



LAPORAN PENELITIAN

JUDUL

Potensi Tepung Umbi Dioscorea (*Dioscorea alata* L) untuk mencegah Aterosklerosis pada Kelinci Percobaan.

OLEH

Nelis Immaningsih, S.T.P., MSc

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

2010

KATA PENGANTAR

LAPORAN PENELITIAN

JUDUL

Potensi Tepung Umbi Dioskorea (*Dioscorea alata* L) untuk mencegah Aterosklerosis pada Kelinci Percobaan.

OLEH

Nelis Imanningsih, S.T.P., MSc

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan	
PERPUSTAKAAN	
Tanggal :	_____
No. Indak :	_____
No. Klas :	622 C G17

**Puslitbang Gizi dan Makanan
Badan Litbang Kesehatan Kementrian Kesehatan**

2010

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur dipanjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas berkat rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian yang berjudul "Potensi Tepung Umbi Dioskorea (*Dioscorea Alata* L) untuk Mencegah Aterosklerosis pada Kelinci Percobaan".

Penelitian ini merupakan penelitian disertasi yang dilakukan untuk meraih gelar doktor pada Program Studi Ilmu Pangan Institut Pertanian Bogor. Dalam perjalanannya, banyak terdapat masukan yang memperkaya metode penelitian, sehingga sebagian tahap penelitian sudah dapat dilakukan dan dilaporkan, dan ada sebagian lainnya yang masih dalam proses pengerjaan. Hal lain yang memperlambat penyelesaian penelitian adalah hambatan teknis seperti terbatasnya ketersediaan bahan baku dan kelinci percobaan.

Dalam laporan penelitian ini, penulis menyajikan hasil-hasil penelitian yang telah selesai dilakukan sehingga laporan penelitian ini lebih tepat dikatakan sebagai laporan progres penelitian. Pada akhirnya ketika seluruh rangkaian penelitian sudah dilakukan, maka laporan ini akan diperbaiki dan dilengkapi.

Berbagai masukan sangat diharapkan untuk perbaikan, sehingga laporan penelitian ini dapat disempurnakan dengan lebih baik dan bermanfaat, sekaligus menjadi langkah penting bagi penulis untuk menyelesaikan Program Doktor yang telah dicita-citakan. Amin ya Robbal alamin.

Bogor, Desember 2010

Nelis Imanningsih

RINGKASAN EKSEKUTIF

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.

Umbi dioskorea mengandung bahan aktif diosgenin yang terbukti sebagai anti hiperkolesterolemia, pembengkakan hati dan dapat menurunkan gula darah. Umbi ini juga mengandung senyawa polifenol, flavonoid khususnya antosianin yang memiliki aktivitas antioksidan yang dapat berpotensi mencegah oksidasi kolesterol LDL. 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. Dengan komponen bioaktif yang potensial tersebut, umbi ini sampai saat ini belum ada yang mempelajari proses pembuatan tepung umbi yang dapat mempertahankan komponen bioaktif untuk dikembangkan sebagai makanan fungsional, dan 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.

Kandungan senyawa bioaktif yaitu serat pangan, total polifenol, antosianin, diosgenin dan serat pangan yang lebih tinggi ditemukan pada tepung yang diproses dengan perlakuan blansir selama 10 menit. Perlakuan perendaman dalam asam sitrat 1% dapat mempertahankan total polifenol, serat pangan dan kapasitas antioksidan pada tingkat yang paling tinggi. Sedangkan perendaman dalam asam sitrat 0,5% dapat mempertahankan

kadar antosianin dan diosgenin dengan baik. Kapasitas antioksidan yang paling tinggi diberikan oleh tepung yang diblansir selama 10 menit, dan direndam oleh asam sitrat 1%. Kapasitas penghambatan radikal bebas 100 gram tepung umbi dioskorea setara dengan 846 g vitamin C, 3200 vitamin E dan 1280 g trolox.

Data dari penelitian ini dapat digunakan untuk merancang dan megembangkan makanan fungsional berbahan dasar umbi dioskorea yang memiliki retensi zat bioaktif paling tinggi untuk digunakan sebagai makanan untuk mencegah kondisi hiperlipidemia dan aterosklerosis.

ABSTRAK

Kondisi hiperlipidemia yang berkepanjangan yang disertai oksidasi LDL merupakan tahap awal terjadinya proses aterosklerosis. Beberapa komponen bioaktif memiliki fungsi fisiologis untuk mengurangi faktor risiko terjadinya aterosklerosis dengan cara menurunkan total kolesterol di dalam darah, atau sebagai antioksidan yang mencegah oksidasi LDL. Umbi-umbian dioskorea berpotensi dalam mengurangi risiko kejadian aterosklerosis, karena mengandung komponen-komponen fungsional antosianin, diosgenin dan serat pangan. Dengan adanya aktivitas fisiologis senyawa-senyawa yang terdapat di dalam umbi dioskorea, dapat dikembangkan suatu bahan pangan fungsional untuk mencegah terjadinya aterosklerosis yang merupakan faktor langsung dari kejadian penyakit kardiovaskuler dan jantung koroner. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh pemberian tepung umbi dioskorea terhadap pencegahan kejadian aterosklerosis pada kelinci percobaan. Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap. Tahap pertama adalah proses pembuatan tepung umbi dan analisis kandungan kimia umbi segar dan tepung umbi. Tahap kedua adalah uji kapasitas antioksidan dan anti agregasi platelet umbi segar dan tepung umbi secara in vitro, dan tahap ketiga adalah uji penghambatan aterosklerosis secara vivo pada kelinci percobaan selama 12 minggu. Kandungan senyawa bioaktif yaitu serat pangan, total polifenol, antosianin, diosgenin dan serat pangan yang lebih tinggi ditemukan pada tepung yang diproses dengan perlakuan blansir selama 10 menit. Pada kelompok blansir ini, perlakuan perendaman dalam asam sitrat 1% dapat mempertahankan total polifenol, serat pangan dan kapasitas antioksidan pada tingkat yang paling tinggi. Sedangkan perendaman dalam asam sitrat 0,5% dapat mempertahankan kadar antosianin dan diosgenin dengan baik. Kapasitas antioksidan yang paling tinggi diberikan oleh tepung yang diblansir selama 10 menit, dan direndam oleh asam sitrat 1%. Kapasitas penghambatan radikal bebas 100 gram tepung umbi dioskorea setara dengan 846 g vitamin C, 3200 vitamin E dan 1280 g trolox

Kata kunci : Dioskorea, hiperlipidemia, aterosklerosis, antioksidan, antiagregasi platelet.



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

KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

NOMOR : HK.02.04/2/4847/2010

TENTANG

TIM PENELITIAN POTENSI TEPUNG UMBI DIOSKOREA
(*Dioscorea alata*, L) UNTUK MENCEGAH ATEROSKLEROSIS
PADA KELINCI PERCOBAAN

KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

- Menimbang** :
- a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2010 perlu dibentuk Tim Pelaksanaan Penelitian "Potensi Tepung Umbi Dioscorea (*Dioscorea alata* L) untuk Mencegah Aterosklerosis pada Kelinci Percobaan";
 - b. bahwa sehubungan dengan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a tersebut diatas, dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksanaan Penelitian "Potensi Tepung Umbi Dioscorea (*Dioscorea alata* L) untuk Mencegah Aterosklerosis pada Kelinci Percobaan";
- Mengingat** :
1. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130) ;
 2. Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);
 3. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261 088 Faksimile: (021) 4243933

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

Lampiran

**Keputusan Kepala Badan Penelitian
dan Pengembangan Kesehatan**

Nomor : HK.02.04/2/4247/2010

Tanggal : 7 JUNI 2010

**SUSUNAN TIM PENELITIAN POTENSI TEPUNG UMBI DIOSKOREA
(*Dioscorea alata*, L) UNTUK MENCEGAH ATEROSKLEROSIS
PADA KELINCI PERCOBAAN**

No	Nama	Kedudukan dalam Tim	Lama Tugas	
1	Nelis Imanningsih, STP MSc	Peneliti Utama	33 jam	6 bulan
2	Mutiara Prihatini, S.Giz	Peneliti	20 jam	6 bulan
3	Drh. Endi Ridwan, MSc	Peneliti	15 jam	6 bulan
4	Prof. Dr. Komari, MSc	Peneliti	15 jam	4 bulan
5	Prof. Dr. Ir. Deddy Muchtadi, MS	Peneliti	15 jam	4 bulan
6	Nia Kurniawati, AMd	Pembantu Peneliti	15 jam	6 bulan
7	Ari Salbiah	Pembantu Peneliti	15 jam	6 bulan
8	Supandi	Pembantu Peneliti	15 jam	6 bulan
9	Asiah	Pembantu Peneliti	15 jam	6 bulan
10	Enday Yunidar	Administrasi	6 bulan	

**KEPALA BADAN PENELITIAN
DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN,**



Prof. Dr. dr. AGUS PURWADIANTO, SH, M.Si, SpF(K)

SUSUNAN TIM PENELITIAN

1.	Nelis Imanningsih, MSc	Ketua Pelaksana
2.	Mutiara Prihatini, S.Giz	Peneliti
3.	Drh. Endi Ridwan	Peneliti
4.	Nia Kurniawati	Pembantu Peneliti
5.	Ari Salbiah	Pembantu Peneliti
6.	Supandi	Pembantu Peneliti
7.	Asiah	Pembantu Peneliti
8.	Enday Yunidar	Administrasi
10	Prof. Komari	Konsultan
11	Prof. Dedi Muchtadi	Konsultan

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
RINGKASAN EKSEKUTIF	ii
ABSTRAK	iv
SUSUNAN TIM PENELITI	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
I PENDAHULUAN	1
II TUJUAN PENELITIAN	4
III METODE PENELITIAN	5
A. Tempat dan Waktu Penelitian	5
B. Materi Penelitian	5
C. Tahapan Penelitian	5
D. Jenis dan Disain Penelitian	11
E. Variabel	13
F. Prosedur Analisis	13
G. Pertimbangan Izin Penelitian	26
H. Pertimbangan Etik	26
IV HASIL	27
V PEMBAHASAN	34
VI KESIMPULAN	47
VII DAFTAR PUSTAKA	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
1 Rekomendasi komposisi pakan untuk kelinci dewasa	9
2 Komposisi ransum basal kelinci per 100 kg	9
3 Hasil analisa proksimat umbi segar dan tepung umbi	27
4 Hasil analisa jenis mineral umbi segar dan tepung umbi	28
5 Hasil analisa serat pangan	29
6 Hasil analisa total antosianin	30
7 Hasil analisa total polifenol	31
8 Hasil analisa diosgenin	32
9 Hasil analisa kapasitas antioksidan	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1 Diagram alir penelitian	6
2 Diagram alir pembuatan tepung umbi dioskorea	7
3 Diagram Alir Uji Secara in Vivo	12
4 Tahapan Preparasi Sediaan Jaringan Organ Kelinci	24
5 Umbi <i>Dioskorea Alata</i> jenis <i>purpurea</i>	34
6 Umbi dioskorea yang telah dikupas	34
7 Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0% dengan 2 waktu blansir	35
8 Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0,25% dengan 2 waktu blansir	36
9 Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0,5% dengan 2 waktu blansir	36
10 Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 1% dengan 2 waktu blansir	36
11 Kadar air umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	37
12 Kadar abu umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	38
13 Kadar lemak umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	38
14 Kadar protein umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	39
15 Kadar abu umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	39
16 Kadar serat pangan pada umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	41
17 Kadar antosianin segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	43
18 Kandungan total polifenol umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	43
19 Kandungan total polifenol umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan	44
20 Kapasitas antioksidan ekstrak metanol tepung umbi pada beberapa perlakuan	45

I. PENDAHULUAN

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 gembili (*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).

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 *dioscorea* 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 *dioscorea*

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

II. 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.

III. METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Pangan Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Laboratorium Kimia Makanan dan Percobaan Hewan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Bogor, Laboratorium Pusat Pengabdian Masyarakat Departemen Biokimia Universitas Indonesia, dan Laboratorium Patologi Klinik Pusat Jantung Terpadu RSCM dari bulan Juni 2010 sd bulan Juni 2012.

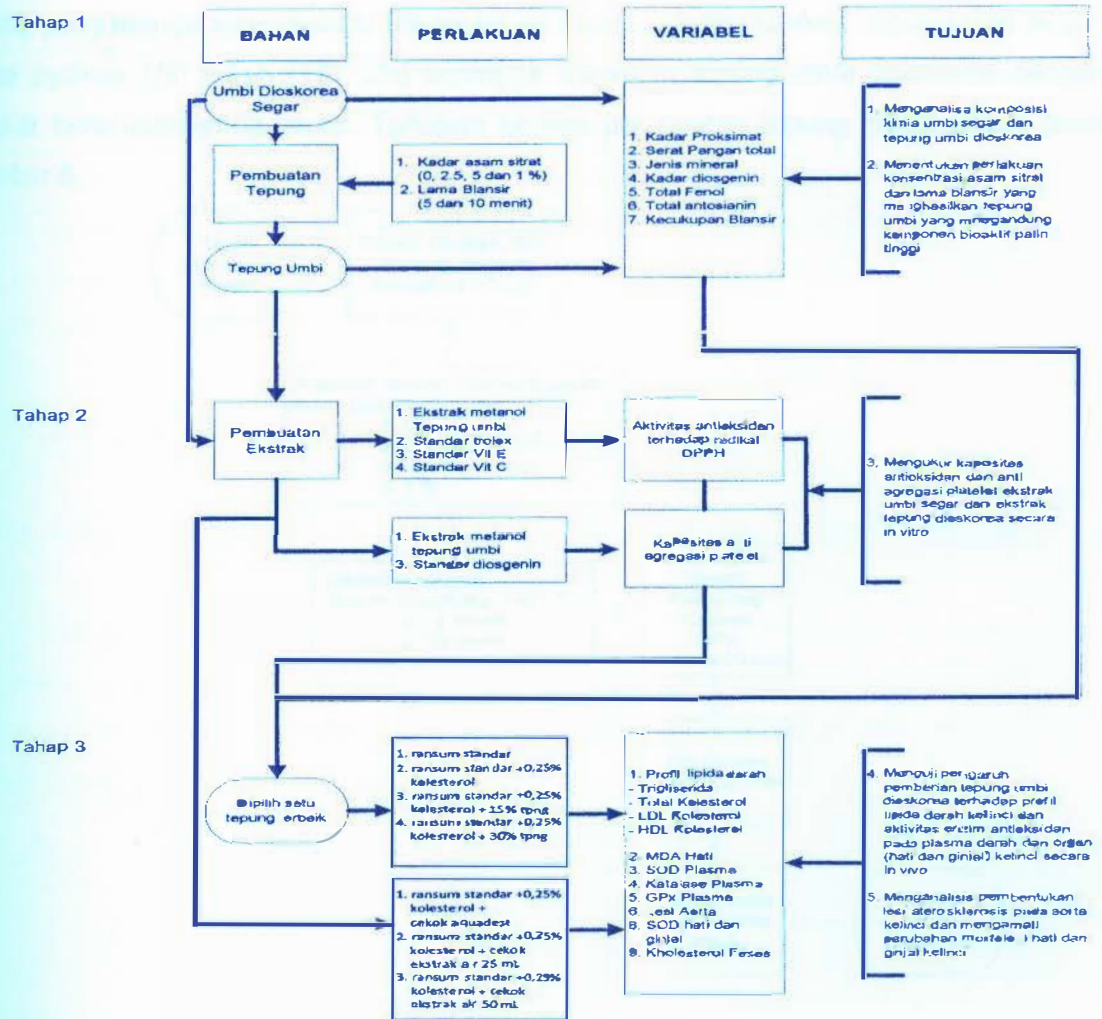
Materi Penelitian

Materi utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi *Dioscorea alata* berwarna ungu yang diperoleh dari pedagang pengumpul di daerah Pondok Cabe dengan umur panen yang seragam yaitu 10 bulan. Bahan pendukung yang digunakan adalah bahan-bahan kimia untuk ekstraksi senyawa bioaktif dan analisis kimia, serta kit dan reagen biokimia untuk analisis biokimia. Selain itu digunakan pula kelinci sebagai hewan percobaan beserta komponen pakannya untuk pengujian in vivo. Peralatan yang digunakan meliputi peralatan untuk pembuatan dan pengemasan tepung, alat-alat untuk analisis laboratorium, pengujian secara in vitro dan in vivo.

Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap dengan proses dan luaran setiap tahapannya dapat dilihat pada gambar 5. Tahap pertama adalah proses pembuatan tepung umbi dan analisis kandungan kimia umbi segar dan tepung umbi. Tahap kedua adalah uji kapasitas antioksidan dan anti agregasi platelet umbi segar dan tepung umbi secara in vitro, dan tahap ketiga adalah uji penghambatan aterosklerosis secara vivo pada kelinci percobaan.

Tahapan penelitian yang dapat dilakukan pada tahun 2010 adalah tahap pertama dilakukan pada bulan Juni 2010 – Desember 2010. Tahap kedua dan percobaan pendahuluan dari tahap ke tiga dilakukan pada bulan Januari 2011 sampai dengan bulan

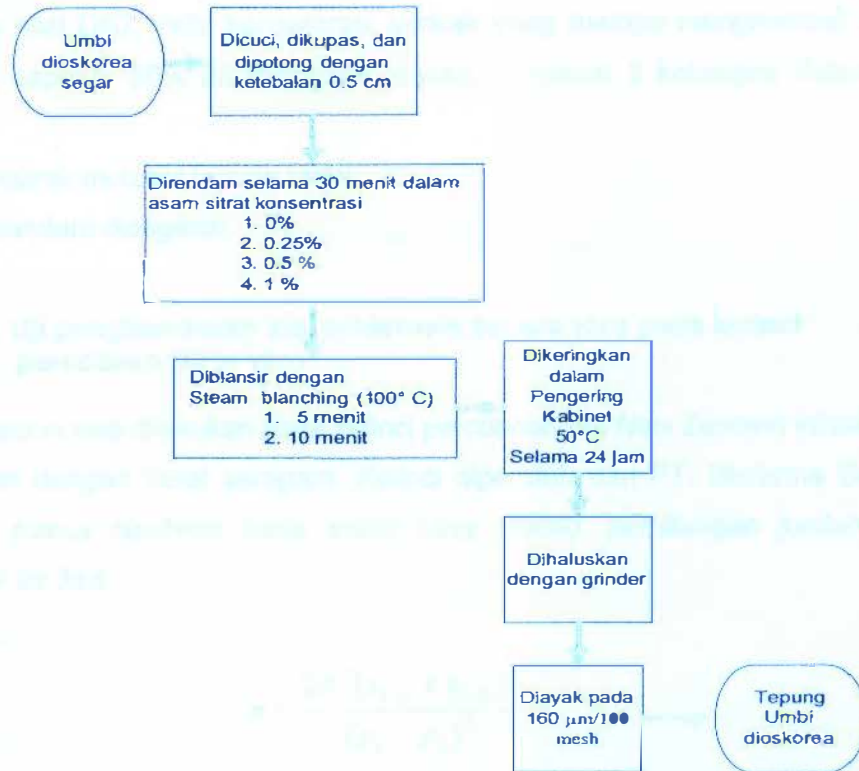


Gambar 1. Diagram alir penelitian

Tahap Pertama : Proses pembuatan tepung umbi dan analisis kimia umbi segar dan tepung umbi.

Umbi dioskorea (*Dioscorea alata*) berwarna ungu diperoleh dari pedagang pengumpul di daerah Pondok Cabe. Dipilih umbi dengan umur panen yang seragam yaitu 10 bulan. Umbi dibersihkan dari kotoran yang melekat, dan disimpan di ruangan berpendingin sebelum diolah menjadi tepung. Umbi diproses menjadi tepung dengan perlakuan sebagai berikut. Pertama-tama umbi dicuci dan dikupas. Potongan umbi yang sudah dibersihkan kemudian diiris dengan ketebalan 5 mm, kemudian direndam dalam asam sitrat dengan konsentrasi 0%, 0,25%, 0,5% dan 1% selama 30 menit. Setelah perendaman, umbi ditiriskan kemudian diblansir selama 5 menit dan 10 menit dengan cara pengukusan pada suhu 100°C. Umbi kemudian dikeringkan dengan menggunakan udara panas di dalam pengering kabinet pada suhu 50°C selama 24 jam. Potongan umbi

kering yang mengandung sekitar 8% kadar air kemudian dihancurkan, digiling dan diayak pada ayakan 100 mesh (160 μm) sehingga diperoleh tepung umbi dioskorea dengan tingkat kehalusan yang sama. Tahapan proses pembuatan tepung dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 2. Diagram Alir Pembuatan Tepung Umbi Dioskorea

Umbi segar dan tepung umbi dari masing-masing perlakuan dianalisis total proksimat (air, abu, lemak dan protein), kandungan mineral, kandungan diosgenin, total polifenol, kandungan antosianin, total serat pangan, dan diukur kecukupan blansir dengan mengukur aktivitas enzim polifenol oksidase.

Tahap Kedua : Uji kapasitas antioksidan dan anti agegasi platelet umbi segar dan tepung umbi secara in vitro

- a. Uji kapasitas antioksidan ekstrak dan tepung umbi dilakukan dengan mengukur kemampuan membersihkan radikal DPPH (1,1-diphenyl-picrylhydrazyl). Terdapat 3 kelompok dalam uji ini yaitu:
 1. Ekstrak metanol tepung umbi
 2. Standar Trolox
 3. Standar Vit E
 4. Standar Vit C

- b. Kapasitas Anti agerasi platelet dilakukan dengan menggunakan plasma darah kelinci. Pengambilan darah dilakukan setelah kelinci dipelihara selama 2 minggu. Darah kelinci yang diambil, diproses untuk mendapatkan plasma kaya platelet (PRP) dan Plasma Miskin Platelet (PPP). Aktivitas anti-agerasi platelet dinyatakan dengan nilai D50, yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat agerasi platelet sebesar 50% dibandingkan blanko. Terdapat 3 kelompok dalam uji ini yaitu:
1. Ekstrak metanol tepung umbi
 2. Standard diosgenin

Tahap Ketiga: Uji penghambatan aterosklerosis secara vivo pada kelinci percobaan Uji in vivo

Uji secara in vivo dilakukan pada kelinci percobaan ras *New Zealand White*, jantan berusia 5 bulan dengan berat seragam. Kelinci diperoleh dari PT. Biofarma Bandung. Menggunakan rumus hipotesis beda *mean* Levy (1999), perhitungan jumlah kelinci adalah sebagai berikut:

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

Dengan hipotesis Standar deviasi (σ)= 20, *Test value of population mean* (μ_0)= 150 (Total Kolesterol mg/dL), *Anticipated population mean* (μ_a)=100 (Total Kolesterol mg/dL), *Level of significance* (α)= 1%, dan *Power of test* ($1-\beta$) = 90%, maka diperoleh jumlah kelinci percobaan yang digunakan adalah:

$$n = \frac{2(20)^2 \times [(1 - 0.01) + 0.9]^2}{(150 - 100)^2} = 5$$

Untuk menentukan kadar kolesterol yang harus ditambahkan pada pakan hingga dapat membuat kondisi hiperkolesterolemia, maka dilakukan studi pendahuluan. Studi pendahuluan dilakukan selama satu bulan. Pada periode ini kelinci diberi pakan yang disertai kolesterol dengan konsentrasi tertentu. Pada awal dan akhir percobaan pendahuluan, diambil darah kelinci untuk diukur kadar kolesterol total, HDL dan LDL.

Ransum untuk pakan kelinci diformulasi berdasarkan kebutuhan nutrisi kelinci seperti tercantum pada tabel 2.

Tabel 1. Rekomendasi komposisi pakan untuk kelinci dewasa.

No	Bahan	Jumlah
1.	Protein kasar	17 %
2.	Energi	2550 kal
3.	Lemak	3-4 %
4.	Serat Kasar	12 %
5.	Kalsium	1.1 %
6.	Fosfor	0.6 %
7.	Kalium	0.9 %
8.	Natrium	0.3 %
9.	Klor	0.3 %
10.	Magnesium	0.25 %
11.	Vitamin A	10.000 (IU/Kg)
12.	Vitamin D	1000 (IU/Kg)
13.	Vitamin E	50 ppm
14.	Vitamin K	2 ppm
15.	Vitamin B1	2 ppm
16.	Vitamin B2	4 ppm
17.	Vitamin B12	0.01 ppm
18.	Asam Folat	5 ppm
19.	Asam Pantotenat	20 ppm
20.	Niasin	50 ppm
21.	Biotin	0.2 ppm

Sumber: Lebas, 1989 di dalam FAO, 1997

Untuk mendapatkan komposisi pakan seperti tersebut di atas, dilakukan perhitungan dengan menggunakan WUFFDA (Windows-Based User Friendly Feed Formulation Workbook) Versi 3 Software (Thomson, 2009). Dihindari bahan pakan yang mengandung tinggi polifenol atau fitoestrogen seperti kedelai untuk menghindari bias. Untuk mendapatkan kandungan nutrisi seperti tercantum di atas, maka komposisi bahan ransum basal adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Komposisi ransum basal kelinci per 100 kg

No	Bahan	Berat (Kg)
1.	Dedak	11,0
2.	Polard (dedak gandum)	11,0
3.	Corn Gluten Feed	27,0
4.	Bungkil kelapa	12,0
5.	Jagung	10,0
6.	Rumput gajah kering	27,8
7.	Premix (berisi vitamin dan mineral)	0,3
8.	Garam	0,3
9.	Kapur (kalsium karbonat)	0,3
10.	Tepung tulang (dikalsium fosfat)	0,3

Pakan dibuat setiap dua minggu sekali. Pakan berupa pellet disimpan pada refrigerator untuk mencegah kerusakan senyawa bioaktif. Pada setiap pembuatan pakan, dianalisis kandungan antosianin dan diosgenin serta bilangan peroksida untuk memastikan bahwa ransum tetap baik.

Kelinci diadaptasikan pada lingkungan pemeliharaan selama satu bulan untuk penyesuaian lingkungan dan pakan. Pada saat adaptasi pakan diberikan secara bertahap. Setelah masa adaptasi, kelinci ditimbang berat badannya, kemudian dikelompokkan menjadi dua yaitu:

Kelompok A adalah:

1. Ransum basal
2. Ransum basal + 0,25% Kolesterol
3. Ransum basal yang mengandung 15% tepung umbi dioskorea + 0,25% Kolesterol
4. Ransum basal yang mengandung 30% tepung umbi dioskorea + 0,25% Kolesterol

Kelompok B adalah:

1. Ransum basal + 0,25% Kolesterol + 25 mL aquadest
2. Ransum basal + 0,25% Kolesterol + 25 mL ekstrak air tepung umbi
3. Ransum basal + 0,25% Kolesterol + 50 mL ekstrak air tepung umbi

