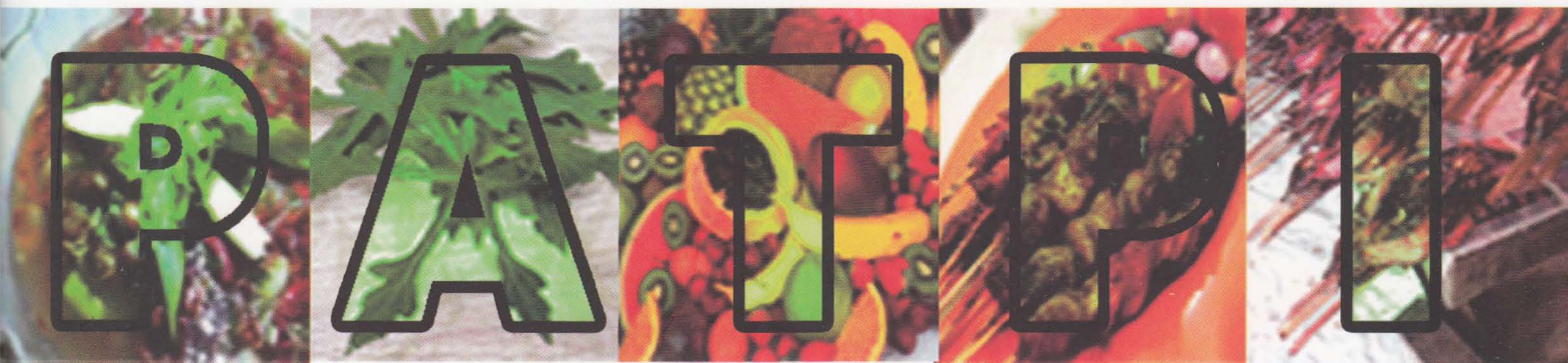


PROSIDING

SEMINAR NASIONAL

Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia



**“Peran Teknologi dalam Pengembangan
Pangan yang Aman, Bermutu dan
Terjangkau bagi Masyarakat”**

15 – 17 September 2011

Aryaduta Hotel, Manado, Sulawesi Utara

Diselenggarakan oleh:



Editors :

Dr. Roike I. Montolalu
Dr. Nuri Andarwulan
Prof. Dr. F. G. Ijong
Dedie Tooy, Ph.D
Dr. G. S. S. Djarkasi
Dr. Feny Mentang
Daisy M. Makapedua, Ph.D

Bekerjasama dengan:



Program Studi ILMU PANGAN
Program PASCASARJANA
Universitas Sam Ratulangi

Didukung oleh:



FOODREVIEW.
INDONESIA

Daya Inhibisi Ekstrak Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap Enzim Alfa-Amilase, Alfa-Glukosidase dan Lipase secara *In Vitro*

(Inhibition of α -amylase, α -glucosidase and lipase in vitro by roselle extracts)

Endang Prangdimurti, Ilul Urifah, dan Fransisca R. Zakaria

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan FATETA IPB

Email : prangdimurti@ipb.ac.id

ABSTRACT

Obesity is caused as the results of an imbalance between energy intake and expenditure. Moreover, obesity is strong risk factor for various diseases, such as hypertension, arteriosclerosis, and diabetes mellitus. The aim of the present study was to assess the ability of roselle water extracts (RWEs) to inhibit lipase, α -glucosidase, and α -amylase in vitro activity, and the effect of pH digestion on the inhibitory activities. Fresh roselle flower was extracted by aquadest at 70, 85 and 100°C for 15 and 30 minutes. Results showed that RWEs without pH treatment had more than 80% inhibitory activity for lipase, α -glucosidase and α -amylase. But, RWEs with pH treatment mimic to pH of gastrointestinal tract, i.e roselle extracts was adjusted to pH 6,8 after reduced to pH 2 for 30 minutes previously, had no effect on α -glucosidase and slight inhibition on pancreatic lipase (3-41%), and pancreatic α -amylase (9-40%) activity. RWEs was suggested had an inhibitory activity on salivary α -amylase. Based on its strong α -amylase inhibitory RWEs appears to be a potential functional food for delimitate energy intake.

