



**EFEK MODIFIKASI AUTOCLAVING-COOLING
PATI SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz) TERHADAP
INDEKS HOMA-IR DAN HOMA-B
TIKUS MODEL DIABETES**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Maria Ulfa
NIM 142010101093**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Bapak Anityo dan Ibu Umi Hanik tercinta, adik-adik terkasih Indi Aina Salsabila, Tria Nur Oktaviani, Artalita Nazwa Ramadhani dan Naura Syareefa Azzahra;
2. Kakek tersayang, Kakung Suyoto yang selalu memberikan doa dan nasehat serta keluarga besar tercinta;
3. Guru-guru saya yang telah mendidik saya mulai dari Taman Kanak-Kanak hingga Perguruan Tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

*Follow your dreams, work hard, practice and persevere.
Make sure you eat a variety of foods, get plenty of exercise and
maintain a healthy lifestyle.*)*



^{*})Kutipan kalimat motivasi yang disampaikan oleh atlet *figure-skating* Amerika, Alexandra Pauline “Sasha” Cohen (2006).

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Maria Ulfa

NIM : 142010101093

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Modifikasi *Autoclaving-cooling* Pati Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Indeks HOMA-IR dan HOMA-B Tikus Model Diabetes” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi mana pun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Desember 2017
Yang menyatakan,

Maria Ulfa
NIM 142010101093

SKRIPSI

**EFEK MODIFIKASI AUTOCLAVING-COOLING
PATI SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz) TERHADAP
INDEKS HOMA-IR DAN HOMA-B
TIKUS MODEL DIABETES**

Oleh
Maria Ulfah
NIM 142010101093

Pembimbing :
Dosen Pembimbing Utama : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
Dosen Pembimbing Anggota : dr. Yohanes Sudarmanto, M.Med.Ed

RINGKASAN

Efek Modifikasi Autoclaving-cooling Pati Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Indeks HOMA-IR dan HOMA-B Tikus Model Diabetes;
Maria Ulfa; 142010101093; 2017; 72 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Resistensi insulin merupakan kondisi yang berhubungan dengan kegagalan organ target merespon aktivitas hormon insulin. Prevalensi resistensi insulin pada populasi kulit putih sebesar 3-16%, lebih rendah 2% dari jumlah yang dilaporkan di Jepang. Sekitar 10% penduduk kota besar di Indonesia mengalami resistensi insulin. Resistensi insulin dapat terjadi melalui beberapa mekanisme diantaranya induksi oleh asam lemak bebas dan sitokin proinflamasi. Asam lemak bebas yang terakumulasi di jaringan akan berkompetisi dengan substrat untuk berikatan dengan reseptor insulin yang menyebabkan hiperglikemia kronik. *Adipose tissue macrophage* dapat mensekresikan berbagai macam sitokin proinflamasi yang dapat memodulasi kerja insulin sehingga terjadi resistensi insulin dan nekrosis sel β pankreas. Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mengandung 9,69% pati yang tidak terdegradasi oleh enzim pencernaan di usus halus dan telah terbukti dapat meningkatkan sensitivitas insulin dan memperbaiki disfungsi sel β pankreas. RS pada pati singkong alami tergolong rendah namun proses modifikasi melalui *autoclaving-cooling* dapat meningkatkan resistensi pati terhadap hidrolisis enzim amilase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan efek pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks resistensi insulin dan fungsi sel β pankreas dengan metode *homeostasis model assessment-insulin resistance* (HOMA). Desain penelitian yang digunakan adalah *quasy experimental post-test only control group design*. Sampel penelitian menggunakan 16 ekor tikus wistar jantan yang dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok kontrol normal K(N), kontrol negatif K(-), perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2). Kelompok K(-), P1 dan P2 diinduksi diabetes dengan diet tinggi

