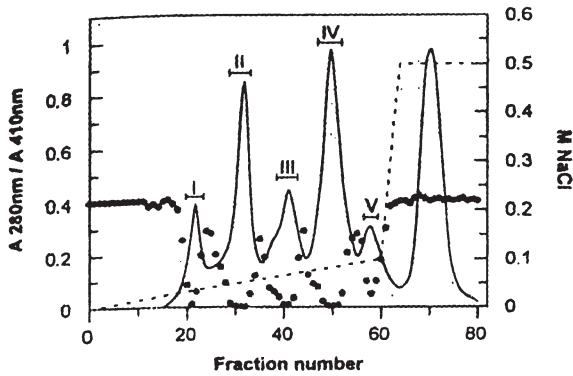


Figure 2. Separation of TI proteins by anion exchange chromatography on a DEAE-Sepharose column. The solid line shows absorbance at 280 nm. The solid line shows absorbance at 280 nm. The dots indicate the absorbance at 410 nm of TI assays on every fraction. Control trypsin reaction (without pea protein fractions) gave an $A_{410\text{ nm}}$: 0,4. Dotted line indicates NaCl gradient. (Ferrason dkk., 1997)

Pada Gambar 3 terlihat bahwa berdasarkan susunan asam amino pada 6 jenis *protease inhibitor pea seeds*, maka dapat dikelompokkan dalam *Bowman-Birk Protease inhibitor*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya kesamaan susunan terminal-N, khususnya pada *V. faba* dan *V. angustifolia* dengan PSTI IVa. Secara khusus terlihat adanya kesamaan pada semua jenis *protease inhibitor* tersebut pada susunan asam amino Pro-Pro yaitu di posisi 19–20, dan pada susunan asam amino Lys-Ser di posisi 16-17 yang merupakan ikatan peptida reaktif. Adanya residu *cysteiny*, diketahui berperan dalam stabilisasi sisi aktif (Ferrason dkk., 1997).

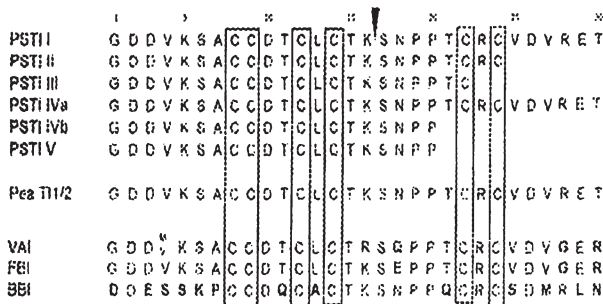


Figure 3. Comparison of the N-terminal sequences of PSTI I–V (Pea Seeds Trypsin Inhibitor I–V) with those of legume BBI (Bowman-Birk Inhibitors) from *Pisum abyssinicum* (T1/2 inhibitors), *Vicia angustifolia* (VAI), *Vicia faba* (FBI). Arrow indicates the trypsin reactive sites. The conserved cysteines are enclosed in boxes. (Ferrason dkk., 1997).

Isolasi TI biji turi secara bertahap menggunakan kromatografi kolom dengan prinsip *affinity*, pertukaran ion dan berat molekul (filtrasi gel) juga telah dilakukan oleh Hilyati dan Sri-Benti (1991). Pada tahap awal ekstrak TI dimasukkan kedalam kolom yang berisi *trypsin-sepharose 4B*. TI akan tertahan dalam kolom dan selanjutnya dielusi dengan larutan urea. Fraksi-fraksi aktif dari kolom tersebut dipekatkan dan diinjeksikan kedalam kolom *DEAE-cellulose* yang dielusi dengan larutan NaCl. Fraksi aktif dikumpulkan, dipekatkan, dan dimurnikan berdasarkan ukuran molekulnya menggunakan kolom *sephadex G-50*.

Dari ketiga tahap proses isolasi tersebut diperoleh volume fraksi aktif berturut-turut 45, 105 dan 125 ml dengan nilai aktivitas TI berturut-turut 1,037; 1,379; dan 7,340 TIU/g. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemisahan menggunakan kolom *sephadex G-50* dapat meningkatkan kemurnian TI yang diperoleh. Kadar TI dalam biji diperhitungkan dari perbandingan berat fraksi aktif dari kolom *sephadex G-50* yang dikeringkan menggunakan *freeze dryer* dengan berat biji kering awal yang diekstraksi (Hilyati dan Sri-Benti, 1991)

Pemurniaan TI biji *Dimorphandra mollis* (*Leguminosae-Mimosoideae*) dengan cara kromatografi secara bertahap juga telah dilakukan oleh Marcedo dkk. (2000). Hasil pemurnian setiap tahap tersebut terlihat pada Tabel 2.

Table 2. Results of a typical purification of TI from *Dimorphandra mollis*

	Total protein (mg)	Total activity (UI)	Specific activity (UI/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
- Saline extraction	220350	4200	0.019	1.0	100.0
- Amonium sulfat Precipitation	125000	3020	0.024	1.32	71.9
- Sephadex G-75	5217	1980	0.038	2.0	47.1
- DEAE Sepharose	2520	980	0.64	33.7	23.3
- Sepharose Trypsin	450	450	1.0	52.6	10.7
- HPLC	145	320	2.21	116.2	7.6

Macredo dkk. (2000)

Pengujian karakteristik TI dari pemurnian tersebut menunjukkan bahwa TI dari biji *Dimorphandra mollis* memiliki pH isoelektrik 5,6 – 5,9, dan memiliki sisi reaktif arginin. Selain itu dari pengamatan 26 residu asam amino dari NH_2 terminal diketahui bahwa TI ini memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan KTI (Marcedo dkk., 2000).