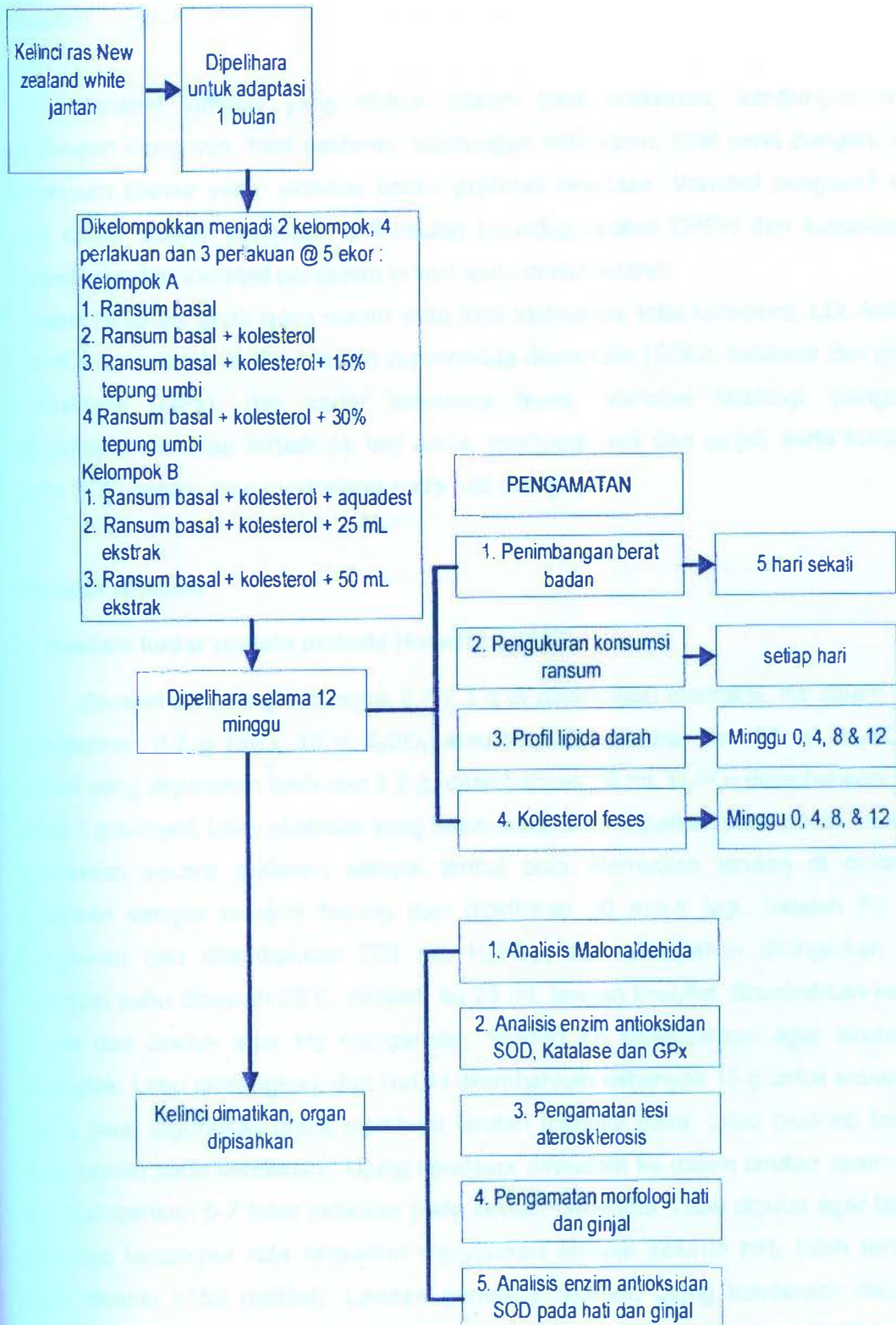
Kolesterol sebesar 0,25% ditambahkan untuk membuat kelinci menjadi hiperkolesterolemia. Pakan yang mengandung kolesterol dibuat terpisah dengan ransum basal. Pakan yang mengandung kolesterol diberikan terlebih dahulu kepada kelinci percobaan untuk dihabiskan, baru kemudian diberikan pakan basal sebanyak 120 g/ hari. Pada kelompok A, tepung umbi dicampurkan ke dalam pakan basal, sedangkan pada kelompok B, ekstrak air tepung umbi diberikan dengan cara dicekakan. Semua ransum diformulasikan iso kalori, iso protein, dan mengandung jumlah serat yang sama.

Kelinci diberi diet sesuai dengan perlakuan hingga dua belas minggu. Pada jangka waktu ini diperkirakan telah terbentuk plak pada dinding arteri kelinci. Selama pengujian, dilakukan pengamatan terhadap: berat badan setiap lima hari sekali, konsumsi ransum setiap hari, kadar kolesterol, trigliserida, HDL kolesterol dan LDL kolesterol dan kolesterol pada feses pada minggu ke 0 (baseline), 4, 8 dan 12. Sebelum pengambilan contoh darah, kelinci dipuasakan antara 10-12 jam. Darah diambil pada pembuluh darah vena atau arteri telinga kelinci sebanyak 5 mL. Pada akhir pengujian, kelinci dimatikan dengan cara disembelih menggunakan pisau yang tajam. Setelah darah dikeluarkan, kelinci kemudian dibedah dan dipisahkan organ-organnya yaitu: jantung dan aorta, hati, dan ginjal. Lalu difiksasi untuk selanjutnya dilakukan pengamatan histologi. Pengamatan yang dilakukan adalah terhadap lesi aterosklerosis pada dinding aorta, perubahan

morfologi hati dan ginjal, kadar malonal dehidratasi hati, dan kadar enzim SOD, GPX dan katalase pada hati dan ginjal.

Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian adalah Eksperimental. Desain penelitian yang digunakan untuk uji kimia adalah Rancangan Acak Kelompok dengan faktor 3 X 2. Faktor pertama adalah konsentrasi asam sitrat untuk perendaman umbi, dan faktor kedua adalah lama blansir. Pengelompokan dilakukan berdasarkan asal bonggol umbi yaitu 3 kelompok. Desain penelitian yang digunakan untuk uji secara in vitro adalah Rancangan Acak Lengkap dengan faktor: ekstrak metanol tepung umbi, standar trolox, vit E dan vit C. Desain penelitian yang digunakan untuk uji secara in vivo adalah Rancangan Acak Lengkap dengan faktor pada kelompok A: 1. Ransum basal, 2. Ransum basal + 0,25% Kolesterol, 3. Ransum basal yang mengandung 15% tepung umbi + 0,25% Kolesterol, 4. Ransum basal yang mengandung 30% tepung umbi + 0,25% Kolesterol. Pada kelompok B: 1. Ransum basal + 0,25% Kolesterol + 25 mL aquadest, 2. Ransum basal + 0,25% Kolesterol + 25 mL ekstrak air tepung umbi, dan 3) Ransum basal + 0,25% kolesterol + 50 mL ekstrak tepung umbi.



Gambar 3. Diagram Alir Uji Secara in Vivo

Variabel

Variabel kimiawi yang diukur adalah total proksimat, kandungan mineral, kandungan diosgenin, total polifenol, kandungan antosianin, total serat pangan, dan uji kecukupan biarsir yaitu: aktivitas enzim polifenol oksidase. Variabel pengujian in vitro yang diukur adalah kapasitas antioksidan terhadap radikal DPPH dan kapasitas anti-asegasi platelet. Variabel pengujian in vivo yang diukur adalah:

Variabel biokimia: profil lipida serum yaitu total trigliserida, total kolesterol, LDL-kolesterol dan HDL-kolesterol; aktifitas enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GPx), dan kadar kolesterol feses. Variabel histologi: pengamatan mikroskopis terhadap terjadinya lesi aorta, morfologi hati dan ginjal, serta kandungan enzim SOD secara imunohistokimia pada hati dan ginjal.

Prosedur Analisis

A. Analisis kadar protein metode Horwitz (2007)

Sampel ditimbang sebanyak 0.7-2.2 g di dalam labu ekstraksi. Ke dalam sampel ditambahkan 0.7 g HgO, 15 g K₂SO₄ atau Na₂SO₄ anhidrat dan 25 mL H₂SO₄. Jika sampel yang digunakan lebih dari 2.2 g, ditambahkan 10 mL H₂SO₄ ditambahkan kepada setiap 1 g sampel. Labu ekstraksi yang berisi sampel ditempatkan pada posisi miring, dan dipanaskan secara perlahan sampai timbul buih. Kemudian larutan di dalam labu dididihkan sampai menjadi bening dan dididihkan 30 menit lagi. Setelah itu larutan didinginkan dan ditambahkan 200 mL H₂SO₄, dan dilanjutkan didinginkan hingga mencapai suhu dibawah 25°C. Setelah itu 25 mL larutan tiosulfat ditambahkan ke dalam larutan dan diaduk agar Hg mengendap. Butiran Zn ditambahkan agar larutan tidak bergejolak. Labu dimiringkan, dan NaOH ditambahkan sebanyak 15 g untuk setiap 10 mL H₂SO₄ yang digunakan untuk membuat larutan menjadi basa. Labu destilasi kemudian dihubungkan pada kondensor. Ujung kondensor direndam ke dalam larutan asam standar dan ditambahkan 5-7 tetes indikator pada larutan penerima. Labu diputar agar larutan di dalamnya tercampur rata kemudian dipanaskan sampai seluruh NH₃ telah terdestilasi (telah dicapai ≥150 destilat). Larutan penerima dicabut, ujung kondensor dicuci, dan dilakukan titrasi asam standar pada destilat dengan larutan standard NaOH. Koreksi dilakukan dengan penghitungan blanko. Persentasi nitrogen dihitung sebagai berikut:

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

B. Analisis kandungan lipida metode Horwitz (2007)

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

C. Analisis kandungan air metode Horwitz (2007)

Sampel ditimbang sebanyak 2 g. Sampel kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-135°C sampai dicapai berat tetap. Kadar air dihitung sebagai selisih berat sampel setelah mencapai bobot tetap.

D. Analisis kandungan abu metode Horwitz (2007)

Cawan abu dipanaskan di dalam oven, kemudian didinginkan di desikator dan ditimbang segera setelah mencapai suhu ruang. Sampel ditimbang sebanyak 3-5 g ke dalam cawan abu tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam furnace dan dipanaskan pada suhu 550°C sampai sampel berwarna abu-abu muda, atau dicapai berat konstan. Cawan didinginkan dalam desikator dan ditimbang segera setelah mencapai suhu kamar.

E. Analisis kadar mineral metode Horwitz (2007)

Analisis dilakukan menggunakan metode *Atomic Absorption Spectrophotometric* (AAS). Pertama-tama sampel dipreparasi mengguriakan pengabuan basah, yaitu sampel ditimbang sebanyak 1 g, dikeringkan dan dihancurkan, kemudian dimasukkan ke dalam 150 mL gelas beker. HNO₃ sebanyak 10 mL ditambahkan ke dalam gelas beker dan sampel dibiarkan terendam dengan baik. Setelah itu HClO₄ 60% ditambahkan sebanyak 3 mL. Larutan dipanaskan pada *hot plate*, sampai HNO₃ hampir semuanya menguap dan terbentuk uap HClO₄ berwarna putih. Larutan didinginkan dan ditambahkan HCl sebanyak 10 mL dan dipindahkan ke labu 50 mL. Larutan 5% La ditambahkan hingga mencapai volume. Jika diperlukan, sampel dapat diencerkan dengan menambahkan HCl 10% agar dapat dibaca oleh instrument. Larutan dianalisis dengan menggunakan AAS. Perhitungan konsentrasi elemen adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Elemen} = \text{ppm} \times 10^4$$

$$\text{Ppm elemen} = \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times \frac{F}{g \text{ sampel}}$$

$$\text{Dimana, } F = \frac{\text{mL pengenceran awal} \times \text{pengenceran akhir}}{50 \text{ mL}}$$

F. Penentuan kandungan diosgenin metode Uematsu (2000).

Kadar lemak sampel dihilangkan terlebih dahulu dengan cara mengekstrak sampel menggunakan n-heksan. Residu yang telah bebas lemak, kemudian diekstrak menggunakan metanol. Ke dalam 3 g sampel bebas lemak, ditambahkan 30 mL metanol kemudian dikocok menggunakan *shaker* selama 12 jam, kemudian disentrifus untuk memisahkan residu dengan supernatan. Prosedur ekstraksi diulangi sebanyak tiga kali.

Standar diosgenin dan *p*-anisaldehid (4-methoxybenzaldehyde) disiapkan. Kandungan diosgenin ditentukan dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 430 nm, berdasarkan reaksi warna dengan anisaldehyde, asam sulfat dan etil asetat. Disiapkan dua pereaksi pembentuk warna yaitu : (A) 0.5 ml *p*-anisaldehid dan 99.5 ml etil asetat, dan (B) 50 ml asam sulfat pekat dan 50 ml etil asetat. 200 µg ekstrak metanol umbi ditempatkan pada tabung reaksi. Untuk ini, 1 mg ekstrak metanol dari umbi yang telah dihilangkan lemaknya pertama-tama dilarutkan dalam 1 ml methanol, dan 200 µl dari larutan ini ditempatkan pada tabung yang lain; metanol dievaporasi dengan gas nitrogen. Residu ini kemudian dilarutkan dalam 2 mL etil asetat; masing-masing 1 mL dari reagen A dan B kemudian ditambahkan ke dalam tabung dan diaduk. Tabung reaksi ditempatkan pada water bath yang dijaga suhunya pada 60°C selama 10 menit agar warna terbentuk, kemudian didinginkan selama 10 menit pada waterbath dengan suhu 25°C. Selanjutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang 430 nm dengan menggunakan spektrofotometer. Etil asetat digunakan sebagai kontrol blanko dengan cara menempatkan 2 mL etil asetat pada tabung dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang sama. Untuk pembuatan kurva standard, 2-40 µg standard diosgenin dilarutkan dalam 2 mL etil asetat. Setiap sampel diulangi tiga kali dan rata-ratanya dihitung.

G. Ekstraksi Antosianin metode Pazmino-Duran (2001)

Sampel dipotong kecil-kecil sebanyak 5 gam kemudian ditambah 100 mL metanol (nisbah 1:20) yang mengandung 0.1% HCl pekat dan dimaserasi selama semalam pada suhu dingin ($\pm 5^\circ\text{C}$). Filtrat disaring dan residu diekstrak kembali dengan pelarut yang sama (50 mL metanol-0.1% HCl) dengan pengaduk magnetik sampai sampel berwarna pucat. Filtrat disatukan, dipekatkan dengan evaporator berputar pada suhu 40°C sampai

diperoleh ekstrak pekat, lalu disimpan pada suhu dingin ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) atau dikering bekukan (*Freeze dried*).

H. Analisis Total Antosianin metode Giusti dan Wrolstad (2000)

Penetapan antosianin total dilakukan dengan metode perbedaan pH, yaitu dengan melarutkan sejumlah kecil ekstrak sampel dalam buffer pH 1.0 dan pH 4.5, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm dan 700 nm. Buffer pH 1.0 dibuat dengan cara melarutkan 1.49 g KCl dalam 100 mL aquadest kemudian diatur pH nya dengan HCl pekat hingga pH 1.0 ± 0.1 . Pada pH 1.0 antosianin berbentuk ion flavilium yang berwarna merah, sedang pada pH 4.5 antosianin berbentuk karbinol yang tidak berwarna..

