

KOMPONEN AKTIF DALAM TEMPE UNTUK PENCEGAHAN DIARE

Oleh : Mien KMS Mahmud¹; Hermana²; Heru Yuniati³; dan Endi Ridwan^{4,5}

¹*Kelompok Program Penelitian Eksplorasi Potensi Gizi, dan*
^{2,3}*Kelompok Program Penelitian Penanggulangan Gizi Utama, Puslitbang Gizi, Bogor*

ABSTRAK

Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa tempe mempunyai khasiat yang bermanfaat bagi kesehatan yaitu kemampuan mencegah terjadinya kenaikan kadar kolesterol darah dan diare akibat infeksi bakteri enteropatogenik *Eserichia coll* (*E.coli*). Komponen atau zat aktif dalam tempe yang berperan pada pencegahan diare belum diketahui. Komponen tersebut dapat ditentukan melalui dua tahap penelitian yaitu pertama menguji jenis ekstrak tempe yang mampu mencegah diare, dan kedua menentukan komponen atau senyawa yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Penelitian ini bertujuan menentukan jenis ekstrak tempe yang mampu mencegah/menghambat terjadinya diare akibat infeksi bakteri enteropatogenik *E.coli*. Penelitian dilakukan secara *bloog* menggunakan kelinci sebagai hewan percobaan. Kelinci saphan yang sehat dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing kelompok di samping ransum basal diberi ekstrak tempe dengan pelarut etanol atau pelarut etanol-hexan (1:1) atau pelarut hexan, satu kelompok diberi residu dan satu kelompok lagi hanya diberi ransum basal (kelompok kontrol). Setelah 30 hari pemberian ransum, kelinci diinfeksi dengan *E.coll*. Pengamatan dilakukan terhadap kenaikan berat badan, kejadian diare, jangka waktu diare, reaksi imun, patologi-anatomi, dan histopatologi saluran pencernaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa komponen dalam tempe yang berpengaruh terhadap pertumbuhan terdapat di dalam residu. Komponen yang berpengaruh mengurangi resiko diare terdapat di dalam ekstrak etanol. Komponen yang menghambat kejadian diare terdapat di dalam residu dan ekstrak etanol. Komponen yang bersifat sebagai antigen yang dapat menimbulkan reaksi imunitas terhadap bakteri *E.coli* terdapat di dalam ekstrak hexan.

Pendahuluan

Tempe, mempunyai beberapa sifat khusus yang bermanfaat bagi kesehatan di samping merupakan bahan makanan yang bermutu gizi tinggi. Telah diketahui bahwa tempe mengandung zat trihidroksi-isoflavon yang mempunyai kemampuan mencegah terjadinya hemolisa (1).

Penelitian di Universitas Gajah Mada Yogyakarta (2) dan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi, Bogor (3) menunjukkan bahwa tempe memiliki sifat yang bermanfaat bagi kesehatan yaitu, berkemampuan mencegah terjadinya kenaikan kadar kolesterol darah.

Penelitian lain yang dilakukan Wang, dkk. (4) dan Affandi, dkk.(5) menunjukkan bahwa tempe mengandung senyawa antibakteri yang aktif dalam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri gram positif. Penelitian Mahmud, dkk. (6) menunjukkan sifat lain

dari tempe yang bermanfaat bagi kesehatan yaitu kemampuan mencegah terjadinya diare akibat infeksi bakteri *Escherisia coli* patogen.

Dalam penelitian Mahmud, dkk. (6) tidak diteliti/ditentukan jenis komponen atau zat aktif yang berperan dalam mencegah diare tersebut. Jika komponen aktif dalam tempe dapat diketahui, maka pencegahan diare pada bayi dan anak balita dapat dilakukan dengan menggunakan komponen aktif tersebut. Komponen aktif dalam tempe yang dapat mencegah terjadinya diare dapat ditentukan melalui dua tahap penelitian, yaitu pertama menguji jenis ekstrak tempe yang mampu mencegah diare, kedua menentukan komponen atau senyawa yang terkandung dalam ekstrak tempe tersebut.

Penelitian ini merupakan penelitian tahap pertama yang bertujuan menguji kemampuan tiga jenis ekstrak tempe dan residu yang dihasilkan, dalam mencegah diare akibat infeksi bakteri *Escherisia coli* patogen.