lemak menggunakan kuning telur bebek sebanyak 1% berat tubuh atau 0,01 mg/gBB selama 28 hari dan injeksi streptozotocin dosis rendah (35 mg/kgBB) intraperitoneal. Tujuh hari setelah induksi diabetes, dilakukan pemeriksaan toleransi glukosa oral untuk mengonfirmasi kondisi resistensi insulin. Setelah kondisi resistensi insulin tercapai, tikus diberi diet pati singkong alami atau pati singkong termodifikasi secara *ad libitum* dengan masing-masing dosis K(N) 30 g diet pakan standar, K(-) 30 g diet pakan standar, P1 20 g diet pati singkong alami dikombinasi dengan 10 g diet pakan standar, dan P2 20 g diet pati singkong termodifikasi dikombinasi dengan 10 g diet pakan standar. Setelah 28 hari, dilakukan pengambilan sampel darah intrakardiak sebanyak 5 cc. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa dengan metode GOD-PAP dan pengukuran kadar insulin puasa dengan metode *sandwich* ELISA. Resistensi insulin dihitung menggunakan formula HOMA-IR dan fungsi sel β dihitung menggunakan formula HOMA-B yang merupakan turunan pemeriksaan kadar glukosa dan insulin puasa. Data dianalisis menggunakan uji *Kruskall Wallis* dan *One Way ANOVA*.

Hasil penelitian menunjukkan pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi dapat meningkatkan sensitivitas insulin secara signifikan ($p<0,05$) pada kelompok perlakuan dibanding kelompok K(-) yang diberi pakan standar. Kelompok P1 mengalami penurunan indeks HOMA-IR sebesar 61,22, sedangkan kelompok P2 mengalami penurunan indeks HOMA-IR sebesar 61,64. Penurunan indeks HOMA-IR berhubungan dengan komponen pati tahan cerna yang memicu respon glikemik plasma lambat dan hasil fermentasinya berupa *short chain fatty acids* yang memiliki berbagai peran fisiologis dalam metabolisme insulin dan glukosa di berbagai jaringan tubuh. Meskipun demikian, tidak terdapat perbedaan signifikan pada indeks resistensi insulin antar kelompok perlakuan ($p>0,05$). Pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi dapat meningkatkan indeks HOMA-B dibandingkan kelompok KN yang diberikan diet standar. Peningkatan indeks HOMA-B berhubungan dengan perbaikan disfungsi sel β pankreas yang diperantarai oleh kemampuan RS dalam meningkatkan sekresi hormon GLP-1. Meskipun demikian, indeks HOMA-B

tertinggi justru pada kelompok K(-) akibat mekanis kompensasi pankreas terhadap resistensi insulin di jaringan perifer.

Tidak terdapat perbedaan signifikan pemberian diet pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi dalam menurunkan indeks HOMA-IR maupun meningkatkan indeks HOMA-B pada tikus model diabetes. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka diperlukan penelitian lebih lanjut pengaruh pemberian diet pati singkong terhadap gambaran histopatologi jaringan pankreas dan analisis kadar RS pada pati singkong termodifikasi.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. karena atas rahmat dan ridha-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Modifikasi Autoclaving-cooling Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Indeks HOMA-IR dan HOMA-B Tikus Model Diabetes”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi tugas akhir yang merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si selaku Dosen Pembimbing I dan dr. Yohanes Sudarmanto, M.Med.Ed selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu, pikiran, serta perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini;
3. dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D selaku tim penguji I dan dr. Hairrudin, M.Kes selaku tim penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji skripsi ini;
4. dr. Jauhar Firdaus yang telah membantu dan memberikan bimbingan dalam pelaksanaan penelitian ini;
5. Bapak Anityo dan Ibu Umi Hanik yang saya cintai, sayangi, dan saya banggakan yang selalu mendoakan, melimpahkan kasih sayang, kepercayaan, harapan, mendengarkan keluh kesah, memberikan nasihat, menguatkan saya dalam setiap keadaan, dan selalu membimbing penulis kearah yang lebih baik;
6. Indi Aina Salsabila, Tria Nur Oktaviani, Artalita Nazwa Ramadhani, dan Naura Syareefa Azzahra yang selalu memberikan semangat;
7. Kakung Suyoto yang selalu mendoakan dan memberi nasehat untuk ikhlas;