Keywords: roselle, lipase, α -glucosidase, α -amylase, inhibitory activity

PENDAHULUAN

Menurut WHO (2003), obesitas telah menjadi epidemi global dan menjadi problem kesehatan yang harus segera diatasi sebab orang yang mengalami obesitas memiliki resiko tinggi terkena berbagai penyakit kronis seperti penyakit hipertensi, hiperlipidemia, arteriosklerosis dan diabetes. Obesitas disebabkan oleh ketidakseimbangan antara energi yang masuk dengan energi yang digunakan. Energi yang masuk terutama berasal dari lemak dan karbohidrat yang dapat dicerna. Oleh karena itu obesitas dapat dicegah dengan melakukan pembatasan asupan kalori karbohidrat dan lemak. Salah satu alternatifnya yaitu dengan mengonsumsi pangan yang memiliki komponen bioaktif yang dapat menghambat kerja enzim pemecah karbohidrat (α -amilase, α -glukosidase) dan lemak (lipase) pada saat makan.

Minuman dari kelopak bunga rosella dipercaya memiliki berbagai khasiat kesehatan, bahkan diklaim dapat mencegah obesitas. Hal ini diduga terkait dengan kemampuan ekstrak metanol rosela kering dalam menghambat kerja enzim α -amilase secara in vitro hingga 100%. (Hansawasdi *et al*, 2000). Namun hal tersebut perlu didukung oleh data aktivitas inhibisinya apabila ekstrak telah mencapai kondisi usus halus. Oleh karena itu dalam penelitian ini diamati pengaruh perubahan pH selama proses pencernaan terhadap aktivitas inhibisi enzim.

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari pengaruh kondisi ekstraksi dan kondisi pencernaan in vitro terhadap kemampuan inhibisi enzim α -amilase, α -glukosidase dan lipase, dari ekstrak rosela.

METODOLOGI**Bahan dan Alat**

Bahan utama yang digunakan antara lain kelopak bunga rosela segar, enzim alfa amilase dari *Bacillus* sp (Sigma A-6380), alfa amilase dari pankreas babi (Sigma A-3176), alfa glukosidase (Sigma G-5003), dan lipase dari pankreas babi (Sigma L-3126), *p*-nitrofenil laurat (*p*NP laurat), *p*-nitrophenyl- α -D- glukofiranos, pati (soluble starch), acarbose, asam dinitrosalisilat (DNS).

Peralatan utama yang digunakan yaitu penangas air bergoyang (shaker waterbath), sentrifus, dan spektrofotometer.

Pembuatan ekstrak

Kelopak bunga rosella diekstraksi dengan akuades (1:3) pada suhu 70° C, 85° C, 100° C masing-masing selama 15 dan 30 menit dengan menggunakan *shaker waterbath*. Ekstrak-ekstrak yang diperoleh lalu ditetapkan hingga 230 ml dengan akuades, kemudian diukur pH, total asam tertitrisasi (TAT) dan kadar total fenolnya.

Pengujian pengaruh pH saluran pencernaan terhadap daya inhibisi enzim

Pengujian daya inhibisi enzim dilakukan pada 2 macam kondisi pH, yakni pH ekstrak awal, dan pada pH 6,8 setelah terlebih dahulu didiamkan 30 menit pada pH 2 (simulasi kondisi pencernaan).

Uji inhibisi enzim lipase secara in vitro

Pengujian dilakukan mengikuti prosedur Mc Dougall GJ *et al*. (2008). Lipase dilarutkan dalam akuades dingin (10mg/ml). Untuk penentuan aktivitas secara in vitro digunakan Tris bufer pH 8,2 100 mM dan *p*-nitrofenil laurat (*p*NP laurat)

sebagai substrat enzim. Stok substrat 0,08% (b/v) pNP laurat dilarutkan dalam 5mM sodium asetat (pH 5.0) yang mengandung 1% triton X-100 kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 1 menit agar didapatkan larutan yang sempurna kemudian didinginkan pada suhu ruang.

Campuran reaksi berisi 450 μ L larutan substrat dan 150 μ L lipase dan 50 μ L ekstrak rosella. Campuran reaksi diinkubasi pada 37°C selama 2 jam dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Absorbansi supernatan dibaca pada 410 nm.

Uji inhibisi enzim α -glukosidase secara in vitro

Pengujian dilakukan mengikuti prosedur Mayur *et al.* (2010). Enzim α -glukosidase disiapkan dengan melarutkan 0.2 unit α -glukosidase dalam akuades dingin. Campuran reaksi berisi 100 μ l 0,1 M bufer fosfat, 100 μ l 0,5 mM p-nitrophenyl- α -D- glukofiranos, 100 μ l 0.2 unit α -glukosidase dan 100 μ l ekstrak.