Metodologi

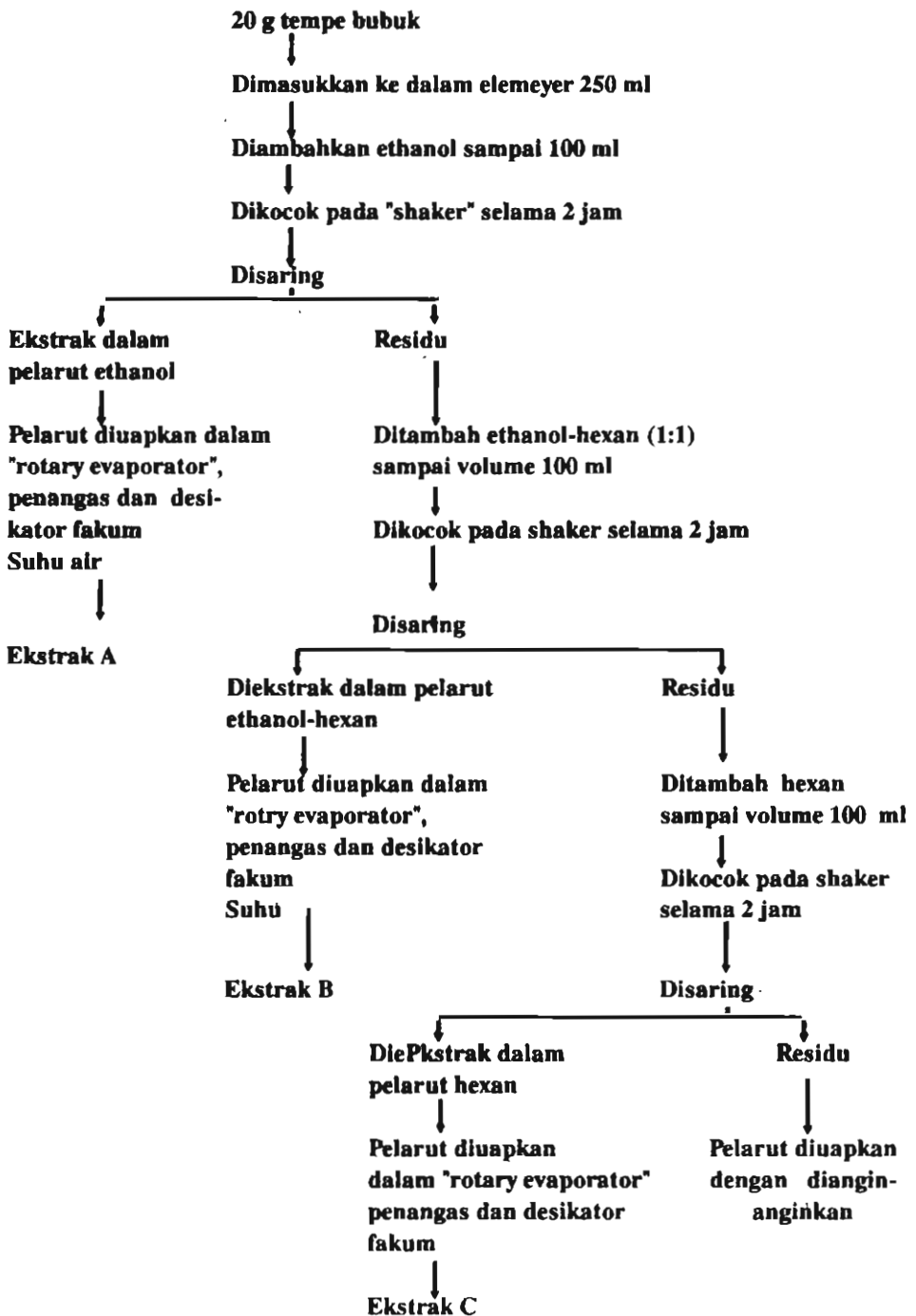
Tempe yang dibuat dengan waktu fermentasi 36-40 jam dikeringkan pada suhu 50-60 derajat Celcius, kemudian dihaluskan. Tempe bubuk diekstraksi dengan pelarut etanol, etanol + heksan (1:1), kemudian heksan. Setelah proses ekstraksi, dihasilkan tiga macam ekstrak dan satu residu. Proses ekstraksi disajikan dalam Gambar 1.