Tipe TI

Dua kelompok utama *trypsin inhibitor*/TI pada kedelai, yaitu *Kunitz* (KTI) dan *Bowman-Birk inhibitor* (BBI) berturut-turut kadarnya 20 dan 2-3 mg/g tepung kedelai (Frokier dkk., 1997). Karakteristik yang penting dari kedua inhibitor tersebut adalah sebagai berikut.

KTI mempunyai berat molekul 21 kD dengan dua ikatan disulfida (Kunitz, 1947 dalam Reseland dkk., 1996), sedangkan BBI mempunyai berat molekul 8 kD yang mengandung asam amino cysteine lebih tinggi dengan

membentuk 7 ikatan disulfida (Birk, 1987 dalam Reseland dkk., 1996). Struktur KTI dan BBI terlihat pada Gambar 4 dan 5. Gambar tersebut memperlihatkan bahwa struktur KTI disusun oleh 180 residu asam amino dan distabilkan dengan dua ikatan kovalen disulfida, sedangkan BBI disusun oleh 70 residu asam amino dan distabilkan dengan 7 ikatan kovalen disulfida (Birk, 1989; Frokier, dkk., 1997).

Perbedaan struktur pada kedua jenis inhibitor tersebut menyebabkan perbedaan sifat stabilitasnya terhadap panas. KTI mudah dinaktifkan oleh panas atau tidak stabil terhadap pemanasan (Birk, 1989), sedangkan BBI sangat stabil terhadap pemanasan (Frokier dkk., 1997). Rouhana dkk. (1996) mengemukakan bahwa BBI memiliki struktur yang lebih kompak dan kokoh (*rigid*), serta memiliki ikatan disulfida yang lebih banyak, sehingga BBI memiliki stabilitas terhadap panas lebih besar daripada KTI.

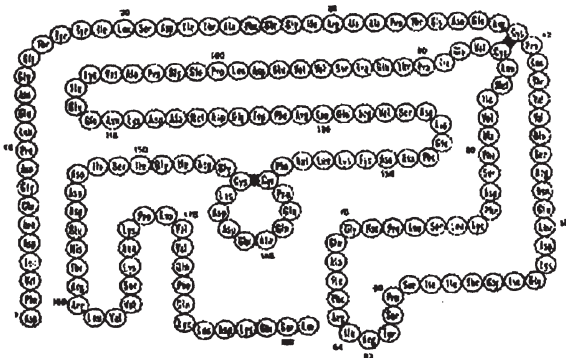


Figure 4. Covalent structure of Kunitz soybean trypsin inhibitor from Koide and Ikenaka, 1973 (Birk, 1989).

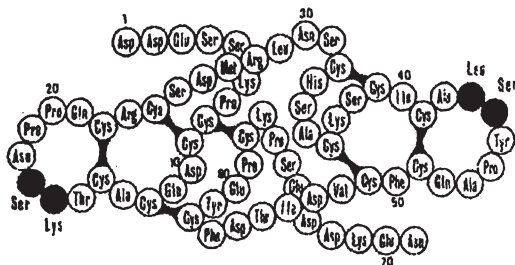


Figure 5. Covalent structure of Bowman-Birk soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor (BBI). Residues at the two reactive sites are shown as solid black circles from Odani and Ikenaka, 1973 (Birk, 1989).

Perlakuan panas biasanya digunakan untuk menginaktifkan TI. Dari pengamatan menggunakan DSC (*Differential Scanning Calorimetri*) yang menunjukkan suhu pada saat mulai terjadi perubahan bahan (*change of state transition temperature* = T_{max}) diketahui bahwa KTI memiliki T_{max} 61,1 °C. Sedangkan TI dari kedelai *defatted* memiliki T_{max} 58,2 °C dan pada suhu tersebut terjadi penurunan kelarutan nitrogen (NSI) sebesar 80–90 % serta penurunan aktivitas TI sebesar 90 % (Anderson, 1992).

BBI memiliki kestabilan terhadap panas yang lebih tinggi daripada KTI. Pemanasan BBI pada suhu 80 °C selama 1 jam kemudian dilakukan pendinginan menunjukkan bahwa

tidak terjadi perubahan konformasi dibandingkan struktur alaminya (*native structure*) dan 96 % aktivitasnya masih ada. Hal tersebut menunjukkan BBI tetap stabil pada suhu 80 °C selama 1 jam dan bersifat reversibel jika dilakukan pendinginan (Wu dan Sessa, 1994). Birk (1961) dalam Wu dan Sessa (1994) juga mengemukakan bahwa BBI tetap memiliki aktivitas anti proteolitik sesudah dipanaskan suhu 100 °C.

BBI ditemukan pada semua jenis kacang-kacangan. Pada umumnya *inhibitor* ini mengandung 60–85 residu asam amino yang membentuk rantai polipeptida tunggal (*single polypeptide chain*), dan memberikan BM sekitar 8000 Da (Norioka dan Ikenaka, 1983 dalam Desphande, 2002). Namun, beberapa kelompok *inhibitor* ini menunjukkan asosiasi yang kuat dalam larutan, sehingga membentuk BM yang lebih besar (dimer atau trimer) tanpa adanya agensia pendenaturasi, seperti urea (Birk 1985 dalam Desphande, 2002). Komposisi asam amino BBI menunjukkan kandungan Cys yang sangat tinggi (14 residu) dan semuanya membentuk ikatan disulfida. *Inhibitor* ini juga mengandung Asp, Asn, dan Ser yang relatif tinggi. Sedangkan Met, Val, Tyr, dan Phe sedikit, dan pada umumnya tidak mengandung Trp (Mossor dkk., 1984 dalam Desphande, 2002). Tingkat homologi yang tinggi dari inhibitor ini ditunjukkan antara setengah urutan pertama (*the first half of the sequence*) residu asam amino yang mengandung sisi reaktif dan *the second half of the sequence* yang mengandung sisi reaktif kedua (Wilson, 1981 dalam Desphande, 2002).