Untuk menghitung konsentrasi antosianin total, faktor pengenceran yang tepat harus ditentukan terlebih dahulu dengan cara melarutkan sampel dengan buffer KCl pH 1.0 hingga diperoleh absorbansi kurang dari 1.2 pada panjang gelombang 510 nm. Selanjutnya, ekstrak sampel dilarutkan dalam buffer asetat pH 4.5 dengan pengenceran yang sama. Sampel yang dilarutkan pada buffer 4.5 dibiarkan selama 5 menit, sebelum diukur absorbansinya. Absorbansi dari kedua larutan diukur pada panjang gelombang 510 dan 700 nm dengan buffer pH 1.0 dan 4.5 sebagai blanko. Absorbansi untuk masing-masing ekstrak pada panjang gelombang 510 dan 700 nm, dimasukkan ke dalam rumus:

$$A = [(A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}]$$

Kandungan antosianin total dihitung dengan rumus :

$$\%b/b = \frac{A}{(\epsilon \times L)} \times MW \times DF \times \frac{V}{W_t} \times 100\%$$

Keterangan:

%b/b = Kandungan antosianin (dalam %)

E = Koefisien ekstingsi molar sianidin-3-rutinosida = 28.800 L/cm

L = Lebar kuvet

MW = Berat molekul sianidin-3-rutinosida = 445.2 g/mol

DF = Faktor pengenceran

V = Volume akhir/volume ekstrak pigmen (L)

Wt = Berat sampel (g)

I. Analisis kadar total fenol metode Folin-Ciocalteu yang telah dimodifikasi oleh Chaovanalikit dan Wrolstad (2004).

Analisis kadar total fenol pada sampel ekstrak tepung umbi dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri. Pembuatan kurva standar dilakukan dengan membuat

konsentrasi asam galat dalam air deionisasi sebesar 0, 40, 80, 120, 160, dan 200 ppm di dalam tabung reaksi. Standar kemudian dicampur dengan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu 50 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A) dan 7,5 mL air deionisasi. Campuran dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1,5 mL sodium karbonat 2 % (w/v). Selanjutnya, campuran dipanaskan pada suhu 40°C dalam *water bath* selama 20 menit, dan secepatnya didinginkan. Campuran kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 755 nm. Hasil absorbansi merupakan fungsi konsentrasi kadar asam galat, dan diplotkan dalam grafik untuk digunakan sebagai kurva standar asam galat. Pengujian sampel ekstrak dilakukan seperti seperti pada standar dan hasilnya diplotkan ke dalam persamaan kurva standar sehingga konsentrasi total fenol sebagai asam galat dalam larutan sampel diketahui dalam bentuk persentase (%) fenol per berat sampel.

J. Analisis kandungan serat pangan metode Horwitz (2007)

Analisis dilakukan menggunakan total *Dietary Fiber Kit* yang menggunakan kombinasi metode enzimatik dan gravimetrik. Jika kandungan lemak sampel lebih besar dari 10%, dilakukan penghilangan lemak dengan petroleum eter. Kehilangan berat akibat penghilangan lemak dicatat untuk menghitung persentase akhir kandungan serat pangan. Setiap sampel dihomogenisasi dan dikeringkan semalam pada oven dengan suhu 105°C. Sampel didinginkan dalam desikator, dan dihaluskan sampai 0,3 -0,5 mm mesh.

Sampel yang telah kering dicerna dengan Termamyl atau α -amilase yang tahan panas pada pH 6 dan suhu 95°C untuk menghilangkan karbohidrat sederhana. Setelah itu sampel dicerna dengan protease pada pH 7.5 dan suhu 60°C untuk menghilangkan protein. Terakhir, sampel dicerna dengan amiloglukosidase pada pH 4-4.6 dan suhu 60°C untuk menghilangkan pati. Etil alkohol sebanyak 4 kali lipat volume ditambahkan untuk mempresipitasi soluble dietary fiber (SDF). Total residu disaring dan dicuci dengan 78% etil alkohol, 95% etil alkohol dan aseton secara berturut-turut. Residu kemudian dikeringkan dan ditimbang. Setiap sampel ditimbang dua kali masing-masing duplo. Satu sampel dianalisis untuk protein dan satu sampel untuk kadar abu. Total serat pangan dihitung sebagai selisih antar berat residu dengan berat protein ditambah abu.

K. Pengukuran kecukupan blansir metode Ndiaye (2008)

Enzim polifenoloksidase pada sampel diekstrak dengan menggunakan air. Umbi yang telah diblansir kemudian secara cepat dihancurkan menggunakan waring blender. *Puree* umbi kemudian ditimbang sebanyak 10 gam dan dicampur dengan buffer

Mcllvaine-sitrat-fosfat pada pH 6.5, menggunakan vorteks. Campuran kemudian disentrifuse pada 6000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh disimpan di dalam refrigerator sampai saat analisis.

Aktivitas enzim polifenol oksidase dilakukan secara duplikasi menggunakan spektrofotometer, dan dihitung berdasarkan slope dari kurva absorbansi pada panjang gelombang 420 dengan waktu (menit). Larutan katekol (1 mL, 0.175 M) dan bufer Mcllvaine sitrat-fosfat pH 6.5 di tambahkan ke dalam 0.5 mL ekstrak polifenol oksidase. Campuran kemudian diinkubasikan pada 30°C selama 20 detik sebelum pengukuran absorbansi. Pengukuran dilakukan setiap 20 detik sampai dengan 5 menit. Satu unit aktivitas polifenol oksidase didefinisikan sebagai kenaikan 0.001 nilai absorbansi pada panjang gelombang 420 / untuk setiap mL sampel per menit. Aktivitas PPO residu diekspresikan sebagai persen rasio antara sampel pure umbi yang diblansir dengan sampel yang tidak diblansir (kontrol).

L. Uji kapasitas antioksidan metode Yamaguchi (1998)

Umbi segar dikupas dan dipotong kecil. Tepung umbi ditimbang sebanyak 5 g kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Ke dalam labu dimasukkan metanol-0.1% HCl dengan nisbah sampel-metanol adalah 1 : 20. Campuran dimaserasi selama semalam pada suhu dingin ($\pm 5^\circ\text{C}$). Filtrat disaring dan residu diekstrak kembali dengan pelarut yang sama (metanol-0.1% HCl) dengan pengaduk magnetik sampai sampel berwarna pucat. Filtrat disatukan, dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak pekat, lalu disimpan pada suhu dingin ($\pm 5^\circ\text{C}$) sampai dilakukan pengujian.

Uji kapasitas antioksidan dilakukan dengan menguji efek pembersihan radikal DPPH (1,1-diphenyl-picrylhydrazyl) oleh ekstrak sampel. Sebagai standard digunakan trolox. Kurva standard trolox dibuat dengan cara melarutkan trolox dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm ke dalam metanol. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan metanol, buffer asetat, standard atau sample dan larutan DPPH. Sebagai blanko digunakan metanol, dan DPPH. Campuran diinkubasi di dalam gelap selama 20 menit, kemudian diukur absorbansi pada 517 nm. Nilai kapasitas antioksidan merupakan selisih antara nilai absorbansi DPPH dengan nilai absorbansi sampel. Kurva standard trolox dibuat dengan cara memplotkan nilai konsentrasi trolox dengan nilai kapasitas antioksidan. Nilai absorbansi sampel diperoleh dengan memasukkan nilai kapasitas antioksidan ke dalam persamaan kurva standard dengan satuan mili equivalent trolox per 100 g bahan.

M. Analisis kapasitas anti agitasi platelet metode Gong (2010) dan Azima (2004).

Persiapan platelet : Darah kelinci diambil dari pembuluh vena dengan menggunakan *syringe* steril, kemudian dicampur dengan trinitrium sitrat 3.8% dengan perbandingan (9:1 v:v) ke dalam tabung. Plasma Kaya Platelet (PRP) diperoleh dengan cara mensentrifus darah pada 1000 rpm selama 15 menit. Plasma miskin Platelet (PPP) diperoleh dengan mensentrifuse endapan darah yang tersisa pada 1000 rpm selama 15 menit. ADP digunakan sebagai agen agitasi. Prinsip pengukuran agitasi platelet adalah berdasarkan perubahan transmisi cahaya. Sebelum penambahan agagator, transmisi cahaya yang melalui PRP adalah terendah, karena platelet tersuspensi dalam PRP. Setelah penambahan agagator, platelet akan beragitasi dan mengendap hingga plasma menjadi jernih dan transmisi cahaya akan meningkat. Alat yang digunakan untuk mengukur agitasi adalah Chrono log Aggegometer dikerjakan di laboratorium patologi Klinik Pusat Jantung Terpadu RSCM.

PPP sebanyak 500 μ l dimasukkan ke dalam kuvet. Kuvet yang berisi PPP dimasukkan ke dalam lubang optis, lalu PPP set switch ditakan untuk menentukan agitasi 100% (dimana PRP 0% agitasi). Ke dalam kuvet yang lain dimasukkan 440 μ l PRP, lalu dimasukkan 10 μ l Ekstrak umbi dioskorea segar, ekstrak tepung umbi atau ekstrak diosgenin (untuk blanko digunakan 10 μ l PPP tanpa ekstrak) yang telah diencerkan dengan PPP sesuai konsentrasi yang diinginkan, disusul dengan memutar sampel menggunakan magnetik stirer untuk menghomogenisasi campuran. Setelah itu campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, dan ake dalam masing-masing kuvet ditambahkan ADP 10 μ M sebanyak 50 μ l sebagai bahan penginduksi agitasi platelet, sehingga volume akhir masing-masing kuvet adalah 500 μ l, kemudian agitasi platelet diukur.

Aktivitas anti agitasi platelet dinyatakan dengan nilai D50, yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat agitasi platelet sebesar 50% dibandingkan dengan blanko. Konsentrasi ekstrak dinyatakan dalam berat per volume dengan satuan mg/ml PRP. Konsentrasi ekstrak yang dianalisis dinyatakan dalam berat ekstrak per volume pelarut yang diperoleh dari penimbangan dibagi volume keseluruhan sampel (volume PRP) dalam kuvet dibagi faktor pengenceran,

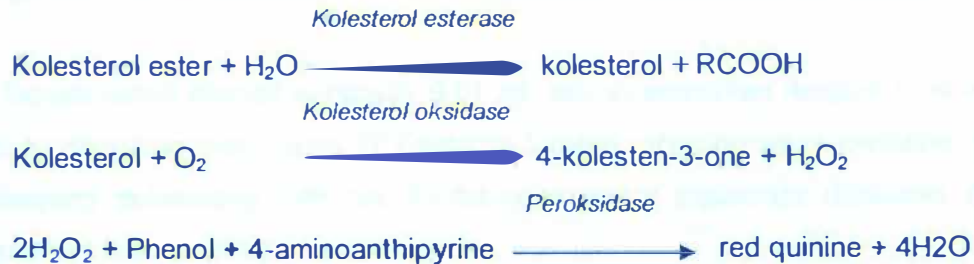
Adapun rumus untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang dianalisis adalah sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi(mg / ml.PRP)} = \frac{\text{Beratsampel}}{\text{Vol.pelarut}} \times \frac{1}{FP} \times \frac{10}{\text{volPRP}}$$

FP = Faktor Pengenceran

N. Pengujian Total Kolesterol / TK (Boehringer Kits)

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



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

$$\text{Kadar kolesterol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times 200 \text{ mg/dL}$$

O. 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 sebagai berikut.

$$\text{Kadar HDL} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = [\text{absorbansi sampel}] \times 219.2 \text{ mg/dL}$$

P. Pengujian Trigliserida/TG (Boehringer Kits)

Prinsip pengujian berdasarkan reaksi dibawah ini :





Serum darah diambil sebanyak 0.01 ml, lalu dicampurkan dengan 1 ml reagen. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, absorbansinya kemudian dibaca pada panjang gelombang 546 nm. Perhitungan kadar trigliserida dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kadar Trigliserida} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standar}} \times 200 \text{ mg/dL}$$

Q. Pengujian Kadar Low Density Lipoprotein (LDL) metode Baraas (1994)

Kadar LDL dihitung secara langsung menggunakan rumus sebagai berikut.

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

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

R. Analisis kadar malonaldehida metode Singh (2002)

Sekitar 2,5 gram hati yang telah dicacah (keadaan dingin) ditambahkan ke dalam 10 ml larutan PBS (*phosphat buffered saline*) yang mengandung 11,5 g/l KCl. Selanjutnya sampel dihancurkan dengan digerus, kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 2 ml supernatan hati kelinci ditambah 8,0 ml HCl 0,25 N (dingin) yang mengandung 15% TCA (*trichloroacetic acid*), 0,38% TBA (*thiobarbituric acid*), dan 0,5% BHT (*butylated hydroxytoluena*). Campuran dipanaskan dalam penangas air pada 80°C selama 1 jam. Setelah dingin, campuran disentrifus pada 3000 rpm selama 15 menit. Absorbansi supernatan diukur dengan spektrofotometer pada 532 nm. Sebagai larutan standar digunakan TEP (*1,1,3,3-tetraethoxypropane*). Bila konsentrasi MDA rendah, menunjukkan adanya penghambatan terhadap oksidasi lipid oleh suatu antioksidan.

S. Analisis Aktifitas Enzim Super oksida dismutase (SOD), Katalase dan Glutation Peroksidase (GPX) Plasma metode Pigeolet (1990)

Aktifitas SOD diuji berdasarkan laju penghambatan reduksi ferisitokrom c oleh anion superoksida yang dihasilkan oleh xantin/xantin oksidase. Xantin dioksidasi menjadi asam urat dan anion superoksida yang terjadi akan mereduksi ferisitokrom c. Reduksi ferisitokrom c diamati berdasarkan kenaikan absorbansi pada panjang gelombang 550 nm. Pengukuran aktifitas SOD dilakukan dengan cara memasukkan 2,9 mL larutan campuran xantin dan larutan sitokrom c ke dalam tabung reaksi 3 mL. Kemudian kedalamnya ditambahkan 50 uL larutan sampel atau larutan kontrol (air destilasi) dan divorteks secara perlahan. Setelah itu ditambahkan 50 uL larutan xantin oksidase dan divorteks secara perlahan. Untuk blangko digunakan buffer fosfat sebagai pengganti sampel. Perubahan absorbansi yang terjadi diamati pada panjang gelombang 550 nm.

$$\text{Aktifitas SOD } \left(\frac{U}{g}\right) = \frac{A \left(\frac{U}{mL}\right) \times 0.67 \text{ mL}}{0.5 \text{ g (bb)}}$$

A adalah: aktifitas yang diperoleh dari persamaan regresi

Pengukuran aktifitas katalase dilakukan dengan menambahkan 1 mL sampel ke dalam 5 mL buffer fosfat 0,05 M pada pH 7 sambil divorteks. Selanjutnya pada campuran ditambahkan 4 mL H₂O₂ dan diinkubasi selama 60 detik. Sebanyak 1 mL campuran larutan ditambahkan 2 mL larutan kalium bikarbonat, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Setelah dingin, serapan diukur pada panjang gelombang 570 nm.

$$\text{Aktifitas Katalase } \left(\frac{U}{g}\right) = \frac{A \left(\frac{U}{mL}\right) \times 1.4 \text{ mL}}{0.5 \text{ g (bb)}}$$

A adalah: Konsentrasi katalase yang diperoleh dari persamaan regresi kurva standar.

