

**586
GIZ**

LAPORAN PENELITIAN

JUDUL

**Anti Hiperkolesterolemia, Anti Agregasi Platelet Tepung dan Hidrolisat Umbi
Dioscorea serta Potensinya dalam Mengurangi Risiko Aterosklerosis pada Kelinci
Percobaan.**

OLEH

**Nelis Imanningsih, S.T.P., MSc
dkk**

**Puslitbang Gizi dan Makanan
Badan Litbang Kesehatan Kementerian Kesehatan
2010**

LAPORAN PENELITIAN

JUDUL

**Anti Hiperkolesterolemia, Anti Agregasi Platelet Tepung dan Hidrolisat Umbi
Dioscorea serta Potensinya dalam Mengurangi Risiko Aterosklerosis pada Kelinci
Percobaan.**

OLEH

**Nelis Imanningsih, S.T.P., MSc
dkk**

**Puslitbang Gizi dan Makanan
Badan Litbang Kesehatan Kementerian Kesehatan
2010**



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor : LB.03.04/KE / 6124 / 2010

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Anti Hiperkolesterolemia, Anti Agregasi Platelet Tepung dan Hidrolisat Umbi Dioscorea serta Potensinya dalam Mengurangi Resiko Aterosklerosis pada Kelinci"

yang mengikutsertakan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

Nelis Imanningsih, MSc

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 27 Agustus 2010

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| RINGKASAN PENELITIAN | 2 |
| I. LATAR BELAKANG | 3 |
| II. PERUMUSAN MASALAH | 6 |
| III. TUJUAN PENELITIAN | 7 |
| IV. MANFAAT PENELITIAN | 7 |
| V. METODE PENELITIAN | 8 |
| A. Kerangka Pikir | 8 |
| B. Tempat dan Waktu Penelitian | 8 |
| C. Jenis dan Disain Penelitian | 9 |
| D. Variabel | 9 |
| E. Instrumen dan Cara Pengumpulan Data | 10 |
| F. Bahan dan Prosedur Kerja | 12 |
| G. Analisis Data | 24 |
| H. Pertimbangan Izin Penelitian | 24 |
| I. Pertimbangan Etik | 24 |
| VI. DAFTAR PUSTAKA | 25 |

RINGKASAN PENELITIAN

Penyakit kardiovaskuler dan jantung koroner saat ini merupakan salah satu penyebab kematian utama pada orang dewasa di seluruh dunia. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar tahun 2007, prevalensi penyakit degeneratif jantung koroner di Indonesia adalah 7.2%, dan angka ini diperkirakan akan terus meningkat seiring dengan perubahan gaya hidup, pola makan dan tingkat stres yang ada.

Pola makan merupakan salah satu faktor yang dominan dalam kejadian penyakit kardiovaskuler. Makanan secara langsung mempengaruhi kondisi-kondisi yang meningkatkan potensi terjadinya penyakit degeneratif seperti hiperkolesterolemia (tingginya kadar kolesterol darah dan tinggi LDL) dan kadar kolesterol HDL yang rendah, sebagai faktor risiko mempermudah terjadinya aterosklerosis yang berkaitan erat dengan penyakit kardiovaskuler. (American Heart Association, 2008).

Umbi dioskorea mengandung bahan aktif diosgenin yang terbukti sebagai anti hiperkolesterolemia, pembengkakan hati dan dapat menurunkan gula darah (Gong, 2010., Yeh, 2007). Umbi ini juga mengandung senyawa polifenol, flavonoid khususnya antosianin dan protein dioskorin yang memiliki aktivitas antioksidan yang dapat berpotensi mencegah oksidasi kolesterol LDL (Lin, 2005., Liu, 2006). Selain itu di dalam getah kentalnya (musilase) terdapat polisakarida dan serat larut air yang dapat membantu menurunkan penyerapan kolesterol makanan atau menurunkan level kolesterol darah dan membantu meregulasi tekanan darah (Lee, 2003) . Dengan komponen bioaktif yang potensial tersebut, sampai saat ini belum ada yang mempelajari pengaruhnya pada penghambatan aterosklerosis.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yang meliputi: 1) Penentuan proses pembuatan tepung yang dapat menghasilkan tepung umbi dioskorea dengan kandungan bioaktif terbaik 2) Uji in vitro aktivitas antioksidan dan anti agregasi platelet ekstrak tepung umbi dioskorea, dan 3) Uji in vivo sifat anti- hiperkolesterolemia dan penghambatan kejadian aterosklerosis pada kelinci.

I. Latar Belakang

Penyakit kardiovaskuler dan jantung koroner saat ini merupakan salah satu penyebab kematian utama pada orang dewasa di seluruh dunia. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar tahun 2007, prevalensi penyakit degeneratif jantung koroner di Indonesia adalah 7.2% (Badan Litbang Kesehatan, 2008), dan angka ini diperkirakan akan terus meningkat seiring dengan perubahan gaya hidup, pola makan dan tingkat stres yang ada.

Studi epidemiologi telah berhasil mengidentifikasi faktor risiko penyakit jantung koroner. Banyak faktor risiko yang dapat menimbulkan penyakit jantung koroner seperti karakteristik individu yaitu: umur, jenis kelamin dan riwayat keluarga, kebiasaan hidup seperti: stres, merokok, gaya hidup santai dan kebiasaan makan, serta kondisi kesehatan seperti diabetes, hipertensi dan hiperlipidemia. Faktor-faktor risiko karakteristik individu merupakan faktor yang tidak dapat diubah, akan tetapi faktor-faktor kebiasaan hidup dan kondisi kesehatan adalah faktor-faktor yang dapat diubah (Muchtadi, 2009)

Makanan dapat secara langsung mempengaruhi kondisi-kondisi yang meningkatkan potensi terjadinya penyakit jantung koroner seperti hiperlipidemia; yaitu tingginya kadar kolesterol total darah, dengan komposisi kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) tinggi, dan kolesterol *high density lipoprotein* (HDL) yang rendah.. Salah satu cara untuk mengurangi risiko penyakit kardiovaskuler dan jantung koroner adalah melalui pemilihan bahan makanan yang dikonsumsi.

Di dalam bahan pangan terdapat zat-zat gizi yang diperlukan bagi pertumbuhan dan perkembangan tubuh manusia. Selain itu, didalamnya juga terdapat komponen bioaktif yang memiliki fungsi fisiologis yang bermanfaat bagi tubuh. Bahan makanan dengan kandungan bioaktif tertentu memiliki potensi untuk mengurangi faktor risiko jantung koroner. Salah satunya adalah umbi dioskorea atau dikenal dengan nama dioskorea (*Dioscorea alata L.*). Umbi ini mengandung beberapa senyawa bioaktif yang berpotensi dalam mengurangi risiko jantung koroner melalui beberapa macam mekanisme. Senyawa bioaktif tersebut adalah diosgenin (Qin, 2009., Olayemi, 2007., dan Chen, 2003) yang merupakan gugus aglikon dari saponin, musilase yang merupakan kompleks polisakarida serat pangan (Lee, 2003., Chen, 2003., Lin, 2005., Yeh, 2007), flavonoid antosianin (Shoyama, 1990) dan protein dioskorin (Hou, 1999, 2001) yang merupakan protein simpanan umbi.

Dioskorea sering dikategorikan sebagai tanaman herbal karena potongan umbi yang dikeringkan sering digunakan dalam obat herbal (Yeh, 2007). Umbi tanaman ini di negara-negara Afrika digunakan sebagai makanan pokok, dan digunakan secara luas di Cina dan

Taiwan sebagai bahan dasar pembuatan mie (Hou, 2001). Di Indonesia, umbi ini merupakan umbi minor yang digunakan sebagai makanan tradisional lokal daerah, dikonsumsi sebagai makanan pokok di daerah Papua atau sebagai makanan selingan pengganti beras di daerah Jawa Barat, Tengah dan Sulawesi. Di daerah Jawa Barat umbi ini dikenal dengan nama huwi, di Jawa Tengah disebut uwi, di Sulawesi dikenal dengan nama lame, atau dalam bahasa Inggris dikenal dengan nama *greater yam* atau *water yam* (Prohati, 2010).

Pemanfaatan umbi dioskorea belum dilakukan secara optimal, baik pengolahan maupun manfaat kesehatannya. Pada umumnya umbi ini diolah dengan cara direbus, dikukus, dibakar atau diolah menjadi keripik. Jenis-jenis umbi *Dioscorea* yang ada di Indonesia contohnya adalah gambili (*Dioscorea esculenta*), dan gadung (*Dioscorea hispida*).

Komponen umbi dioskorea sangat tergantung pada jenisnya. Namun secara umum umbi ini mengandung 24,47% total padatan. Dari jumlah ini 72,6% adalah pati, 8,24% protein dan 0,24% lipida (Behera, 2009). Hasil yang hampir sama ditemukan oleh Lebot et al. (2005), yaitu bahwa total padatan bervariasi antara 31,42% - 14,81%, dimana pati adalah sekitar 78,6%-63,6%, protein 17,0%-8,8%, dan lemak 0,5% -0,2%. Kandungan serat kasar dari *Dioscorea alata* rata-rata adalah 2% dari berat kering (Behera, 2009). Selain itu umbi dioskorea mengandung karbohidrat seperti pati dan polisakarida selain pati, glikoprotein dan asam amino serta komponen alkaloid seperti alantoin, dopamin, batatasin, asam fitat, absisinil, kolin, ergosterol, kampesterol dan saponin, (Ma et al., 2005; Mishra & Gaikar, 2004; Yang, Lu, & Hwang, 2003). Kandungan mineral dari umbi ini juga cukup lengkap, yaitu kalium 2.26%, fosfor 0.2%, kalsium 0.2%, magnesium 0.14%, besi 53.6 mg/kg, seng 29.2 mg/kg, tembaga 10.6 mg/kg and mangan 5.38 mg/kg (Zhou, Wu, Zhang, & Yan, 2004).

Dari hasil penelitian yang dilakukan di Cina diketahui bahwa konsumsi umbi *Dioscorea opposita* dapat menurunkan kadar lipida darah. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian umbi *Dioscorea (Yam)* menurunkan total kolesterol serum dan level trigliserida pada tikus yang hiperlipidemia (Hang, 1994). Jenis Yam Taiwan dengan pemberian 25% atau 50% pada ransum menurunkan total kolesterol serum, trigliserida dan LDL-kolesterol pada tikus normal (Hang, 1994). Penelitian yang dilakukan oleh Chen (2003) menemukan bahwa musilase kental yang terdiri dari glikoprotein yang larut air, serat pangan, dan diosgenin dapat mengatur metabolisme lipida. Polisakarida yang larut air, terutama serat, dapat menurunkan total kolesterol serum dan kadar LDL-kolesterol secara konsisten pada tikus yang hiperlipidemia (Jenkins, Vuksan, & Jenkins, 2001; Thewles, Parslow, &

Coleman, 1993; Uchida et al., 1984). Sebuah studi dilakukan oleh Chen (2003) bertujuan mempelajari pengaruh tepung liofilisasi *Dioscorea alata* terhadap modulasi fungsi gastrointestinal dan metabolisme lipida. Penelitian tersebut menemukan bahwa suplementasi tepung umbi sebanyak 50% dapat menurunkan level kolesterol plasma hewan coba.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa umbi *Dioscorea* mengandung bahan aktif diosgenin yang berfungsi sebagai anti hiperkolesterolemia dan anti pembengkakan hati (Olayemi, 2007). Diosgenin terdapat dalam berbagai jenis tumbuhan termasuk spesies-spesies *Dioscorea*., *fenugreek* dan *Coctus speciosus* (Sautour, 2004). Diosgenin merupakan sisi aglikon dari molekul saponin steroid dan merupakan bahan baku untuk sintesis produk-produk hormonal tubuh seperti dehidroepiandrosteron (Corbiere, 2004). Diosgenin merupakan metabolit steroid saponin utama di dalam tubuh yang telah terbukti memiliki efek anti proliferasi sel (Corbiere, 2004), anti hiperkolesterolemia dengan menekan absorpsi kolesterol dan meningkatkan sekresi kolesterol (Sun, 2002).

