

Penentuan Tipe Inhibisi Senyawa Analog Kurkumin CA2 terhadap Enzim α -Glukosidase dari Beras Lapuk

Atiqoh Zummah^{1*}, Endang Astuti², Bambang Purwono²

¹ Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya, Surabaya, Indonesia

² Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author: atiqoh.zummah@uinsby.ac.id

ABSTRACT

Diabetes is a health problem that exists throughout the world, especially in Indonesia. Based on data compiled from the International Diabetes Federation (IDF) in 2017, people with diabetes in Indonesia reached 10.3 million people, and if not handled properly it is suspected that there will be an increase to 21.3 million people in 2030. Curcumin analog compounds can be used for the treatment of diabetes by inhibiting the enzyme α -glucosidase. The curcumin analog compound used in this study was synthesized from 4-methoxybenzaldehyde with cyclopentanone which was then called the CA2 compound. The α -glucosidase enzyme used in this study was obtained through extraction of weathered rice with an optimum pH of 4.5 and the enzyme extract fraction used was fraction II which had the highest activity compared to fractions I and III. The results showed that the values of the kinetic parameters K_m and V_{max} of the extracted α -glucosidase enzyme were 1.53 mM and 0.03 U/mL, respectively. The K_m kinetic parameter value changed to 1.66 mM while the V_{max} value did not change when the α -glucosidase enzyme was inhibited by CA2 compound, so that the type of inhibition shown by CA2 compound was competitive.

Keywords: enzyme inhibition, glucosidase, curcumin analogs

ABSTRAK

Diabetes adalah masalah kesehatan yang ada di seluruh dunia khususnya di Indonesia. Berdasarkan data yang dihimpun dari International Diabetes Federation (IDF) pada tahun 2017, penderita diabetes di Indonesia mencapai 10,3 juta jiwa, dan jika tidak tertangani dengan baik diduga akan terjadi peningkatan menjadi 21,3 juta jiwa pada Tahun 2030. Senyawa analog kurkumin dapat digunakan untuk pengobatan diabetes dengan cara menghambat enzim α -glukosidase. Senyawa analog kurkumin yang digunakan dalam penelitian ini disintesis dari 4-metoksibenzaldehid dengan siklopentanon yang kemudian disebut senyawa CA2. Enzim α -glukosidase yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh melalui ekstraksi beras lapuk dengan pH optimum 4,5 dan fraksi ekstrak enzim yang digunakan adalah fraksi II yang mempunyai aktivitas tertinggi dibandingkan fraksi I dan III. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai parameter kinetik K_m dan V_{maks} enzim α -glukosidase hasil ekstraksi adalah berturut-turut 1,53 mM dan 0,03 U/mL. Nilai parameter kinetik K_m berubah menjadi 1,66 mM sedangkan nilai V_{maks} tidak berubah ketika enzim α -glukosidase diinhibisi oleh senyawa CA2, sehingga tipe inhibisi yang ditunjukkan senyawa CA2 adalah kompetitif.

Kata Kunci: inhibisi enzim, glukosidase, analog kurkumin

PENDAHULUAN

Diabetes merupakan salah satu penyakit yang menjadi permasalahan di dunia terutama di Indonesia. Menurut Guariguata (2012) dan Whiting dkk. (2011) menjelaskan bahwa ada 371 juta penderita diabetes di dunia dan diperkirakan akan meningkat menjadi 552 juta pada tahun 2030. Berdasarkan data yang dihimpun dari International Diabetes Federation (IDF) pada tahun 2017, penderita diabetes di Indonesia mencapai 10,3 juta jiwa, dan jika tidak tertangani dengan baik diduga akan terjadi peningkatan menjadi 21,3 juta jiwa pada Tahun 2030.

Salah satu terapi diabetes yang dapat dilakukan yaitu dengan cara menghambat enzim α -glukosidase. Enzim α -glukosidase merupakan enzim yang terlibat dalam hidrolisis karbohidrat menjadi glukosa. Inhibisi terhadap enzim ini akan menghambat absorpsi glukosa dalam tubuh sehingga bisa mencegah keadaan hiperglikemia.