Pengukuran aktifitas glutathion peroksidase dilakukan dengan menambahkan 200 uL buffer fosfat 0.1M pH7.0 yang mengandung 0.1mM EDTA ke dalam 200 uL sampel. 200 uL glutathion tereduksi (GSH) 10 mM dan 200 uL enzim glutathion reduktase 2.4 unit selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Larutan yang telah diinkubasi ditambahkan 200 uL NADPH 1.5 mM, kemudian larutan tersebut diinkubasi

lagi pada suhu yang sama selama 3 menit. Setelah diinkubasi ditambahkan 200uL H₂O₂ 1.5 mM ke dalam larutan. Selanjutnya serapan larutan dibaca di antara waktu 1-2 menit setelah inkubasi pada panjang gelombang 340 nm.

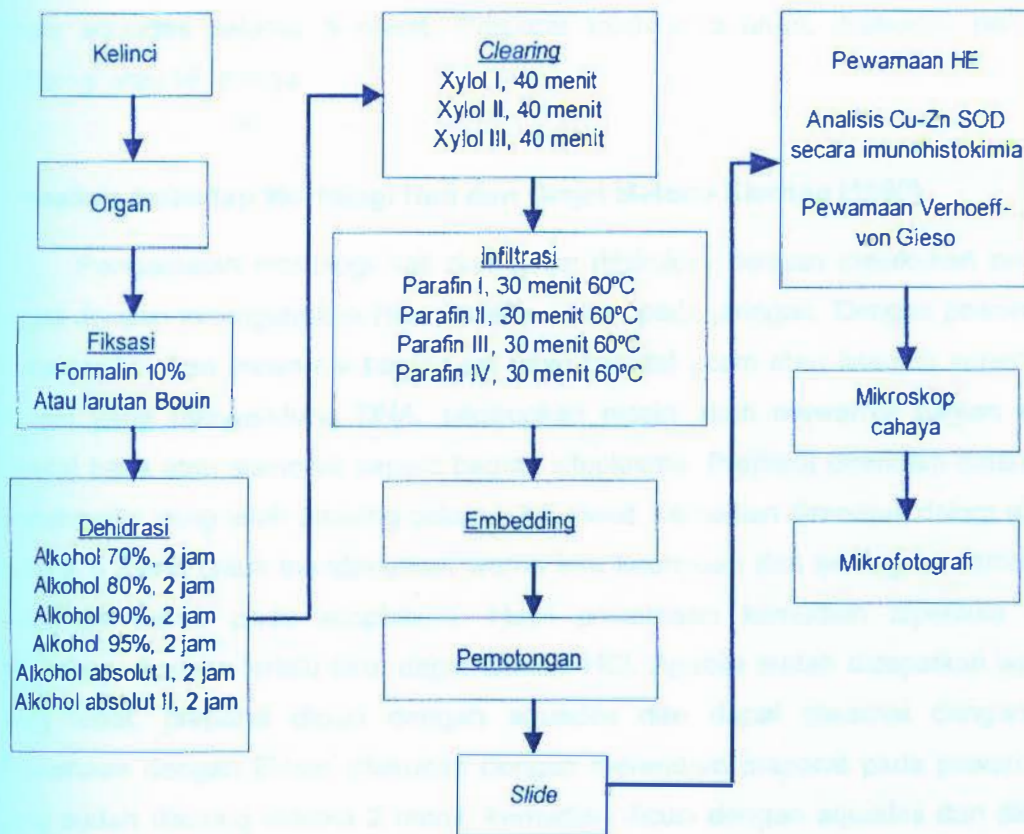
$$\text{Aktivitas GSH - Px} = \frac{\text{Abs} \times Vt}{6.22 \times Vs} \times 2 \times 1000 \times \frac{1}{\text{mg protein}}$$

T. Analisis kolesterol pada feses metode Chen (2001)

Feses selama periode metabolisme dikumpulkan, dan dikeringkan menggunakan oven vakum dan dikeringkan. 1 g feses kering diekstrak netral steroid dan asam empedunya menggunakan kloroform dan metanol (2:1) pada 60°C selama 2 jam. Steroid netral dihitung dengan meraksikannya menggunakan reagent Libermann-Burchard (asetat anhidrat : asam sulfat : asam asetat, 20 : 1 : 10). Asam empedu dihitung berdasarkan reaksi yang dikatalisa oleh 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase. Sejumlah kolesterol/ asam kenodeoksikolat ditambahkan pada sampel feses, kemudian diekstrak dengan cara yang sama seperti sampel feses lainnya.

U. Pengamatan Histopatologis metode Kiernan (1990)

Prosedur pembuatan sedian histologis adalah sebagai berikut: pemeriksaan organ-organ kelinci setelah dieuthanasi adalah dilakukan fiksasi, dehidrasi, clearing, infiltrasi, embedding, pemotongan, pewarnaan dan mikrofotografi.



Gambar 4. Tahapan preparasi sediaan jaringan organ kelinci

Pembuluh aorta jantung, jaringan ginjal dan hati diambil dan dipisahkan dari organ lainnya. Kemudian difiksasi dengan menggunakan formalin atau larutan *Bouin*. Organ disayat-sayat untuk memudahkan filtrasi larutan fiksatif ke dalamnya. Sampel organ dimasukkan dalam botol sampel yang telah diisi larutan fiksasi. Selanjutnya sample dehidrasi yaitu proses mengeluarkan air dari dalam jaringan/organ dengan menggunakan alkohol bertingkat. Konsentrasi alkohol yang digunakan dari 70%, 80%, 90%, 95% dan 100% (alkohol absolut) masing-masing selama 1 jam. Setelah proses dehidrasi dilakukan, dilakukan penjernihan untuk menggantikan tempat alkohol dalam jaringan setelah dehidrasi dengan suatu medium penjernih yaitu xylo. Selanjutnya adalah proses *embedding*, yaitu proses memasukkan/menanam jaringan ke dalam blok-blok parafin (cetakan) untuk memudahkan pada proses penyayatan dengan mikrotom. Jaringan yang telah di *embedding* kemudian disayat menggunakan mikrotom sehingga didapatkan sediaan dengan ketebalan 0.4-0.5 μm . Untuk mewarnai preparat diperlukan proses deparafinisasi (penghilangan paraffin) dan rehidrasi jaringan. Deparafinisasi dilakukan dalam xylo sebanyak tiga kali, rehidrasi dilakukan pada larutan alkohol bertingkat mulai dari alkohol absolut hingga alkohol 70% dan dilanjutkan dengan perendaman preparat dalam air mengalir selama 3-15 menit. Terakhir, preparat dibilas di

dalam aquades selama 5 menit. Preparat telah siap untuk dilakukan pengamatan morfologi atau uji lainnya.

1. Analisis terhadap Morfologi Hati dan Ginjal Metode Kiernan (1990)

Pengamatan morfologi hati dan ginjal dilakukan dengan melakukan pewarnaan umum dengan menggunakan Hematoksilin Eosin pada jaringan. Dengan pewarnaan ini, hematoksilin akan mewarnai bagian sel yang bersifat asam atau basofilik seperti bagian inti sel yang mengandung DNA, sedangkan eosin akan mewarnai bagian sel yang bersifat basa atau eisinofilik seperti bagian sitoplasma. Preparat direndam dalam larutan hematoksilin yang telah disaring selama 3-5 menit, kemudian direndam dalam air ledeng selama 5 menit untuk mendapatkan warna biru keunguan dan sekaligus membersihkan kelebihan warna pada sitoplasma. Hasil pewarnaan kemudian diperiksa dibawah mikroskop. Apabila terlalu biru, dapat ditetesi HCl. Apabila sudah didapatkan warna biru yang tepat, preparat dicuci dengan aquades dan dapat diwarnai dengan Eosin. Pewarnaan dengan Eosin dilakukan dengan merendam praparat pada pewarna eosin yang sudah disaring selama 2 menit, kemudian dicuci dengan aquades dan didehidrasi dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan absolut 1 masing-masing sekitar 3-5 detik, dilanjutkan dengan alkohol absolut 2 dan absolut 3 masing-masing 1 menit. Setelah itu preparat diclearing dengan xylol 1, xylol 2 dan xylol 3 masing-masing selama 1 menit. Preparat yang sudah diinfiltrasi dengan xylol siap ditutup dengan gelas penutup (cover glass) dan siap untuk diamati.

2. Analisis Kandungan Cu-Zn SOD pada Hati dan Ginjal Secara imunohistokimia metode Kiernan (1990) dan Wresdiati (2006).

Keberadaan enzim Cu-Zn SOD pada jaringan hati dan ginjal dilakukan menggunakan metode *enzyme-labelled* antibodi dengan tehnik tidak langsung (*indirect*). Pada tehnik ini, antibodi pertama adalah monoklonal antibodi anti SOD pada organ hati dan ginjal secara berturut-turut. Antibodi kedua dilabel oleh adanya konjugasi dengan enzim peroksidase. Tempat menempelnya antibodi kedua pada jaringan dapat dideteksi secara histologis dengan menggunakan reaksi DAB-hidrogen peroksida yang menghasilkan warna coklat. Urutan proses tehnik imunohistokimia adalah sebagai berikut. Preparat yang sudah dideparafinisasi dan rehidrasi dihilangkan peroksidase endogennya dengan substrat metanol dan hidrogen peroksida. Setelah itu dicuci dengan air destilasi dan *Phosphat Buffer Saline* (PBS). Preparat yang sudah dicuci kemudian diinkubasi dengan normal serum dengan tujuan untuk memblok Ag non spesifik yang dapat

mengacaukan reaksi. Setelah itu kembali dilakukan pencucian dengan PBS. Jaringan kemudian diinkubasi dalam antibodi monoklonal anti SOD untuk jaringan ginjal. Setelah selesai diinkubasi, jaringan kembali dicuci dengan PBS dan kemudian diinkubasi dengan antibodi kedua DEPS. Setelah selesai diinkubasi, jaringan kemudian dicuci dengan PBS untuk menghilangkan eksese antibodi sekunder. Untuk visualisasi, ditambahkan DAB dalam tris buffer dan H₂O₂ sebagai substrat. Penambahan DAB dan H₂O₂ ini dilakukan dalam kondisi gelap untuk mencegah rusaknya bahan akibat cahaya. Jaringan kemudian dicuci dan diberi "counterstain" dengan hematoksilin.

3. Analisis Lesi Aterosklerosis Aorta Kelinci metode Kiernan (1990)

Organ aorta difiksasi dengan larutan Bouin selama 24 jam untuk mencegah terjadinya autolisis. Setelah dilakukan embedding dengan parafin, contoh disiapkan lebih lanjut untuk pengujian morfologi. Terlebih dahulu setiap bagian *aortic arch* diseksi secara potongan serial berurutan (ketebalan 5 µm) sehingga luas maksimum plak dapat ditentukan. Pewarnaan Verhoeff-von Gieso dimaksudkan untuk melihat perubahan kolagen dan elastin pada plak yang terbentuk. Ketebalan plak diukur dengan cara mengukur lebar bagian aorta yang terdapat plak kemudian dikurangi dengan bagian aorta yang tidak terdapat plak.

Analisis Data

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

Pertimbangan Etik

Pertimbangan etik dimintakan kepada Komisi Etik Badan Litbang Kesehatan.

IV. HASIL

Tabel 3. Hasil analisa poksimat umbi segar dan tepung umbi

Bahan		Air g/100 g	Abu g/100 g	Lemak g/100 g	Protein g/100 g	Karbohidrat g/100 g
Uwi segar 1	Wet basis	74,2	0,62	1,46	1,5	22,22
Uwi segar 2		71,4	0,59	0,64	2,22	25,15
Uwi segar 3		65,4	0,59	0,46	2,64	30,91
Rata-rata		70,33	0,60	0,85	2,12	26,09
Uwi segar 1	Dry basis	25,8	2,40	5,66	5,81	86,12
Uwi segar 2		28,6	2,06	2,24	7,76	87,94
Uwi segar 3		34,6	1,71	1,33	7,63	89,34
Rata-rata		29,67	2,02	2,88	7,15	87,96
Ulangan 1						
Tepung T1-1	Wet basis	8,67	1,98	0,7	5,33	83,32
Tepung T1-2		8,63	2,01	0,62	6,11	82,63
Tepung T1-3		8,36	1,83	0,65	5,52	83,64
Tepung T1-4		8,7	1,78	0,64	5,42	83,46
Tepung T2-1		8,48	2,77	1,07	7,84	79,84
Tepung T2-2		8,54	2,32	0,98	7,57	80,59
Tepung T2-3		9,05	2,37	1,05	7,23	80,30
Tepung T2-4		8,55	1,96	1,03	7,06	81,40
Ulangan 2	Wet basis					
Tepung T1-1		7,18	3,65	0,66	8,12	80,39
Tepung T1-2		7,18	3,65	0,66	8,12	80,39
Tepung T1-3		7,79	3,54	0,73	7,8	80,14
Tepung T1-4		9,41	3,3	0,68	7,52	79,09
Tepung T2-1		7,89	3,25	0,78	6,83	81,25
Tepung T2-2		9,53	3,15	1,01	7,58	78,73
Tepung T2-3		7,88	3,18	1,19	8,43	79,32
Tepung T2-4		8,3	3,21	0,77	8,02	79,70