Antosianin merupakan senyawa polifenol yang terdapat di dalam *Dioscorea alata* varitas *purpurea*. Jenis antosianin yang diisolasi dari jenis *dioscorea ini* adalah *Alatanin C*. Alantanin C merupakan antosianin yang mengandung gugus asil tunggal (*monoacylated*) yang stabil di dalam larutan netral. Kestabilan ini adalah karena adanya ikatan intermolekular asam sinapik ke gugus kiral antosianidin (Yoshida, 2001). Antosianin termasuk dalam kelas flavonoid yang tersebar dalam bentuk polifenol tumbuhan. Pigmen antosianin diketahui menjaga kesehatan sirkulasi darah dan memiliki sifat anti inflamasi karena memiliki aktifitas antioksidan dengan kemampuannya membersihkan radikal bebas yang merusak sel (Wrolstad, 2001)

II. PERUMUSAN MASALAH

Dengan aktifitas-aktifitas tersebut di atas, umbi *Dioscorea* mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai bahan pangan fungsional dalam mencegah terjadinya aterosklerosis yang merupakan faktor langsung dari kejadian penyakit kardiovaskuler dan jantung koroner. Sehingga diperlukan suatu penelitian yang mempelajari potensi umbi *dioscorea* untuk mencegah kejadian aterosklerosis.

Pengolahan umbi menjadi tepung dapat memperluas penggunaan umbi *dioscorea* untuk menghasilkan produk-produk pangan yang memiliki manfaat kesehatan. Tepung memiliki semua komponen yang ada pada bahan asal, akan tetapi dalam pengolahan

menjadi tepung perlu diperhatikan faktor-faktor pengolahan yang mempengaruhi kestabilan dan retensi zat bioaktif seperti suhu, keasaman dan cara blansir. Karena komponen bioaktif umbi dioskorea terdapat pada fraksi musilase, maka keberadaan musilase di dalam tepung yang dihasilkan perlu dipertahankan.

Pertanyaan penelitian yang akan dijawab pada penelitian ini adalah: 1) faktor-faktor pengolahan apa yang harus diperhatikan agar retensi bahan aktif umbi dioskorea dapat optimal dipertahankan, 2) apakah tepung umbi dioskorea dapat menurunkan risiko aterosklerosis dengan menormalkan profil lipida darah, mencegah agregasi platelet dan mempertahankan enzim antioksidan pada kelinci

III. TUJUAN PENELITIAN

Umum:

Untuk mempelajari pengaruh pemberian tepung umbi dioskorea dalam mencegah aterosklerosis pada kelinci percobaan.

Khusus:

1. Menentukan perlakuan pemanasan (blansir) dalam pembuatan tepung umbi dioskorea dengan kandungan komponen bioaktif paling tinggi.
2. Menganalisa komposisi kimia tepung dan kadar mineral umbi dioskorea
3. Mengukur kapasitas antioksidan ekstrak umbi segar, ekstrak tepung umbi, ekstrak diosgenin dan ekstrak antosianin.
4. Menguji sifat anti agregasi platelet ekstrak umbi segar, ekstrak tepung dan ekstrak diosgenin pada plasma darah kelinci.
5. Menguji pengaruh pemberian tepung umbi dioskorea terhadap profil lipida darah kelinci.
6. Menganalisis pembentukan lesi aterosklerosis pada aorta kelinci.

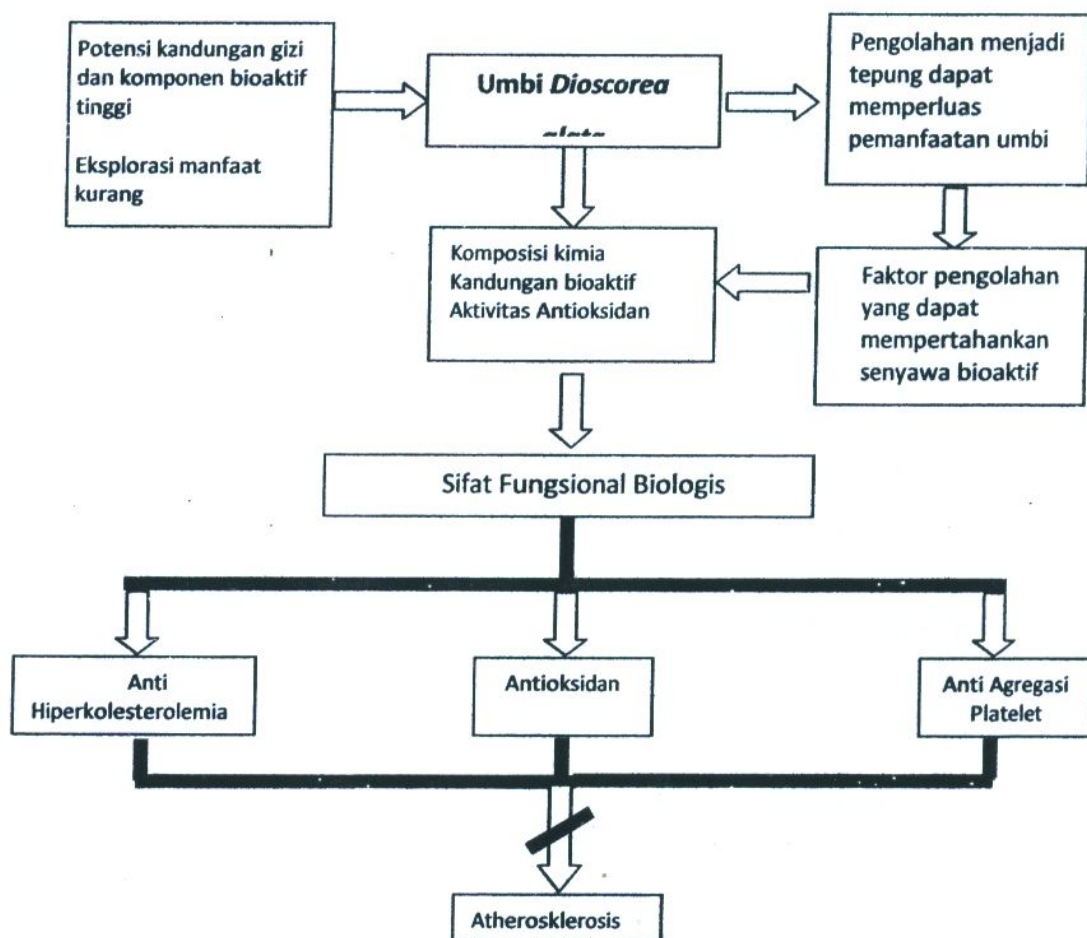
IV. MANFAAT PENELITIAN

1. Memberikan nilai tambah pada umbi dioskorea sebagai salah satu sumberdaya alam Indonesia yang belumbanyak dimanfaatkan.

2. Menghasilkan proses pembuatan tepung umbi dioscorea yang dapat mempertahankan komponen bioaktif (diosgenin dan antosianin) untuk dikembangkan sebagai pangan fungsional.
3. Mengetahui mekanisme penghambatan aterosklerosis oleh komponen bioaktif umbi dioscorea (diosgenin dan antosianin).

V. METODE PENELITIAN

A. Kerangka Pikir



B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Laboratorium Kimia Makanan, Laboratorium Pengolahan Makanan dan Laboratorium percobaan hewan Puslitbang Gizi dan Makanan, Bogor

2. Laboratorium Kimia Pangan Fakultas Ilmu dan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor.
3. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan September 2010 sampai Maret 2011

C. Jenis dan Disain Penelitian

Jenis penelitian adalah Eksperimental

Disain penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap

D. Variabel

1. Variabel kimiawi yang diukur adalah: Total proksimat (makro nutrisi), kandungan mineral, kandungan diosgenin, total polifenol, kandungan antosianin, Kandungan dioskorin, kandungan dan jenis serat pangan.
2. Variabel pengujian in vitro yang diukur adalah: Kkapasitas antioksidasi radikal DPPH, dan kapasitas anti-agregasi platelet.
3. Variabel pengujian in vivo yang diukur adalah:
 - a. Biokimia: profil lipida serum (trigliserida, total kolesterol, LDL-kolesterol dan HDL-kolesterol), C-Reaktif Protein, kadar homosistein, enzim antioksidan (total SOD, Katalase, dan GPx plasma)
 - b. Histologi: morfologi hati dan ginjal, pembentukan lesi aterosklerosis, kadar enzim SOD pada hati dan ginjal.

E. Instrumen dan Cara Pengumpulan Data

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap.

1. Proses pembuatan tepung umbi dan analisis kimia dan senyawa bioaktif.
2. Uji in vitro aktivitas antioksidan dan anti agregasi platelet ekstrak tepung dan ekstrak umbi segar dioskorea.
3. Uji in vivo sifat anti hiperkolesterolemia dan penghambatan kejadian aterosklerosis pada kelinci percobaan.

Tahap Pertama:

Umbi dioskorea segar dianalisis kandungan total proksimat, kandungan mineral, kandungan diosgenin, total polifenol, kandungan antosianin, Kandungan dioscorin, total enzim polifenol oksidase dan peroksidase, dan kandungan dan jenis serat pangan.

Umbi dikupas, dipotong dengan ketebalan 5 mm kemudian diproses menjadi tepung melalui kombinasi perlakuan perendaman dengan asam sitrat pada pH 4-5, steamed blansir (pengukusan) dalam 3 tahap, dan pengeringan pada suhu 60°, kemudian dihaluskan dan diayak. Pada tepung yang dihasilkan dilakukan kembali analisis seperti di atas.

Tepung umbi yang dihasilkan dianalisa total proksimat (makro nutrisi), kandungan mineral, kandungan diosgenin, total polifenol, kandungan antosianin, Kandungan dioscorin, dan kandungan dan jenis serat pangan. Dipilih jenis umbi dan jenis produk yang kandungan bahan aktifnya paling tinggi.

Tahap Kedua:

- a. Uji aktivitas antioksidan tepung dioscorea dilakukan dengan mengukur kemampuan scavenging radikal DPPH (Diphenl Picril Hidrazyl) menggunakan pembanding Tokoferol.
- b. Anti agregasi platelet dilakukan dengan menggunakan plasma darah kelinci. Aktivitas anti agregasi dinyatakan dengan nilai D50, yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat agregasi platelet sebesar 50% dibandingkan blanko.