KTI hanya ditemukan pada beberapa jenis kacang-kacangan, yaitu kedelai dan kacang hijau. Pada kedelai inhibitor ini membentuk *single polypeptide chain* (Desphande, 2002). Proteinase inhibitor tipe ini mengandung 170 sampai 200 residu asam amino dengan BM sekitar 20000 Da (Liener, 1983 dalam Desphande, 2002). Kandungan Cys inhibitor ini lebih sedikit dibandingkan BBI dan membentuk dua ikatan disulfida, namun inhibitor ini mengandung Trp (Odani dan Ikenaka, 1972 dalam Desphande 2002).

Proteinase inhibitor dapat diklasifikasikan berdasarkan sisi reaktifnya. KTI dikelompokkan dalam *Arg inhibitor* (sisi reaktifnya Arg), sedangkan BBI dikelompokkan tipe Lys (sisi reaktif Lys). Modifikasi pada sisi reaktif akan mengakibatkan *inhibitor* kehilangan aktivitasnya (Weder, 1986 dalam Desphande, 2002). Kedua *inhibitor* tersebut mampu menghambat aktivitas enzim tripsin. Tripsin mengkatalisis hidrolisis protein dan polipeptida menjadi asam amino. Hidrolisis ini terjadi pada ikatan karboksil asam amino lisin dan arginin (Mazur dan Harrow, 1971 dalam Aisjah-Girindra, 1979).

Sisi reaktif *inhibitor* didefinisikan sebagai bagian dari molekul *inhibitor* yang mengambil bagian dalam terjadinya kontak dengan pusat aktivitas proteinase sehingga terbentuk kompleks *proteinase-inhibitor* (Birk, 1989). Residu asam amino penyusun sisi aktif diikat oleh ikatan peptida yang disebut ikatan peptida sisi aktif. Ikatan peptida ini mudah mengalami hidrolisis selama pembentukan kompleks *inhibitor-proteinase*. Namun sisi aktif tersebut dipertahankan oleh ikatan disulfida, sehingga

konformasinya tidak mengalami perubahan akibat hidrolisis. Hal tersebut ditunjukkan pada Gambar 6.

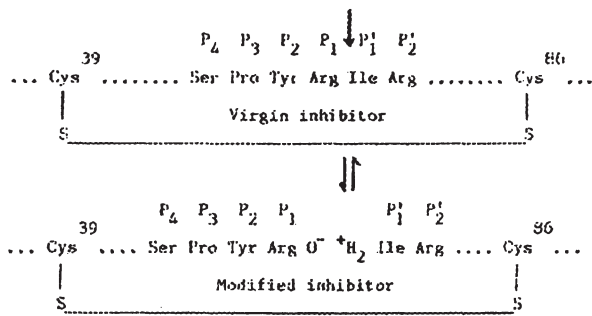


Figure 6. Schematic diagram of the ractive site of Kunitz soybean trypsin inhibitor. Virgin inhibitor has all of its peptide bonds intact. Modified inhibitor has reactive site peptide bond hydrolyzed from Laskowski, 1986 (Birk, 1989).

Mekanisme penghambatan TI

TI merupakan senyawa penghambat enzim tripsin dengan sifat penghambatan kompetitif (Birk, 1989). Kompleks enzim-inhibitor yang terbentuk pada penghambatan tripsin oleh TI sangat stabil, dan aktivitas enzim dapat dihambat dengan sempurna (Laskowski, 1986 dalam Birk, 1989). Pengamatan menggunakan *X-ray crystallographic* dan NMR menunjukkan bahwa kompleks enzim-inhibitor melibatkan 10-15 residu asam amino pada inhibitor yang kontak dengan enzim (Mallory dan Travis, 1975 dalam Birk, 1989). Rasio KTI terhadap enzim tripsin sehingga terjadi penghambatan adalah 1:1 molar ratio (Froquier dkk., 1997), sedangkan rasio BBI : enzim protease (tripsin/khimotripsin) adalah 1: 2 atau dapat dikemukakan bahwa satu molekul *inhibitor* dapat mengikat/menghambat dua molekul tripsin/khimotripsin (Birk, 1989).

Pengikatan *protease inhibitor* dengan enzim diawali terjadi pada sisi aktif yang sama dengan apabila enzim mengikat substrat protein. Sebagai contoh, tripsin mengikat inhibitor pada residu arginin dan lisin melalui muatan positif pada gugus amino/guanidine yang berinteraksi dengan muatan negatif pada residu asam amino aspartat, interaksi ini terjadi di bagian bawah dari kantong yang merupakan bagian spesifik enzim, dan oleh ikatan-ikatan hidrogen yang terbentuk antar ikatan-ikatan peptida disepanjang rantai peptida pada bagian sisi aktif. *Inhibitor* akan mengikat sangat kuat ($K_i = 10^{-9}$ sampai 10^{-11} M) dan tidak dapat dihidrolisis karena konformasi *inhibitor* pada sisi pengikatannya sangat tidak leluasa (terbatas) (Whitaker, 1997).