Senyawa yang diduga dapat digunakan untuk menghambat enzim α -glukosidase adalah senyawa analog kurkumin. Senyawa analog kurkumin yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa CA2 yang disintesis dengan cara memodifikasi beta-diketon dari kurkumin menjadi monoketon serta memodifikasi farmakofor rantai samping dengan substituen berbeda. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa senyawa analog kurkumin mampu menjadi

inhibitor terhadap enzim, diantaranya penelitian yang dilakukan oleh Yuan dkk. (2014) membuktikan bahwa senyawa analog kurkumin mampu menjadi inhibitor enzim 11β -hidroksisteroid dehydrogenase yang berfungsi mengatur regulasi glukokortikoid, akan tetapi aktivitas senyawa analog kurkumin CA2 terhadap enzim α -glukosidase belum diketahui sehingga akan diteliti dalam penelitian ini.

Penelitian ini juga perlu ketersediaan enzim α -glukosidase, tetapi harga relatif mahal sehingga dalam penelitian ini juga akan dilakukan ekstraksi enzim α -glukosidase dari bahan alam yang mudah didapat, yaitu beras lapuk. Alasan beras lapuk digunakan sebagai sumber enzim karena beras lapuk sudah tidak mungkin dapat dikonsumsi lagi, Enzim α -glukosidase ditemukan dalam beras karena memiliki peran penting dalam reaksi hidrolisis pati menjadi glukosa (Papriani, 2019), selain itu aktivitas mikroorganisme yang terdapat dalam beras lapuk sendiri juga diduga akan menyumbang jumlah enzim α -glukosidase.

METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Universitas Gadjah Mada. Prosedur yang dilakukan meliputi sintesis senyawa analog kurkumin CA2, optimasi pH ekstrak kasar, uji aktivitas enzim α -glukosidase, fraksinasi, dialisis, penentuan nilai K_m dan V_{maks} , dan penentuan tipe inhibitor.

Sintesis Senyawa Analog Kurkumin CA2

Sintesis senyawa analog kurkumin CA2 dilakukan dengan menggunakan metode yang digunakan Yuan (2014). Senyawa turunan 4-metoksibenzaldehida sebanyak 15,4 mmol ditambahkan ke dalam 7 mmol senyawa siklopentanon. Campuran dilarutkan dalam 10 mL etanol. Larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 20 menit. Selanjutnya ditambah 2 mL KOH (5%) setetes demi setetes dan dilanjutkan pengadukan dalam labu bulat pada suhu 50 °C selama 50 menit. Labu bulat dihubungkan dengan pendingin refluks. Ketika reaksi selesai akan terlihat adanya endapan. Endapan didinginkan pada suhu ruang. Endapan yang terbentuk dicuci dengan air dingin dan etanol dingin, selanjutnya dikeringkan dalam desikator.

Optimasi pH Ekstrak Kasar

Sampel beras lapuk yang sudah dihancurkan dengan mesin blender ditimbang sebanyak 20g. Optimasi pH dilakukan dengan cara sampel tepung beras lapuk dimasukkan ke dalam beker gelas yang berisi 50 mL larutan buffer fosfat dingin 67 mM pH 3,5-7,5. Campuran diaduk selama satu jam menggunakan *magnetic stirrer* dalam keadaan dingin dan dibiarkan semalaman dalam lemari pendingin. Selanjutnya homogenat yang diperoleh disaring dengan kain kasa dan filtratnya dipisahkan dengan sentrifugasi kecepatan 13.500 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang

diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang akan diuji aktivitas α -glukosidasenya.

Uji Aktivitas Enzim α -Glukosidase

Pengukuran aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan dengan menggunakan *Sigma quality control test procedure* yang telah dimodifikasi (Anonim, 1996). Substrat yang digunakan berupa *p*-nitrofenil- α -D-glukosida (*p*NPG). Pengujian dilakukan dengan membuat campuran larutan 5 mL buffer fosfat 67 mM pH 6,80 dan 200 μ L larutan enzim ke dalam tabung reaksi. Campuran selanjutnya disetimbangkan pada suhu 37 °C. Campuran ditambahkan 500 μ L *p*NPG 10 mM dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Reaksi dihentikan dengan cara 2 mL campuran diambil dan ditambahkan 8 mL Na_2CO_3 100 mM. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombang 400 nm. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama, dengan mengganti larutan enzim dengan air bebas mineral. Aktivitas Enzim dihitung dengan rumus pada persamaan 1 (Anonim, 1996).