Tahap Ketiga:

Uji in vivo sifat anti hiperkolesterolemia dan analisis kejadian aterosklerosis dilakukan pada kelinci percobaan. Sampel uji in vivo adalah Kelinci jantan dengan ras New Zealand White berusia 5 bulan dengan berat seragam antara 1,5 – 2 kg. Kelinci percobaan diperoleh dari Pusat Studi Biofarmaka Institut Pertanian Bogor. Berbagai studi mengenai aterosklerosis telah dilakukan dan digunakan hewan percobaan. Penggunaan hewan model pada penelitian kardiovaskuler adalah berdasarkan pertimbangan ukuran terjadinya lesi aterosklerosis yang cukup jelas untuk pengamatan histologi (Rosenfeld, 2001). Pemberian makanan mengandung kolesterol tinggi atau luka endothelial merupakan dua jenis cara yang paling baik untuk meniru kejadian aterosklerosis (Dhanya, 2008). Karakteristik yang dimiliki oleh kelinci ras New Zealand White menjadikan hewan ini sangat baik untuk dijadikan

model untuk studi aterosklerosis karena dapat diperoleh plak yang cukup jelas untuk pengamatan histologi (Amalia, 2004, Dhanya, 2008)

Jumlah kelinci pada masing-masing kelompok dihitung dengan hipotesis sebagai berikut:

| | |
|---|-------------------------------|
| Standard deviasi (σ) | = 20% |
| Test value of population mean (μ_0) | = 150 Total Kholesterol mg/dL |
| Anticipated population mean (μ_a) | = 100 Total Kholesterol mg/dL |
| Level of significance (α) | = 0,01 |
| Power of test ($1-\beta$) | = 90% |

Perhitungan besar sampel uji hipotesis beda mean (Levy, 1999):

$$n = \frac{2\sigma^2 [z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}]^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$$\sigma^2 = \frac{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

Dari perhitungan tersebut diperlukan 5 ekor kelinci pada tiap kelompok. Sebagai cadangan, ditambahkan 1 ekor kelinci pada setiap kelompok sehingga keperluan sampel adalah 6 ekor x 6 kelompok = 36 ekor kelinci.

F. Bahan dan Prosedur Kerja

1. Bahan penelitian adalah umbi *dioscorea alata* yang diperoleh dari pedagang pengumpul di daerah Pondok Cabe. Umbi dipilih dengan umur panen yang seragam (9 bulan).
2. Umbi diproses menjadi tepung. Pertama-tama umbi dibersihkan, dikupas, dan diiris dengan ketebalan 5mm menggunakan "slicer". Kemudian irisan umbi direndam dalam larutan asam sitrat 0.25% pada pH 4-5 selama 1 jam. Umbi diangkat dan diblansir

dengan menggunakan "steam" selama 5, 10 dan 15 menit. Umbi yang sudah diblansir kemudian dikeringkan di dalam "cabinet drier" dengan suhu 60°C selama 24 jam. Potongan umbi kering yang mengandung sekitar 5% kadar air kemudian dihancurkan, digiling dan diayak dengan ayakan 60 mesh sehingga diperoleh tepung umbi dioskorea dengan tingkat kehalusan yang sama.

Tepung dengan berbagai perlakuan kemudian dianalisa komposisi kimia dan zat bioaktif. Kemudian dipilih satu cara pembuatan tepung yang memiliki kandungan zat bioaktif tertinggi. Untuk uji in vitro dan in vivo diperlukan sekitar 50 kg tepung umbi. Untuk mendapatkan jumlah tersebut, diperlukan 200 Kg umbi dioskorea segar.

3. Pengukuran kecukupan blansir metode Daniel (2003)

Pengukuran kecukupan blansir dilakukan dengan mengukur enzim peroksidase dan enzim polifenol oksidase. Umbi dioskorea yang telah diblansir dicacah halus dan secara cepat ditimbang sebanyak 10 g dan dicampur dengan 50 mL buffer A dingin. Campuran tersebut dihaluskan dalam blender selama 1 menit. Campuran kemudian disaring dengan kertas Whatman no 1 ke dalam labu erlenmeyer yang direndam dalam es.

Untuk pengukuran enzim peroksidase: 0,6 mL ekstrak enzim ditambahkan 0,6 mL buffer B dan dipindahkan ke tabung reaksi. Diinkubasikan selama 5 menit pada 30°C. Pindahkan isi tabung reaksi ke dalam kuvet. Absorbansi diukur pada 410 nm dan nol kan pembacaan alat dengan air destilasi. Siap reaksi dimulai dengan menambahkan 1,2 mL larutan hydrogen peroksida dan 0,6 mL larutan guaiacol ke dalam cuvet yang telah disiapkan. Balikan kuvet untuk mencampur. Seleh itu absorbansi dibaca dengan cepat.

Untuk pengukuran polifenoloksidase: 0,5 mL larutan dopa dan 2 mL buffer B ditransfer ke dalam kuvet. Panjang gelombang pada spektrofotometer di set pada 475 nm dan nol kan alat dengan menggunakan air destilasi. 0,5ml of ekstrak enzim ditambahkan pada kuvet dan dicampur rata dan segera dibaca.

4. Analisa kadar protein (AOAC-955.04, 2007)

Sampel ditimbang sebanyak 0,7-2,2 g di dalam labu ekstraksi. Ditambahkan 0,7 g HgO, 15 g K₂SO₄ atau Na₂SO₄ anhidrous, dan 25 mL H₂SO₄. Jika sampel yang digunakan lebih dari 2,2 g, tambahkan H₂SO₄ 10 mL setiap 1 g sampel.

Tempatkan labu pada posisi miring, panaskan secara perlahan sampai timbul buih. Didihkan sampai larutan menjadi bening dan tambah 30 menit lagi. Setelah itu larutan didinginkan dan ditambahkan 200 mL H₂SO₄. Dinginkan hingga suhu dibawah 25°C. Tambahkan 25 mL larutan thiosulfat dan aduk agar Hg mengendap. Tambahkan butiran Zn agar larutan tidak bergejolak. Miringkan labu, dan tambahkan NaOH sebanyak 15 g untuk setiap 10 mL H₂SO₄ yang digunakan untuk membuat larutan menjadi basa. Segera hubungkan labu dengan labu destilasi pada kondensor. Ujung kondesor direndam dalam larutan asam standard dan 5-7 tetes indikator ditambahkan pada larutan penerima. Labu diputar agar larutan di dalamnya tercampur rata kemudian panaskan sampai seluruh NH₃ telah terdestilasi (telah dicapai ≥150 destilat). Cabut larutan penerima, cuci ujung kondensor, dan titrasi asam standard pada destilat dengan larutan standard NaOH. Lakukan koreksi dengan penghitungan blanko. Persentasi nitrogen dihitung sebagai berikut:

$$\%N = \frac{[(\text{mL standard asam} \times \text{asam normal}) - (\text{mL standard NaOH} \times \text{NaOH normal})]}{\text{g sampel}} \times 1.4007$$

5. Analisis kandungan lipida metode AOAC-920.39B (2007)

Sampel sebanyak 2 g dikeringkan dengan metode AOAC-934.01. Sampel kering kemudian diekstraksi dengan menggunakan ether yang dilalukan dengan cepat. Lama pengestrakan dapat bervariasi antara 4-16 jam. Ekstrak kemudian dikeringkan selama 30 menit pada 100°C, didinginkan dan ditimbang.

6. Analisis kandungan air metode AOAC-934.01 (2007)

Sampel ditimbang sebanyak 2 gr. Dikeringkan dalam oven suhu 100-135°C sampai dicapai berat tetap. Kadar air dihitung sebagai pengurangan berat sampel.

7. Analisis kadar abu metode AOAC-923-03 (2007)

Sampel ditimbang sebanyak 3-5 g. Sampel dicampur di dalam cawan abu yang telah dipanaskan, didinginkan di desikator dan telah ditimbang segera setelah mencapai suhu ruang. Sampel di dalam cawan dimasukkan ke dalam furnace dan dipanaskan pada suhu 550°C sampai sampel berwarna abu-abu muda, atau dicapai

berat konstan. Dinginkan dalam desikator dan ditimbang segera setelah mencapai suhu kamar.

8. Analisis kandungan serat pangan metode AOAC (2007)

Analisa dilakukan menggunakan otal Dietary Fiber Kit yang menggunakan kombinasi metode enzimatik dan gravimetrik. Sampel yang telah kering, dihilangkan kadar lemaknya terlebih dahulu apabila mengandung lemak lebih dari 10%. Kemudian cerna dengan Termamyl atau α -amilase yang tahan panas. Setelah itu cerna dengan protease dan amiloglukosidase untuk menghilangkan protein dan pati. Etil alkohol sebanyak 4 kali lipat volume ditambahkan untuk mempresipitasi soluble dietary fibre (SDF). Total residu difilter dan dicuci dengan 78% etil alkohol, 95% etil alkohol dan aseton. Setelah dikeringkan, residu ditimbang. Satu sampel lainnya dianalisis untuk protein dan kadar abu. Total serat pangan dihitung sebagai selisih berat residu dan berat protein ditambah abu.

9. Ekstraksi Saponin metode Yang et al (2003)

Dari tepung umbi dioscorea, kandungan saponin diekstrak dengan menggunakan metanol selama 12 jam pada suhu 25°C dilanjutkan dengan filtrasi dan pengkonsentrasian dengan menggunakan rotary evaporator. Residu dipindahkan ke 25 mL air destilasi dan dipartisi dengan n-butanol selama 3 kali untuk mendapatkan ekstrak saponin. Ekstrak tersebut dicuci dengan air destilasi dan dikeringkan.

10. Analisa Saponin metode Yang et al (2003)

Analisis dilakukan sesuai metode Yang et al (2003) dengan menggunakan High Performance Coloum Chromatografi (HPLC) dengan menggunakan evaporative Light Scattering Detector (ELSD). Kolom yang digunakan adalah C18 (4.6 mm i.d x 250 mm, 5 μ m). Fase gerak digunakan secara gradient yaitu methanoil:air 62/38 v/v selama 20 menit pertama dan 71/29 v/v dari 21 sampai 65 dengan flow rate 1ml/min.

11. Ekstraksi Diosgenin metode Drapeau et al (1986)

Tepung dan hidrolisat diekstrak dengan menggunakan metanol dengan perbandingan 1:10 selama 12 jam pada 25°C. Metanol ekstrak dikeringkan dan residunya dihidrolisa menggunakan larutan 70% isopropanol yang mengandung asam sulfat 2N pada 80°C

selama 2 jam. Hidrolisat dinetralisasi dengan menggunakan NaOH 4N dan isopropanol dihilangkan dengan menggunakan rotary evaporator. Terhadap ekstrak ditambahkan n-hexane sebanyak 3 kalinya, kemudian ditambahkan air destilasi. Kemudian n-hexane dihilangkan dan residu dilarutkan dalam metanol untuk analisis menggunakan HPLC.

12. Analisa diosgenin metode Yang (2003)

Analisis diosgenin dilakukan dengan menggunakan HPLC dengan menggunakan evaporative Light Scattering Detector (ELSD). Kolom yang digunakan adalah C18 (4.6 mm i.d x 250 mm, 5 μ m). Fase gerak yang digunakan adalah campuran acetonitril dan air 95:5 v/v dengan flow rate 1 mm/min.

13. Ekstraksi Dioscorin dilakukan dengan metode Liao (2006)

Umbi dioscorea dicuci dengan air, dikupas dan dipotong kecil. Potongan dioscorea kemudian dimaserasi dengan aseton atau 95% ethanol untuk menghilangkan material yang berlendir dan kemudian difiltrasi dengan kain katun. Residu yang tersisa kemudian ditimbang dan dihomogenisasi dengan 5 volume (w/v) 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 23,130g selama 30 menit. Setelah sentrifugasi protein kasar di dalam supernatant di "salting out" dengan menggunakan 0-70% amonium sulfat. Presipitat dari larutan ammonium sulfat kemudian didialisa menggunakan air deionisasi atau air destilasi, kemudian dileofilisasi untuk purifikasi lebih lanjut.

