

PENGHAMBAT α AMILASE: JENIS, SUMBER, DAN POTENSI PEMANFAATANNYA DALAM KESEHATAN

[α Amylase Inhibitors: Types, Sources, and Their Potential Utilization for Health Purposes]

Budiasih Wahyuntari*

Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro-Biomedika (LAPTIAB), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Kawasan Pusat Teknologi dan Ilmu Pengetahuan (PUSPIPTEK) gedung no 610, Serpong, Tangerang 15310

Diterima 09 Desember 2009 / Disetujui 19 Desember 2011

SUMMARY

Alpha amylase inhibitors affect carbohydrate metabolism in digestive system. The inhibitors induce carbohydrate tolerance, fullness and prolonging gastric emptying that might be used to aid in diabetic and obesity treatment. There are two types of α -amylase inhibitors, proteinaceous and non-proteinaceous ones. Proteinaceous inhibitor is classified into seven classes including legumes, lectin, knottin, cereal, Kunitz, γ -thionin and thaumatin types. Plant proteinaceous inhibitors are present in cereals and legumes. Some non-proteinaceous inhibitors include flavonoid, polyphenols, organic acid that might be produced by microbes or extracted from plants such as acarbose, saponin dan cardiac glycoside, gallic acid, proto-catechuic acid, caffeic acid, ellagic acid, ferulic acid, quercetin hibiscus acid and α -, β - and γ -cyclodextrin.

Key words: inhibitor amylase, anti obesity, diabetes

PENDAHULUAN

Berdasarkan laporan World Health Organization (WHO), lebih dari satu milyar masyarakat dunia menderita kegemukan (Celleno *et al.*, 2007). Penderita kegemukan tidak hanya terjadi di negara-negara berkembang tetapi juga di negara-negara sedang berkembang termasuk Indonesia. Kegemukan terjadi karena akumulasi lemak yang berlebih dalam tubuh yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara konsumsi makanan dan pengeluaran energi. Kegemukan tidak hanya menyebabkan penampilan fisik yang tidak menarik tetapi juga akan menyebabkan peningkatan risiko terkena beberapa macam penyakit antara lain tekanan darah tinggi, diabetes tipe II, *arthritis*, peningkatan sirkulasi kolesterol, kanker, ketidak-seimbangan hormon pada wanita yang dapat berakibat sterilitas (Celleno, 2007) juga penyakit demencia dan Alzheimer (Kivipelto *et al.*, 2005). Usaha untuk mengurangi lemak tubuh biasanya merupakan kombinasi antara pembatasan asupan kalori dan peningkatan aktivitas fisik, terapi perilaku, terapi farmaka hingga yang paling ekstrim yaitu pembedahan (Celleno *et al.*, 2007). Akhir-akhir ini suplemen diet alami untuk mengurangi berat badan makin populer, akan tetapi kebanyakan efektivitas terapinya masih diragukan. Beberapa produsen cenderung melebih-lebihkan kegunaan produk suplemennya tanpa bukti-bukti yang memadai. Diantara suplemen yang dipasarkan terdapat beberapa yang benar-benar bermanfaat sebagai produk penurunan berat badan dan biasanya mengandung penghambat α amylase atau populer sebagai "*starch blocker*". Konsumsi karbohidrat yang sangat cepat diserap tubuh yang berlebihan seringkali berhubungan dengan kegemukan. Secara teori, *starch blocker* dapat menyebabkan penurunan berat badan

dengan cara mengganggu atau memperlambat pemecahan karbohidrat kompleks sehingga mengurangi ketersediaan karbohidrat yang tercerna menjadi kalori (Hansawasdi *et al.*, 2001; Santimone *et al.*, 2004).

Ulasan ini melaporkan beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan mengenai pengelompokan jenis penghambat α -amilase, sumber, pengaruh penghambat terhadap α -amilase dari mamalia serangga dan mikroba serta penelitian percobaan untuk terapi diabetes tipe 2 dan kegemukan.