Kondisi keasaman sangat mempengaruhi ikatan enzim-*inhibitor*. Apabila pH turun dari pH 8 ke pH 3-4, maka ikatan antara kompleks tersebut menjadi lemah, dan hidrolisis dapat terjadi secara lambat, seperti terlihat pada Gambar 7. E.I merupakan bentuk kompleks dengan ikatan yang tidak kuat ($K_i = 10^{-2}$ sampai 10^{-5} M) yang ditunjukkan pada tahap 1. E-I adalah bentuk kompleks dengan ikatan yang kuat ($K_i = 10^{-9}$ sampai 10^{-11} M) dan terbentuk pada pH 8 (tahap 2). Sedangkan E.I* adalah *modified inhibitor* yang terjadi akibat hidrolisis ikatan peptida pada sisi

pengikatan secara lambat dan terjadi pada pH 3-4 (Whitaker, 1997).

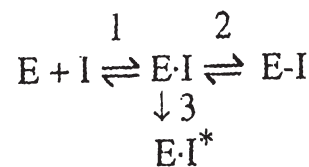


Figure 7. Enzyme-inhibitor complex (E=enzyme; I=inhibitor, I*= modified inhibitor (Whitaker, 1997)

Bentuk kompleks enzim tripsin dengan TI kedele (KTI) pada kondisi E.I (Gambar 7) dapat dilakukan kristalisasi dan diamati pada resolusi 5 Å. Dari pengamatan tersebut diketahui bahwa daerah kontak antara dua protein, yaitu KTI dengan BM 20.400 D dan tripsin dengan BM 24.000 melibatkan residu asam amino Asp1, Asn13, Pro60, Ser61, Tyr62, Arg63, Ile64, Arg65, dan His71 pada rantai pelipatan KTI yang kontak dengan residu asam amino Ser 195, His57, Gly193, Asp189, Ser214, dan Gly216 pada tripsin. Interaksi yang terjadi pada pembentukan kompleks tersebut mengakibatkan tripsin nampak sama dengan substrat polipeptida dalam kondisi normal. (Whitaker, 1997).

Sifat Anti Gizi TI

Biji kacang-kacangan telah diketahui merupakan sumber protease inhibitor yang dapat menghambat protease dari pankreas hewan tingkat tinggi, sehingga dapat mengurangi daya cerna protein dan adsorpsi, menginduksi terjadinya *pancreatic hypertrophy*, dan menekan pertumbuhan (Liener dan Kakade, 1980 dalam Ferrasson dkk., 1997). Rackis dan Gumbmann (1981) telah menyimpulkan bahwa binatang yang diberi pakan kedele mentah menyebabkan pertumbuhan terhambat, menghambat proteolisis, menurunkan daya cerna protein, meningkatkan kebutuhan asam amino S, memperbesar pankreas, meningkatkan sintesis protein, phospholipid dan asam nukleat pankreas, menstimulasi sekresi enzim pankreas, menstimulasi sekresi garam empedu, dan menurunkan metabolisme energi. Hal tersebut menjadikan TI dikelompokkan dalam senyawa anti gizi.

Bukti TI kedele merupakan senyawa anti gizi telah ditunjukkan oleh Borchers yang menerangkan bahwa kompleks *inhibitor* – enzim yang terbentuk tidak dapat didegradasi dan direabsorpsi, sehingga tubuh akan kekurangan asam amino endogenous khususnya asam amino S karena protease pankreas mengandung asam amino S yang tinggi. Selain itu kekurangan asam amino juga disebabkan oleh proteolisis dari *dietary protein* tidak sempurna dengan adanya *inhibitor*. Hal tersebut menyebabkan pertumbuhan terhambat. Apabila dalam diet kedele ditambahkan asam amino S ternyata dapat memperbaiki kecepatan pertumbuhan (Borchers, 1961 dalam Desphande, 2002).

TI menstimulasi biosintesis enzim-enzim pankreas, sehingga meningkatkan kebutuhan asam-asam amino, mendorong transformasi Met menjadi Cys dalam pankreas. Peningkatan kebutuhan asam amino S tidak dapat dikompensasikan dari diet protein karena protein

kacang-kacangan defisiensi asam amino S. Peningkatkan sekresi enzim-enzim pankreas menyebabkan *pancreatic hypertrophy* pada binatang yang diberi diet kacang-kacangan (Desphande, 2002). Respon biologis beberapa jenis binatang terhadap pakan kedelai mentah ternyata berbeda-beda, seperti terlihat pada Tabel 3.

Table 3. Biological effects of raw soybean meal in various animals.

Animals	Growth inhibition	Pancreatic hypertrophy	Pancreatic enzyme secretion
Rat	+	+	+
Chick	+	+	+
Pig	+	+	*
Sheep	+	-	*
Dog	-	-	**

+ = growth inhibition and pancreatic hypertrophy and hypersecretion. - = no effect. * = hyposecretion; ** = hyposecretion initially, normal after continued feeding. (Rackis and Gumbmann, 1981).

Pada Tabel 3 tersebut terlihat bahwa tidak semua jenis hewan yang diuji dengan pemberian pakan tepung kedelai mentah mengalami *pancreatic hypertrophy* (Rackis dan Gumbmann, 1981). Liener (1977) dalam Desphande (2002) mengemukakan bahwa terdapat hubungan antara ukuran pankreas dengan kemungkinan terjadinya *pancreatic hypertrophy* yang diinduksi oleh tepung kedelai mentah dan TI. *Pancreatic hypertrophy* akibat pemberian pakan tepung kedelai mentah hanya terjadi pada hewan yang memiliki berat pankreas lebih dari 0,3 % dari total berat tubuhnya. Manusia memiliki berat pankreas hanya 0,09 sampai 0,12 % dari berat tubuhnya, sehingga kemungkinan TI tidak menyebabkan *pancreatic hypertrophy* meskipun pengaruhnya belum dibuktikan (Desphande, 2002).