14. Purifikasi Dioscorin dengan metode Liao (2006)

Protein kasar dioscorea kemudian dipurifikasi dengan menggunakan ion exchange chromatography dan kemudian dianalisa menggunakan gel chromatography yang dilengkapi dengan TSK gel SW guard column (4 cm x 8mm) and a TSK G3000 SW (30 cm x 8 mm) (TosoHaas, Japan). Sistem dilengkapi dengan UV-VIS detector. Puncak dapat dideteksi pada panjang gelombang 280nm. Sebagai fase gerak adalah 0.1M Sodium phosphat dengan 0.05% sodium azide. Larutan Buffer solution disonikasi untuk menghilangkan udara sebelum digunakan. Setiap sampel difiltrasi menggunakan 0.45 μ m sterile units (Millipore, US), dan 10 μ L sampel diinjeksikan ke dalam system kromatografi dengan flow rate 0.6 mL/min.

15. Ekstraksi Antosianin dengan menggunakan metode Garcia (1997).

Sampel ditimbang sebanyak 20 g. Dihancurkan dengan 150 mL campuran metanol, asam asetat dan air desilasi (25:1:24) atau disebut campuran M:A:W. Campuran kemudian disentrifuse pada 12 000 rpm selama 20 menit pada 20°C. Supernatan diambil, dan residu yang dihasilkan dicuci dengan larutan M:A:W, disentrifuse kembali, dan supernatant dipisahkan. Setiap sampel diekstrak sebanyak 3 kali. Hasil ekstrak kemudian dipekatkan secara vacuum pada 35°C. Residu yang didapatkan dari hasil pemekantan dilarutkan dalam 5mL larutan 3% asam format dalam air. Larutan ini kemudian dilalukan pada kolom C18 Sep-Pak. Kolom dicuci dengan 5mL larutan 3% asam format dan dielusi dengan 3,5 mL larutan 3% asam format dalam metanol.

16. Analisis Antosianin dengan menggunakan metode Garcia (1997)

Residu yang didapatkan dari hasil ekstraksi dilarutkan dengan 25 mL campuran larutan metanol dan 0,1 M HCl dengan rasion 85:15. Larutan antosianin kemudian dibaca dengan menggunakan UV-Vis spektrofotometer menggunakan vial 1 cm pada panjang gelombang 538 nm. Total antosianin diekspresikan sebagai cyaniding 3-rutinoside equivalent. Molar absorpvtiy cyaniding 3-rutinoside adalah 31085 pada panjang gelombang 530 dalam larutan metanol:HCl.

17. Uji kapasitas antioksidan metode Yamaguci et al (1998)

Efek scavenging DPPH (1,1-diphenyl-picrylhydrazyl). Ekstrak umbi, ekstrak tepung, ekstrak diosgenin, dan ekstrak antosianin sebanyak 100 ul dicampur dengan 400 ul dari 100mM Tris-HCl (pH 7,4) dan 500 ul DPPH di dalam etanol yang dipersiapkan segar. Setelah diinkubasi di dalam gelap selama 20 menit, diukur absorbansi pada 517 nm. Sebagai standard digunakan asam ascorbat, α -tocoferol dan BHA. Nilai absorbansi yang rendah menunjukkan kemampuan scavenging DPPH radikal yang rendah.

18. Uji Anti-agregasi platelet (Kyriakides, 1985)

Uji anti agregasi platelet dilakukan dengan menggunakan plasma darah kelinci. Kelinci yang diambil darahnya berasal dari ras New Zealand White kelamin jantan

dan berumur 5 bulan. Sebelum diambil darahnya kelinci dipelihara pada kandang terpisah dengan diberi ransum standar.

Darah kelinci diambil dari pembuluh vena pada telinga dengan menggunakan syringe steril 5 mL dengan ukuran 22 gauge x 1.5 inchi. Darah kemudian dicampur dengan natrium sitrat 3.8% dengan perbandingan (9:1) dalam tabung pelastik. Kemudian disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Didapatkan plasma kaya platelet (PRP). Selanjutnya endapan darah yang tersisa disentrifus kembali dengan kecepatan 3100 rpm selama 15 menit., dan diperoleh plasma miskin platelet.

Prinsip pengukuran agregasi platelet adalah berdasarkan perubahan transmisi cahaya yang melalui PRP terendah karena platelet tersuspensi dalam PRP. Setelah penambahan agregator, platelet akan beragregasi dan mengendap hingga plasma menjadi jernih dan transmisi cahaya akan meningkat. Alat yang digunakan untuk mengukur agregasi ini adalah aggrecoorder PA3210 (Daichi, Japan)

19. Uji in vivo dan pemeliharaan kelinci dilakukan sebagai berikut:

- a. Proses adaptasi: Setiap kelinci dikandangan secara individu di dalam kandang secara individu. Kandang berukuran 62,5 X 40 x 67.5 cm³ yang dilengkapi dengan tempat air minum, ransum, dan penampungan feses dan urin. Kandang ditempatkan dalam ruangan yang dilengkapi alat pendingin udara di laboratorium percobaan hewan puslitbang gizi dan makanan. Setiap dua hari sekali kandang dibersihkan.
- b. Sebelum diberi perlakuan, semua kelinci diberi basal diet selama empat minggu masa adaptasi. Ransum basal dan air minum diberikan secara ad libitum. Selama periode adaptasi, semua kelinci diamati satu per satu kebiasaan makan dan kondisi kesehatannya.
- c. Pada akhir masa adaptasi masing-masing kelinci ditimbang untuk mengetahui beratnya dan diambil darahnya. Sebelum pengambilan darah, kelinci dipuasakan selama 10-12 jam. Sampel darah diambil untuk menentukan kandungan

kolesterol yang digunakan sebagai baseline dalam pengelompokan kelinci untuk pengujian. Darah diambil pada pembuluh vena atau arteri telinga kelinci sebanyak 5 mL menggunakan syringe steril 5 mL dengan ukuran 22 gauge x 1.5 inci. Kelinci ditempatkan pada kandang khusus yang memiliki alat untuk menempatkan kepala kelinci agar tidak bergerak saat diambil darahnya. Kandang ini mempermudah proses pengambilan darah untuk menghindari pengambilan yang berulang.

- d. Kelinci dikelompokkan menjadi enam. Pengelompokan kelinci dilakukan berdasarkan berat badan dan kadar kolesterolnya.

Kelompok 1: Kelinci yang diberi ransum standard (Kontrol Negatif)

Kelompok 2 : Kelinci yang diberi ransum standard dan Kolesterol 1% (Kontrol positif)

Kelompok 3 : Kelinci yang diberi ransum standard + Kolesterol 1% + Tepung dioscorea 25%

Kelompok 4 : Kelinci yang diberi ransum standard + Kolesterol 1% + Tepung dioscorea 50%

Kelompok 5 : Kelinci yang diberi ransum standard + Kolesterol 1% + Diosgenin 20 ppm

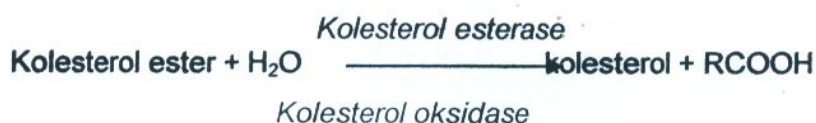
Kelompok 6 : Kelinci yang diberi ransum standard + Kolesterol 1% + Antosianin 50 ppm

- e. Ransum diberikan dalam bentuk pellet. Pembuatan pellet dilakukan dengan alat khusus yang dilakukan di Pusat penelitian Biofarmaka IPB. Ransum berupa pellet disiapkan sebulan sekali, dan disimpan dalam wadah bersih dan kering. Kelinci diberi ransum dalam jumlah yang cukup (kurang lebih 100 g per hari per ekor). Ransum perlakuan dibuat khusus dan diberikan dalam jumlah 10-50 gram yang diletakkan pada bagian atas dari 100 gram pellet yang diberikan agar dihabiskan terlebih dahulu. Semua ransum diberikan secara ad libitum. Air minum selalu tersedia dan diberikan secara ad libitum. Bahan-bahan pembuatan ransum basal adalah: Tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, jagung, dedak, minyak sayur, molase, vitamin dan mineral mix, garam, kapur, tepung tulang dan susu skim.

- f. Kelinci diberi ransum sesuai perlakuan hingga dua belas minggu. Dimana pada jangka waktu ini diperkirakan telah terbentuk plak pada dinding arteri kelinci dengan high kolesterol diet.
- g. Selama pengujian dilakukan pengamatan terhadap : berat badan setiap lima hari sekali, konsumsi ransum setiap hari, Kadar kolesterol, trigliserida , HDL kolesterol dan LDL kolesterol darah pada minggu ke 0 (baseline), 4, 8 dan 12.
- h. Sebelum pengambilan contoh darah, kelinci dipuasakan antara 10-12 jam. Darah diambil pada pembuluh vena atau arteri telinga kelinci sebanyak 5 mL menggunakan syringe steril 5 mL dengan ukuran 22 gauge x 1.5 inci. . Kelinci ditempatkan pada kandang khusus yang memiliki alat untuk menempatkan kepala kelinci agar tidak bergerak saat diambil darahnya. Kandang ini mempermudah proses pengambilan darah untuk menghindari pengambilan yang berulang.
- i. Pada akhir pengujian, kelinci dimatikan dengan cara disembelih menggunakan pisau yang tajam. Setelah darah dikeluarkan, kelinci kemudian dibedah dan dipisahkan organ-organnya yaitu: aorta, jantung, hati, ginjal, usus, paru dan otak. Lalu difiksasi ke dalam formalin untuk selanjutnya dilakukan pengamatan histopatologi.
- j. Pada akhir penelitian, profil serum darah kelinci dianalisa dan dilakukan pengamatan mikroskopis terhadap terjadinya lesi aterosklerosis pada dinding aorta.

20. Pengujian Total Kolesterol / TK (Boehringer Kits)

Kadar Kolesterol total diukur dengan metode CHOD-PAP (*Cholesterol Oxidase-p-aminophenozone*) dengan prinsip pengujian secara enzimatis kalorimetri berdasarkan reaksi :





Serum darah diambil sebanyak 0.01 ml dan dicampurkan dengan 1 ml reagen (kit Komersial) kemudian dimasukkan kedalam tabung lalu dicampurkan sampai homogen. Setelah campuran homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah itu dibaca absorbansinya pada 546 nm. Perhitungan kadar kolesterol total dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar kolesterol (mg/dl)} = [\text{absorbansi sample/absorbansi standar}] \times 200 \text{ mg/dl}$$

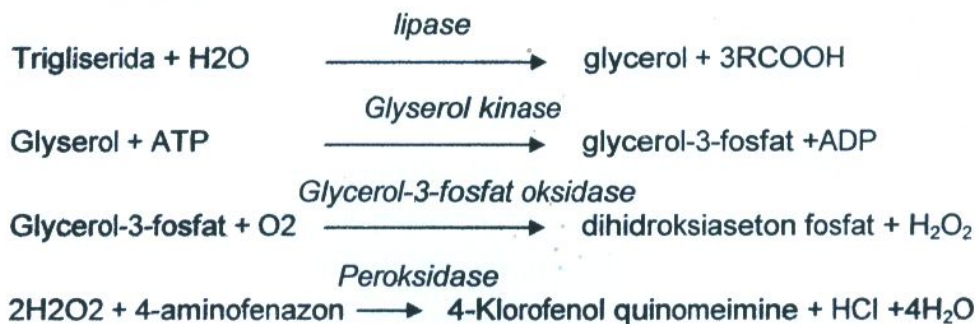
21. Pengujian High Density Lipoprotein / HDL (Boehringer Kits)