8. Nunung Nurhasanah, Verantika Indera Susetiyo dan Briliant Givya Ariansari, rekan seperjuangan yang selalu memberi semangat, teguran, dari awal kuliah hingga saat ini. Semoga kebersamaan kita terus berlanjut dalam meniti perjalanan panjang untuk menjadi dokter yang amanah;
9. Ariani Widiastini dan Novia Adhitama, selaku rekan sekelompok penelitian yang saling mendukung dan memberi semangat sehingga penelitian ini selesai dengan lancar;
10. Mas Agus dan Mbak Nuris, analis yang selalu sabar membimbing dan menemani penulis selama proses penelitian berlangsung;
11. Ulfa Wulandari, sahabat tersayang yang senantiasa sabar mendengarkan keluh kesah dan memberi suntikan semangat;
12. keluarga Elixir yang sudah berjuang bersama selama ini;
13. seluruh civitas Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang membantu dalam urusan skripsi ini;
14. semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

Penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak. Untuk itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi tercapainya kesempurnaan dari skripsi ini. Jika terdapat kekurangan dalam pembuatan skripsi ini penulis mohon maaf.

Jember, Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	3
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Resistensi Insulin	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Patomekanisme Resistensi Insulin	5
2.1.3 Metode Pengukuran Resistensi Insulin	8
2.1.4 <i>Homeostasis Model Assessment</i>	8
2.2 Pati Resisten	9
2.2.1 Struktur Pati Resisten	9
2.2.2 Klasifikasi Pati Resisten	10
2.2.3 Modifikasi <i>Autoclaving-cooling</i>	11
2.2.4 Analisis Daya Cerna Pati	12
2.2.5 Efek Pati Resisten terhadap Resistensi Insulin	13
2.2.5 Efek Pati Resisten terhadap Fungsi Sel β Pankreas	15
2.3 Singkong	16
2.3.1 Deskripsi	16
2.3.2 Varietas Singkong	17
2.3.3 Pati Singkong	18
2.4 Tikus Model Diabetes	19
2.5 Kerangka Teori	21
2.6 Kerangka Konseptual	23
2.7 Hipotesis	24
BAB 3 METODE PENELITIAN	25
3.1 Rancangan Penelitian	25
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	26

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	26
3.4 Variabel Penelitian	26
3.4.1 Variabel Bebas	26
3.4.2 Variabel Terikat	27
3.5 Definisi Operasional	27
3.6 Instrumen Penelitian	28
3.6.1 Alat Penelitian	28
3.6.2 Bahan Penelitian	28
3.7 Prosedur Penelitian	29
3.7.1 Ekstraksi Pati Singkong	29
3.7.2 Modifikasi Pati Singkong	29
3.7.3 Analisis Daya Cerna Pati	29
3.7.4 Pembuatan Tikus Model Diabetes	30
3.7.5 Pemberian Diet Pati Singkong Alami dan Pati Singkong Termodifikasi	31
3.7.6 Pengambilan Sampel	31
3.7.7 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Puasa (GDP)	32
3.7.8 Pengukuran Kadar Insulin Puasa	32
3.8 Analisis Data	32
3.9 Kerangka Pemecahan Masalah	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Hasil Penelitian	36
4.2 Analisis Data	38
4.3 Pembahasan	39
4.3.1 Efek Modifikasi <i>Autoclaving-cooling</i> terhadap Daya Cerna Pati Singkong	39
4.3.2 Tes Toleransi Glukosa Oral pada Tikus Model Diabetes ...	40
4.3.3 Efek Pemberian Pati Singkong Alami dan Pati Singkong Termodifikasi terhadap Indeks HOMA-IR	41
4.3.4 Efek Pemberian Pati Singkong Alami dan Pati Singkong Termodifikasi terhadap Indeks HOMA-B	42
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimia pati singkong	18
2.2 Kandungan amilosa dan amilopektin pada singkong	18
4.1 Hasil analisis daya cerna	36
4.2 Rata-rata hasil pemeriksaan toleransi glukosa oral	37
4.3 Rata-rata <i>intake</i> makanan dan parameter darah <i>post perlakuan</i>	38