Tabel 4. Hasil analisa jenis mineral umbi segar dan tepung umbi

Bahan	Mg (mg%)	Mn (mg%)	Fe (mg%)	Zn (mg%)	Cu (mg%)	Na (mg%)	Al (mg%)	Ca (mg%)	K (mg%)	P (mg%)	I (mg%)
Umbi segar 1	15,1	2,4	1,4	14,1	1,2	53,5	0,0	28,5	42,2	49,4	4,9
Umbi segar 2	13,6	1,8	1,6	11,3	1,8	48,7	0,0	23,2	45,7	50,6	5,3
Umbi segar 3	13,6	2,3	0,8	12,5	1,4	50,0	0,0	19,7	42,0	56,0	4,5
Rata-rata	14,1	2,2	1,3	12,6	1,5	50,7	0,0	23,8	43,3	52,0	4,9
Tepung T1-1	261,0	3,7	16,3	36,8	2,2	217,1	1,3	527,2	512,6	587,5	
Tepung T1-2	313,3	2,8	23,2	30,6	1,78	241,7	0,9	621,1	572,2	659,9	
Tepung T1-3	292,7	3,1	21,2	12,9	2,1	260,2	0,7	549,1	486,0	591,9	
Tepung T1-4	278,1	3,3	14,3	36,7	2,6	212,4	1,1	511,2	502,0	615,4	
Tepung T2-1	302,6	4,1	16,9	22,4	3,1	273,7	1,2	617,2	684,9	626,9	
Tepung T2-2	215,3	2,6	22,4	32,7	2,2	234,1	1,6	641,4	442,3	599,8	
Tepung T2-3	333,1	2,5	15,1	37,4	1,7	226,2	0,9	572,4	668,5	675,0	
Tepung T2-4	266,2	3,4	18,3	31,0	2,4	238,9	1,1	507,9	534,5	577,4	

Tabel 5. Hasil analisa serat pangan

	Kadar Serat Pangan (g/100)			
	Wet basis		Dry basis	
Ulangan 1				
Umbi Segar	2,43	80	umbi Segar	12,15
T1-1	14,33	5	T1-1	15,08
T1-2	16,00	5	T1-2	16,85
T1-3	15,02	5	T1-3	15,81
T1-4	13,96	5	T1-4	14,69
T2-1	19,80	5	T2-1	20,84
T2-2	19,57	5	T2-2	20,60
T2-3	16,89	5	T2-3	17,78
T2-4	22,21	5	T2-4	23,38
Ulangan 2				
umbi Segar	2,43	80	umbi Segar	12,15
T1-1	16,52	5	T1-1	17,39
T1-2	18,89	5	T1-2	19,89
T1-3	20,21	5	T1-3	21,27
T1-4	18,46	5	T1-4	19,43
T2-1	18,57	5	T2-1	19,55
T2-2	20,17	5	T2-2	21,24
T2-3	18,55	5	T2-3	19,53
T2-4	20,99	5	T2-4	22,10

Tabel 6. Hasil analisa total antosianin

Bahan	Kadar Antosianin mg/100 g
Ulangan 1	
Umbi Segar	5,33
Tepung T1-1	9,34
Tepung T1-2	15,14
Tepung T1-3	11,43
Tepung T1-4	13,74
Tepung T2-1	30,27
Tepung T2-2	3,06
Tepung T2-3	11,92
Tepung T2-4	1,93
Ulangan 2	
Umbi segar	8,50
Tepung T1-1	351,68
Tepung T1-2	243,47
Tepung T1-3	289,20
Tepung T1-4	328,49
Tepung T2-1	280,18
Tepung T2-2	254,42
Tepung T2-3	237,67
Tepung T2-4	275,67
Ulangan 3	
Umbi segar	19,94
Tepung T1-1	66,99
Tepung T1-2	93,61
Tepung T1-3	107,78
Tepung T1-4	115,94
Tepung T2-1	184,21
Tepung T2-2	223,50
Tepung T2-3	255,06
Tepung T2-4	249,27

Tabel 7. Hasil analisa total polifenol

Bahan	Total Polifenol (setara mg asam galat/100 g bahan)
Ulangan 1	
Tepung T1-1	73,38
Tepung T1-1	120,55
Tepung T1-2	138,98
Tepung T1-3	137,36
Tepung T1-4	99,72
Tepung T2-1	74,16
Tepung T2-2	114,02
Tepung T2-3	93,70
Ulangan 2	
Tepung T1-1	169,95
Tepung T1-2	180,92
Tepung T1-3	159,90
Tepung T1-4	173,84
Tepung T2-1	165,41
Tepung T2-2	156,52
Tepung T2-3	145,88
Tepung T2-4	139,86
Ulangan 3	
Tepung T1-1	76,34
Tepung T1-2	68,05
Tepung T1-3	94,07
Tepung T1-4	87,22
Tepung T2-1	144,53
Tepung T2-2	150,32
Tepung T2-3	159,90
Tepung T2-4	182,08

Tabel 8. Hasil analisa diosgenin

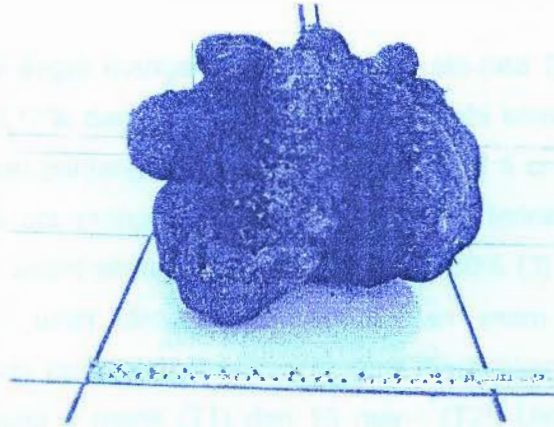
	Kadar diosgenin g/100 g
Ulangan 1	
Tepung T1-1	1,60
Tepung T1-2	2,17
Tepung T1-3	5,52
Tepung T1-4	4,27
Tepung T2-1	1,11
Tepung T2-2	0,79
Tepung T2-3	2,53
Tepung T2-4	2,50
Ulangan 2	
Tepung T1-1	2,46
Tepung T1-2	2,36
Tepung T1-3	3,31
Tepung T1-4	2,87
Tepung T2-1	4,61
Tepung T2-2	6,57
Tepung T2-3	4,58
Tepung T2-4	3,74
Ulangan 3	
Tepung T1-1	1,22
Tepung T1-2	1,65
Tepung T1-3	1,86
Tepung T1-4	1,96
Tepung T2-1	3,43
Tepung T2-2	2,53
Tepung T2-3	3,50
Tepung T2-4	2,71

Tabel 9. Hasil analisa kapasitas antioksidan

Bahan	Kapasitas antioksidan 100 g tepung setara dengan		
	mg Vitamin C	mg Vitamin E	mg Trolox
Ulangan 1			
Tepung T1-1	479.796	1.757.986	703.361
Tepung T1-2	791.648	2.927.431	1.171.139
Tepung T1-3	874.796	3.239.236	1.295.861
Tepung T1-4	884.056	3.273.958	1.309.750
Tepung T2-1	690.537	2.548.264	1.019.472
Tepung T2-2	539.981	1.983.681	793.639
Tepung T2-3	883.685	3.272.569	1.309.194
Tepung T2-4	729.426	2.694.097	1.077.806
Ulangan 2			
Tepung T1-1	842.389	3.117.708	1.247.250
Tepung T1-2	854.056	3.161.458	1.264.750
Tepung T1-3	837.944	3.101.042	1.240.583
Tepung T1-4	884.241	3.274.653	1.310.028
Tepung T2-1	719.611	2.657.292	1.063.083
Tepung T2-2	607.574	2.237.153	895.028
Tepung T2-3	694.796	2.564.236	1.025.861
Tepung T2-4	634.056	2.336.458	934.750
Ulangan 3			
Tepung T1-1	239.241	855.903	342.528
Tepung T1-2	175.352	616.319	246.694
Tepung T1-3	302.019	1.091.319	436.694
Tepung T1-4	348.685	1.266.319	506.694
Tepung T2-1	742.574	2.743.403	1.097.528
Tepung T2-2	846.833	3.134.375	1.253.917
Tepung T2-3	859.241	3.180.903	1.272.528
Tepung T2-4	864.611	3.201.042	1.280.583

V. PEMBAHASAN

Umbi dioskorea (*Dioscorea alata*) yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis yang berwarna ungu. Umbi ini memiliki ukuran dan berat yang bervariasi dengan diameter antara 30-50 cm dengan berat 2 sampai dengan 10 kilogram per buah. Umbi memiliki kulit berwarna ungu kehitaman yang keras, akan tetapi apabila dipotong, bagian tengahnya cukup



Gambar 5. Umbi *Dioscorea alata* jenis purpurea

renyah. Umbi yang telah dikupas berwarna ungu, dengan warna yang lebih pekat di dekat bagian kulitnya dibandingkan dengan bagian tengah umbi.



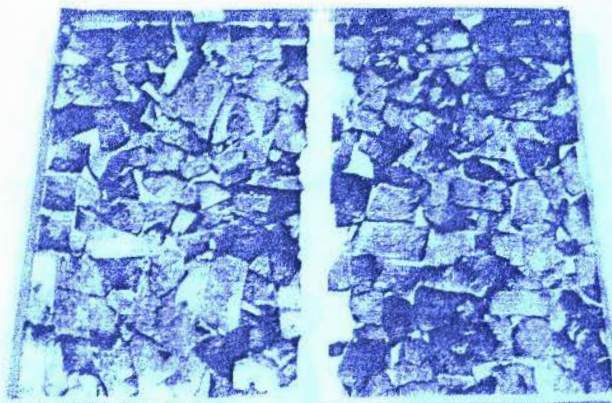
Gambar 6. Umbi *Dioscorea* yang telah dikupas

Senyawa bioaktif yang terdapat pada suatu bagian tanaman sangat bervariasi antara satu tanaman dengan yang lainnya. Oleh karena itu untuk mendapatkan bahan asal yang sama, setiap kelompok perlakuan blansir dan perendaman harus berasal dari

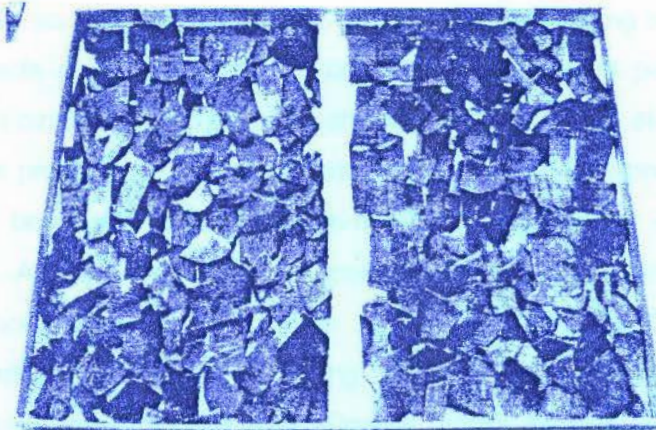
bagian umbi yang sama. Untuk mendapatkan bahan yang homogen, umbi segar ditimbang sesuai kebutuhan. Satu ruas umbi yang telah ditimbang dibagi sesuai dengan kelompok perlakuan yang ada. Misalnya, satu ruas umbi memiliki berat 400 g. Umbi ini dibagi 8 dengan masing-masing berat 50 g, kemudian dimasukkan ke dalam 8 wadah. Begitu pula untuk ruas umbi yang kedua dan berikutnya, hingga untuk masing-masing perlakuan diperoleh 2 Kg umbi kupas dan iris.

A. Kandungan Zat Gizi Makro Umbi segar dan Tepung umbi

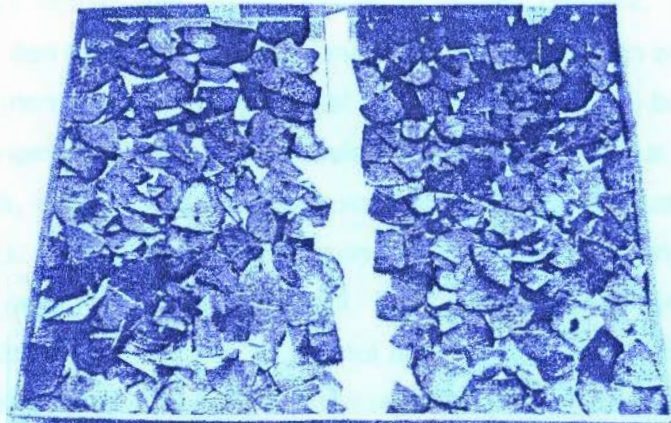
Umbi dioskorea segar mengandung kadar air rata-rata 70 %, kadar abu 0,6%, lemak 0,85% protein 2,12% dan karbohidrat 26,09%. Umbi kemudian dikupas kulitnya, dipotong persegi dengan panjang dan lebar masing-masing 5 cm. Umbi kemudian diiris dengan ketebalan 0,5 cm menggunakan slicer. Setelah teriris tipis, 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 (perbandingan 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).



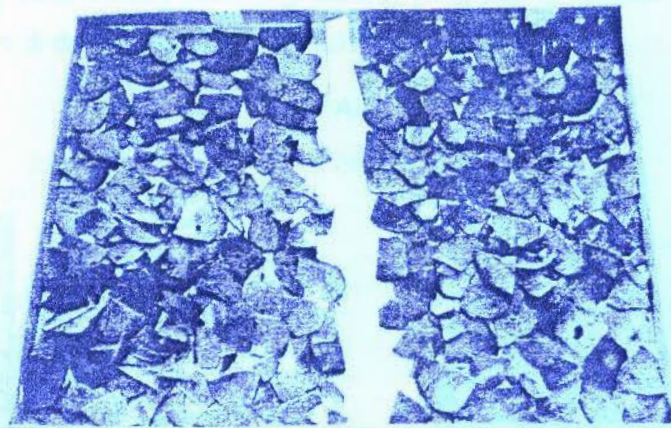
Gambar 7. Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0% dengan 2 lama waktu blansir. 5 menit (kiri) dan 10 menit (kanan).



Gambar 8. Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0,25% dengan 2 lama waktu blansir. 5 menit (kiri) dan 10 menit (kanan).



Gambar 9. Umbi hasil perendaman dengan asam sitrat 0,5% dengan 2 lama waktu blansir. 5 menit (kiri) dan 10 menit (kanan).