Pengukuran HDL dilakukan dengan metode CHOD-PAP. Sebelum pengujian kadar HDL, dilakukan persiapan sampel yaitu sebanyak 200 ml serum darah dicampurkan dengan 500 ml reagen presipitasi kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu dilakukan sentrifuse pada 4000 rpm selama 10 menit sehingga dihasilkan supernatan yang siap untuk dianalisis. Tahapan selanjutnya dilakukan analisis kadar HDL dengan metode CHOD-PAP yaitu diambil 100 ml supernatan kemudian dicampurkan dengan 1000 ml larutan reagen. Setelah tercampur diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah itu dibaca absorbansinya pada 546 nm. Perhitungan kadar HDL dilakukan dengan rumus:

$$\text{Kadar HDL (mg / dl)} = [\text{absorbansi sampel}] \times 219.2 \text{ mg/dl}$$

22. Pengujian Triglicerida/TG (Boehringer Kits)

Prinsip pengujian berdasarkan reaksi dibawah ini :



Diambil 0.01 ml serum darah, lalu dicampurkan dengan 1 ml reagen (kit). Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, kemudian dibaca absorbansinya pada 546 nm. Perhitungan kadar trigliserida dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Trigliserida (mg / dl)} = \frac{\text{Absorbansi.sampel}}{\text{Absorbansi.S tan dar}} \times 200 \text{ mg/dl}$$

23. Pengujian Kadar Low Density Lipoprotein/LDL (Baraas 1994)

Kadar LDL dihitung secara langsung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar LDL} = \text{Total Kolesterol} - \left(\text{HDL} + \frac{\text{TG}}{5} \right)$$

dimana diasumsikan bahwa TG/5 merupakan kadar VLDL (*very low density lipoprotein*).

24. Pengamatan histologi metode Kiernan (1990)

Pengamatan terbentuknya sel busa dilakukan dengan pengamatan histologi. Pembuluh arteri jantung diambil dan dibuat sediaan histologisnya, kemudian diamati dibawah mikroskop. Prosedur pembuatan sediaan histologis adalah sebagai berikut: Pertama organ difiksasi, dengan cara potongan organ atau jaringan yang dimaksud dipisahkan dari organ lain. Organ disayat-sayat untuk memudahkan filtrasi larutan fiksatif ke dalamnya. Sampel organ dimasukkan dalam botol sampel yang telah diisi larutan fiksasi. Selanjutnya sample didehidrasi yaitu proses mengeluarkan air dari dalam jaringan/organ dengan menggunakan bahan-bahan kimia tertentu seperti penggunaan alkohol bertingkat. Setelah itu dilakukan penjernihan. Penjernihan bertujuan menggantikan tempat alkohol dalam jaringan setelah didehidrasi dengan suatu medium penjernih. Bahan yang biasa digunakan untuk clearing adalah xylol. Selanjutnya adalah proses embedding. Proses embedding adalah proses memasukkan/menanam jaringan ke dalam blok-blok paraffin (cetakan) sehingga memudahkan pada proses pemotongan/penyayatan dengan mikrotom. Jaringan yang telah diembedding kemudian disayat menggunakan mikrotom sehingga didapatkan

sediaan dengan ketebalan 0.4-0.5 μm . Sediaan yang telah siap untuk selanjutnya dapat diamati di bawah mikroskop melalui proses pewarnaan.

G. Analisis Data

Semua data disajikan dalam bentuk rata-rata \pm standar deviasi dari tiga ulangan. Analisis data terhadap kandungan kimia dan kadar total kolesterol, LDL dan HDL serum dilakukan menggunakan student T-test. Nilai dikatakan berbeda secara bermakna bila nilai p lebih kecil dari 0.05.

I. Pertimbangan izin penelitian

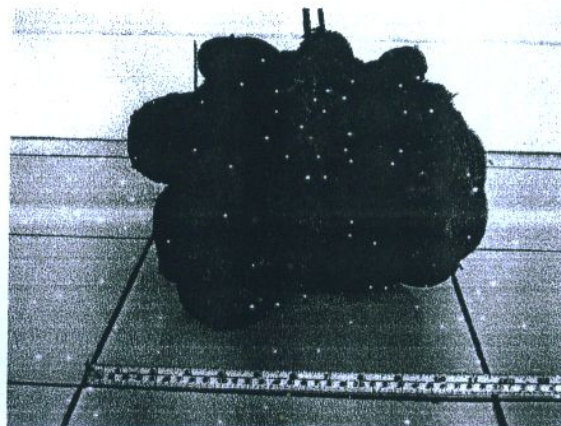
Pertimbangan izin penelitian tidak diminta karena tidak dilakukan penelitian lapangan.

J. Pertimbangan Etik

Pertimbangan etik dimintakan kepada Komisi Etik Badan Litbang Kesehatan.

VI. HASIL DAN PEMBAHASAN

Umbi dioskorea (*Dioscorea alata*) yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis yang berwarna ungu. Umbi ini memiliki ukuran dan berat yang bervariasi yaitu memiliki diameter antara 30-40 cm dengan berat 2-3 kilogram per buah.



Gambar 1. Umbi *Dioscorea alata* jenis *purpurea*

A. Kandungan Zat Gizi Makro Umbi segar dan Tepung umbi

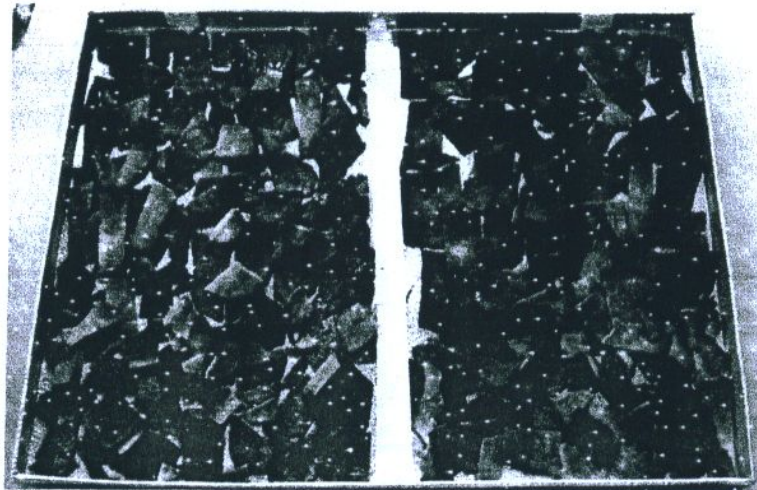
Tabel 1. Hasil analisa proksimat umbi segar

| Jenis analisa | Umbi segar 1 | Umbi segar 2 | Umbi segar 3 | Rata-rata |
|---------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| Air | 74.20 | 71.40 | 65.40 | 70.33 |
| Abu | 0.62 | 0.59 | 0.59 | 0.60 |
| Lemak | 1.46 | 0.64 | 0.46 | 0.85 |
| Protein | 1.5 | 2.22 | 2.64 | 2.12 |
| Karbohidrat | 22.22 | 25.15 | 30.91 | 26.09 |

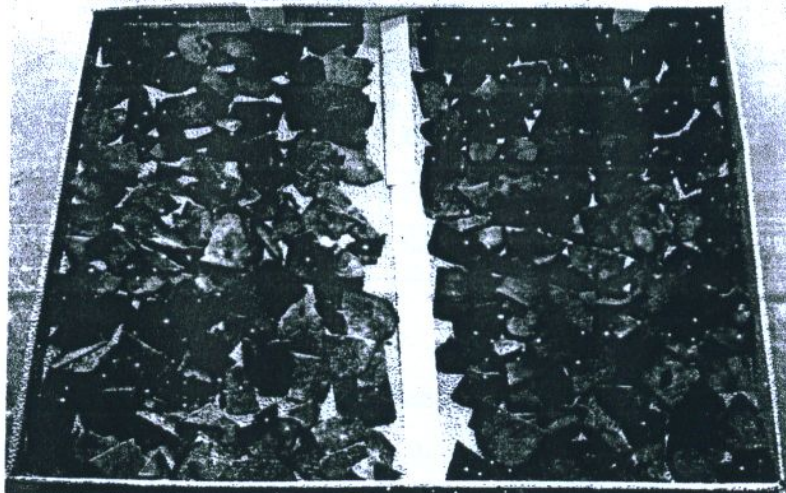
Umbi dioskorea segar mengandung kadar air rata-rata 70 %, kadar abu 0,6%, lemak 0,85% protein 2,12% dan karbohidrat 26,09%. Umbi kemudian dikupas kulitnya, dipotong persegi dengan panjang dan lebar masing-masing 5 cm. Umbi kemudian diiris dengan ketebalan 0,5 cm menggunakan slicer. Setelah teriris tipis, umbi kemudian direndam pada larutan asam sitrat 0% (1), 0,25% (2), 0,50% (3) dan 1% (4) selama 30 menit. Setiap 500 gr umbi direndam dalam larutan asam sitrat sebanyak 1 L (nisbah 1:2). Umbi yang telah direndam kemudian ditiriskan, dan di steam blancing pada suhu 100°C selama 5 menit (T1) dan 10 menit (T2). Umbi yang telah diblansir kemudian diletakkan pada loyang, dan dikeringkan pada suhu 50°C di dalam pengering kabinet selama 24 jam. Potongan kering umbi kemudian dihaluskan dengan menggunakan grinder dan diayak hingga didapatkan tepung berwarna keunguan dengan ukuran partikel 100 mesh (30 mikron):



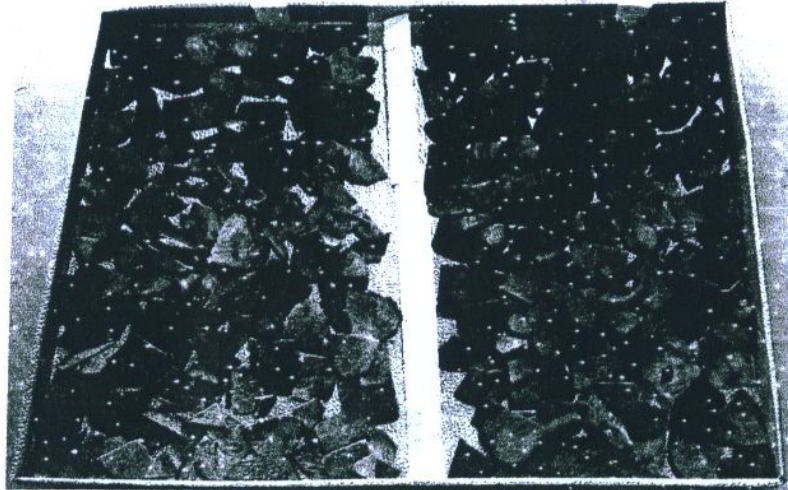
Gambar 2. Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0% dengan 2 lama waktu blansir. 5 menit (kiri) dan 10 menit (kanan).



Gambar 3. Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0,25% dengan 2 lama waktu blansir. 5 menit (kiri) dan 10 menit (kanan).



Gambar 4. Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0,5% dengan 2 lama waktu blansir. 5 menit (kiri) dan 10 menit (kanan).