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini ialah kelinci, yang diperoleh dari peternak. Kelinci tersebut sebelum digunakan dalam penelitian dipelihara di laboratorium percobaan hewan selama dua minggu untuk disesuaikan sebagai hewan percobaan. Pada tahap ini kelinci diberi makan pelet dan sayuran, dan diberi minum larutan orthoquinoksalin. Setelah dua minggu, semua kelinci ditimbang, diperiksa keadaan fisik dan ditentukan kadar hemoglobin darah, lalu dipilih yang sehat untuk penelitian selanjutnya. Kelinci percobaan yang sehat dibagi menjadi lima kelompok. Tiga kelompok, selain diberi ransum biasa, masing-masing mendapat satu jenis ekstrak. Satu kelompok mendapat residu, dan satu kelompok sisanya sebagai kontrol dan hanya mendapat ransum biasa. Pemberian dilakukan per oral dengan dosis $2 \times 1 \text{ ml} \times 10^{10}$, setiap hari selama tujuh hari.

Setelah infeksi, pengamatan dilakukan selama dua minggu untuk mengamati jangka waktu diare (saat diare hilang). Dalam masa ini semua kelompok hanya diberi ransum basal. Data yang dihimpun meliputi berat badan, gejala diare awal, jangka waktu diare, keadaan patologis anatomis dan hispatologis dan reaksi immunologis. Diasumsikan bahwa komponen aktif terdapat dalam salah satu ekstrak atau residu.

Hasil dan Bahasan

Setiap 20 gram tempe bubuk menghasilkan ekstrak sebanyak 2 ml ekstrak etanol (ekstrak A), 1 ml ekstrak etanol + hexan (ekstrak B), 0,6 ml ekstrak hexan (ekstrak C) dan 16,4 gram residu.



Gambar 1. Proses ekstraksi tempe

Dari hasil undian didapat pembagian kelompok percobaan sebagai berikut : Kelompok I diberi ransum basal dan ekstrak etanol (A); kelompok II diberi ransum basal saja (kontrol); kelompok III diberi ransum basal dan ekstrak etanol + hexan (B); kelompok IV diberi ransum basal dan residu; kelompok V diberi ransum basal dan ekstrak hexan (C).

Pemberian ekstrak dilakukan dengan menggunakan alat suntik, diberikan setiap hari pada pagi hari. Residu diberikan dalam bentuk pelet. Pelet dibuat dengan mencampurkan residu ke dalam bahan-bahan ransum basal, kemudian dibuat pelet dan dikeringkan.

Jumlah pemberian sehari yaitu sebagai berikut. Ransum basal *adlibitum*, ekstrak A (etanol) 1 ml, ekstrak B (etanol + hexan) 0.5 ml, ekstrak C (hexan) 0,3 ml dan residu 8,2 gram. Total semua ekstrak dan residu berasal dari 10 gram tempe bubuk. Kelompok ditentukan dengan undian.

Setiap kelompok terdiri dari 12 ekor. Setelah 30 hari pemberian makanan, 8 ekor dari setiap kelompok diinfeksi dengan bakteri *E. coli* 0125K70(B)H19 dari Biofarma dan *E. coli* asal tinja anak penderita diare yang diperoleh dari bagian mikrobiologi FK-UI.

Hasil pengamatan berat badan sebelum dan setelah pemberian ekstrak disajikan dalam Tabel 1, sedangkan dalam Tabel 2 disajikan perubahan berat badan lelaki setiap kelompok percobaan akibat infeksi *E. coli*.

Dari Tabel 1 tampak, bahwa pengaruh residu tempe terhadap kenaikan berat badan ternyata paling baik, yaitu rata-rata per minggu sebanyak 12.0 %. Pengaruh masing-masing ekstrak terhadap kenaikan berat badan lebih rendah daripada pengaruh ransum basal (kontrol), hal ini ada kemungkinan pemberian ekstrak mengurangi selera makan kelinci percobaan.

Setelah infeksi ternyata pengaruh masing-masing ekstrak atau residu lebih baik daripada kontrol (Tabel 2), hal ini menunjukkan bahwa di dalam ekstrak tempe dan residu terdapat komponen yang dapat mengurangi resiko akibat infeksi saluran pencernaan oleh bakteri enteropatogenik. Ternyata pengaruh ekstrak A terbaik diikuti oleh ekstrak B, kemudian ekstrak C dan terakhir residu.