Campuran reaksi diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37° C selama 30 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan memasukkan campuran reaksi ke dalam penangas air suhu 100° C selama 5 menit. Absorbansi hasil reaksi kemudian dibaca pada 410 nm. Sebagai kontrol positif yaitu acarbose 0.5 mg/ml dalam HCl 2 N.

Uji inhibisi enzim α -amilase secara in vitro

Pengujian dilakukan dengan merujuk metode Cengiz *et al.* (2010). Sebanyak 1 unit/ml enzim α -amilase dari *Bacillus* sp. dilarutkan dalam akuades dingin. Aktivitas inhibisi enzim α -amilase dideteksi dengan menggunakan substrat larutan pati (1%). Larutan asam dinitrosalisilat (DNS) dibuat dengan mencampurkan 20 ml larutan 1,5 M Na-K-tartarat, 50 ml 96mM DNS dan air suling hingga volume akhir 100 ml.

Campuran reaksi diperoleh dengan melarutkan 100 μ L substrat, 100 μ L ekstrak dan 100 μ L larutan enzim. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit berakhir, dilakukan penambahan larutan DNS sebanyak 200 μ L dan dilanjutkan inkubasi selama 5 menit pada air mendidih. Setelah itu dilakukan penambahan 4 mL akuades dan diukur absorbansinya pada 540 nm. Sebagai kontrol positif adalah acarbose 0.5 mg/ml dalam HCl 2 N.

Sebagai pembanding, dilakukan pula uji inhibisi enzim α -amilase dari pankreas babi mengikuti prosedur Thalapaneni *et al.* (2008). Ekstrak yang diuji adalah ekstrak yang memiliki daya inhibisi enzim alfa amylase yang paling tinggi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

pH dan Total Asam Tertitiasi (TAT)

Kekhasan dari minuman ekstrak rosella adalah rasa asamnya yang sangat kuat. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa ekstrak rosella memiliki pH yang rendah yaitu berkisar 2,8-2,9. Adanya perbedaan perlakuan kondisi ekstraksi (suhu dan waktu pemanasan) tidak menyebabkan adanya perbedaan nilai pH ekstrak (Tabel 1). Rendahnya pH disebabkan oleh keberadaan asam-asam organik. Bradeldin *et al.* (2005) menyatakan beberapa jenis asam organik pada rosella terdiri

atas asam hibiscus ((-)-Hydroxycitricacid/ HCA), asam malat, asam sitrat, dan asam tartarat.

Hasil analisis TAT menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan ekstraksi menghasilkan perbedaan total asam tertitiasi (Tabel 1). Kecuali pada pemanasan 70°C selama 15 menit, peningkatan suhu dan waktu ekstraksi mengakibatkan peningkatan TAT ekstrak, sehingga pada kondisi ekstraksi 100°C selama 30 menit menghasilkan TAT yang paling tinggi yaitu 9.06%. Penurunan TAT pada ekstrak 70°C 30 menit kemungkinan disebabkan oleh asam-asam yang bersifat volatile. Kadar TAT ekstrak dalam penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian TAT kelopak rosella dari Milkowska and Strzelecka. (1995) yaitu antara 8,2-12,6%.

Tabel 1. Nilai pH, kadar total asam tertitiasi dan total fenol ekstrak awal

Kondisi ekstraksi sampel	pH	Total Asam Tertitiasi (%)	Total Fenol (mg/ml)
70° C 15 menit	2,85 (a)	6,634 (c)	105,93 (a)
70° C 30 menit	2,85 (a)	5,427 (a)	115,14 (a)
85° C 15 menit	2,90 (a)	5,740 (a)	122,98 (b)
85° C 30 menit	2,85 (a)	5,566 (a)	121,27 (b)
100° C 15 menit	2,78 (a)	6,233 (b)	128,55 (c)
100° C 30 menit	2,86 (a)	9,058 (d)	146,73 (c)

Keterangan: nilai yang diikuti huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak adanya perbedaan pada tingkat kepercayaan 95%.