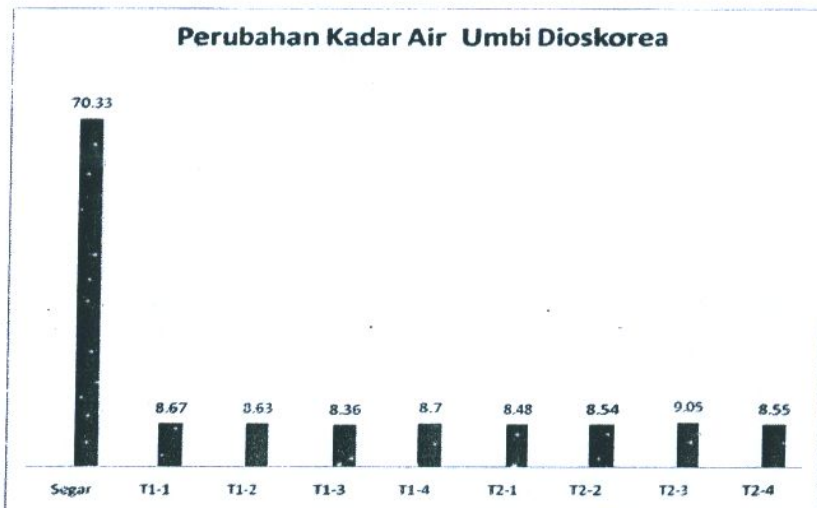


Gambar 5. Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 1% dengan 2 lama waktu blansir. 5 menit (kiri) dan 10 menit (kanan).

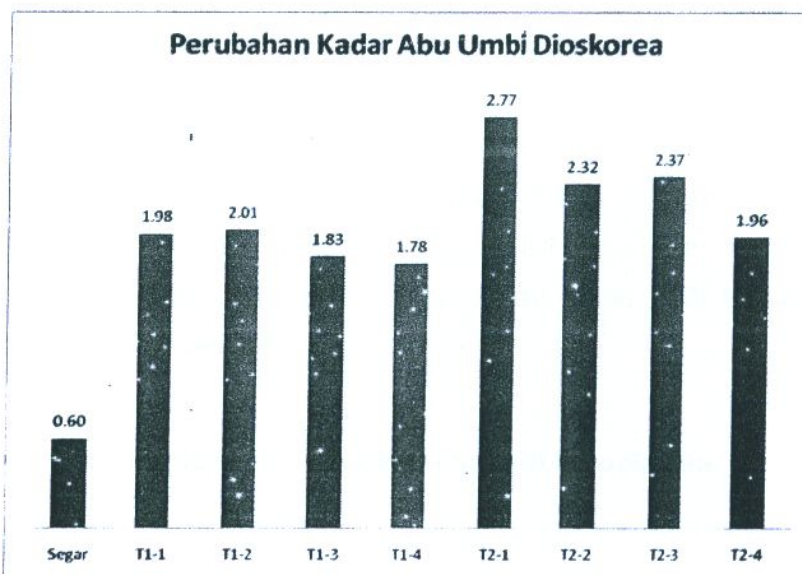
Tabel 2. Hasil analisa kandungan proksimat tepung umbi dioskorea dengan kombinasi perlakuan perendaman dan lama waktu blansir.

| Jenis analisa | T1-1 | T1-2 | T1-3 | T1-4 | T2-1 | T2-2 | T2-3 | T2-4 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Air (g %) | 8.67 | 8.63 | 8.36 | 8.7 | 8.48 | 8.54 | 9.05 | 8.55 |
| Abu (g %) | 1.98 | 2.01 | 1.83 | 1.78 | 2.77 | 2.32 | 2.37 | 1.96 |
| Lemak (g %) | 0.7 | 0.62 | 0.65 | 0.64 | 1.07 | 0.98 | 1.05 | 1.03 |
| Protein (g %) | 5.33 | 6.11 | 5.52 | 5.42 | 7.84 | 7.57 | 7.23 | 7.06 |
| Karbohidrat (g %) | 83.32 | 82.63 | 83.64 | 83.46 | 79.84 | 80.59 | 80.30 | 81.40 |

Dengan proses pengolahan menjadi tepung, terdapat perubahan kandungan proksimat. Hal ini terjadi akibat penurunan kadar air produk dari rata-rata 74,20 % menjadi sekitar 8,36–9.05%., sehingga menyebabkan meningkatnya proporsi komponen makro yang lain seperti lemak, protein, abu dan karbohidrat.

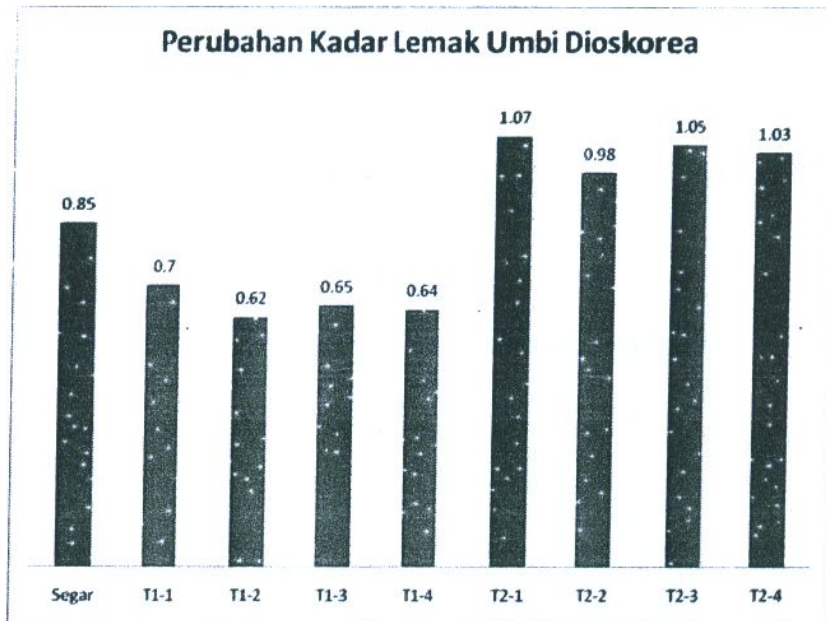


Gambar 6. Perubahan kadar air umbi dioskorea setelah perlakuan



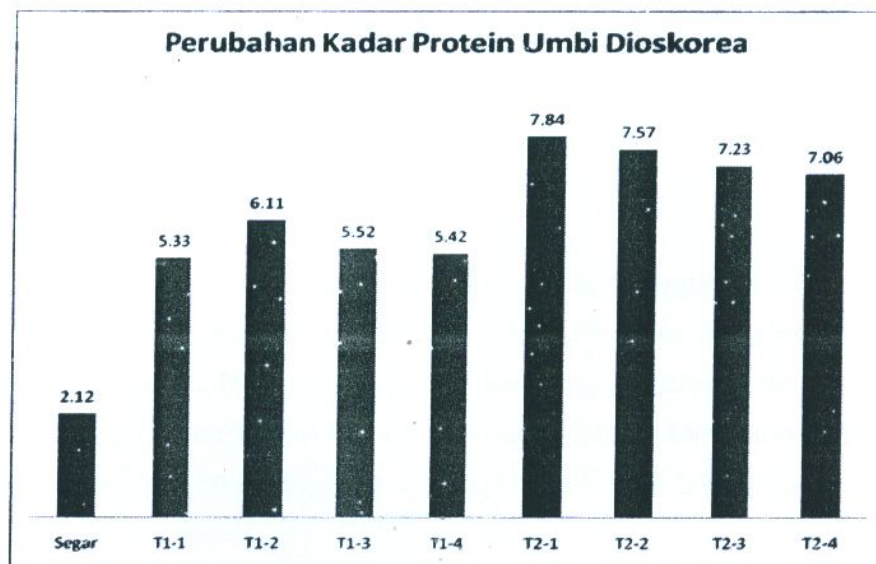
Gambar 7. Perubahan kadar abu umbi dioskorea setelah perlakuan

Kadar abu meningkat dengan penurunan kadar air. Pada umbi segar kadar abu adalah sekitar 0,6 mg % sedangkan pada tepung umbi dengan kadar air sekitar 8% kandungan abu meningkat menjadi 1,78 – 2,77 g %.



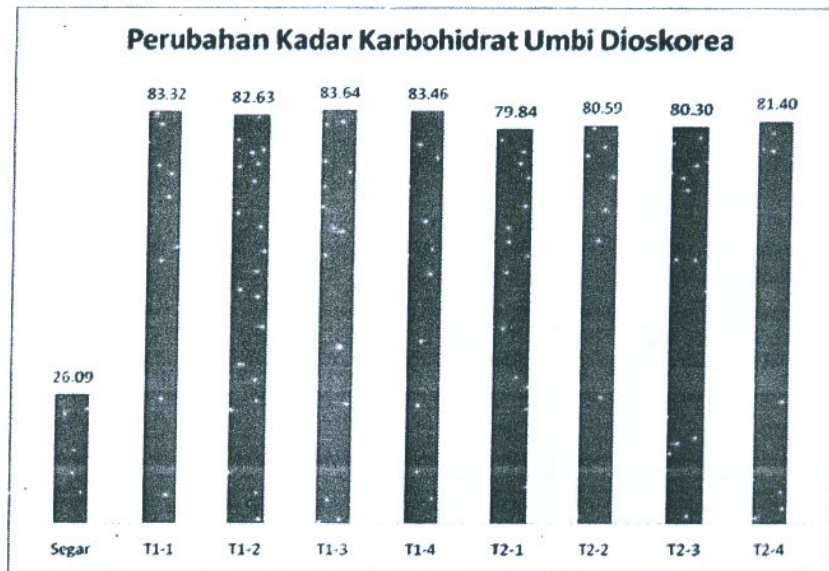
Gambar 8. Perubahan kadar lemak umbi dioskorea setelah pengeringan

Kandungan lemak umbi segar sangat rendah, yaitu 0,85%. Dengan penurunan kadar air, seharusnya terjadi sedikit kenaikan proporsi lemak di dalam bahan. Akan tetapi pada perlakuan waktu blanching 5 menit (T1) justru terjadi sedikit penurunan kadar lemak (0,62 – 0,7 %). Sedangkan pada perlakuan waktu blanching 10 menit (T2) terjadi peningkatan proporsi lemak di dalam bahan menjadi 0,98 – 1,07 %.



Gambar 9. Perubahan kadar protein umbi dioskorea setelah perlakuan

Proporsi protein di dalam bahan juga mengalami peningkatan. Pada umbi segar proporsinya adalah 2,12%, sedangkan pada tepung umbi dengan perlakuan lama blanching 5 menit (T1) proporsinya meningkat menjadi 5,42–6,11% dan pada perlakuan lama blanching 10 menit (T2) proporsinya adalah 7,06-7,84%.



Gambar 10. Perubahan kadar karbohidrat umbi dioskorea setelah perlakuan

Proporsi karbohidrat meningkat dengan adanya penurunan kadar air. Pada lama blanching 5 menit (T1) proporsinya meningkat dari 26,09% menjadi 82,63-83,64%. Sedangkan pada lama blanching 10 menit (T2) proporsinya sedikit lebih rendah, yaitu 79,84-81,40 %.

B. Kandungan Mineral Umbi Dioskorea

Umbi dioskorea memiliki kandungan mineral yang cukup lengkap. Pospor merupakan merupakan mineral dengan jumlah tertinggi yaitu 51,99 mg% kadar yang tinggi ini diimbangi dengan kadar kalsium, yaitu 23,78 mg %. Selain itu, kandungan natrium, dan kalium umbi ini juga cukup tinggi, yaitu 50,73 mg% dan 43,29 mg% berturut-turut. Mineral lain yang terdapat di dalam umbi adalah mg (14,09 mg%), zn (12,6 mg%), Iodium (4,89 mg%), Mn 2,16 mg%, Cu (1,45 mg%) dan Fe (1,27 mg%).