Tabel 1. Pengaruh Makanan Terhadap Berat Badan

Kelompok	Berat badan (g)		Kenaikan Total	% Rata/mg
	Awal	Akhir		
I	1362.8 + 152.8	1907.5 + 204.6	40.0	10.0
II	1362.7 + 184.2	1969.3 + 353.4	44.5	11.1
III	1362.8 + 198.4	1919.7 + 274.8	40.9	10.2
IV	1362.1 + 229.8	2018.0 + 347.4	48.2	12.0
V	1363.0 + 179.5	1869.7 + 360.7	37.1	9.3

Tabel 2. Pengaruh Infeksi Terhadap Berat Badan

Kelompok	Berat badan (g)		Kenaikan Sesudah infeksi	Kenaikan (%)
	Sebelum infeksi			
I	1907,5 ± 209,6	2021,5 ± 229,8	6,0	
II	1969,3 ± 353,4	1978,5 ± 327,2	0,5	
III	1919,7 ± 274,8	2018,7 ± 289,3	5,2	
IV	2018,0 ± 341,4	2087,6 ± 328,7	3,4	

Bila Tabel 1 dan Tabel 2 dibandingkan, maka akibat infeksi *E. coli* pada kelompok kontrol menghambat pertumbuhan sebanyak 95.5 %. Rata-rata kenaikan berat badan per minggu sebelum infeksi sebanyak 11,1 %, sedangkan selama infeksi satu minggu kelompok kontrol hanya naik 0,5 %, ini menunjukkan bahwa infeksi mengakibatkan kelinci usia sapihan tidak mengalami proses pertumbuhan.

Pengaruh ekstrak dan residu berturut-turut sebagai berikut, yaitu ekstrak A 40 %, ekstrak B 47 %, ekstrak C 57% dan residu 71,7 %. Keadaan ini memberi petunjuk bahwa sebagian besar komponen aktif dalam tempe yang dapat menghambat resiko akibat infeksi *E. coli* terdapat dalam ekstrak yang menggunakan pelarut etanol.

Pada Tabel 3 disajikan hasil pengamatan terhadap gejala awal terjadi diare, dihitung sejak pemberian *E. coli*, awal pemberian *E. coli* dinyatakan sebagai hari kesatu.

Tabel 3. Gejala Diare Awal

Kelompok	Jumlah Kelinci	Awal gejala diare		Total yang diare		%
		Hari ke		N (ekor)	N (ekor)	
I	8	5	3	4	50.0	
		6	1			
II	8	3	4	6	75.0	
		4	2			
III	8	4	4	5	62.5	
		7	1			
IV	8	3	2	3	37.5	
		5	1			
V	8	3	3	4	50.0	
		6	1			

Berdasarkan data dalam Tabel 3, yang paling lambat terkena diare adalah kelompok I, yaitu hari ke 5 dan ke 6, kemudian kelompok III yaitu hari ke 4 dan ke 7, sedangkan kelompok II, IV dan V sama yaitu pada hari ke 3. Kelompok I baru memperlihatkan gejala diare setelah pemberian *E. coli* sebanyak 4 X 2 X 1 X 10¹⁰ koloni, sedangkan kelompok III setelah pemberian *E. coli* 3 X 2 X 1 X 10¹⁰ koloni. Berdasarkan data tersebut terdapat gambaran bahwa kelompok I mempunyai daya tahan tubuh paling tinggi. Maka dapat disimpulkan bahwa komponen aktif yang dapat menghambat terjadi diare akibat infeksi bakteri enteropatogenik terdapat dalam ekstrak etanol + hexan.

Pada hari ke 8 yaitu sehari setelah pemberian *E. coli* selesai, jumlah kelinci yang diare dalam masing-masing kelompok adalah sebagai berikut : Kelompok I 4 ekor (50 %), kelompok II 6 ekor (75 %), kelompok III 5 ekor (62,5 %), kelompok IV 3 ekor (37,5 %) dan kelompok V 4 ekor (50 %). Berdasarkan data ini ternyata hambatan terhadap diare terbesar karena pengaruh residu, disusul karena pengaruh ekstrak etanol, ekstrak hexan, kemudian terkecil pengaruh etanol + hexan.