Obat Anti Diabetik

Pada saat ini prevalensi terhadap penyakit degeneratif khususnya diabetes semakin tinggi. Penderita penyakit diabetes di Indonesia mencapai 1,4 - 1,6 % dan diperkirakan akan semakin meningkat di masa mendatang (Waspadji, 1988 dalam Zuheid-Noor dan Rheizy-Fitriana, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa biaya pengobatan penyakit tersebut juga akan meningkat dan penderita diabetes dapat mengalami berbagai komplikasi, penurunan produktivitas kerja, serta aktivitas lainnya, bahkan kematian. Penderita diabetes akan mengalami komplikasi berupa perubahan pembuluh darah sebagai akibat dari hiperglisemia dan hiperlipidemia yang kronis. Atherosklerosis yang merupakan salah satu keadaan perubahan pembuluh darah akan terjadi lebih awal pada penderita diabetes dibandingkan nondiabetes (Burtis dkk., 1988). Manifestasi klinis dari atherosklerosis terutama terjadi pada pembuluh darah arteri jantung yang menyebabkan *coronary artery disease* (CAD) dan pembuluh darah otak yang menyebabkan *cerebrovascular*

disease (Beckman dkk., 2002). CAD menyebabkan kondisi yang semakin buruk dan kematian pada pasien diabetes. Tingkat kematian akibat CAD meningkat 2 – 4 kali pada penderita diabetes. Diabetes berpengaruh terhadap sirkulasi darah pada *cerebrovascular* yang dapat menyebabkan stroke. Resiko stroke akan meningkat 150 sampai 400 % pada pasien diabetes (Beckman dkk., 2002).

Pada umumnya OAD mengandung senyawa *tolbutamide* atau *sulfonylurea* yang dapat menginduksi sekresi insulin sehingga membantu menurunkan level gula darah (Kaplan dan Szabo, 1989). Pada penderita diabetes kadar glukosa puasa akan lebih dari 120 mg/dl, sedangkan pada orang normal sekitar 60 – 110 mg/dl. Level gula darah yang tinggi pada penderita diabetes bisa disebabkan oleh plasma insulin yang rendah pada penderita diabetes tipe II (*insulin-independent diabetics types*) atau plasma insulin hampir tidak tersedia pada penderita diabetes tipe I (*insulin-dependent diabetics types*). Terapi menggunakan OAD dapat memperbaiki kondisi penderita diabetes tipe II, sedangkan pada penderita diabetes tipe I tidak bisa sehingga membutuhkan injeksi insulin dari luar (Zapsalis dan Beck, 1986).

Saat ini obat hipoglisemik/obat anti diabetik (OAD) banyak tersedia, namun obat-obat tersebut bersifat perawatan, dan tidak untuk penyembuhan maupun pencegah komplikasi, sehingga harus diberikan secara kontinyu yang berakibat membosankan bagi penderita (Chase, 1979 dalam Zuheid-Noor dan Rheizy-Fitriana 2002). Selain itu pemberian OAD menimbulkan efek samping, yaitu penambahan berat badan penderita, mual di perut, dan diare (Burtis, 1988). Penemuan komponen bioaktif seperti TI dan penggunaannya untuk makanan fungsional diharapkan dapat mengatasi kelemahan OAD. Penderita diabetes akan lebih menikmati makanan yang dikonsumsi (dalam bentuk makanan fungsional) tanpa khawatir akan terjadi peningkatan gula darah.

Penjajagan TI untuk Terapi Diabetes dan Kemampuan Memacu Sekresi Enzim

Penelitian yang membuktikan bahwa TI kedelai dapat digunakan untuk terapi diabetes secara *in vivo* memang belum ada, namun penggunaan *di-(2s,3s)-2-amino-3-methyl-pentanoic-1,3-thiazolidine fumarate/DP IV inhibitor* telah terbukti dapat menormalkan level insulin pada tikus yang diinduksi diabetes. TI kedelai dan *di-(2s,3s)-2-amino-3-methyl-pentanoic-1,3-thiazolidine fumarate* merupakan *inhibitor* yang dikelompokkan dalam *serin protease inhibitor* (Whitaker, 1997 dan Pospisilik dkk., 2003). Kelompok *serin protease inhibitor* akan menghambat aktivitas enzim protease pada sisi aktifnya, yaitu asam amino serin (Liu, 1999).

Penelitian yang dilakukan oleh Pospisilik dkk. (2003) tersebut menggunakan tikus model yang diinduksi diabetes dengan *streptozotocin* (STZ) dan diberi perlakuan DP IV inhibitor melalui mulut selama 1 minggu sebelum injeksi STZ (perlakuan pemberian awal) dan 1 minggu sesudah injeksi STZ (perlakuan pemberian akhir). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada perlakuan pemberian awal dapat mempertahankan dan pada perlakuan

pemberian akhir dapat meningkatkan jumlah β -cell melalui stimulasi *islet neogenesis*, dan regenerasi (dari deferensiasi sel prekursor) β -cell, dan/atau meningkatkan biosintesis insulin. Oleh karena itu beberapa parameter yang diamati, seperti kadar glukosa darah, *glucose tolerance*, dan kadar insulin plasma pada tikus diabetes yang diberi agensia ini mengalami perbaikan, seperti terlihat pada Gambar 8 dan 9.

Pada Gambar 8 terlihat hasil pengamatan *oral glucose tolerance test* (OGTT) (dilakukan 1 minggu setelah injeksi STZ) yang ditunjukkan dengan kadar glukosa darah dan plasma insulin. Kadar glukosa puasa pada tikus-perlakuan lebih rendah dari pada tanpa perlakuan. Respon glukosa pada pengamatan OGTT selama 120 menit menunjukkan penurunan sebesar 33 dan 20 % berturut-turut pada perlakuan awal dan akhir, yang bersamaan dengan peningkatan respon insulin sebesar 240 dan 45 %. Perlakuan yang diberikan ternyata juga meningkatkan sekresi insulin dan total insulin pankreas, seperti terlihat pada Gambar 9 (Pospisilik dkk., 2003).