Jenis, sumber dan manfaat penghambat α -amilase

Penghambat α -amilase dapat berupa protein atau non protein (Franco *et al.*, 2002). Pada tanaman, penghambat α -amilase jenis protein umumnya terdapat pada biji-bijian (serealea) seperti *wheat/gandum-Triticum aestivum* (Feng *et al.*, 1996; Singh dan Blundel, 2001), *barley-Hordeum vulgareum* (Weselake *et al.*, 1983; Abe *et al.*, 1993; Pekkarinen, Jones, 2003), *sorghum-Sorghum bicolor* (Bloch dan Richardson, 1991), *rye -Secale cereale* (Garcia-Casado *et al.*, 1994; Lulek *et al.*, 2000), beras-*Oryza sativa* (Yamagata *et al.*, 1998) dan juga terdapat dalam kelompok polong-polongan (leguminosa) seperti *pigeonpea-Cajanus cajan* (Giri *et al.*, 1998), *cowpea-Vigna unguiculata* (Melo *et al.*, 1999) *bean-Phaseolus vulgaris* (Grossi de Sa *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1999; Marshall dan Lauda, 1975).

Penghambatan α -amilase oleh penghambat jenis protein dari sumber tanaman menunjukkan spesifitas yang berbeda terhadap α -amilase dari berbagai sumber (Franco *et al.*, 2002). Beberapa penghambat α -amilase tersebut menunjukkan aktivitas penghambatan baik terhadap α -amilase mamalia maupun serangga. Beberapa penghambat α -amilase dari beberapa biji-bijian dan polong-polongan dilaporkan menghambat α -amilase saliva manusia dan atau pankreas *porcine*

*Korespondensi penulis :

Email : budiasih.wahyuntari@bppt.go.id; solichin.budiasih@gmail.com

seperti biji-bijian gandum–*Triticum aestivum* (Feng *et al.*, 1996), *Secale cereale* (Garcia-Casado *et al.*, 1994, Iulek *et al.*, 2000), sorghum–*Sorghum bicolor* (Kutty dan Pattabiraman, 1986) dan berbagai jenis polong-polongan *Phaseolus vulgaris* (Nahoum *et al.*, 2000; Celleno *et al.*, 2007), cowpea–*Vigna unguiculata* (Melo *et al.*, 1999), *Vigna sublobata* (Kokiladevi *et al.*, 2005), dan pigeonpea–*Cajanus cajan* (Giri dan Kachole, 1998). Menurut Richardson (1990) penghambat α -amilase jenis protein diklasifikasi menjadi enam kelas berdasarkan struktur tersiernya, yaitu *legume lectin-type*, *knottin-type*, *cereal-type*, *Kunitz-type*, γ -*thionin-type* dan *thaumatin-type*.

Tipe **Legume lectin** terdapat pada berbagai jenis kacang polong (*commom bean*). Ekstrak kasar *kidney bean* yang mengandung penghambat α -amilase tipe *lectin* telah digunakan sebagai *starch blocker* sejak tahun 1980 untuk mengontrol diabetes melitus yang tidak tergantung pada insulin dan obesitas walaupun tidak begitu berhasil, tetapi ekstrak murni yang hanya terdiri dari fraksi α -amilase inhibitor lebih berhasil untuk mengontrol diabetes (Franco *et al.*, 2002). Ekstrak penghambat α -amilase dari kacang polong putih (*white bean*, *P. vulgaris*) diuji klinis oleh Barret dan Udani (2011). Hasil pengujian menunjukkan bahwa dosis sebanyak 300-500mg per hari mampu menurunkan glukosa postprandial serta integrasi ekstrak kedalam produk makanan dan minuman tidak menimbulkan perubahan penampilan, tekstur maupun rasa serta tidak ada efek samping yang serius.

Penghambat tipe **Knottin** terdapat pada tanaman *Amaranth* yang hanya menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap α -amilase serangga tetapi tidak terhadap α -amilase mamalia (Carugo *et al.*, 2001).