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

Dilihat secara visual terdapat perbedaan warna umbi pada setiap perlakuan. Pada level perendaman asam sitrat yang sama, umbi yang diblanching selama 5 menit memiliki

warna hitam yang lebih banyak dibandingkan dengan yang diblanching selama 10 menit. Proses blansir uwi pada dasarnya bertujuan untuk membuat enzim polifenol oksidase menjadi tidak aktif. Enzim ini merupakan katalisator dari proses oksidasi senyawa polifenol pada banyak produk sayuran dan buah-buahan. Akibat dari proses oksidasi ini adalah produk yang berwarna coklat kehitam-hitaman, yang sering disebut sebagai "enzimatic browning". Adanya warna yang kecoklat-coklatan berbanding lurus dengan kandungan total fenol yang ada di dalam bahan (Ho, 1992). Sehingga untuk mempertahankan kandungan total polifenol yang tinggi, adalah penting untuk membuat enzim polifenol oksidase menjadi tidak aktif. Proses blansir selama 10 menit ternyata dapat mengurangi "enzimatic browning". Hal ini nanti akan dikonfirmasi dengan pengujian total aktivitas polifenol oksidase. Kandungan polifenol sangat berhubungan dengan kualitas sensory dan nutrisi dari suatu bahan makanan (Maheix, 1990). Karena, "enzimatic browning" dari komponen polifenol menghasilkan warna dan aroma yang tidak diinginkan dan dapat menurunkan komponen zat gizi yang ada di dalam bahan.

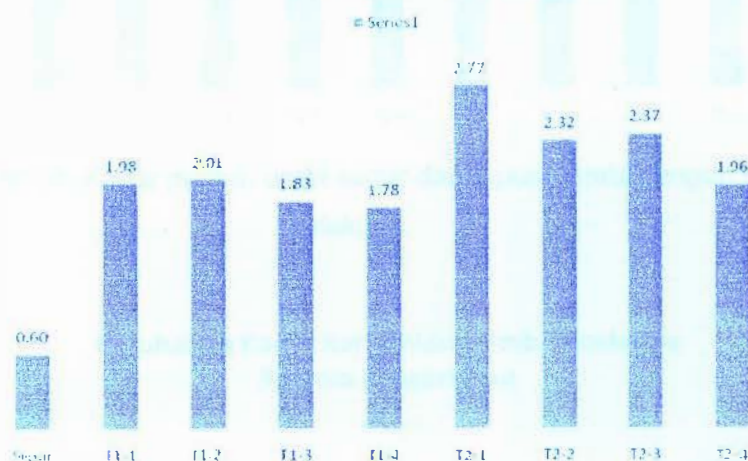
Cara pengeringan dan perlakuan sebelum pengeringan sangat mempengaruhi kandungan air, warna, dan sifat fisik tepung umbi dioscorea. Perlakuan blansir dapat menurunkan aktivitas peroksidase sedangkan pengeringan menurunkan aktivitas polifenol oksidase yang akan mengoksidasi komponen bioaktif. Indeks browning berhubungan nyata dengan kandungan total fenol dari tepung dan aktivitas peroksidase dari umbi segar, dimana dengan tingginya aktivitas enzim peroksidase, indeks browning akan semakin tinggi (Akisoe 2003). Efek perlakuan perendaman dengan asam askorbat, asam sitrat, asam asetat dan sodium metabisulfit dengan konsentrasi juga mempengaruhi nilai indeks browning. Nilai indeks browning tepung yang paling rendah dihasilkan pada tepung yang direndam di dalam asam sitrat 0.25% (Khrisnan 2010)



Gambar 11. Kadar air umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

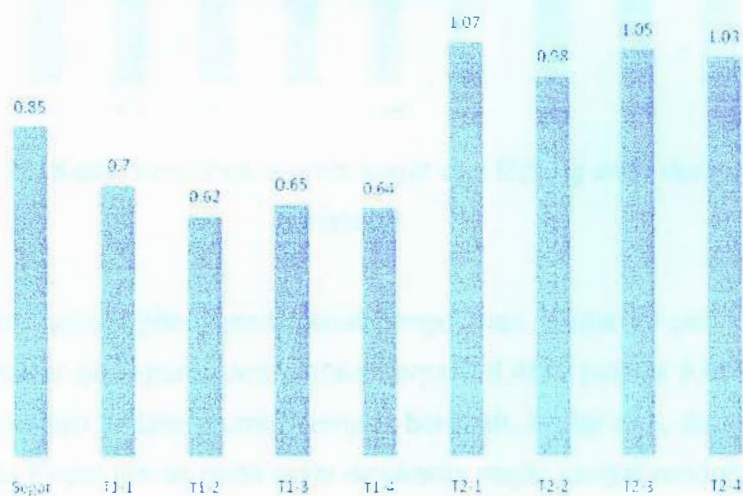
Dengan adanya proses perendaman, blansir dan pengeringan, terdapat perubahan komposisi zat gizi makro pada tepung guwi. Adanya proses pengeringan menyebabkan kadar air menurun. Dengan menurunnya kadar air, maka komposisi komponen lain di dalam umbi ini seperti lemak, protein dan karbohidrat meningkat. Perubahan komposisi kadar air, abu, lemak, protein, dan karbohidrat pada umbi segar dan tepung umbi dapat dilihat pada gambar 11 sampai dengan 15.

Perubahan Kadar Abu Umbi Dioskorea Selama Pengeringan



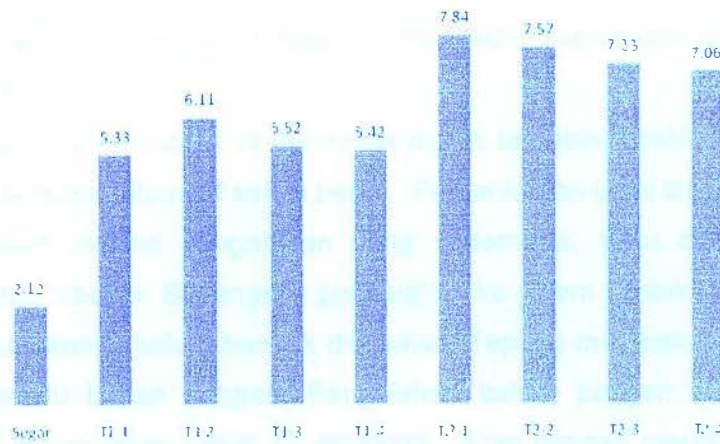
Gambar 12. Kadar abu umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

Perubahan Kadar Lemak Umbi Dioskorea Selama Pengeringan



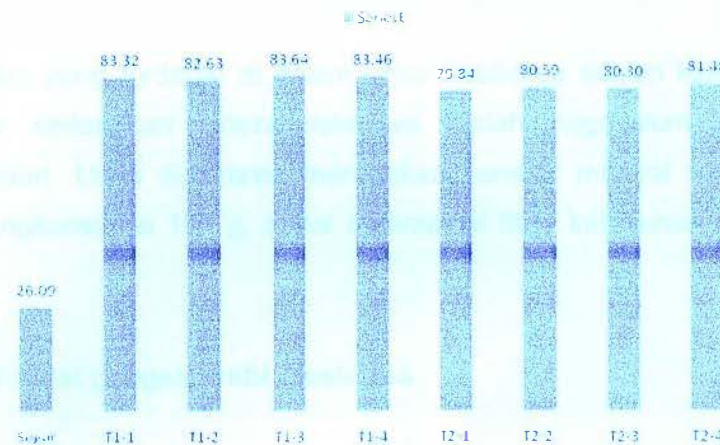
Gambar 13. Kadar lemak umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

**Perubahan Kadar Protein Umbi Dioskorea
Selama Pengeringan**



Gambar 14. Kadar protein umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

**Perubahan Kadar Karbohidrat Umbi Dioskorea
Selama Pengeringan**



Gambar 15. Kadar karbohidrat umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

Kadar air mengalami penurunan akibat pengolahan. Kadar air umbi segar adalah 74%, sedangkan kadar air tepung umbi adalah antara 8,48% hingga 9,05%. Komposisi komponen zat gizi makro di dalam umbi menjadi berubah. Kadar abu, dari 0,6% menjadi 1,78 sampai 2,77%. Kadar lemak pada umbi dioskorea segar sangat rendah, yaitu sekitar 0,85% dari seluruh komponennya. Dengan pengurangan kadar air, komposisi lemak di dalam bahan hanya meningkat sedikit menjadi 1%. Kadar protein umbi dioskorea segar

adalah sekitar 2%. Dengan menurunnya kadar air, maka komposisinya di dalam bahan menjadi 5,42% sampai 7,84%. Komposisi yang meningkat paling tinggi adalah karbohidrat. Pada saat kadar air 74%, komposisi karbohidrat umbi adalah sekitar 26%. Sedangkan ketika kadar air menjadi di bawah 10%, kadar karbohidrat menjadi antara 79,84% sampai 83,46%.

Pemanfaatan umbi dioskorea di Indonesia masih terbatas. Umbi ini dikonsumsi sebagai sumber karbohidrat alternatif selain beras. Pemanfaatan umbi dioskorea sebagai bahan pangan adalah melalui pengolahan yang sederhana, yaitu dengan direbus, dikukus, digoreng atau dibakar. Sedangkan pengolahan ke dalam bentuk lain yang dapat memperluas penggunaannya belum banyak dilakukan. Tepung merupakan suatu bentuk bubuk halus dari suatu bahan pangan. Pengolahan bahan pangan menjadi tepung dimaksudkan untuk menurunkan kadar air sehingga bahan pangan menjadi lebih tahan lama, mudah didistribusikan, dan dapat dipergunakan sebagai bahan baku berbagai jenis produk pangan lainnya. Dengan proses pembuatan yang tepat, komponen bahan asal dapat dipertahankan di dalam tepung.

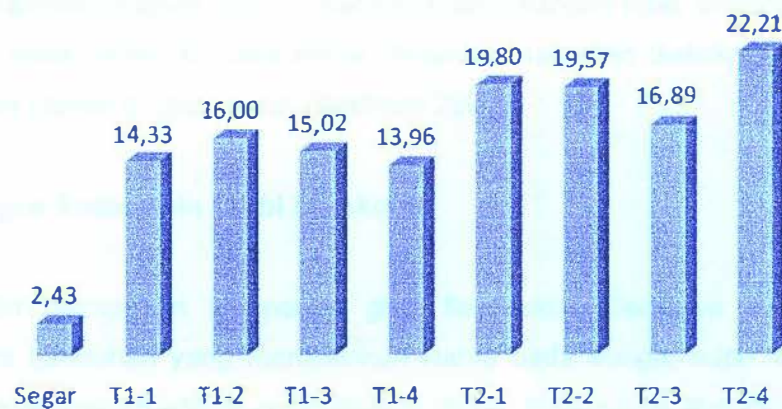
B. Kandungan jenis mineral pada umbi dioskorea.

Mineral makro yang terdapat di dalam umbi dioskorea adalah kalsium, natrium, kalium dan pospor, sedangkan mineral mikronya adalah magnesium, seng, Iodium, tembaga dan mangan. Umbi dioskorea merupakan sumber mineral seng yang baik karena dengan mengkonsumsi 100 g, dapat mencukupi 80% kebutuhan orang dewasa dalam sehari.

C. Kandungan serat pangan umbi dioskorea

Kandungan serat pangan tepung umbi dioskorea adalah sekitar 2,43%. Pada tepung umbi kadar serat pangan bervariasi antara 14 – 22% antara perlakuan.

Kadar Serat Pangan (g/100)



Gambar 16. Kadar serat pangan pada umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

Serat pangan umbi dioskorea umumnya berupa musilase yang merupakan substansi kental dan berlendir yang diproduksi oleh tanaman. Musilase merupakan kompleks karbohidrat-protein dan dapat berikatan dengan substansi lain seperti tanin dan alkaloid. Musilase juga merupakan serat larut air, terdiri dari monomer hexosa dan pentosa. Struktur fisik dari serat pangan ini mirip dengan pektin. Musilase adalah hasil sel-sel sekresi tanaman untuk mencegah kehilangan air melalui transpirasi (Wildman 2001). Musilase disekresikan oleh tumbuhan untuk mempertahankan kehilangan air, membantu perkecambahan, menyimpan makanan, dan untuk memfasilitasi pertumbuhan. Musilase pada tanaman dioskorea mengandung glikoprotein, serat pangan, diosgenin dan protein (Jiang 1999).

Serat Pangan memiliki kemampuan water holding capacity (WHC) yaitu kemampuan untuk mengikat air. Kemampuan ini mirip dengan spons, menyerap air dan semua cairan pencernaan saat ia berada di saluran pencernaan. Jenis-jenis serat larut air seperti pektin, gom dan beberapa hemiselulosa memiliki WHC yang lebih besar dibandingkan jenis yang tidak larut air seperti selulosa dan lignin. Daya WHC ini memiliki efek gastrointestinal yaitu: menunda pengosongan makanan dari lambung, mengurangi bercampurnya makanan di saluran pencernaan dengan enzim-enzim yang ada di dalamnya, mengurangi fungsi-fungsi enzim, menurunkan laju difusi nutrisi sehingga mengurangi penyerapan nutrisi dan peningkatan gula darah, dan menurunkan waktu transit makanan di usus halus (Anderson 1999).

Serat pangan, baik yang larut maupun yang tidak larut air dapat mengurangi penyerapan lemak dengan mengikat asam lemak, kolesterol dan asam empedu di dalam

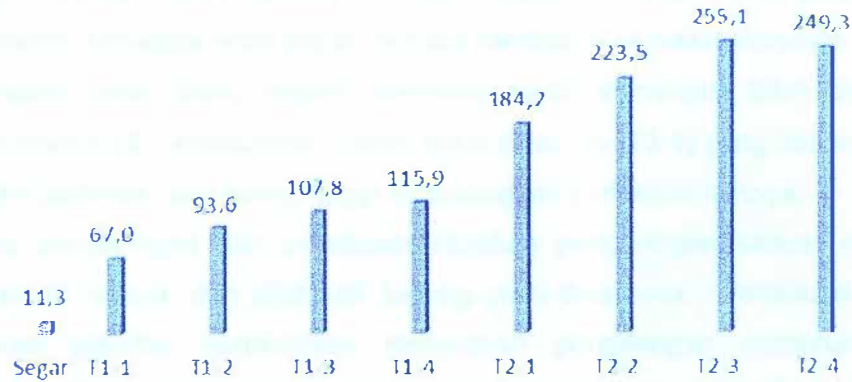
saluran pencernaan. Asam lemak dan kolesterol yang terikat pada serat pangan tidak dapat membentuk misel dan tidak dapat diabsorpsi. Bentuk misel diperlukan sebagai produk akhir penyerapan lemak untuk bisa ditransport melalui lapisan air ke dalam enterosit. Oleh karenanya lipida yang terikat pada serat pangan tidak diabsorpsi di dalam usus halus, dan terus melaju ke usus besar, dimana lemak akan diekskresikan ke feses atau dipecah oleh bakteri di usus besar (Wildman 2000).