$$\text{Aktivitas enzim (unit / mL)} = \frac{(A_{400} \text{ uji} - A_{400} \text{ blanko})(10)(5,7)}{(18,3)(20)(2)(0,2)} \quad (1)$$

Keterangan:

- 5,7 = volume campuran reaksi
- 18,3 = koefisien ekstingsi milimolar
- 20 = waktu assay
- 10 = volume penentuan kalorimetrik
- 2 = volume campuran reaksi yang dipakai dalam penentuan kalorimetrik
- 0,2 = volume larutan enzim yang digunakan

Fraksinasi

Sebanyak 800 g tepung beras lapuk ditambahkan dalam 2000 mL larutan buffer dengan pH optimum. Ekstrak kasar enzim yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan penambahan garam ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-20, 20-50, dan 50-70%. Garam ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-20% ditambahkan ke dalam ekstrak kasar sedikit demi sedikit. Proses penambahan garam dan pengadukan dilakukan dalam lemari pendingin. Setelah penambahan garam pengadukan dilanjutkan sampai 20 menit. Campuran dibiarkan semalam dan diendapkan dengan sentrifus kecepatan 13500 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer pH optimum sampai larut. Endapan yang dihasilkan disebut dengan fraksi I. Supernatan selanjutnya difraksinasi lebih lanjut dengan ditambahkan garam ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-50 dan 50-70%. Campuran didiamkan semalaman dan kembali diendapkan dengan sentrifus. Endapan fraksi 20-50% disebut fraksi II dan endapan fraksi 50-70% disebut fraksi III. Ekstrak kasar fraksi I, II, dan III selanjutnya diuji aktivitas enzim α -glukosidase.

Dialisis

Ketiga fraksi yang dihasilkan didialisis untuk menghilangkan sisa garam ammonium sulfat. Larutan enzim dari masing-masing fraksi dimasukkan ke dalam membran selofan dan kedua ujung membran dijepit menggunakan penjepit membran. Membran selofan yang berisi enzim dimasukkan ke dalam larutan

buffer fosfat pH optimum dengan konsentrasi sepuluh kali lebih encer dari larutan enzim. Larutan buffer diaduk dengan *magnetic stirrer* sehingga membran selofan dapat bergerak memutar. Proses ini dilakukan selama 16 jam dengan suhu sistem sebesar 4 °C dengan mengganti buffer sebanyak dua kali. Larutan enzim yang selesai didialisis kemudian ditentukan aktivitasnya untuk menentukan fraksi enzim yang mempunyai aktivitas tertinggi. Fraksi enzim yang mempunyai aktivitas tertinggi selanjutnya digunakan untuk pengujian K_m dan V_{maks} .

Penentuan Nilai K_m dan V_{maks}

Penentuan parameter kinetik enzim K_m dan V_{maks} dilakukan dengan variasi larutan substrat pNPG. Larutan substrat pNPG dibuat dengan konsentrasi 1 mM- 10 mM. Masing-masing konsentrasi substrat ditentukan aktivitas enzimnya. Selanjutnya dibuat grafik hubungan $1/V$ terhadap $1/[S]$. Nilai K_m dan V_{maks} dapat ditentukan berdasarkan kurva Lineweaver-Burk. Kurva Lineweaver-Burk menghasilkan nilai K_m dan V_{maks} sesuai persamaan 2 (Shuler dan Kargi, 1992).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2)$$

$\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$
 $y = m \quad x \quad + c$

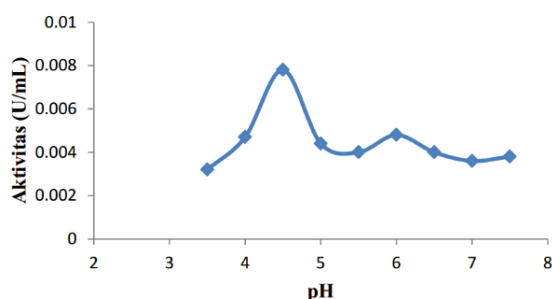
Penentuan Tipe Inhibisi

Larutan substrat pNPG dibuat dengan konsentrasi 1 mM-10 mM. Masing-masing konsentrasi substrat ditentukan aktivitas enzimnya. Selanjutnya dibuat grafik

hubungan $1/V$ terhadap $1/[S]$. Grafik hubungan $1/V$ terhadap $1/[S]$ menghasilkan kurva Lineweaver-Burk. Nilai K_m dan V_{maks} diketahui berdasarkan kurva Lineweaver-Burk. Untuk menentukan tipe inhibitor dilakukan dengan membandingkan nilai K_m dan V_{maks} dari enzim α -glukosidase hasil isolasi ditambah senyawa analog kurkumin CA2 dengan nilai K_m dan V_{maks} dari enzim α -glukosidase hasil isolasi tanpa penambahan senyawa analog kurkumin CA2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini pengujian aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan melalui pengamatan serapan *p*-nitrofenol yang terbentuk pada panjang gelombang 400 nm. Secara keseluruhan aktivitas enzim pada masing-masing pH dapat dilihat pada Gambar 1.