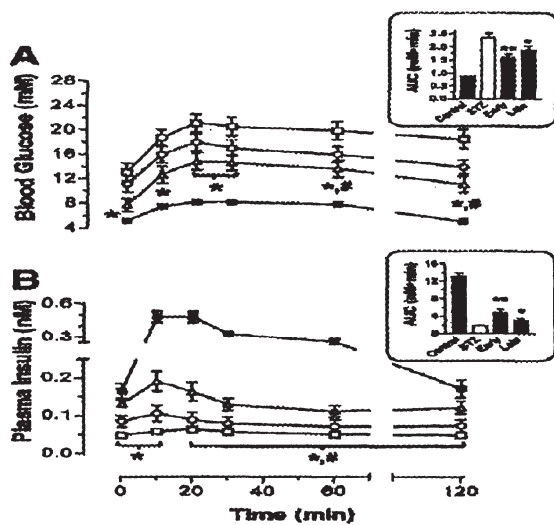


Figure 8. OGTT performed on Wistar rats ($n = 20$) exposed to a single high dose of STZ (50 mg/kg) and treated either with or without the DP IV inhibitor P 32/98 for 7 weeks. Blood glucose (A) dan plasma insulin (B) were measured during a 1 g/kg OGTT in control (solid squares) and STZ control (open squares) animals that were administered a 1 % cellulose solution and an early treatment group (open triangles; treatment initiated 1 week before STZ administration) and late treatment group (open circles; treatment initiated 1 week after STZ administration) that received 10 mg/kg P32/98 twice daily by oral gavage for 7 weeks after STZ administration. (Pospisilik dkk., 2003).

Mekanisme peningkatan respon insulin akibat pemberian *DP IV inhibitor* untuk terapi diabetes adalah terjadinya inaktivasi enzim *dipeptidyl peptidase IV*. Enzim ini bersifat mengurangi hormon *incretin* yang berperan pada pengembangan fungsi β -cell. Penghambatan enzim tersebut oleh DP IV inhibitor menyebabkan peningkatan level hormon *incretin*, yaitu GIP (*glucose dependent insulinotropic polypeptide*) dan GLP-1 (*glucagon-like*

peptide), sehingga terjadi peningkatan responsivitas β -cell terhadap glukosa, dan *insulin sensitivity* dan *glucose tolerance* (Pospisilik dkk., 2003).

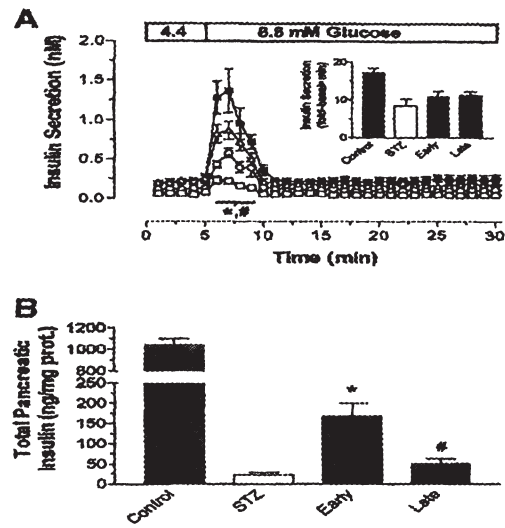


Figure 9. Insulin response to glucose (A) and insulin content (B) in pancreata isolated from Wistar rats ($n=20$) exposed to a single high dose of STZ (50 mg/kg) and treated either with or without the DP IV inhibitor P 32/98. (Pospisilik dkk., 2003)

Hasil penelitian tersebut membuka peluang kemungkinan penggunaan TI kedelai untuk terapi diabetes, karena *DP IV inhibitor* termasuk *inhibitor* dalam kelompok yang sama dengan TI yaitu *serin protease inhibitor* (Whitaker, 1997 Pospisilik dkk., 2003). Zuheid-Noor (1998) mengemukakan bahwa senyawa TI dapat menghambat metabolisme protein dengan membentuk kompleks tripsin-TI. Terbentuknya kompleks tersebut akan mengakibatkan terpacunya produksi enzim dan/atau hormon pankreatik, sehingga tidak menutup kemungkinan terjadi peningkatan produksi insulin sebagai salah satu hormon pankreatik yang diperlukan dalam metabolisme karbohidrat. Kemungkinan penggunaan TI kedelai untuk terapi diabetes juga didukung dari penelitian yang dilakukan oleh Henny-Krissetiana (2000). Penelitian ini menunjukkan bahwa berdasarkan pengujian secara *in vitro* melalui inkubasi pankreas tikus yang dibuat diabetes dengan ekstrak kasar TI ternyata menyebabkan peningkatan sekresi insulin oleh pankreas.

Penelitian yang menunjukkan penghambatan tripsin oleh TI sehingga menyebabkan peningkatan sekresi enzim dari pankreas telah dilakukan oleh Holm dkk. (1992). Penelitian tersebut menggunakan kedele yang diinstilasi secara *intraduodenal* pada manusia untuk mengetahui pengaruhnya terhadap sekresi proteinase pankreas (tripsin dan khimotripsin). Penelitian ini menunjukkan bahwa instilasi *raw soybean/RS* (kedele mentah) pada *duodenal* manusia menstimulasi sekresi proteinase pankreas. Konsentrasi total tripsin (bebas dan bentuk kompleks) meningkat dua sampai tiga kali dan total khimotripsin meningkat 3 – 4 kali dari nilai basal. Sedangkan aktivitas spesifik tripsin pada perlakuan RS lebih rendah (Holm dkk., 1992).