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus Glukosa-Asam Lemak	6
2.2 Struktur RS tipe III	11
2.3 SCFA dan Interaksi Interorgan	13
2.4 Densitas Sel β Pankreas	15
2.5 Kerangka Teori	21
2.6 Kerangka Konseptual	23
3.1 Rancangan Penelitian	25
3.2 Alur Ekstraksi Pati Singkong	34
3.3 Alur Modifikasi Pati Singkong	34
3.4 Alur Perlakuan Hewan Coba	35
4.1 Karakteristik Awal Sampel Penelitian	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Keterangan Persetujuan Etik Penelitian	54
3.2 Lembar Identifikasi Tumbuhan Singkong	56
3.3 Cara Perhitungan Besar Sampel Penelitian	57
3.4 Cara Perhitungan Dosis	59
3.5 Cara Perhitungan Daya Cerna Pati	60
3.6 Cara Perhitungan Kadar Insulin Plasma	62
3.7 Dokumentasi Penelitian	63
4.3 Analisis Statistik Rata-rata <i>Intake Makanan</i>	65
4.4 Analisis Statistik Indeks HOMA-IR	66
4.5 Analisis Statistik Indeks HOMA-B	68

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi insulin merupakan kondisi yang berhubungan dengan kegagalan organ target yang secara normal merespon aktivitas hormon insulin. Resistensi insulin ditandai dengan gangguan transduksi sinyal insulin terutama pada aksis *insulin receptor substrate/phosphatidyl-inositol 3-kinase/protein kinase B* yang bertanggung jawab pada seluruh aktivitas metabolismik insulin (Tanti *et al.*, 2013). Olatunbosun *et al.* (2017) menyatakan prevalensi resistensi insulin pada populasi kulit putih sebesar 3-16%, lebih rendah 2% dari jumlah yang dilaporkan di Jepang. Sekitar 10% penduduk kota besar di Indonesia mengalami resistensi insulin (Aggasarah, 2015). Resistensi insulin dapat terjadi melalui beberapa mekanisme diantaranya induksi oleh asam lemak bebas dan sitokin proinflamasi. Asam lemak bebas yang terakumulasi di jaringan akan berkompetisi dengan substrat untuk berikatan dengan reseptor insulin yang menyebabkan hiperglikemia kronik. *Adipose tissue macrophage* (ATM) dapat mensekresikan berbagai sitokin inflamatorik seperti interleukin-1 β (IL- β), interleukin-6 (IL-6), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), dan plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) yang memodulasi kerja insulin sehingga terjadi resistensi insulin bahkan diperkirakan ikut berperan menyebabkan disfungsi sel β pankreas (Sulistyoningrum, 2010).

Penelitian terbaru menunjukkan pendekatan gaya hidup melalui diet dan olahraga lebih efektif dalam meningkatkan sensitivitas jaringan terhadap insulin dibanding terapi farmakologis. Konsumsi pati resisten (RS) dapat memperbaiki keadaan resistensi insulin (Robertson *et al.*, 2005). Pati resisten didefinisikan sebagai sejumlah pati dan produk hasil degradasinya yang tidak dapat diserap di usus halus pada individu yang sehat (Merendino dan Jibrin, 2009). Pati resisten dapat mencapai kolon dan berperan sebagai substrat pada fermentasi mikroba yang hasil akhirnya berupa hidrogen, karbon dioksida, metana, dan *short chain fatty acids* (SCFA) (Englyst *et al.*, 1996; Nugent, 2005).

Penelitian pada tikus wistar yang diberi diet RS selama 14 hari menunjukkan penurunan ekspresi enzim *fatty acid synthase* yang berhubungan

dengan sintesis asam lemak (Mochizuki *et al.*, 2010). *Short chain fatty acids* yang dihasilkan dari fermentasi RS dapat menghambat lipolisis jaringan lemak sehingga asam lemak yang beredar di sirkulasi menurun (Crouse *et al.*, 1968; Robertson *et al.*, 2005). Penelitian lain pada tikus yang diinduksi streptozotocin menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi plasma GLP-1 dan PYY, hormon yang berperan dalam sekresi insulin dan pengaturan nafsu makan, setelah pemberian diet RS (Zhou, *et al.*, 2008). Tikus Goto-Kakizaki yang diberikan diet RS selama 10 minggu ditemukan mengalami peningkatan densitas sel β pankreas (Shen, 2010).