Total fenol

Analisis sidik ragam dengan selang kepercayaan 95% menunjukkan bahwa waktu ekstraksi tidak berpengaruh terhadap total fenol ekstrak, namun suhu ekstraksi berpengaruh terhadap total fenol ekstrak rosella. Semakin tinggi suhu ekstraksi semakin banyak komponen fenolik yang terekstrak dari jaringan bunga rosella, sehingga kadar total fenol meningkat. Komponen fenolik yang terekstrak memiliki sifat yang berbeda-beda baik ketahanannya terhadap panas maupun pH. Sebagai contoh tannin memiliki ketahanan panas yang lebih tinggi dibandingkan dengan antosianin. Komponen fenolik pada rosella adalah quercetin, luteolin glukosida, asam klorogenat, antosianin (delphidin-3-sambubioside dan cyanidin-3-sambubioside (Bradeldin *et al.*, 2005)

Pengaruh Simulasi pH Saluran Pencernaan Terhadap Daya Inhibisi Enzim

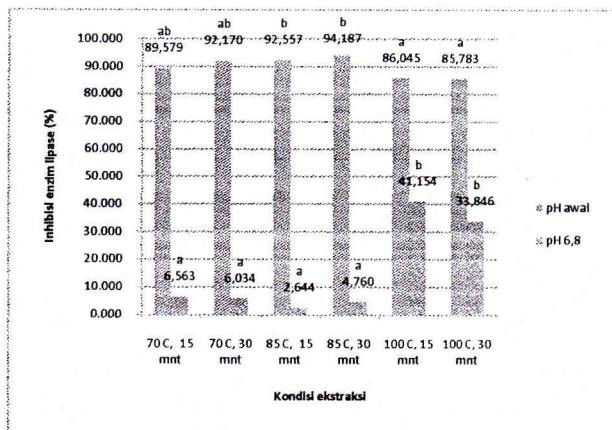
Pengujian aktivitas inhibisi enzim pada penelitian-penelitian terdahulu belum memperhitungkan adanya perubahan aktivitas inhibisi enzim dari suatu komponen bioaktif pangan akibat perubahan pH selama pencernaan. Bahan makanan yang masuk ke dalam tubuh akan dicerna pada organ-organ pencernaan seperti lambung yang memiliki kisaran pH 1-2 dan usus besar dengan kisaran pH 6.8-7.00. Dalam penelitian ini pengujian daya inhibisi enzim dilakukan pada 2 pH yang berbeda, yakni pH ekstrak awal dan pada pH 6,8 setelah sebelumnya didiamkan selama 30 menit pada pH 2 sebagai simulasi kondisi pada pH usus.

Inhibisi enzim lipase secara in vitro

Ekstrak rosella awal memiliki daya inhibisi yang besar terhadap lipase yaitu 85,78- 94,17%, Hasil analisis

menunjukkan bahwa perbedaan kondisi ekstraksi berpengaruh aktivitas inhibisi lipase ekstrak awal. Ekstraksi pada suhu 85°C menghasilkan ekstrak dengan daya inhibisi yang lebih tinggi dibandingkan dengan suhu 100°C (Gambar 3). Diduga inhibisi ekstrak awal sangat dipengaruhi oleh keberadaan asam-asam organik, termasuk *asam hibiscus* (HCA), dan komponen fenolik pada rosella. Jena *et al* (2002) menyatakan HCA pada ekstrak *Garcinia Cambogia* menyebabkan pH ekstrak tersebut bersifat asam. Pada pH yang rendah tidak optimum bagi enzim lipase untuk bekerja dengan baik sehingga daya inhibisi ekstrak rosella cukup besar..

Daya inhibisi enzim lipase menurun dengan cukup tajam pada kondisi pH simulasi pencernaan, yaitu menjadi 2,64-41,15%. Aktivitas inhibisi tertinggi terdapat pada ekstrak hasil kondisi ekstraksi 100°C, yaitu memiliki daya inhibisi sebesar 33,85-41,15%. Karena pada pH usus terjadi penigkatan pH maka asam hibiscus diduga sudah tidak mampu menghambat kerja enzim, dengan demikian diperkirakan komponen yang berperan sebagai inhibitor adalah komponen fenolik yang tahan panas. Karena lipase berada di usus halus, maka dapat dikatakan bahwa ekstrak rosella yang memiliki kemampuan biologis menghambat lipase adalah ekstrak rosella yang diperoleh pada suhu ekstraksi 100oC. Komponen inhibitor yang diduga adalah komponen fenolik yang tahan panas seperti tannin. Tanin merupakan senyawa bioaktif yang tahan terhadap panas. Kandungan tanin pada ekstrak *Tanacetum parthenium* hasil ekstraksi 75-90° C lebih rendah daripada suhu 100° C (Marete *et al.* 2009).