Tabel 3. Hasil analisa kandungan mineral umbi dioskorea segar.

| Jenis Analisa | Umbi segar 1 | Umbi segar 2 | Umbi segar 3 | Rata-rata |
|---------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| Mg (mg %) | 15.07 | 13.59 | 13.62 | 14.09 |
| Mn (ppm) | 2.40 | 1.83 | 2.25 | 2.16 |
| Fe (mg %) | 1.38 | 1.64 | 0.78 | 1.27 |
| Zn (mg %) | 14.08 | 11.26 | 12.45 | 12.60 |
| Cu (ppm) | 1.22 | 1.77 | 1.36 | 1.45 |
| Na (mg %) | 53.46 | 48.71 | 50.03 | 50.73 |
| Al (ppm) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ca (mg %) | 28.45 | 23.16 | 19.74 | 23.78 |
| K (mg %) | 42.19 | 45.70 | 41.99 | 43.29 |
| P (mg %) | 49.39 | 50.60 | 55.99 | 51.99 |
| Cl (mg %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Se (mg %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| I (mg %) | 4.89 | 5.30 | 4.47 | 4.89 |

Tabel 4. Hasil analisa kandungan mineral tepung umbi dioskorea dengan perlakuan pemanasan dan pH.

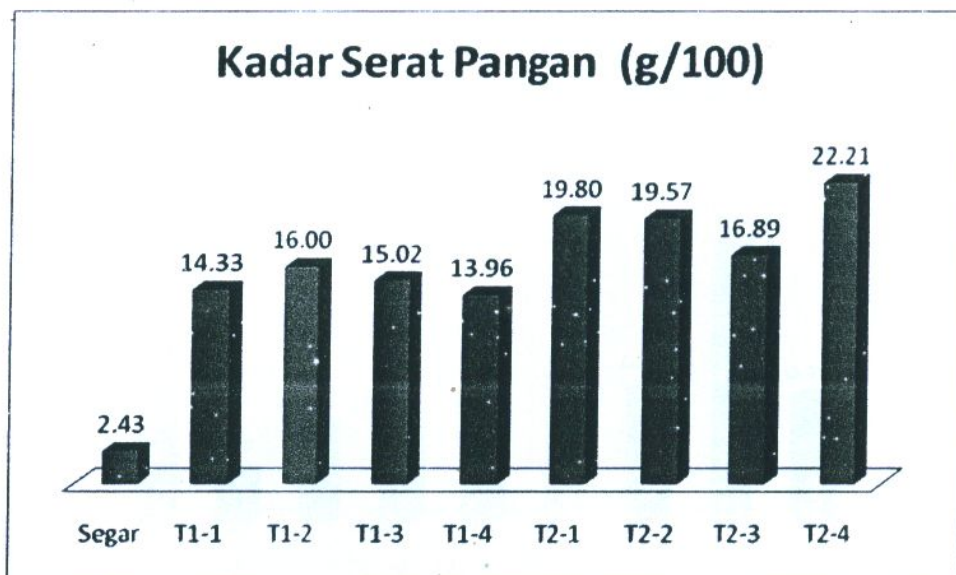
| Jenis Analisa | T1-1 | T1-2 | T1-3 | T1-4 | T2-1 | T2-2 | T2-3 | T2-4 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Mg (mg %) | 260.95 | 313.31 | 292.68 | 278.09 | 302.57 | 215.25 | 33.1 | 266.23 |
| Mn (ppm) | 3.71 | 2.8 | 3.11 | 3.27 | 4.1 | 2.62 | 2.51 | 3.35 |
| Fe (mg %) | 16.27 | 23.16 | 21.2 | 14.31 | 16.87 | 22.42 | 15.11 | 18.26 |
| Zn (mg %) | 36.81 | 30.56 | 12.85 | 36.74 | 22.37 | 32.69 | 37.37 | 30.95 |
| Cu (ppm) | 2.21 | 1,78 | 2.13 | 2.64 | 3.1 | 2.17 | 1.66 | 2.36 |
| Na (mg %) | 217.13 | 241.72 | 260.15 | 212.42 | 273.65 | 234.11 | 226.24 | 238.92 |
| Al (ppm) | 1.27 | 0.85 | 0.71 | 1.11 | 1.21 | 1.62 | 0.91 | 1.07 |
| Ca (mg %) | 527.18 | 621.1 | 549.14 | 511.22 | 617.23 | 641.38 | 572.44 | 507.91 |
| K (mg %) | 512.56 | 572.18 | 486.03 | 501.96 | 684.85 | 442.25 | 668.48 | 534.49 |
| P (mg %) | 587.45 | 659.87 | 591.88 | 615.37 | 626.86 | 599.75 | 675.02 | 577.37 |

C. Kandungan Serat Pangan Umbi Dioskorea

Tabel 5. Hasil analisa kandungan serat pangan umbi dioskorea.

| | Serat Pangan (g/100 g) |
|------------|------------------------|
| Umbi segar | 2.43 |
| T1-1 | 14.33 |
| T1-2 | 16.00 |
| T1-3 | 15.02 |
| T1-4 | 13.96 |
| T2-1 | 19.80 |
| T2-2 | 19.57 |
| T2-3 | 16.89 |
| T2-4 | 22.21 |

Kandungan serat pangan umbi dioskorea adalah 2,43 g%. Atau dalam basis kering kandungannya adalah 8,1 g%. Setelah pengeringan kandungan serat pangan tepung umbi meningkat antara 13.96% sampai dengan 22.21%. Hal ini terjadi karena penurunan kadar air bahan yang akan meningkatkan proporsi serat pangan dan bahan solid lain di dalamnya.



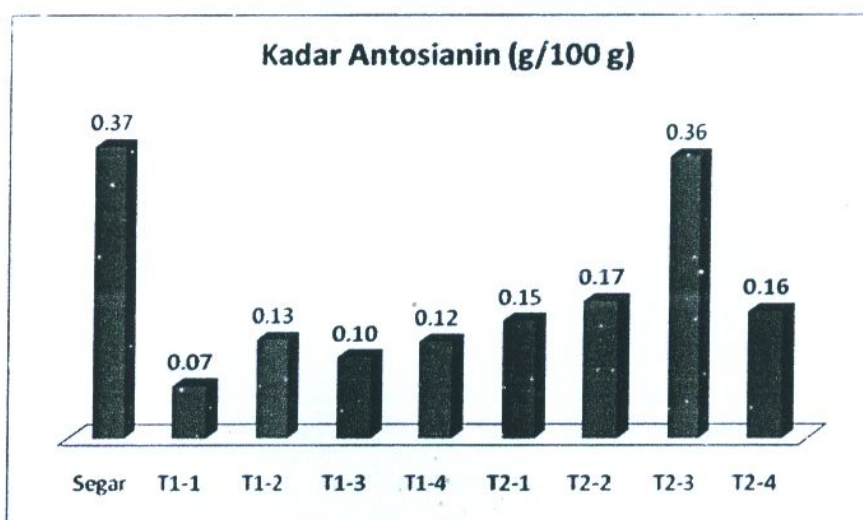
Gambar 11. Kadar serat pangan umbi segar dan tepung umbi

D. Kandungan Antosianin Umbi Dioskorea

Kadar antosianin umbi dioskorea sangat bervariasi antara satu ulangan dengan ulangan lainnya. Dari penampakan kasat mata juga terlihat intensitas warna antosianin berbeda antara umbi yang satu dengan yang lainnya. Proses perendaman di dalam asam sitrat dengan berbagai konsentrasi dimaksudkan untuk menstabilkan antosianin yang terdapat di dalam umbi, sedangkan proses blanching dimaksudkan untuk menginaktivasi enzim polifenol oksidase yang dapat mendegradasi komponen antosianin.

Tabel 6. Hasil analisa kandungan antosianin umbi dioskorea.

| | Kadar antosianin (g/100 g) |
|------------|----------------------------|
| Umbi Segar | 0.37 |
| Tepung 1-1 | 0.07 |
| Tepung 1-2 | 0.13 |
| Tepung 1-3 | 0.10 |
| Tepung 1-4 | 0.12 |
| Tepung 2-1 | 0.15 |
| Tepung 2-2 | 0.17 |
| Tepung 2-3 | 0.36 |
| Tepung 2-4 | 0.16 |

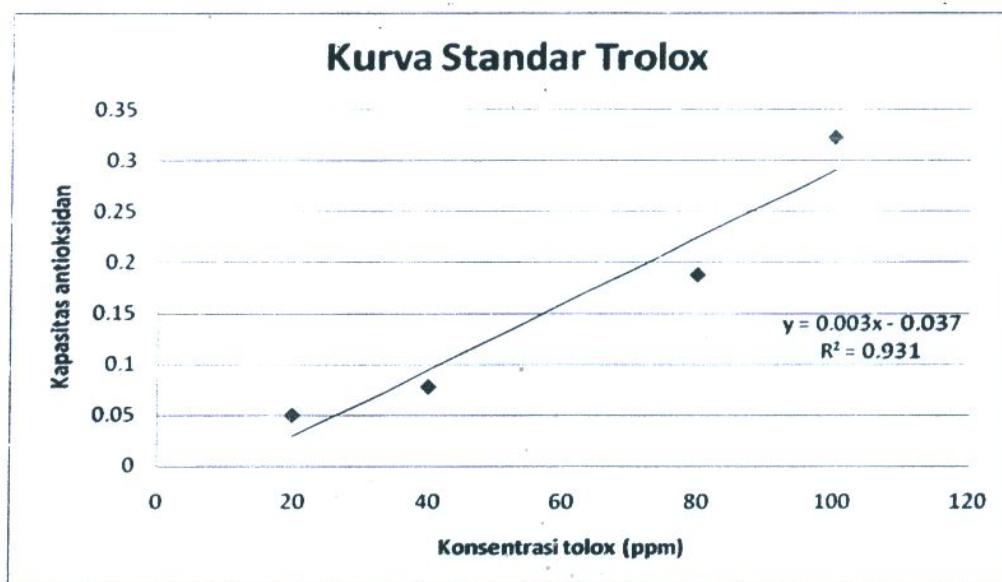


Gambar 12. Kadar antosianin umbi segar dan tepung umbi

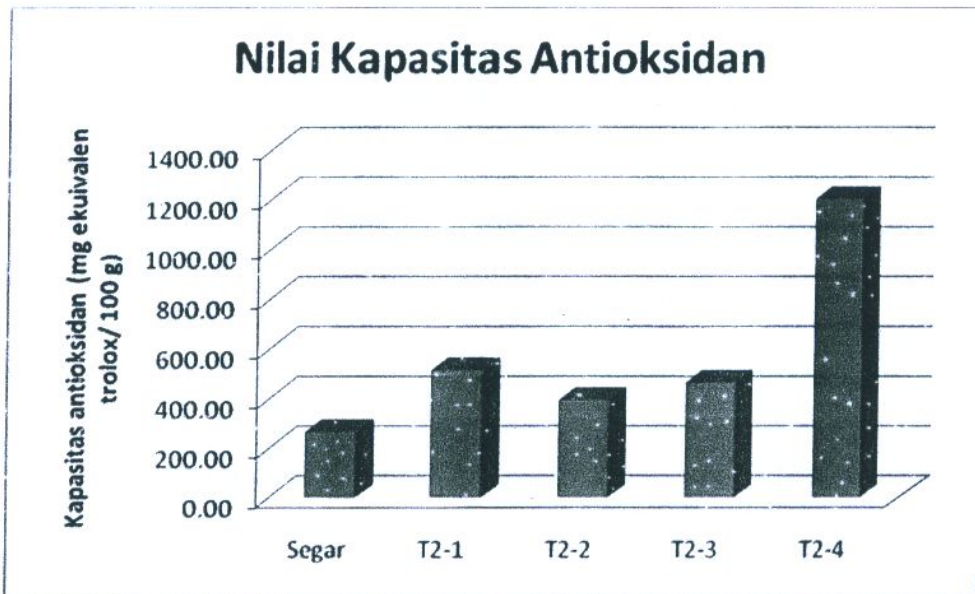
Setelah proses perendaman, blansir, pengeringan dan penepungan, terdapat perubahan kandungan antosianin pada produk. Lama blansir 10 menit (T2) menunjukkan hasil yang lebih tinggi di semua tingkat konsentrasi asam sitrat dibandingkan dengan lama blansir 5 menit (T1). Kemungkinan pada lama blansir 10 menit (T2) enzim polifenol oksidase telah diinaktivasi secara sempurna sehingga tidak mendegradasi komponen antosianin. Sedangkan untuk taraf konsentrasi asam sitrat, dikedua kelompok terlihat bahwa konsentrasi 1% memberikan nilai antosianin tertinggi dibandingkan konsentrasi lainnya.