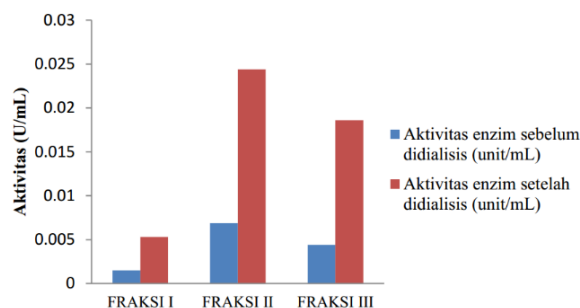


Gambar 1. Optimasi pH ekstrak kasar

Hasil optimasi pH menunjukkan aktivitas enzim terus meningkat dari pH 3,5 sampai pH 4,5, selanjutnya aktivitas enzim mengalami penurunan sampai pH 7,5. Sehingga aktivitas enzim optimum dihasilkan pada ekstrak enzim yang mempunyai pH 4,5. Penelitian yang dilakukan Risma (2012) yaitu

isolasi enzim α -glukosidase dari beras lapuk juga menghasilkan pH optimum ekstraksi di suasana asam, yaitu pH 6. Hasil antar penelitian ini berbeda karena diduga disebabkan dari perbedaan kondisi beras lapuk yang memungkinkan adanya campuran-campuran enzim lain dari aktivitas mikroorganisme.

Setelah dilakukan optimasi pH selanjutnya dilakukan fraksinasi. Fraksinasi dengan ammonium sulfat merupakan salah satu metode yang digunakan untuk permurnian protein (enzim) sehingga akan meningkatkan kemurnian fraksi dari campuran (Davidson dan Sittman, 1999). Fraksi I, II, dan III baik sebelum maupun setelah dialisis diuji aktivitasnya untuk menentukan fraksi yang mempunyai aktivitas tertinggi. Fraksi dengan aktivitas tertinggi akan digunakan selanjutnya untuk pengujian inhibisi senyawa analog kurkumin hasil sintesis terhadap enzim α -glukosidase hasil isolasi. Aktivitas dari masing-masing fraksi dapat dilihat pada Gambar 2.

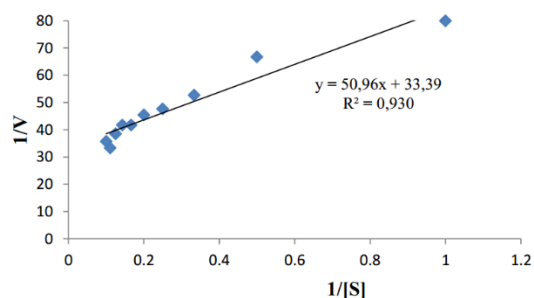


Gambar 2. Diagram aktivitas fraksi sebelum dan setelah dialisis

Fraksi I sampai fraksi III mempunyai aktivitas yang lebih tinggi setelah proses dialisis dibandingkan sebelum dialisis. Hal tersebut dikarenakan setelah dialisis mikromolekul, peptidapeptida protein, dan ammonium sulfat berdifusi keluar membran, sehingga meningkatkan aktivitas spesifik dari enzim α -glukosidase. Meningkatnya aktivitas spesifik enzim menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan semakin murni dan dari ketiga fraksi tersebut menunjukkan bahwa fraksi II mempunyai aktivitas tertinggi. Oleh karena itu, fraksi II akan digunakan untuk pengujian selanjutnya, yaitu pengujian K_m dan V_{maks} , serta penentuan tipe inhibisi senyawa analog kurkumin CA2 hasil sintesis. Rendemen yang dihasilkan dari fraksi II adalah sebesar 0,06 Unit/g beras.