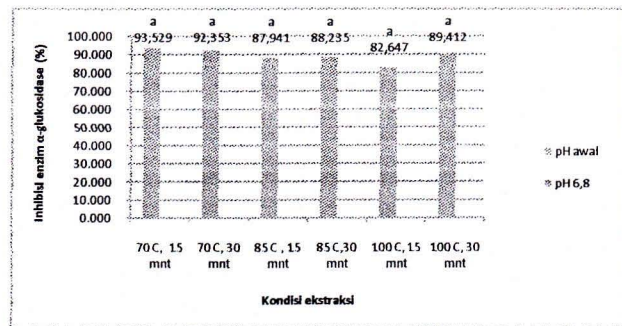


Gambar 3. Daya inhibisi ekstrak rosella terhadap enzim lipase

Inhibisi Enzim α -glukosidase Secara In Vitro

Seluruh ekstrak awal rosella memiliki kemampuan inhibisi enzim alfa glukosidase yang cukup besar yaitu 82,6 – 93,5% (Gambar 4). Hasil analisis menunjukkan bahwa perbedaan kondisi ekstraksi tidak berpengaruh pada daya inhibisi enzim dari ekstrak awal. Namun pada perlakuan simulasi pH usus, semua ekstrak tidak lagi memiliki kemampuan inhibisi enzim α -glukosidase. Acarbose sebagai kontrol positif memiliki kemampuan inhibisi sebesar 100% baik pada pH awal maupun setelah mengalami perlakuan pH usus.

Karena enzim alfa glukosidase berada pada saluran usus, maka dapat dikatakan ekstrak rosella tidak memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim alfa glukosidase.



Keterangan: Nilai penghambatan pada pH 6,8 sebesar 0%

Gambar 4. Daya inhibisi ekstrak rosella terhadap enzim α -glukosidase

Inhibisi enzim α -amilase secara in vitro

Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -amilase dilakukan menggunakan 2 enzim dari sumber yang berbeda yaitu α -amilase dari *Bacillus* sp. dan α -amilase yang berasal dari pankreas babi. Alfa-amilase dari *Bacillus* sp. lebih sulit dihambat daripada aktivitas enzim yang lain. Inhibisi enzim α -amilase menggunakan ekstrak amadumbe (*Colocasia esculenta*) terhadap berbagai sumber enzim yaitu air liur manusia, barley, kentang, *Bacillus* sp, *Aspergillus* sp dan pankreas babi menunjukkan α -amilase dari *Aspergillus* sp. paling tidak bisa dihambat diikuti dengan α -amilase dari kentang dan *Bacillus* sp (McEwan *et al.* 2010). Hasil penelitian Marshall *et al* (1975) menunjukkan inhibitor α -amilase dari kacang jogo (*Phaseolus vulgaris*) tidak mampu menghambat kerja enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, rye dan gandum barley. Inhibitor kacang jogo mampu menghambat kerja enzim α -amilase dari pankreas babi sebesar 97%.

Inhibisi enzim α -amilase *Bacillus* sp.

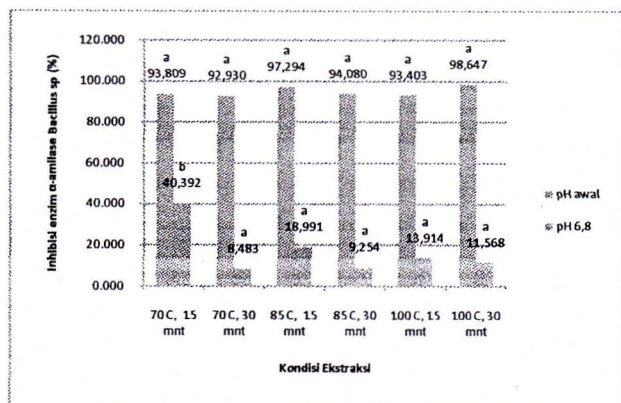
Ekstrak awal rosella memiliki daya inhibisi alfa amylase yang cukup tinggi yaitu sebesar 92,93-98,65% (Gambar 5). Adanya perbedaan kondisi ekstraksi tidak berpengaruh pada daya inhibisi enzim dari ekstrak awal. Namun pada perlakuan simulasi pH usus, semua ekstrak mengalami penurunan kemampuan inhibisi enzim α -amilase yang cukup besar, yaitu menjadi berkisar 8,48–40,39%. Ekstrak yang dihasilkan dari kondisi ekstraksi 70°C selama 15 menit memiliki kemampuan inhibisi yang paling besar pada pH usus yaitu 40,39%, sedangkan kondisi ekstraksi lainnya signifikan lebih rendah. Acarbose sebagai kontrol positif memiliki kemampuan inhibisi sebesar 98,76% pada pH awal, juga mengalami penurunan setelah mengalami perlakuan pH usus yaitu menjadi 65,22%.