D. Kandungan Antosianin Umbi Dioskorea

Antosianin merupakan komponen grup flavonoid. Senyawa ini terdistribusi sebagai polifenol tumbuhan yang memberikan warna pada bunga, buah, batang daun dan akar. Warna pigmen ini adalah pada kisaran merah hingga biru, tergantung pada pH lingkungan. Antosianin merupakan glikosida yang larut air yang terdiri dari derivatif polihidroksil dan polimetoksil dari garam 2-phenylbenzopyrylium. Jenis-jenis antosianin dibedakan berdasarkan jumlah grup hidroksil yang ada di dalam molekul, derajat metilasi dari gugus hidroksil, sumber, dan lokasi terikatnya gugus gula, dan susunan asam alifatik atau aromatik (Galvano 2005). Antosianin memiliki dasar rantai karbon dengan posisi grup hidrogen, hidroksil atau metoksil yang dapat ditemukan dalam enam posisi yang berbeda. Jenis, jumlah dan posisi ikatan gula pada rangka karbon juga berbeda-beda, struktur yang paling umum adalah, gugus gula terikat pada karbon-3, karbon-5 dan kadang-kadang pada karbon-7 dalam bentuk glukosa, arabinosa, rhamnosa atau galaktosa (Gao 1994).

Dua jenis antosianin, yaitu sianidin dan peonidin 3-gentiobioside yang terasilasi dengan asam sinapik telah berhasil diisolasi dari umbi *Dioscorea alata* L (Shoyama 1990). Selain itu alantanin C yang stabil pada larutan netral juga telah berhasil diisolasi dari umbi ini adalah jenis antosianin dalam bentuk monoasilasi. Kestabilan ini merupakan ikatan intramolekular asam sinapik inti antosiandin dengan membentuk gugus kiral (Yoshida 2001).

Kadar Antosianin (mg/100 g bahan)

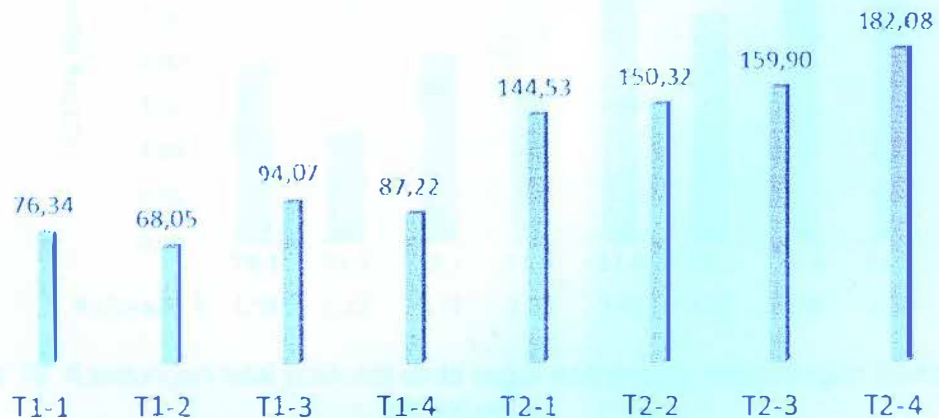


Gambar 17. Kadar antosianin umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

Kadar antosianin umbi segar adalah sekitar 11.3 mg/100 g bahan. Pada tepung umbi, jumlahnya lebih besar dan bervariasi antara 67 – 255 mg/100 g bahan. Perlakuan blansir 10 menit (T2) dapat meretensi antosianin lebih besar dibandingkan dengan perlakuan blansir 5 menit (T1). Pada kelompok perlakuan blansir 5 menit, perlakuan perendaman dengan asam sitrat 0,5% (T2-3) memiliki nilai retensi yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa asam (T2-1), 0,25% asam sitrat (T2-2), dan 1% asam sitrat (T2-4).

E. Kandungan Total Polifenol

Total Polifenol (mg ekuivalen asam galat/100 g tepung)



Gambar 18. Kandungan total polifenol umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

Profil kandungan total polifenol tepung umbi pada kelompok perlakuan hampir sama dengan total antosianin. Kelompok perlakuan blansir selama 10 menit (T2) memiliki retensi total polifenol yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan blansir 5 menit (T1). Proses blansir selama 10 menit dapat membuat enzim polifenol oksidase menjadi inaktif, sehingga tidak dapat menjadi katalisator oksidasi senyawa polifenol yang ada di dalam umbi. Maka retensi senyawa polifenol menjadi lebih tinggi. Diantara perlakuan blansir 10, perendaman dalam asam sitrat 1% (T2-4) yang dapat menghasilkan retensi total polifenol yang paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya.

Cara pengeringan dan perlakuan sebelum pengeringan sangat mempengaruhi kandungan air, warna, dan sifat fisik tepung umbi dioscorea. Perlakuan blansir dapat menurunkan aktivitas peroksidase sedangkan pengeringan menurunkan aktivitas polifenol oksidase yang akan mengoksidasi komponen bioaktif. Indeks browning berhubungan nyata dengan kandungan total fenol dari tepung dan aktivitas peroksidase dari umbi segar, dimana dengan tingginya aktivitas enzim peroksidase, indeks browning akan semakin tinggi (Akisoe 2003). Efek perlakuan perendaman dengan asam askorbat, asam sitrat, asam asetat dan sodium metabisulfit dengan konsentrasi juga mempengaruhi nilai indeks browning. (Khrisnan 2010).

F. Kandungan Diosgenin



Gambar 19. Kandungan total polifenol umbi segar dan tepung umbi dengan berbagai perlakuan

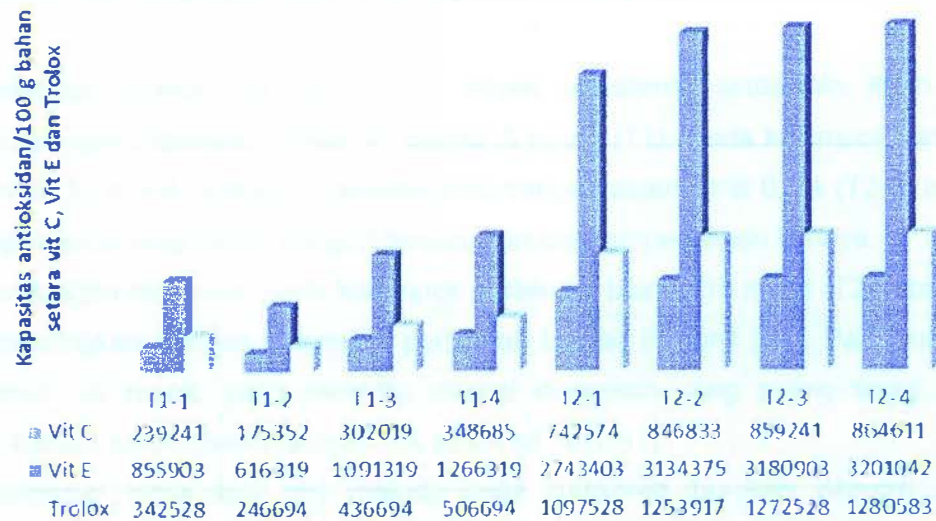
Diosgenin adalah bagian aglikon dari saponin umbi diosgenin. Diosgenin merupakan senyawa bioaktif kedua yang menjadi fokus penelitian ini. Profil retensi diosgenin pada beberapa kelompok perlakuan tidak serupa dengan profil retensi antosianin dan total polifenol yang sudah dijelaskan di atas, walaupun terlihat bahwa kandungan diosgenin pada kelompok perlakuan blansir 10 menit (T2) lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan blansir 5 menit (T1). Pada kelompok blansir 10 menit, yang memiliki retensi diosgenin yang paling tinggi adalah perlakuan perendaman dengan 0% asam sitrat (T2-1).

Diosgenin dilaporkan memiliki keuntungan kesehatan. Penelitian klinis menunjukkan bahwa saponin steroid dapat meningkatkan aliran darah, menguatkan otot jantung, memperbaiki sirkulasi perifer, menurunkan agregasi platelet, menurunkan kadar trigliserida dan kolesterol darah (Sun 2002). Diosgenin yang merupakan stereoidal saponin dari umbi dioscorea telah digunakan cukup lama sebagai bahan baku untuk industri obat-obatan steroid, dan dilaporkan memiliki efek hipokolesterolemia dengan menekan absorpsi kolesterol dan meningkatkan sekresinya. Studi yang dilakukan oleh Temel (2009) menemukan bahwa diosgenin meningkatkan ekskresi kolesterol pada feses dengan cara menghambat absorpsi kolesterol oleh usus halus dan meningkatkan sekresi kolesterol dari empedu.

G. Kapasitas Antioksidan

Kemampuan sifat antioksidan dari *Dioscorea alata* ternyata sangat dipengaruhi oleh suhu. Sifat antioksidan ini ternyata berhubungan dengan total kandungan polifenol. Umbi dioscorea mentah memiliki total kandungan polifenol yang lebih tinggi, sehingga, pada keadaan mentah, umbi ini memiliki kemampuan membersihkan DPPH radikal yang lebih baik, dan kemampuan mengkelat logam yang lebih baik dibandingkan umbi yang telah diperlakukan panas. Semakin tinggi suhu pengolahan yang diberikan, maka semakin rendah total polifenol dan yang berhasil dideteksi. Oleh karenanya, kemampuan membersihkan DPPH radikal dan kemampuan pengkelatan logamnya juga menurun. Sehingga dalam memproses umbi dioscorea, perlu diperhatikan suhu pengolahan yang diberikan (Chen 2007).

Kapasitas antioksidan tepung umbi



Gambar 20. Kapasitas antioksidan ekstrak metanol tepung umbi pada beberapa perlakuan

pH juga memberikan efek terhadap kapasitas antioksidan ekstrak umbi dioskorea. Kandungan senyawa fenolik *Dioscorea alata* varitas *purpurea* adalah antosianin (Liu 1999). Pigmen antosianin pada umumnya bersifat tidak stabil. Namun kestabilannya akan meningkat pada lingkungan yang asam (Von Elbe, 1996). Penelitian Chen (2008) menunjukkan bahwa kemampuan membersihkan radikal DPPH oleh ekstrak umbi ini lebih baik pada perlakuan dengan pH asam (4 sampai dengan 5), yaitu setara dengan kemampuan BHA dan vitamin E. Akan tetapi dengan meningkatnya pH kemampuan membersihkan ini menurun.

Kapasitas antioksidan yang paling tinggi terdapat pada tepung umbi dioskorea yang diolah dengan perendaman asam sitrat 1% dan dibilansir dengan waktu 10 menit (T2-4). Kapasitas antioksidan dari 100 gram tepung T2-4 ini adalah setara dengan 864611 mg vitamin C, 3201042 mg vitamin E dan 1280583 trolox. Profil kapasitas antioksidan ini serupa dengan profil antosianin dan total polifenol. Hal ini membuktikan bahwa senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antioksidan pada tepung umbi dioskorea adalah golongan polifenol.

VI. KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah:

1. Perlakuan blansir 10 menit (T2) dapat meretensi antosianin lebih besar dibandingkan dengan perlakuan blansir 5 menit (T1). Pada kelompok perlakuan blansir 10 menit, perlakuan perendaman dengan asam sitrat 0,5% (T2-3) memiliki nilai retensi yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.
2. Kandungan diosgenin pada kelompok perlakuan blansir 10 menit (T2) lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan blansir 5 menit (T1). Pada kelompok blansir 10 menit, yang memiliki retensi diosgenin yang paling tinggi adalah perlakuan perendaman dengan 0% asam sitrat (T2-1).
3. Komposisi kimia (zat gizi makro) umbi dioskorea berubah dengan adanya pengolahan menjadi tepung. Komposisi komponen lemak, protein, dan karbohidrat meningkat dengan penurunan kadar air.
4. Mineral makro yang terdapat di dalam umbi dioskorea adalah kalsium, natrium, kalium dan pospor, sedangkan mineral mikronya adalah magnesium, seng, lodium, tembaga dan mangan.
5. Kapasitas antioksidan yang paling tinggi terdapat pada tepung umbi dioskorea yang diolah dengan perendaman asam sitrat 1% dan diblansir dengan waktu 10 menit (T2-4). Kapasitas antioksidan dari 100 gram tepung T2-4 ini adalah setara dengan 864611 mg vitamin C, 3201042 mg vitamin E dan 1280583 trolox. Profil kapasitas antioksidan ini serupa dengan profil antosianin dan total polifenol.
6. Dengan data kimia dan in vitro, maka dilakukan uji selanjutnya pada 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.
- [Balitbangkes] Badan Litbang Kesehatan Departemen Kesehatan. 2008. Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar.
- 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.

Lohachoopol, V., Srzednicki, 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 activities. *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 Determination in health studies. A Practical Manual.* World Health Organization. Geneva.

Muchtadi D. 2007. *Atherosclerosis. Bahan kuliah Pangan dan Sistem Vaskuler.* Institut Pertanian Bogor.

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.

Prohati. 2007. Umbi-umbian. <http://www.proseanet.org/prohati2/browser.php?Docsid=481.html> [5 Mei 2010].

Qin Y, Xia M, Ma J, Hao YT, Liu J, Mou HY, Cao L, Ling HW. 2009. Anthocyanin supplementation improves serum LDL and HDL cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr* 90:485-92.

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.

Yeh YH, Lee YT, Hwang DF. 2007. Yam (*Dioscorea alata*) inhibits hyper-triglyceridemia and liver enlargement in rats with hypercholesterol diet. *J Chin Med* 18(1,2): 65-74.

LEMBAR PENGESAHAN

Ketua Pelaksana



Nelis Imanningsih, MSc
NIP. 19710812 199603 2 001

Mengetahui,

Ketua PPI



Dr. Sandjaja, MPH
NIP. 19520814 197603 1 001

Kepala Puslitbang Gizi dan Makanan



Dr. Siswanto, MHP, DTM
NIP. 19600527 198803 1 001