Hasil pengamatan lamanya menderita diare disajikan dalam Tabel 4. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa gejala diare yang nampak hanya ringan dan sedang saja, tidak terlihat adanya diare berat, dengan kriteria sebagai berikut.

Tabel 4. Jangka waktu diare pada kelinci percobaan akibat infeksi *E. coli*.

Kelompok	N (ekor)	Jangka waktu (hari)	Jangka waktu rata-rata (hari)
I	1	3	7.25 \pm 3.1
	1	7	
	1	9	
	1	10	
II	1	6	8.83 \pm 1.6
	4	9	
	1	11	
III	1	3	6.2 \pm 1.9
	1	6	
	2	7	
	1	8	
IV	1	7	9.3 \pm 2.1
	1	10	
	1	11	
V	1	8	9.75 \pm 1.3
	2	10	
	1	11	

Diare ringan terjadi apabila tinja berubah menjadi kecil-kecil, lunak dan lengket satu sama lain. Diare sedang, ditandai oleh sekeliling anus menjadi kotor karena tinja yang menempel, tinja yang lunak berlendir dan berbau busuk. Diare berat terjadi jika tinja encer sekali, tidak berbentuk, berbau sangat busuk dan kelinci menjadi lemah, sangat apatis (Mahmud, dkk. 1987). Hanya kelompok I dan III yang lamanya diare lebih singkat daripada kontrol, sedangkan kelompok IV dan V jangka waktu menderita diare lebih lama daripada kontrol (lihat Tabel 4). Hal ini memberikan petunjuk bahwa komponen yang berpengaruh terhadap daya tahan tubuh akibat infeksi *E. coli* terdapat dalam ethanol dan ekstrak etanol hexane.

Pengamatan patologi anatomi dan hispatologi dilakukan pada duodenum, jejunum, ileum, caecum, rectum dan colon. Kelinci yang diperiksa adalah kelinci yang diberi infeksi *E. coli* tanpa gejala diare dan diinfeksi *E. Coli* dengan gejala diare. Hasil pengamatan berturut-turut disajikan dalam Tabel 5, Tabel 6, Tabel 7 dan Tabel 8.

Pengamatan reaksi imunologis dilakukan terhadap kelinci dari masing-masing kelompok sebanyak tiga ekor. Pemeriksaan dilakukan secara slide agglutination (SA). Hasil pengamatan kualitatif disajikan dalam Tabel 9.

Pada pengujian awal terdapat 4 serum kelinci (26.7 %) yang bereaksi positif, pada pengujian kedua hanya satu dari empat serum tersebut masih bereaksi positif, tiga lainnya menjadi negatif. Keadaan tersebut memberi petunjuk suatu kemungkinan bahwa kelinci tersebut mengandung antibodi dari *E. coli* yang didapat dari alam atau masih mengandung antigen yang berasal dari air susu ibu, sehingga masa istirahat harus diperpanjang.

Pada pemeriksaan kedua yaitu setelah pemberian ekstrak tempe, serum kelinci pada kelompok III, kelompok IV dan kelompok V bereaksi positif, sementara pada kelompok kontrol tetap negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa di dalam ekstrak ethanol + hexane, residu, dan ekstrak hexane ada komponen yang merupakan antigen terhadap *E. coli*. Maka pemberian ekstrak tersebut bersifat imunisasi.

Ekstrak ethanol + hexane hanya memberi sifat imun pada satu dari tiga ekor kelinci (33.3 %), namun reaksinya positif dua menunjukkan daya imunisasinya cukup tinggi. Pada kelompok residu hanya satu dari tiga ekor kelinci (33.3 %) yang menunjukkan adanya reaksi imunitas dan hanya positif satu. Ekstrak hexane memberi reaksi imunitas pada dua dari tiga ekor kelinci yang diuji (66.7 %) dan reaksinya masing-masing positif dua. Hal ini menunjukkan bahwa komponen antigen sebagian besar terdapat pada ekstrak hexane. Pada ekstrak ethanol + hexane terdapat juga dalam jumlah kecil.