Keberadaan asam-asam organik dan *asam hibiscus* pada ekstrak mampu menurunkan pH sampai dengan 2,75. Asam-asam organik pada rosella merupakan faktor penting dalam hubungannya dengan penghambatan kerja enzim α -amilase. Hansawasdi *et al* (2000) menyatakan *asam hibiscus* atau HCA hasil ekstraksi menggunakan metanol dan aseton

pada rosela kering mampu menghambat kerja enzim α -amilase pankreas babi sampai dengan 100% pada konsentrasi 1M, namun pada pH netral asam hibiscus tidak efektif menghambat amylase.

Enzim alfa amilase terdapat di saliva dan juga di pankreas. Pengujian ekstrak awal dapat mencerminkan kemampuan inhibisi ekstrak terhadap alfa amilase saliva, dan pengujian ekstrak setelah perlakuan pH usus dapat mencerminkan kemampuan inhibisinya di usus. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ekstrak rosela memiliki kemampuan yang besar dalam menghambat aktivitas alfa amilase saliva, namun untuk alfa amilase pankreas dihambat oleh ekstrak yang diperoleh dari kondisi ekstraksi 70°C selama 15 menit. Diduga pada kondisi ekstraksi yang menggunakan suhu dan waktu yang lebih tinggi terjadi perubahan struktur komponen fenolik yang berperan dalam menghambat α -amilase. Komponen fenolik yang diduga antara lain antosianin.

Rosela memiliki kandungan antosianin yang cukup tinggi, namun antosianin bersifat kurang tahan panas. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Kim dan Goodner (2009) ekstraksi suhu tinggi menghasilkan antosianin paling tinggi pada jagung ungu, akan tetapi suhu tinggi mendegradasi antosianin dengan sangat cepat. Suhu sedang (70°C selama 20 menit) merupakan kombinasi yang paling bagus untuk menghasilkan antosianin dan total fenol pada jagung ungu. Komponen fenolik dapat membentuk kompleks dengan protein enzim sehingga menyebabkan kehilangan kemampuan katalisatornya



Gambar 5. Daya inhibisi ekstrak rosela terhadap enzim α -amilase

Inhibisi enzim α -amilase pankreas babi.

Inhibisi menggunakan ekstrak rosela terhadap kerja enzim α -amilase dari pankreas babi hanya dilakukan pada pH ekstrak awal. Pemilihan ekstrak yang digunakan untuk analisis berdasarkan kemampuan inhibisinya pada pH awal dan setelah mendapat perlakuan pH. Berdasarkan daya inhibisi pada enzim α -amilase *Bacillus sp.*, ekstraksi pada kondisi 70°C 15 menit tetap memiliki kemampuan inhibisi yang masih cukup tinggi (40,39%) sehingga hanya ekstrak tersebut yang digunakan untuk analisis kali ini.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa hasil ekstraksi pada kondisi 70°C 15 memiliki daya inhibisi yang hampir sama dengan α -amilase *Bacillus sp* yaitu sebesar

90,14%. Oleh karena itu diduga ekstrak rosela juga mampu menghambat kerja enzim α -amilase dari pankreas babi pada berbagai kondisi ekstraksi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa enzim alfa amylase yang berasal dari mikroba lebih sulit dihambat dibandingkan alfa amylase dari mamalia. Mc Ewan *et al* (2010), menyatakan bahwa ekstrak amadumbe (*Colocasia esculenta*) memiliki daya inhibisi 2 kali lebih besar terhadap kerja enzim α -amilase dari pankreas babi daripada α -amilase *Bacillus sp.* Hasil penelitian Marshall *et al* (1975) menunjukkan α -amilase dari *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* tidak mampu dihambat oleh ekstrak kacang jogo. Ekstrak kacang jogo mampu menghambat kerja α -amilase pankreas babi sebesar 97%, α -amilase saliva manusia sebesar 94% dan α -amilase pankreas manusia sebesar 100%.