Aktivitas spesifik yang rendah pada sampel RS, disebabkan instilasi RS mengakibatkan adanya protease inhibitor (KTI) dalam cairan duodenal seperti terlihat pada Tabel 4. Hal tersebut menimbulkan terbentuknya kompleks enzim-*inhibitor* yang menurunkan aktivitas enzim. Banyaknya kompleks yang terbentuk sekitar 50 – 80 % dari total konsentrasi tripsin dalam cairan *duodenal* (Holm dkk., 1992).

Table 4. Concentration of Kunitz soybean trypsin inhibitor in duodenal juice after instillation of raw soybean (RS) or saline¹ Holm dkk. (1992).

Instillation (meal/time)	Analyzed ²	Calculated ¹
	<i>g/L</i>	
RS, 10 min	0.56 ± 0.18	1.35 ± 0.20
RS, 20 min	1.68 ± 0.09	1.34 ± 0.23
RS, 30 min	1.70 ± 0.07	1.41 ± 0.21
RS, 40 min	1.30 ± 0.30	1.26 ± 0.33
RS, 50 min	1.66 ± 0.06	1.18 ± 0.38
RS, 60 min	1.74 ± 0.09	1.13 ± 0.34
saline, 70 min	1.28 ± 0.17	
Saline, 80 min	0.76 ± 0.18	
Saline, 90 min	0.40 ± 0.11	

¹Values are means ± SEM, n = 5.

²By rocket immunoelectrophoresis.

³According to intraduodenal dilution (Holm et al. 1988a).

Fraksi KTI maupun BBI dari TI kedelai juga telah terbukti dapat menghambat aktivitas enzim yang disekresikan oleh pankreas, seperti yang telah dilakukan oleh Reseland dkk. (1996). Penelitian tersebut menguji kemampuan KTI atau BBI dalam memstimulasi enzim tripsin dan khimotripsin dari pankreas pada 6 orang sukarelawan wanita yang sehat.

Peningkatan sekresi enzim tripsin dan chymotripsin sesudah instilasi KTI dan BBI ditunjukkan pada Gambar 10 dan 11. Pada dasarnya kedua tipe protease inhibitor tersebut dapat meningkatkan sekresi protease pankreas, namun pada KTI tidak diikuti dengan perubahan plasma *Cholecystokinin* (CCK) sedangkan pada BBI diikuti dengan peningkatan plasma CCK. Adanya peningkatan plasma CCK tersebut kemungkinan akan meningkatkan sekresi pankreas termasuk hormon insulin yang sangat penting dalam metabolisme karbohidrat. Percobaan secara *in vivo* juga telah menunjukkan bahwa penghambatan enzim tripsin dalam usus dua belas jari (*duodenum*) pada tikus akan meningkatkan plasma CCK yang selanjutnya meningkatkan sekresi enzim/hormon pankreas secara paralel (Liener dkk., 1988 dalam Reseland dkk., 1996). Ganong, 1981 juga mengemukakan bahwa CCK merupakan hormon intestinal yang memiliki kemampuan menstimulasi sekresi insulin.

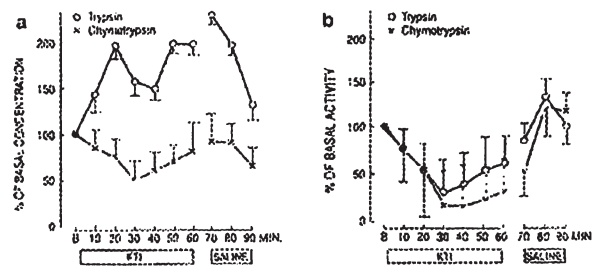


Figure 10. Enzyme concentrations and activities in human duodenal juice during intraduodenal instillation (10 – 60 min) of 100 ml of KTI (1.8 g/L). Illustrated as percentages of basal values (B); 70 – 90 min represent the terminating saline period. (Reseland dkk., 1996)

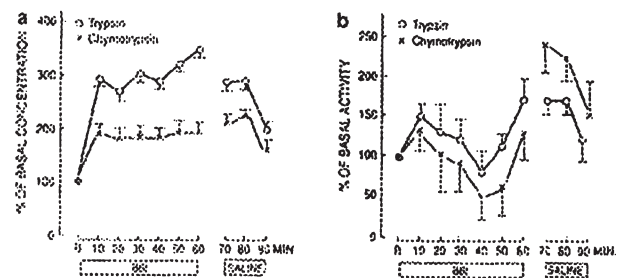


Figure 11. Enzyme concentrations and activities in human duodenal juice during intraduodenal instillation (10 – 60 min) of 100 ml of BBI (0.6 g/L). Illustrated as percentages of basal values (B); 70 – 90 min represent the terminating saline period. (Reseland dkk., 1996)

Kesimpulan

TI kacang-kacangan telah diketahui terdiri dari dua kelompok yaitu KTI dan BBI. Pemisahan lebih lanjut dari TI dengan kromatografi secara bertahap menghasilkan beberapa fraksi yang memiliki kesamaan susunan asam amino, sisi aktif dan ikatan disulfida sehingga masih bisa dikelompokkan dalam KTI atau BBI. Sifat anti gizi TI yang menyebabkan *pancreatic hypertrophy* masih perlu diteliti lebih lanjut, karena hanya terbukti pada hewan dengan berat pankreas lebih dari 0,3 % dari total berat tubuhnya.