Penghambat tipe **Cereal** terdapat pada *wheat*, *barley*, *ragi* (*Indian finger millet*). Penghambat tipe ini yang paling banyak dipelajari dan memiliki kemampuan menghambat α -amilase eksogenus. Demikian pula penghambat dwifungsi yaitu yang mampu menghambat α -amilase dan subtilisin atau proteinase yang lain banyak dipelajari. Beberapa penghambat tipe ini merupakan glikoprotein dengan sifat alergenitasnya. Kontak yang terlalu sering dengan penghambat jenis ini dapat menyebabkan alergi dermatitis, *baker's asthma* (Garcia-Casado *et al.*, 1996). Penghambat yang akan digunakan sebagai bahan anti obesitas dan diabetes harus bebas dari senyawa alergen (Mills *et al.*, 2004; Nakase *et al.*, 1996). Penghambat α -amilase yang diekstraksi dari gandum kultivar Iran (*T. aestivum* v *zarrin*) mampu menghambat 97,7% α -amilase saliva manusia (Heidari *et al.*, 2005).

Penghambat tipe **Kunitz** terdapat pada serealea seperti barley, gandum, dan beras. Penghambat tipe ini yang telah dikarakterisasi secara lengkap adalah yang berasal dari barley yang merupakan penghambat dwifungsi yaitu penghambat α -amilase dan subtilisin. Penghambat ini terlibat dalam pengaturan degradasi karbohidrat dalam biji untuk mencegah α -amilase endogenus menghidrolisis pati selama perkecambahan dini (Svensson *et al.*, 2004).

Penghambat tipe γ -**thionin** antara lain terdapat dalam biji sorghum, gandum, jagung dan barley (Bloch dan Richardson, 1991; Castro *et al.*, 1996; Thevissen *et al.*, 1996; Mendez *et al.*, 1996). Kelompok penghambat ini terlibat dalam pertahanan

tanaman dengan berbagai macam mekanisme antara lain modifikasi permeabilitas membran (Thevissen *et al.*, 1996), penghambatan sintesis protein (Mendez *et al.*, 1996) dan penghambatan protease (Wijaya *et al.*, 2000). Penghambat tipe ini yang diisolasi dari sorghum dilaporkan memiliki daya penghambatan yang sangat kuat terhadap α -amilase serangga *locust* dan kecoa tetapi sedikit menghambat α -amilase *O sativa* dan saliva manusia, serta tidak menghambat α -amilase pankreas *porcine*, barley maupun *Bacillus* sp (Bloch dan Richardson, 1991).

Penghambat serupa **thaumatin**. *Thaumatococcus danielli* (Kant, 2005). *Zeamatin* yang diisolasi dari biji jagung termasuk kelompok penghambat tipe **thaumatin** karena memiliki struktur homologi dengan *thaumatin*. *Zeamatin* berpotensi sebagai anti fungi patogen manusia dan tumbuh-tumbuhan (Svensson *et al.*, 2004). Selain memiliki aktivitas antifungi juga dapat menghambat α -amilase *Tribolium* dan tripsin pankreas *porcine*. Menurut Abad *et al.* (1996) *zeamatin* berikatan dengan β -1,3 glukon dan merembes (*permeabilize*) ke dalam sel fungi sehingga menyebabkan kematian sel. Penghambat non protein terdiri atas berbagai senyawa organik karbohidrat, polifenol, flavonoid seperti antara lain *acarbose*, *isocarbose*, *acarviosine-glucose*, asam hibiscus, siklodekstrin. *Acarbose* dapat diperoleh dari mikroba *Actinoplanes* sp dan *Streptomyces* sp (Hemker *et al.*, 2001). α -, β - dan γ -siklodekstrin yang diproduksi oleh beberapa bakteri *Bacillus* sp dilaporkan sangat aktif menghambat α -amilase pankreas manusia dan *porcine*; (Qian *et al.*, 2001). Asam hibiscus, *isocarbose* dan *acarviosine-glucose* diisolasi dari roselle (*Hibiscus sabdariffa*) (Hansawasdi *et al.*, 2000).