Penentuan nilai K_m dan V_{maks} bertujuan untuk menentukan parameter kinetik enzim. K_m merupakan konsentrasi substrat pada saat kecepatan reaksi enzim mencapai $\frac{1}{2} V_{maks}$, sedangkan V_{maks} merupakan kecepatan maksimum dari enzim untuk mengubah substrat menjadi produk. Substrat yang digunakan berupa *p*NPG dan enzim α -glukosidase hasil isolasi akan menunjukkan aktivitasnya apabila substrat berhasil diubah menjadi *p*-nitrofenol dan glukosa. Dalam penelitian ini yang diamati adalah terbentuknya *p*-nitrofenol dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 400 nm. Nilai K_m dan V_{maks} ditentukan dengan mengukur aktivitas ekstrak enzim α -glukosidase per menit [V] pada konsentrasi substrat [S] 1-10 mM. Grafik hubungan

antara $1/[S]$ Vs $1/V$ akan menghasilkan grafik Lineweaver-Burk yang dapat dilihat pada Gambar 3.

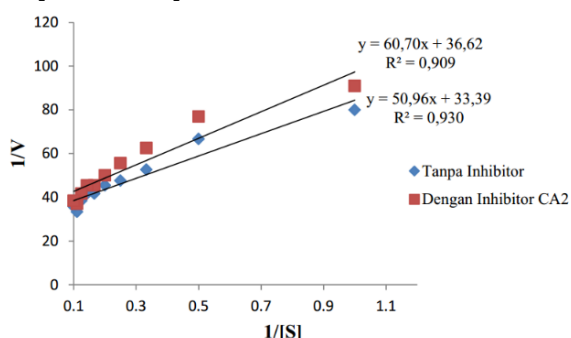


Gambar 3. Grafik Lineweaver-Burk hubungan $1/V$ dan $1/[S]$

Berdasarkan Gambar 3 diperoleh persamaan garis $y = 50,96x + 33,39$ sehingga didapatkan nilai K_m yang diperoleh sebesar 1,53 mM dan nilai V_{maks} sebesar 0,03 U/mL. Nilai K_m dan V_{maks} enzim α -glukosidase hasil isolasi berbeda dengan nilai K_m dan V_{maks} teori, sehingga diduga sampel enzim α -glukosidase hasil isolasi masih belum murni. Ketidakmurnian ini karena ekstrak enzim yang dihasilkan hanya pada tahap dialisis dan tidak sampai isolasi murni. Enzim yang lebih murni akan mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan enzim yang masih berupa ekstrak kasar, tetapi ekstrak kasar enzim yang dihasilkan dalam penelitian ini tetap mempunyai aktivitas enzim α -glukosidase yang ditunjukkan dengan adanya serapan *p*-nitrofenol pada Panjang gelombang 400 nm. Mishra (2015) melakukan isolasi dan pemurnian enzim α -glukosidase dari *Hyophilla nymaniana* dan hasil penelitian menunjukkan nilai K_m dan V_{maks} yang diperoleh berturut-turut sebesar 5,2 mM dan

8,6 U/mL. Risma (2012) juga melakukan isolasi enzim α -glukosidase dari beras lapuk dan hasil menunjukkan nilai K_m sebesar 5,17 mM sedangkan nilai V_{maks} sebesar 0,55 mM/menit.

Penentuan tipe inhibisi dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim α -glukosidase dengan adanya inhibitor senyawa analog kurkumin CA2 per menit [V] pada konsentrasi substrat [S] 1-10 mM. Grafik hubungan antara $1/[S]$ Vs $1/V$ akan menghasilkan grafik Lineweaver-Burk yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik $1/V$ terhadap $1/[S]$ dengan inhibitor CA2 dan tanpa inhibitor

Persamaan garis Lineweaver-Burk yang diperoleh dengan adanya inhibitor yaitu $y = 60,70x + 36,62$, sehingga nilai K_m yang diperoleh sebesar 1,66 mM dan nilai V_{maks} sebesar 0,03 U/mL. Nilai K_m dari ekstrak enzim α -glukosidase hasil isolasi dengan adanya inhibitor CA2 mengalami perubahan terhadap nilai K_m ekstrak enzim α -glukosidase hasil isolasi tanpa adanya inhibitor CA2, sedangkan nilai V_{maks} tidak mengalami perubahan. Nilai K_m dan V_{maks} sebelum adanya penambahan inhibitor CA2 berturut-turut sebesar 1,53 mM dan 0,03

U/mL, sedangkan setelah adanya penambahan inhibitor CA2 nilai K_m dan V_{maks} berturut-turut sebesar 1,66 mM dan 0,03 U/mL. Dari hasil ini dapat ditentukan bahwa tipe inhibitor CA2 merupakan inhibitor kompetitif. Penambahan inhibitor kompetitif akan berpengaruh terhadap nilai K_m , akan tetapi nilai V_{maks} tidak dipengaruhi oleh inhibitor jenis ini.