E. Uji In Vitro Kapasitas Antioksidan Ekstrak Umbi Dioskorea

Uji kapasitas antioksidan dilakukan terhadap ekstrak metanol umbi dan tepung umbi dioskorea. Ekstraksi dilakukan dengan nisbah bahan : pelarut 1:25. Ekstrak metanol kemudian dikering bekukan hingga diperoleh ekstrak kering. Nilai kurva standar trolox diperoleh dengan memplotkan konsentrasi bertingkat trolox terhadap nilai absorbansi pada panjang gelombang 517 lamda. Ekstrak umbi dan tepung kemudian dilarutkan pada pengenceran tertentu, kemudian direaksikan dengan radikal DPPH (diphenyl picryl hidrazil). Kemampuan ekstrak dalam memudahkan warna DPPH kemudian diukur dengan menggunakan spektrofotometer.



Gambar 13. Kurva standard Trolox



Gambar 14. Nilai Kapasitas antioksidan umbi dioskorea segar dan tepung umbi

100 gram umbi segar memiliki kapasitas antioksidan setara dengan 265 mg ekuivalen trolox. Sedangkan tepung umbi rata-rata memiliki kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan umbi segar. Pada tepung bahan aktif lebih terkonsentrasi, sehingga nilai antioksidannya menjadi lebih tinggi. Diantara perlakuan pengolahan tepung, perlakuan blanching pada lama waktu 10 menit dengan perendaman asam sitrat 1% memiliki nilai kapasitas yang paling tinggi, yaitu setara dengan 1200 mg ekuivalen trolox. Proses pembuatan tepung yang dapat mempertahankan bahan aktif dan yang memiliki kapasitas antioksidan yang paling tinggi akan digunakan sebagai proses untuk pembuatan tepung umbi untuk ransum kelinci percobaan.

VII. DAFTAR PUSTAKA

Alsuhendra. 2004. Daya Anti-Aterosklerosis Zn-Turunan Klorofil Dari Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Pada Kelinci Percobaan. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Amalia E .Yanni, The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research, *Laboratory animals*(2004) 38,246-256

American Heart Association. 2008. Atherosclerosis. Tersedia pada [<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=228>]. Diunduh pada 12 Noverber 2009.

American Hearth Association. 1995. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. *Circulation*. 1995;91:2488-2496.

Argani, A. Ghorbani, N. Rashtchizade, M. Rahbaninobar, Effect of Lovastatin on lipid peroxidation and total antioxidant concentrations in hemodialysis patients, *Lipids Health Dis.* (2004) 6–10.

Araghiniknam, M. et al. 1996. Antiozidative and hypolipidemic effect of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high cholesterol fed rats. Available on [www.sciencedirect.com]. Elsevier Science Inc.

Azima, Fauzan. 2004. Aktivitas Antioksidan dan Anti-Agregasi Platelet Ekstrak Casia Vera (*Cinnamomum burmanni*) Serta Potensinya dalam Pencegahan Aterosklerosis pada Kelinci. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Chen, H. L., Wang, C. H., Chang, C. T., & Wang, T. C. (2003). Effect of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* thunb. var. *Pseudojaponica* yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. *Nutrition*, 19, 646–651.

Dimmeler, S. and Zeiher, A.M 1999. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 964–968.

Dhanya, S.P. and Hema, C.G. 2008. Small Animal Model of Atherosclerosis. *Calcut Medical Journal* 2008; 6(4)

Esterbauer, H., R.G. Schaur, and H. Zollner. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehyde. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81-28.

Garcia, VC, Zafrilla P, Tomas-Barberan FA. Determination of Authenticity of Fruit Jams by HPLC analysis of Antosianins. *Journal of The Science of Food and Agriculture.* 1997; 73(2):207-213

Hou, W.C., H.J. Chen, and Y.H. Lin. 1999. Dioscorin, the major tuber storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne), with dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase activities. *Plant Sci.* 149:151-156.

- Honga, J.H., and Lee, I.S. 2009. Effects of *Artemisia capillaris* ethyl acetate fraction on oxidative stress and antioxidant enzyme in high-fat diet induced obese mice, *Chem.Biol. Interact.* 179 (2009) 88–93.
- Liu, L.J., Liu, Y.Q., Chang, Y.R., Li, Q and Wang, J.B.X. 2006. GC/MS determination of diosgenin in rats plasma, *Chin. J. Pharm. Anal.* 26 (2006) 177–180.
- Lohachoompol, V., Szrednicki, G and Craske, J. 2004. The Change of Total Antosianins in Blueberries and Their Antioxidant Effect After Drying and Freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2004. 2004:5 248-252.
- Hou, G., 2001. Oriental noodles. *Advances in Food and Nutrition Research* 43, 143-193.
- I.K. Son, J.H. kim, H.Y. Shon, K.H. Son, J.S. Kim, C.S. Kwon, Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 3063–3071.
- Kiernan. 1990. *Histological And Histochemical Methods: Theory and Practice.* PergamonPress. Oxford
- Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar. 2007. BadanLitbang Kesehatan DepKes.
- Lee, M.H. et al. 2003. The mucilage of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory acrivities. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* Vol 44.
- Liao, Y.H., C.H. Wang, C.Y. Tseng, H.L. Chen, L.L. Lin, and W.Chen. 2004. Compositional and conformational analysis of yam proteins by near infrared Fourier transform Raman spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 52: 8190-8196.
- Liu, Yuh-Hwa et al. 2006. Comparison of in vitro antioxidant activities of storage proteins in tuber of two dioscorea species. *Botanical Studies* 47: 231-237.
- Loscalzo, J. 2001. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis, *Circ. Res.* 88 (2001) 756–762.
- Lwanga, S.K., and Lemeslow, S. 1998. *Sample Size Determintation in health studies. A Practical Manual.* World Health Organization. Genewa.
- Nagai, Takeshi et al. 2007. Antioxidant and antihypertensive activities of autolysate and enzymatic hydrolysates from yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) ichyoimo tubers. *Journal of Food Agriculture and Environment* Vol.5 (3&4) : 64-68.
- Official Methods of Analysis. 1990. 15 th ed. AOAC Arlington, VA, Vol II. Sec 085.29, 1105.
- Olayemi, J.O and Ajaiyeoba, E.O. 2007. Anti-inflammatory studies of yam (*Dioscorea esculenta*) extract on wistar rats. *African Journal of Biotechnology* Vol 6 (16), pp 1913-1915. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>.

Omoruyi, F.O. 2008. Jamaican Bitter Yam Sapogenin : Potential Mechanism of Action in Diabetes. *Plant Foods Human Nutrition* 63: 135-140.

Q. Sun, Y. Ju, Y. Zhao, Steroid saponins with biological activities, *Chin. Tradit. Herb. Drug* 33 (2002) 276–280.

Rosenfeld et al. 2001. Fatty streak initiation in Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 7,9-23

Shujun, Wang et al. Characterisation and preliminary lipid-lowering evaluation of starch from Chinese yam. 2007. *Food Chemistry* 108 (2008) 176-181. Available online at [www.sciencedirect.com].

Ward, P.A. 1991. Mechanisms of endothelial cell killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils, *Am. J. Med.* 91 (1991) 89S–94S.

Weisbroth, S.H., Flatt Ronald e., Krauss, A.L. 1974. *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Academic Press. London.

VIII. SUSUNAN TIM PENELITIAN

| No | Nama | Keahlian/ Kesarjanaan | Kedudukan dalam Tim | Uraian Tugas |
|-----|-----------------------------|--|------------------------|--|
| 1. | Nelis Imanningsih, MSc | Master of Food Science & Technology | Ketua Pelaksana | Merancang dan bertanggung jawab terhadap seluruh pelaksanaan penelitian, |
| 2. | Mutiara Prihatini, S.Giz | Sarjana Gizi | Peneliti | Bertanggungjawab terhadap pembuatan tepung dan ekstraksi senyawa bioaktif umbi dioscorea |
| 3. | Drh. Endi Ridwan | Dokter Hewan, Master of Science | Peneliti | Bertanggungjawab terhadap tindakan perawatan dan perlakuan terhadap kelinci |
| 4. | Nia Kurniawati | Analisis Kimia | Pembantu Peneliti | Menganalisa zat gizi mikro dan senyawa bioaktif |
| 5. | Ari Salbiah | Analisis Kesehatan | Pembantu Peneliti | Membantu analisis komponen lipida darah dan mikroskopis organ. |
| 6. | Supandi | SLTA | Pembantu Peneliti | Membantu merawat kelinci percobaan |
| 7. | Asiah | SLTA | Pembantu Peneliti | Membantu pekerjaan pembuatan tepung umbi dioscorea |
| 8. | Enday Yunidar | SLTA | Administrasi | Melakukan pekerjaan admistrasi |
| 10. | Prof. Komari | Doktor food biotechnology, Ahli Peneliti Utama | Konsultan | Memberi masukan terhadap jalannya penelitian |
| 11. | Prof. Dedi Muchtadi | Doktor di bidang Biokimia Pangan | Konsultan | Memberi masukan terhadap jalannya penelitian |

XI. BIODATA KETUA PELAKSANA & PENELITI UTAMA

Ketua Pelaksana : Nelis Imanningsih, S.T.P., MSc

Pendidikan :

Sarjana Teknologi Pertanian : Universitas Sriwijaya 1994

Master of Food Science and Technology : University of New South Wales 2004

Riwayat pekerjaan

Peneliti di Puslitbang Gizi dan Makanan mulai 1997 s/d Sekarang

Publikasi (Lima yang terakhir, sebut majalah, volume dan tahun).

1. Pengembangan minuman formula ibu hamil berbasis bahan lokal non susu. 2009. Penelitian Gizi dan Makanan.
2. Faktor-Faktor Pengolahan yang Mempengaruhi Off Flavour Formula Tempe. 2008. Penelitian Gizi dan Makanan.
3. Phytosterol. Senyawa Alami Pelindung Jantung. Prosiding Dietisien Indonesia. 2005
4. Stabilitas Vitamin A pada Kecap dan Saus Tomat. 2005. Dipresentasikan pada Workshop hasil-hasil penelitian Badan Litbang Kesehatan.
5. Rheological Study on Several Types of Flour and Formulation Commonly Used in Indonesian Food Products. Project Report. The University of New South Wales. 2004.