Kotowaroo *et al.* (2006) melaporkan bahwa daun dari tanaman famili *Moraceae* (*Arthocarpus heterophyllus*) juga mengandung penghambat α -amilase. Ekstrak daun *Arthocarpus heterophyllus* mengandung sikloartenon, sikloartenol, β -sitosterol dan tannin tetapi komponen mana yang berfungsi sebagai penghambat α -amilase belum diketahui. Daun *Arthocarpus heterophyllus* secara tradisional selain digunakan sebagai bahan pangan juga dimanfaatkan sebagai bahan obat tradisional diabetes melitus oleh masyarakat Mauritius. Sistem pengobatan diabetes tradisional menggunakan tanaman obat telah lama dipraktikkan di Asia maupun Afrika (Kotowaroo *et al.*, 2006; Said *et al.*, 2007; Ani dan Naidu, 2008; Hui *et al.*, 2009; Deguchi dan Miyazaki, 2010; Sudha *et al.*, 2011).

Campuran ekstrak kering daun *walnut* (*Juglans regia* L), zaitun (*Olea europea* L), *nettle* (*Urtica dioica* L) dan *salt bush* (*Atriplex halimus* L) secara tradisional telah dimanfaatkan sebagai obat anti diabetes dalam pengobatan herbal tradisional di Arab. Said *et al.* (2007) mengamati keamanan dan pengaruh campuran tersebut dalam mempertahankan kadar gula darah. Walaupun telah sejak lama dipakai sebagai obat tradisional tetapi, kandungan senyawa aktif dari masing-masing daun belum pernah diamati.

Di China, daun "hanliu" (*Salix matsudana*) telah berabad-abad dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk mengobati *jaundice*, hepatitis, rematik, arthritis, eczema. Han *et al.*, (2003) menguji polifenol dari ekstrak daun tersebut untuk dimanfaatkan sebagai anti obesitas pada hewan percobaan *rodent*. Fraksi

flavonoid glukosida dari daun tanaman *S. matsudana* menyebabkan penghambatan adsorpsi karbohidrat dan lipid pada usus kecil melalui penghambatan α -amilase dan penyerapan asam palmitat (Han *et al.*, 2003).

Akhir-akhir ini penelitian berbagai tanaman yang digunakan dalam pengobatan herbal untuk terapi diabetes telah banyak dilakukan. Sudha *et al.* (2011) menguji kemampuan 126 ekstrak dari 17 jenis tanaman obat yang digunakan di India sebagai penghambat α -amilase pankreas maupun α -glukosidase. Penelitian tersebut mendapatkan bahwa senyawa alkaloid, steroid, saponin dan kardiak glikosida dari *Linum usitatissimum* L, tannin, saponin dan kardiak glikosida dari *Morus alba* L serta alkaloid, tannin dan flavonoid dari *Ocinum tenuiflorum* L memiliki kemampuan untuk menghambat α amilase pankreas *porcine*.

Gnidia glauca and *Dioscorea bulbifera* telah lama dimanfaatkan untuk pengobatan di India dan China. Ekstrak petroleum eter, etil asetat, methanol dan etanol dari daun, batang dan bunga *G. glauca* serta umbi *D. bulbifera* mampu menghambat α amilase pankreas *porcine*. (Ghosh *et al.*, 2011).

Komponen polifenolik/flavonoid dalam biji *Centrathium anthelminticum* L Kuntze terdiri dari *gallic acid*, *proto-catechuic acid*, *caffeic acid*, *ellagic acid*, *ferulic acid*, *quercetin* dan *kaemferol* menunjukkan penghambatan yang signifikan terhadap aktivitas α amilase saliva manusia dan glukosidase usus serta menurunkan *postprandial hyperglycemia* pada tikus sehingga memungkinkan ekstrak yang diuji dapat dimanfaatkan untuk terapi diabetes tipe 2 (Ani dan Naidu, 2008).