Inhibisi yang dihasilkan oleh senyawa analog kurkumin CA2 adalah tipe inhibitor kompetitif, sehingga menurut Sharma (2012) pada tipe inhibisi kompetitif molekul inhibitor akan bersaing dengan substrat untuk menempati sisi aktif enzim. Pada saat inhibitor menempati sisi aktif enzim, jumlah kompleks enzim substrat akan berkurang, sehingga produk tidak segera terbentuk. Secara kinetik, inhibitor kompetitif akan terikat pada enzim bebas secara reversibel membentuk kompleks enzim-inhibitor dan tidak dapat mengikat substrat. Inhibitor kompetitif mengurangi kemampuan enzim bebas untuk berikatan dengan substrat, sehingga nilai K_m akan berubah sedangkan nilai V_{maks} tidak mengalami perubahan.

KESIMPULAN

Enzim α -glukosidase berhasil diekstraksi dari beras lapuk dengan pH optimum ekstraksi 4,5 dan fraksi yang mempunyai aktivitas tertinggi adalah fraksi II. Fraksi II memberikan rendemen sebesar 0,06 Unit/g beras. Inhibisi oleh analog kurkumin CA2 menunjukkan tipe inhibisi kompetitif

dengan nilai K_m sebesar 1,66 mM dan nilai V_{maks} sebesar 0,03 U/mL. Nilai K_m ini berbeda dengan nilai K_m sebelum adanya penambahan inhibitor analog kurkumin CA2, yaitu sebesar 1,53 mM, sedangkan nilai V_{maks} tidak mengalami perubahan karena nilai V_{maks} sebelum adanya penambahan inhibitor analog kurkumin CA2 sebesar 0,03 U/mL. Selanjutnya perlu dilakukan penelitian lanjutan secara *in vivo* untuk mengetahui pengaruh kandidat senyawa obat seperti analog kurkumin CA2 di dalam tubuh makhluk hidup.

and Bioapplications. InTech Web Publishers, Rijeka.

Shuler, M.L. and Kargi, F. 1992. *Bioprocess Engineering Basic Concept*. Prentice-Hall International Inc., New Jersey.

Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., and Shaw, J. 2011. IDF Diabetes Atlas: Global Estimates Of the Prevalence Of Diabetes For 2011 And 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 94: 311–321.

Yuan, X., Li, H., Bai, H., Su, Z., Xiang, Q., Wang, C., Zhao, B., Zhang, Y., Zhang, Q., Chu, Y., and Huang, Y. 2014. Synthesis of Novel Curcumin Analogues For Inhibition Of 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 With Anti-Diabetic Properties. *Eur. J. Med. Chem.* 77: 223-230.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1996. *Enzymatic Assay of α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) p-Nitrophenyl α -D-Glucosidase as Substrate Product Nos. G5003, G6136, G7256, G8889, G0660, and G3651*. Sigma quality control test procedure. Saint Louis Missouri.
- Davidson, V.L. dan Sittman, D.B. 1999. *Biochemistry*, 4th edition. Lipincott Williams and Wilkins, Maryland.
- Guariguata, L. 2012. By The Numbers: New Estimates From The IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 98: 524–525.
- Mishra, R., Chandra, R. 2016. Purification and Characterization of α -Glukosidase From Moss Hypophilla Nymaniana (Fleish) Musel. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research*. 9 (1): 179-186.
- Papriani, N.P., et al. 2019. Purification and characterization of α -glucosidase enzyme from rice groats. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1341 032017.
- Risma, D. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Enzim α -glukosidase Dari Beras Lapuk (*Oryza sativa*). *Skripsi*. Program Reguler Kimia, FMIPA UI, Depok.
- Sharma, R.. 2012. *Enzyme Inhibition: Mechanisms and Scope, Enzyme Inhibitor*