Data dalam Tabel 5, 6, 7 dan 8 menunjukkan bahwa meskipun tidak nampak gejala diare, infeksi telah terjadi, hal tersebut menyebabkan terpacunya antibodi sehingga pada pemeriksaan imunologis yang terakhir semua bereaksi positif. Data hasil pemeriksaan patologi anatomi dan hispatologis menunjukkan bahwa gejala diare hanya terjadi apabila saluran pencernaan telah mengalami kerusakan berat. Pada Tabel 7 terlihat bahwa kerusakan saluran pencernaan paling ringan terjadi pada kelompok kontrol, namun ternyata

nyata terjadi gejala diare. Gejala kerusakan saluran pencernaan paling ringan dan tidak menyebabkan diare adalah pada kelompok V; keadaan tersebut menunjukkan bahwa infeksi tidak berlanjut, mungkin disebabkan adanya faktor imun. Hal tersebut didukung pula oleh hasil pada Tabel 9 bahwa pada kelompok V setelah pemberian ekstrak terjadi reaksi positif dua pada serum kelinci.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan patologis anatomis saluran pencernaan kelinci setelah infeksi E.Coli dengan gejala diare.

Kelompok	Doudenum	Jejenum	Ileum	Caecum	Rectum	Colon
I	TAP/Normal	Penebalan	Penebalan	Kemerahan Penebalan	TAP	TAP
II	Kemerahan Penebalan	Kemerahan Penebalan	Penebalan	TAP	TAP	TAP
III	Berkaca-kaca TAP	Kemerahan Penebalan Berkaca-kaca Eksudasi	Kemerahan Penebalan Eksudasi	Berkaca-kaca Berkaca -kaca	TAP	Berkaca-kaca Berkaca-kaca
IV	Kemerahan Penebalan Berkaca-kaca	Kemerahan Penebalan	Kemerahan Penebalan Berkaca-kaca Eksudasi	TAP	TAP	TAP Berkaca-kaca
V	TAP	Kemerahan Penebalan Berkaca-kaca	Penebalan Kemerahan	Penebalan Kemerahan Berkaca-kaca	TAP	TAP Berkaca-kaca

Tabel 6 Hasil pemeriksaan patologis anatomi saluran pencernaan kelinci setelah infeksi E.Coli, tanpa gejala diare

Kelompok	Duodenum	Jejenum	Ileum	Caecum	Rectum	Colon
I	Kemerahan Penebalan Berkaca-kaca	Kemerahan Penebalan	Kemerahan Penebalan Berkaca-kaca	TAP	TAP	TAP Berkaca-kaca
II	Kemerahan Penebalan Berkaca-kaca	TAP	TAP	TAP	TAP	TAP
III	Kemerahan	Kemerahan	Kemerahan	TAP	TAP	TAP
IV	TAP	TAP	TAP Berkaca-kaca	Penebalan	TAP	TAP
V	TAP	TAP	Penebalan Berkaca-kaca	Penebalan	TAP	TAP

Tabel 7. Hasil pemeriksaan histopatologis saluran pencernaan kelinci setelah infeksi E.Coli dengan gejala diare

Kelompok	Duodenum	Jejunum	Ileum	Kaecum	Kolon	Rektal
I	Pembendungan degenerasi, lisis nekrosis dan ada sel radang	Pembendungan perdarahan, degenerasi, nekrosis dan sel radang	Degenerasi, perdarahan, pembendungan, nekrosis, lisis, ada sel radang	TAP	TAP	
II	Degenerasi, nekrosis, lisis dan ada sel radang	Degenerasi, nekrosis, lisis banyak sekali dan ada sel radang	Degenerasi, nekrosis, lisis dan ada sel radang	Sedikit-degenerasi	Sedikit-degenerasi	Sedikit-degenerasi
III	TAP	Perdarahan, nekrosis lisis dan sel radang	Pembendungan, degenerasi, nekrosis, lisis dan ada sel radang	Lisis dan ada sel radang	Degenerasi, dan ada sel radang	TAP
IV	Pembendungan, perdarahan, degenerasi, nekrosis, lisis dan ada sel radang	Pembendungan, degenerasi, nekrosis, lisis dan ada sel radang	Degenerasi, nekrosis dan lisis	Perdarahan degenerasi, nekrosis, dan ada sel radang	Degenerasi dan sel radang	TAP
V	Degenerasi, nekrosis, lisis, ada sel radang	Pembendungan, degenerasi, lisis, ada sel radang	Degenerasi, nekrosis lisis dan ada sel radang	Degenerasi, dan ada sel radang	Degenerasi,	Degenerasi