Ekstrak etanol dan heksan yang merupakan senyawa non protein seperti *phyllanthin*, *hypophyllanthin*, *terpenes*, *tripenes*, *flavonoids* (*quercetin*, *quercetrin*, *rutin*), dan *alkaloids* dari tanaman *Phyllanthus amarus* yang telah lama digunakan sebagai obat herbal untuk terapi diabetes berdasarkan penelitian Tamil *et al.* (2010) menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap α -amilase pankreas *porcine*.

Tanaman herbal, antara lain ginseng (*Panax ginseng*), *bitter melon* (*Momordica charantia*), *huanglian* (*Coptis chinensis*) secara tradisional telah digunakan dalam pengobatan diabetes di Cina (Hui *et al.*, 2009). Pengujian terhadap ekstrak ginseng menunjukkan bahwa ginseng mengandung 76 komponen yang berupa ginsenosida, polisakarida, peptida, alkohol poliasietilenik. Sedangkan kandungan dalam *bitter melon* yang memiliki efek hipoglikemik antara lain *charantin*, *vicine* dan *alkaloid*. Berberin adalah senyawa aktif alkaloid isoquinolin yang terkandung dalam akar, rhizoma, batang dan kulit batang tanaman *Coptis chinensis* (Hui *et al.*, 2009). Sayuran *Welsh onion* (bawang daun) berpotensi sebagai bahan hipoglikemik yang efektif terhadap hewan uji tikus, tetapi bagian yang biasa dimakan (umbi, *stalk*-batang dan daun) memiliki daya penghambatan lebih rendah daripada serabut akarnya (Kang *et al.*, 2010). Di Jepang, daun *Psidium guajava* Linn yang dimanfaatkan sebagai teh juga telah terbukti memiliki efek anti hiperlipidemia dan hiperlipidemia (Deguchi dan Miyazaki, 2010).

Mekanisme penghambatan metabolisme karbohidrat dalam sistem pencernaan

Semua karbohidrat kompleks yang dikonsumsi manusia, sebelum dapat diserap oleh sistem pencernaan harus dihidrolisis menjadi unit-unit monomernya. Pati adalah salah

satu bentuk karbohidrat kompleks yang merupakan polimer glukosa. Di dalam sistem pencernaan manusia terdapat enzim-enzim yang berperan mencerna makanan. Enzim yang terlibat dalam pemecahan pati antara lain α -amilase dalam air liur (*saliva*) dan pankreas. α -amilase mengkatalis pemecahan pati menjadi maltosa dan glukosa yang merupakan satu-satunya bentuk gula yang dapat diserap tubuh. Peristiwa pemecahan pati tersebut terjadi sangat cepat. Beberapa menit setelah asupan pati, akan terjadi hiperglikemia yang mengarah ke hiperinsulinaemia. Kedua kondisi hiperglikemia dan hiperinsulinaemia tidak dikehendaki terjadi pada penderita diabetes mellitus, obesitas atau hiperlipoproteinaemia (Kotowaroo *et al.*, 2006). Pada kondisi normal monosakarida yang tidak segera digunakan sebagai energi akan disimpan sebagai glikogen di hati atau trigliserida dalam jaringan adiposa, hati dan plasma (Celleno *et al.*, 2007). Penghambat α -amilase berpengaruh terhadap metabolisme didalam saluran pencernaan antara lain mengganggu atau memperlambat pemecahan karbohidrat sehingga akan mengurangi ketersediaan kalori atau mempengaruhi sistem glukosa-insulin. Pengaruh penghambatan α -amilase terhadap absorpsi karbohidrat dan glukosa plasma setelah makan (*postprandial*) telah di uji pada manusia dan menunjukkan bahwa penghambat tersebut memperlambat penyerapan dan mengurangi konsentrasi glukosa plasma. Oleh karena itu penghambat α -amilase dapat dimanfaatkan bagi penderita diabetes mellitus tipe II (Judge dan Svensson, 2006).

KESIMPULAN

Terdapat dua golongan penghambat α -amilase yaitu golongan protein dan non protein yang bisa diperoleh dari tumbuhan, hewan maupun mikroba. Penghambat α -amilase non protein berupa senyawa organik. Aktivitas penghambatan suatu jenis penghambat dari sumber yang berbeda akan berpengaruh berbeda terhadap α -amilase. Beberapa penghambat protein dan non protein telah diteliti memiliki kemampuan menghambat α -amilase pankreas manusia sehingga dapat dimanfaatkan untuk terapi kegemukan dan diabetes tipe II.