KESIMPULAN

Ekstrak rosella memiliki pH sekitar 2,8-2,9, dan tidak ada perbedaan pH pada berbagai kondisi ekstraksi. Kondisi ekstraksi 100°C selama 30 menit menghasilkan TAT dan total fenol tertinggi.

Ekstrak rosella awal memiliki kemampuan inhibisi yang tinggi terhadap enzim lipase, alfa glukosidase dan alfa amylase. Namun perlakuan simulasi pH saluran pencernaan mengakibatkan penurunan kemampuan inhibisi ekstrak rosella yang cukup besar. Pada simulasi pH usus, ekstrak rosela tidak lagi memiliki kemampuan inhibisi α -glukosidase. Kemampuan inhibisi lipase terbaik ditunjukkan oleh ekstrak rosella yang diperoleh dari hasil ekstraksi 100°C (15-30 menit), sedangkan kemampuan inhibisi amilase yang terbaik ditunjukkan oleh hasil ekstraksi 70°C 15 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Bradeldin A.H, Al-Wabel, N., Gerald, B. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L: A review. *Phytother. Res*, 19, 369-375.
- Cengiz S, Cavaz L, Yurdakoc K. 2010. Alpha-amylase Inhibition Kinetics by *Caulerpernyne*. *Mediterranean Marine Research*.
- Hansawasdi C, Kawataba J, Kasai T. 2000. Alpha-amilase Inhibitor from Roselle (*Hibiscus Sabdariffa linn*) Tea. *Biosci.Biotechnol. Biochem.* 64(5) 1041-1043.
- Jena BS, Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. 2002. Chemistry and Biochemistry of (-)-Hydroxycitric Acid from *Garcinia*. *J Agric. Food Chem* 50: 10-22

- Marete E, Jacquier JC, O'Riordan D. 2009. Effect of Drying Methods on the Phenolic Constituents of Meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and Willow (*Salix alba*). Food Science and Technology Paper.
- Marshall JJ and Lauda CM. 1975. Purification and Properties of Phaseolamin an Inhibitor of α -amylase, from kidney bean. *Phaseolus Vulgaris*. *Journal of Biological Chemistry* 250(20): 8030-8037.
- Mayur B, Sandez S, Shruti S, Sung-Yum S. 2010. Antioxidant and Alpha-Glucosidase Inhibitory Properties of *Carpesium abrotanoides* L. *Journal of Medical Plant Research* 4(15) : 1547-1553
- Milkowska K, Strzelecka H. 1995. Flos Hibisci. The methods of identification and estimation of crude drug. *Iherba.-Polonica*. 41:11-16.
- Mc Dougall GJ, Kulkarni NN, Stewart D. 2008. Berry Polyphenols Inhibit Pancreatic Lipase Activity In Vitro. *Journal of Food Chemistry* 115; 193-199.
- Mc Ewan R, Madivha RP, Djarova T, Oyedeji OA, Opoku AR. Alpha-amylase Inhibitor of amadumbe (*Colocasia esculenta*): Isolation, purification and selectivity toward α -amylase from Various Sources. *African Journal of Biochemistry Research* Vol. 4(9): 220-224
- Pansera MR, Iob GA, Atti-Santos AC, Rossato, Atti-Serafini L, Cassel E. 2004. Extraction of Tannin by *Acacia mearnsii* with Supercritical Fluids. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*.
- Sakkiadi AV, Stavrakakis MN, Haroutounian SA. 2001. Direct HPLC Assay of five biologically interesting phenolic antioxidants in varietal greek red wines. *Lebensm Wiss Technol*. 34:410-413.
- Strycharz S dan Shetty K. 2002. Effect of *Agrobacterium Rhizogenes* on Phenolic Content of *Menthapulegium* Elite Clonal Line for Phytoremediation Applications
- Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. 2006. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci*. 52: 149-153