Singkong atau ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan salah satu sumber karbohidrat lokal Indonesia yang menduduki urutan ketiga terbesar setelah padi dan jagung. Kandungan pati dalam singkong sebesar 79,81% dengan kadar amilosa 28,57%, dan kadar amilopektin 51,24% (Kustyawati *et al.*, 2013). Secara alami, 9,69% dari komponen pati singkong bersifat resisten, lebih besar dibandingkan jumlah RS di dalam pati jagung (1,16%) dan pati kentang (6,30%). Tingkat resistensi bahan makanan terhadap hidrolisis enzim α -amilase dapat ditingkatkan melalui proses modifikasi salah satunya dengan teknik *autoclaving-cooling*. Metode ini akan menghasilkan RS yang memiliki sifat lebih stabil terhadap panas, sangat kompleks, dan tahan terhadap hidrolisis enzim α -amilase (Setiarto *et al.*, 2015).

Homeostasis model assessment (HOMA) adalah metode pengukuran sensitivitas insulin non-invasif dengan formula yang merupakan turunan dari pemeriksaan kadar glukosa dan insulin plasma. Metode ini paling sering digunakan dalam penghitungan derajat resistensi insulin dan fungsi sel β pankreas pada manusia dan hewan coba dengan sensitivitas mencapai 90% (Antunes *et al.*, 2016). Berdasarkan potensi pati singkong sebagai bahan baku RS dan pengaruhnya terhadap meningkatkan sensitivitas insulin dan fungsi sel β pankreas, perlu dilakukan pengujian efektivitas pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi dengan teknik modifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-IR dan HOMA-B pada tikus model diabetes.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbedaan efek pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-IR dan HOMA-B tikus model diabetes?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui perbedaan efek pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-IR dan HOMA-B tikus model diabetes.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui perbedaan efek pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-IR tikus model diabetes.
- b. Mengetahui perbedaan efek pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-B tikus model diabetes.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut.

1.4.1 Bagi Ilmu Pengetahuan

Memberikan informasi mengenai efektivitas pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* dalam meningkatkan sensitivitas insulin dan fungsi sel β pankreas.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Mengetahui manfaat dari pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* sebagai inovasi terapi resistensi insulin dan disfungsi sel β pankreas.

1.4.3 Bagi Institusi

Memberikan tambahan pengetahuan baru bagi teman sejawat dan civitas akademika mengenai potensi singkong sebagai produk pangan lokal berbasis kesehatan, serta dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Resistensi Insulin

2.1.1 Definisi

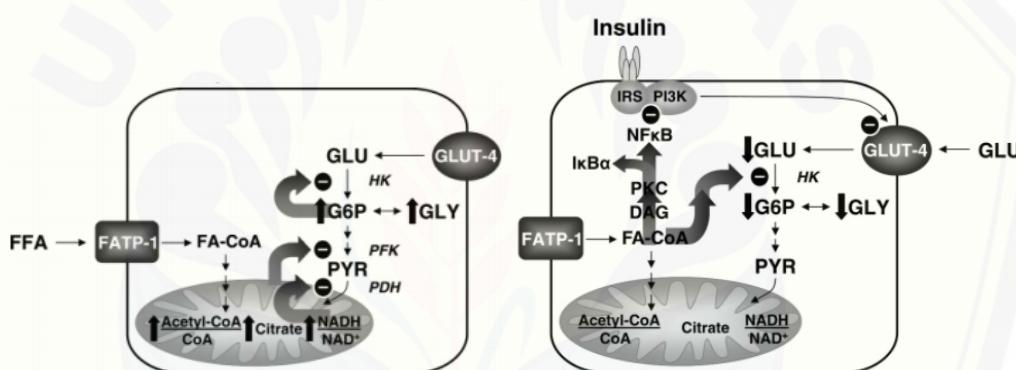
Resistensi insulin merupakan kondisi yang berhubungan dengan kegagalan organ target yang secara normal merespon aktivitas hormon insulin. Resistensi insulin terjadi terutama pada daerah *post reseptor* sel target terutama pada jaringan otot dan hepar. Kerusakan reseptor ini menyebabkan kompensasi peningkatan sekresi insulin oleh sel β pankreas, sehingga terjadi hiperinsulinemia pada keadaan puasa maupun posprandial (Krenzt, 2007). Seseorang dikatakan mengalami resistensi insulin ketika dibutuhkan insulin dalam jumlah lebih banyak dari normal untuk mempertahankan keadaan euglikemia (Merentek, 2006).