Penelitian terakhir menyebutkan bahwa TI dapat dikelompokkan dalam senyawa *phytochemical*. BBI telah terbukti memiliki kemampuan sebagai *anti-carcinogenic*. TI juga merupakan senyawa yang bersifat hipoglisemik melalui mekanisme pembentukan kompleks TI-tripsin dalam pencernaan. Pembentukan kompleks tersebut memacu sekresi enzim maupun hormon pankreatik termasuk insulin. Selain itu juga diikuti dengan peningkatan sekresi hormon CCK yang merupakan hormon intestinal pemacu sekresi insulin. TI memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai komponen dalam makanan fungsional bagi penderita diabetes tipe 2 (IIDM)

Ucapan Terima kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada PT Indofood Sukses Makmur *bogasari flour mills* yang telah

memberikan bantuan dana untuk membantu penelitian tentang pengembangan tepung terigu bagi penderita diabetes dengan memanfaatkan TI.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisjah-Girindra, 1979. Faktor anti tripsin kedelai. Disertasi, IPB, Bogor.
- Anderson, R.L., 1992. Effects of steaming on soybean protein and trypsin inhibitors. *JAOCS* 69:1170 – 1176.
- Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, 2002. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287: 2570-2574.
- Birk, Y., 1989. Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition *dalam Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*, Huisman, j., van der Poel, T.F.B., dan Liener, I.E. (eds). Pudoc Wageningen
- Boisen, S., 1989. Comparative studies on trypsin inhibitors in legumes and cereal *dalam Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*, Huisman, j., van der Poel, T.F.B., dan Liener, I.E. (eds). Pudoc Wageningen.
- Burtis, G., J. Davis, and S. Martin, 1988. Applied nutrition and diet therapy. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Desphande, S.S., 2002. Handbook of food toxicology. Marcel Dekker Inc, New York.
- Ferrason, E., L. Quillien, and J. Gueguen, 1997. Proteinase inhibitors from pea seeds: purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 45:127-131.
- Frozier, H., T.M.R. Jorgensen, A. Rosendal, M.C. Tonsgaard, and V. Barkholt, 1997. Antinutritional and allergenic proteins *dalam Antinutrient and phytochemical in food*, Shahidi, F. (ed). American Chemical Society, Washington DC.
- Ganong, 1981. Review of Medical Physiologi, diterjemahkan oleh Adji Dharma, Buku Kedokteran, Universitas Indonesia.
- Henny-Krissetiana, 2000. In vitro bioassay pancreas tikus yang dibuat diabetic dalam berbagai medium. Thesis S-2 Pasca Sarjana, UGM, Yogyakarta.
- Hilyati dan Sri-Benti, 1991. Kerentanan tripsin-inhibitor biji turi terhadap panas. *Agritech* Vol 11. No 1: 2 – 9.
- Holm, H., J.E. Reseland, L.I. Thorsen, A. Flatmark, and L.E. Hanssen, 1992. Raw soybean stimulate human pancreatic proteinase secretion. *J. Nutr.* 122: 1407 – 1416.
- Kaplan, A. and L.L. Szabo, 1989. Clinical chemistry: interpretation and techniques. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Liu, K., 1999. Soybeans: Chemistry, technology, and utilization. Aspen Publ., Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Losso, J.N., 2002. Preventing degenerative diseases by anti-angiogenic functional foods. *Food Tech.* Vol. 56, No. 6: 78-88.
- Macedo, M.L.R., D.G.G. deMatos, O.L.T. Machado, S. Marangoni, and J. C. Novello, 2000. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry* 54:553-558.
- Pospisilik, J.A., J. Martin, T. Doty, J.A. Ehses, N. Pamir, F.C.Lynn, S. Piteau, H.U. Demuth, C.H.S. McIntosh, and R.A. Pederson, 2003. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates β -cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52: 741-750.
- Rackis, J.J. and M.R. Gumbmann, 1981. Protease inhibitors: Physiological properties and nutritional significance *dalam Antinutrients and natural toxicants in foods*, Ory, R.L. (ed). Food and Nutrition Press, Inc., Westport, Connecticut.
- Reseland, J.E, H. Holm, M.B. Jacobsen, T.G. Jenssen, and L.E. Hanssen, 1996. Proteinase inhibitor induced selective stimulation of human trypsin and chymotrypsin secretion. *J. Nutr.* 126:634-642.
- Rouhana, A., J.A. Niessen, U. Cogan, and H. Frozier, 1996. Heat inactivation kinetics of trypsin inhibitors during high temperature short time processing of soymilk. *J. Food Sci.* 61:265-269.
- Saini, H.S., 1989. Activity and thermal inactivation of protease inhibitors in grain legumes *dalam Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*, Huisman, j., van der Poel, T.F.B., dan Liener, I.E. (eds). Pudoc Wageningen
- Su, G. and K.C. Chang, 2002. Trypsin inhibitor activity in vitro digestibility and sensory quality of meat-like yuba products as affected by processing. *J. Food Sci.* 67:1260-1266.
- Whitaker, J.R., 1997. Protease and alpha-amilase inhibitors of higher plants *in Antinutrients and phytochemicals in food*, Shahidi, F. (ed). American Chem. Society, Washington, DC.
- Wu, Y.V. and D. J. Sessa, 1994. Conformation of Bowman-Birk inhibitor. *J. Agric. Food Chem* 42: 2136 – 2138
- Zapsalis, C. and R.A. Beck, 1986. Food Chemistry and nutritional biochemistry. Macmillan Publ. Co., New York
- Zuheid-Noor, Y. Marsono, dan Mary-Astuti, 2000. Sifat hipoglisemik komponen kedelai. Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan Vol II PATPI, Surabaya.
- Zuheid-Noor dan Rheizy-Fitriana, 2002. Penjajagan kacang merah sebagai komponen makanan fungsional bagi penderita diabetes (lidm). Prosiding Seminar Nasional PATPI, Malang.