DAFTAR PUSTAKA

- Abad LR, D'Urzo MP, Lin D, Narasimhan ML, Renveni M, Zhu JK, Niu X, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan RA. 1996. Anti fungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 118: 11-23.
- Abe JI, Sidenius U, Svensson B. 1993. Arginine is essential for the α amylase inhibitory activity of the α amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem J* 193: 151-155.
- Ani V, Naidu KA. 2008. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cumin *Centrathium anthelminticum* (L) Kuntze seeds. *Eur Food Res Technol* 226:897-903. doi 10.1007/s00217-007-0612-1.

- Barret ML, Udani JK. 2011. A proprietary alpha-amylase inhibitor from White vean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. Nutr J 10:24 (<http://www.nutritionj.com/content/10/1/24>).
- Blanco-Labra A, Iturbe-Chiñas FA. 1981. Purification and characterization of glycoprotein α -amylase inhibitor from tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). J Food Biochem 5: 1 – 17.
- Bloch C, Richardson M. 1991. A new family of small (5 kD) protein inhibitors of insect α amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with γ -purothionin. FEBS Lett 279: 101-104.
- Burgos-Hernandez A, Rosas-Burgos C, Ramirez-Wong B, Carbonell-Barrachina AA, Cinco-Moroyoqui FJ. 1999. Identification of α -amylase inhibitors in triticale grain. J Sci Food Agric 79: 1671-1675.
- Carugo O, Lu S, Luo J, Gu X, Liang S, Strobl S, Pongor S. 2001. Structural analysis of free and enzyme-bound amaranth α -amylase inhibitor: classification within the knottin fold superfamily and analysis of its functional flexibility. Protein Eng 14: 639– 646.
- Castro MD, Fontes W, Morhy L, Bloch Jr. C. 1996. Complete amino acid sequence from g-thionin from maize (*Zea mays* L) seeds. Protein Pept. Lett 3: 267-274.
- Celleno L, Tolaini MV, D'Amore A, Perricone NV, Preuss HG. 2007. A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. Int. J Med Sci 4: 45-52.
- Deguchi Y, Miyazaki K. 2010. Anti-hyperglycemic and anti hyperlipidemic effects of guava leaf extract, Nutrition metab 79: 9 (<http://www.nutritionmetabolism.com/content/7/1/9>).
- Feng GH, Richardson M, Chen MS, Kramer KJ, Morgan TD, Reeck GR. 1996. α -Amylase inhibitors from wheat: a sequences and pattern of inhibition of insect and human α amylase. Insect. Biochem.Mol. Biol 26: 419-426.
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Bloch Jr. C, Silva CP, Grossi-de-Sa MF. 2000. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α amylase and structural explanation of observed specificities. Eur. J Biochem 267: 1466 – 1473.
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-de-Sa MF. 2002 Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: for Structure, function and potential crop protection. FEBS. Eur. J Biochem 269: 397-412.
- Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Chrispeels MJ, Armentia A, Salcedo G, Gomez L. 1996. Role of complex asparagin-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. Glycobiology 6: 471-477.
- Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Lopez-Otin C, Salcedo G. 1994. Rey inhibitors of animal α -amylases shown different specificities, aggregative properties and IgE-binding capacities than their homologues from wheat and barley. Eur.J Biochem 224: 525-531.
- Ghosh S, Ahire M, Patil S, Jabgunde, Dusane MB, Joshi BN, Pardesi K, Jachak S, Dhavale DD, Chopade BA. 2011. Antidiabetic Activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*: Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors, Hindawi Publish Co. 2012. article ID 929051. 10pp (<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/929051>).
- Giri AP, Kachole MV. 1998. Amylase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds. Phytochemistry 47: 197-202.
- Grossi de Sa MF, Mirkov TE, Ishimoto M, Colucci G, Bateman KS, Chrispeels MJ. 1997. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. Planta 203: 295-303.
- Han LK, Sumiyoshi M, Zhang J, Liu MX, Zhang XF, Zheng YN, Okuda H, Kimura Y. 2003. Anti-obesity Action of *Salix matsudana* Leaves (Part 1). Anti-obesity Action by Polyphenols of *Salix matsudana* in High Fat-diet Treated Rodent Animals, Phytother. Res 17: 1188–1194/ doi: 10.1002/ptr.1404.
- Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T. 2000. Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) tea. Biosci Biotechnol Biochem 64:1041-1043
- Hansawadi C, Kawabata J, Kasai T. 2001. Hibiscus acid as an inhibitor of starch digestion in the caco-2 cell model system. Biosci Biotechnol Biochem 65 (9): 2087-2089
- Heidari R, Zareae S, Heidarizadeh M. 2005. Extraction, Purification, and Inhibitory Effect of Alpha-Amylase Inhibitor from Wheat (*Triticum aestivum* var *Zarrin*). Pakistan J Nutr 4: 101-105.
- Hui H, Tang G, Go VLW. 2009. Hypoglycemic herbs and their action mechanisms, Chinese Med 4:11, doi:10.1186/1749-8546-4-11 (<http://www.cmjournal.org/content/4/1/11>).
- Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch Jr.C, Rigden DJ, Grossi de Sa MF. 2000. Purification, biochemical characterization and primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rey). Inter. J Biochem Cell Physiol 32: 1195-1204.
- Judge, N, Svensson, B., 2006. Review proteinaceous inhibitor of carbohydrate active enzymes in cereals: implication in agriculture, cereal processing and nutrition. J Sci Food Agric 0022–5142. doi: 10.1002/jsfa.2454
- Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Vitanen M, Kareholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. 2005. Obesity and vascular risk factors ant midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. Arch Neurol 62: 1556-1560.
- Kang MJ, Kim JH, Choi HN, Kim MJ, Han JH, Lee JH, Kim JI. 2010. Hypoglycemic effects of Welsh onion in an animal model of diabetes mellitus. Nutr Res Pract 4(6): 486-491. doi: 10.4162/nrp.2010.4.6.486.
- Kokiladevi E, Manickam A, Thayumanavan B. 2005. Characterization of α amylase inhibitor in *Vigna sublobata*. Bot Bull Acad Sin 46: 189 – 196.
- Kotowaroo MI, Mahomoodally MF, Gurib-Fakim A, Subratty AH. 2006. Screening of Traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible α amylase inhibitory effect in vitro. Phytother Res (20): 228-231.