Menurut Saini (2010), resistensi insulin terjadi karena gangguan sinyal transduksi insulin dari reseptor sampai substrat akhir yang merespon aktivitas hormon insulin. Kerja insulin dimulai ketika hormon tersebut berikatan dengan reseptor glikoprotein spesifik pada permukaan sel target dan mengaktifasi tirosin kinase. Pada keadaan resistensi insulin terjadi penurunan aktivasi tirosin kinase yang menyebabkan penurunan fosforilasi *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) pada reseptor insulin. Fosforilasi IRS-1 diperlukan pada ekspresi gen, metabolisme lipid dan protein serta aktivitas *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI-3K) dan *mitogen activator protein kinase* (MAPK). Adanya penurunan aktivasi PI-3K menyebabkan gangguan aktivasi Akt (protein kinase B) sehingga menyebabkan gangguan pada transpor glukosa dan sintesis protein (Handayani *et al.*, 2009).

2.1.2 Patomekanisme Resistensi Insulin

Mekanisme terjadinya resistensi insulin dapat dijelaskan melalui beberapa jalur (Sulistyoningrum, 2010). Mekanisme resistensi insulin yang pertama adalah peningkatan produksi asam lemak bebas. Asam lemak yang terakumulasi di jaringan akan menginduksi resistensi insulin terutama pada organ hati dan otot. Hipotesis Randle menyatakan mekanisme induksi resistensi insulin oleh asam lemak ini terjadi akibat kompetisi substrat (siklus glukosa-asam lemak) untuk

berikatan dengan reseptor insulin. Pada sel yang menggunakan glukosa sebagai sumber energi, asam lemak dan beberapa metabolit lain termasuk asil koA, seramid dan diasil gliserol (DAG) bertindak sebagai molekul sinyaling yang mengaktifkan protein kinase seperti protein kinase C dan inhibitor $\kappa\beta$ kinase (IKK β) yang selanjutnya mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor-kappa* β (NF- $\kappa\beta$) (Dewi, 2007). *Nuclear factor-kappa* β dapat merusak sinyaling insulin dengan meningkatkan fosforilasi serin yang bersifat inhibisi dari IRS. Selain asam lemak bebas, aksis IKK β /NF- $\kappa\beta$ dapat diaktivasi oleh berbagai macam molekul eksogen dan endogen diantaranya sitokin inflamasi, *tool like receptors, advanced glycosylation end products*, dan *reactive oxygen species* (Soriano *et al.*, 2016).



Gambar 2.1 Siklus Glukosa-Asam Lemak. Asam lemak bebas masuk ke dalam sel melalui *fatty acid transporter protein-1* (FATP-1) dan teraktivasi menjadi *fatty acyl coenzyme-A* (FA-CoA), sedangkan glukosa masuk melalui *glucose transporter-4* (GLUT4) dan difosforilasi oleh enzim heksokinase. **Kiri:** Oksidasi FA-CoA akan meningkatkan rasio asil-CoA/CoA dan NADH/NAD $^+$, yang menghambat kompleks piruvat dehidrogenase (PDH). Peningkatan sitrat bersifat inhibisi terhadap aktivitas fosfofruktokinase (PFK). Perubahan tersebut akan memperlambat oksidasi glukosa dan piruvat serta mengingkatkan glucosa-6-fosfat (G6P), yang berperan dalam stimulasi penyimpanan glikogen (GLY), inhibisi aktivitas heksokinase (HK), dan penurunan ambilan glukosa. **Kanan:** Interaksi asam lemak dengan transporter glukosa. FA-CoA dapat mengaktifkan isoform PKC and NF- $\kappa\beta$, yang dapat menghambat transduksi sinyal insulin (Roden, 2004)