Tabel 8. Hasil pemeriksaan histopatologis saluran pencernaan kelinci setelah infeksi E.Coli, tanpa gejala diare

Kelompok	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Rectal
I	Degenerasi	Degenerasi, nekrosa dan lisis	Degenerasi, nekrosa dan lisis	Degenerasi dan terlibat sel radang	TAP	TAP
II	Degenerasi, nekrosa dan sel radang	Degenerasi, nekrosa	Degenerasi	TAP dan nekrosa	TAP	
III	Pembendungan, dan degenerasi	Pembendungan	Pembendungan	Pembendungan	TAP	TAP
IV	Pembendungan, perdarahan degenerasi	TAP	Perdarahan dan degenerasi	Degenerasi, nekrosa dan sel radang	Degenerasi dan ada sel radang	TAP
V	TAP	TAP	Degenerasi, nekrosa dan sel radang	Degenerasi nekrosa dan lisis	TAP	TAP

Tabel 9. Reaksi imunitas (SA) serum kelinci terhadap E.coli sebelum dan setelah diberi ekstrak tempe dan setelah diinfeksi E. coli.

Kelompok	Sebelum diberi ekstrak	Setelah diberi ekstrak /sebelum di infeksi	Setelah diinfeksi
I	(-)	(-)	(+)
	(-)	(-)	(+)
	(-)	(-)	(+)
II	(+)	(+)	(+)
	(-)	(-)	(+)
	(+)	(-)	(+)
III	(-)	(+ +)	(+ +)
	(+)	(-)	(+)
	(-)	(-)	(+)
IV	(-)	(-)	(+ +)
	(-)	(-)	(+)
	(-)	(+)	(+)
V	(-)	(+ +)	(+ +)
	(+)	(-)	(+)
	(-)	(+ +)	(+)

Simpulan

Hasil penelitian ini mendapatkan bahwa komponen dalam tempe yang berpengaruh baik terhadap pertumbuhan berat badan masa sapihan terdapat di dalam residu. Komponen yang berpengaruh untuk mengurangi resiko akibat infeksi *E.coli* terdapat di dalam ekstrak ethanol. Komponen yang menghambat kejadian diare terdapat di dalam residu dan ekstrak ethanol. Komponen yang menimbulkan reaksi immunitas terdapat di dalam ekstrak hexane dan ekstrak ethanol + hexane.

Ucapan Terima Kasih

Kepada Dr. Fachriyan H. Pasaribu atas pemeriksaan reaksi imunologis, dan kepada Drh. Seti Bahagia atas pemeriksaan patologis-anatomis dan histopatologis, di Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Pustaka

1. Ikehata, H.; M.Wakaizumi; and K.,Murata. Antitoxidant and antihemolytic activity of a new flavone factor 2, isolated from tempeh. *Agr Biol Chem* 1968, 32 : 740-746.
2. Mangkuwidjojo, Djoko Pranowo; Sutjipto Nitisuwirjo; Zoeheid Noor, Pengamatan daya hipokolesteremik pada tempe. *Proc. Simposium Pemanfaatan Tempe Dalam Peningkatan Upaya Kesehatan dan Gizi, Jakarta* 1985 : 114-125.
3. Mahmud, Mien KMS; Rossy Rozana; dan Hermana, Sifat hipokolesteremik minyak kelapa sawit, minyak kedelai dan tempe. *Penelitian Gizi dan makanan* 1989, 12 : 49-57
4. Wang, Hwa L.; Doris I. Ruttle; and C.W. Hesseltine, Antibacterial coumpound from a soybean product fermented by *Rhizopus oligosporus* (33930). *Proc Soc Exp Biol Med* 1969, 131: 579-583.
5. Affandi; dan Mien K. Mahmud, Pengujian aktivitas anti bakterial pada tempe terhadap bakteri penyebab diare. *Penelitian Gizi dan Makanan* 1985, 8 : 46-56.
6. Mahmud, Mien K.; Erwin Affandi; dan Hermana, Pengaruh tempe dalam mengurangi resiko diare akibat infeksi enteropatogen *Eschericia coli*. *Penelitian Gizi dan Makanan* 1987, 10 : 61-76.