- Kutty AVM, Pattabiraman TN. 1986. Isolation and characterization of an α amylase inhibitor from sorghum seeds, specific for human enzymes. *J Agric Food Chem* 34: 552 – 557.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Marshall JJ, Lauda CM. 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha amylase from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem* 250: 8030 – 8037.
- Melo FR, Sales MP, Pereira LS, Bloch CJ, Franco OL, Ary MB. 1999. α -amylase inhibitors from cowpea seeds. *Protein and Peptide Letters* 6: 385 – 390.
- Mendez E, Rocher A, Calero M, Girbes T, Citores L, Soreano F. 1996. Primary structure of ω -hordothionin, a member of a novel family of thionin from barley endosperm and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. *Eur. J Biochem* 239: 67-73.
- Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ, Shewry PR. 2004. Structural, biological, and evolutionary relationship of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract, *Crit Rev. Food Sci Nutr* 44: 379-407.
- Mundy J, Rogers JC. 1986. Selective expression of a probable alpha amylase/subtilisin inhibitor. *Planta* 169: 51 – 63.
- Nahoum V, Roux G, Anton V, Rouge P, Puigserver A, Bischoff H, Hendrissat B, Payan F. 2000. Crystal structures of human pancreatic α amylase in complex with carbohydrate and proteinaceous inhibitors. *J Biochem* 346: 201-208.
- Nakase M, Adachi T, Urisu A, Miyashita T, Alvarez AM, Nagasaka S, 1996, Rice (*Oryza sativa*) α amylase inhibitors of 14-16kDa are potential allergens and products of multigene family. *J Agr Chem* 44: 2624-2628.
- Pekkarinen AI, Jones BL. 2003. Purification and identification of barley (*Hordeum vulgare* L) proteins that inhibit the alkaline serine proteinase of *Fusarium culmorum*. *J Agric Food Chem* 51: 1710–1717.
- Qian M, Nahoum V, Bonicel J, Bischoff H, Hendrissat B, Payan, F. (2001) Enzyme- catalyzed condensation reaction in a mammalian alpha-amylase. High resolution structural analysis of an enzyme inhibitor complex. *Biochemistry* 40, 7700±7709.
- Richardson M. 1990. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In *Methods in Plant Biochemistry* (Rogers. L. ed). 5: 261-307. Academic Press. London. UK.
- Said O, Fulder S, Khalil K, Azaizeh H, Kassis E, Saad B, 2008, maintaining A Physiological Blood Glucose level with “Glucoselevel” A Combination of Four Anti-Diabetes Plants Used in Traditional Arab Herbal medicine, *eCAM* 5: 421-428 doi;10.103/ecam/nem047. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk>).
- Selitretnnikoff CP, Wilson SJ, Clemons KV, Stevens DA. 2000. Zeamatin an antifungal protein. *Curr. Opin. Anti Infective drugs* 2: 368-374.
- Singh J, Bblundel M. 2001. Albumin and globulin proteins of wheat flour: Immunogical and N-terminal sequence characterisation. *J Cereal Sci* 34: 85 – 103.
- Sudha P, Zinjarde SS, Shobha YB, Kumar AR, 2011, Potent α Amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal Plants, *BMC Complementary Alternative medicine*, 11:5 (<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/5>).
- Svensson B, Fukuda K, Nielsen PK, Bonsager BC. 2004. Proteinaceous α -amylase inhibitors. *Biochim. Biophys Acta*. 1696: 145-156.
- Tamil IG, Dineshkumar B, Nandhakumar M, Senthilkumar M, Mitra A, 2010, *In vitro* study on α -amylase inhibitory activity of an Indian medicinal plant, *Phyllanthus amarus*, *Indian J Pharmacol.*; 42(5): 280–282. doi: [10.4103/0253-7613.70107](https://doi.org/10.4103/0253-7613.70107)
- Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx G, Brownlee C, Osborn RW, Broekaert WF. 1996. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionin. *J Biol Chem* 271: 15018-15025.
- Thornton DJ, Carlstedt I, Sheehan JK. 1994. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels dalam *Methods in Molecular Biology*. 32: Basic protein and peptide protocols. Ed J.M. Walker. Humana Press Inc. Totowa NJ.
- Warchalewski JR. 1977. Isolation and purification of native α -amylase inhibitors from winter wheat. *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser Sci Biol* 25: 731–735.
- Weselake RJ, MacGregor AW, Hill RD, Duckworth HW. 1983. Purification and characteristics of α -amylase inhibitor from Barley Kernels. *Plant Physiol* 73: 1008-1012.
- Wijaya R, Neuman GM, Condrón R, Hughes AB, Polya GM. 2000. Defense protein from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci* 159: 243-255.
- Yamagata H, Kunimatsu K, Kamasaka H, Kuramoto T, Iwasaki T. 1998. Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization and changes in developing and germinating seeds. *Biosci. Biotechnol Biochem* 62: 978-985.
- Yamasaki T, Deguchi M, Fujimoto T, Masamura T, Uno T, Kanamaru K, Yamagata H. 2006. Rice Bifunctional α -Amylase/Subtilisin Inhibitor: Cloning and Characterization of the Recombinant Inhibitor Expressed in *Eschericia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(5): 1200-1209.
- Young NM, Thibault P, Watson DC, Chrispeels MJ. 1999. Post translational processing of two α -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean *Phaseolus vulgaris*. *FEBS Lett* 446: 203-206.