Mekanisme terjadinya resistensi insulin yang kedua adalah induksi resistensi insulin karena faktor inflamasi. Pada penderita resistensi insulin terbukti adanya metainflamasi yang ditunjukkan dengan peningkatan konsentrasi mediator

proinflamasi plasma. Sel adiposit yang mengalami hipertrofi akan mensekresi *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) yang menyebabkan infiltrasi monosit ke dalam sel dan induksi diferensiasi monosit menjadi M1 makrofag. Makrofag dapat mensekresikan sitokin proinflamasi seperti IL- β , IL-6, TNF- α , PAI-1, dan angiotensinogen. Pengikatan molekul sitokin ini pada reseptor spesifik akan mengaktifkan jalur IKK β /NF- $\kappa\beta$. Translokasi NF- $\kappa\beta$ ke dalam nukleus akan menginduksi transkripsi berbagai macam sitokin proinflamasi, enzim, molekul adhesi, dan reseptor imun yang dapat memicu resistensi insulin (Soriano *et al.*, 2016).

Resistensi insulin di jaringan perifer menyebabkan penggunaan glukosa yang dimediasi oleh insulin menjadi berkurang. Resistensi insulin akan menyebabkan kegagalan dari fosforilasi kompleks IRS, tidak teraktivasinya PI-3K yang lebih lanjut memicu penurunan translokasi GLUT4 sehingga glukosa tetap berada di ekstrasel (hiperglikemia). Tingginya kadar glukosa darah (*glucotoxicity*) yang diikuti pula oleh dislipidemia (*lipotoxicity*) bertanggung jawab terhadap kerusakan jaringan baik secara langsung melalui stres oksidatif maupun tidak langsung melalui proses glikosilasi yang meluas (Manaf, 2006). Resistensi insulin pada sel adiposa menyebabkan peningkatan lipolisis dan penurunan adipogenesis. Resistensi insulin pada sel hepar memicu glukoneogenesis sehingga produksi glukosa dalam keadaan basal (HGP atau *hepatic glucose production*) meningkat. Gangguan kinerja insulin pada otot terjadi intramioseluler akibat gangguan fosforilasi tirosin sehingga timbul gangguan ambilan glukosa ke dalam sel, penurunan sintesis glikogen dan penurunan oksidasi glukosa (De Fronzo, 2009).

Sel β pankreas pada awalnya akan melakukan kompensasi dengan meningkatkan produksi insulin untuk mempertahankan kadar gula darah dalam batas normal (euglikemia). Seiring dengan progresivitas penyakit, terjadi dekompensasi sel β pankreas dalam merespon keadaan hiperglikemia sehingga terjadi abnormalitas jalur transduksi sinyal insulin dan resistensi pada sel β . Resistensi insulin pada sel β pankreas mengaktifasi jalur *cystein-aspartic acid protease (caspase)* 3 dan *caspase* 8. Aktivasi jalur *caspase* akan meningkatkan

kadar *ceramide* di mitokondria dan menginduksi apoptosis sel β pankreas (Sulistyoningrum, 2010).

2.1.3 Metode Pengukuran Resistensi Insulin

Baku emas diagnosis resistensi insulin adalah dengan metode *hyperinsulinemic-euglycemic clamp* (HEC). Insulin dimasukkan ke dalam sirkulasi intravena sampai mencapai kadar yang diinginkan ($\pm 40 \text{ mU/m}^2/\text{menit}$) dan kadar glukosa dipertahankan pada kadar basal dengan klem infus 20% dekstrosa dengan volume yang bervariasi. Cara lain yang dapat digunakan adalah *minimal model frequently sampled intravenous glucose tolerance test* (FSIGTT). Pasien diberikan bolus glukosa intravena diikuti dengan bolus insulin. Kadar insulin dan glukosa diukur selama FSIGTT dan diestimasikan sebagai indeks sensitivitas insulin. Kedua metode ini akurat dalam menilai adanya resistensi insulin, tetapi kurang disukai karena bersifat invasif dan memakan waktu maupun biaya yang cukup besar (Sulistyoningrum, 2010).

Pendekatan yang lebih sederhana dengan berbagai formula yang merupakan turunan dari pemeriksaan kadar glukosa, insulin maupun parameter lainnya banyak dikembangkan untuk menilai sensitivitas insulin (Gutch *et al.*, 2015). Terdapat dua kelompok indeks resistensi insulin yaitu: 1) indeks yang dikalkulasi menggunakan kadar insulin, glukosa dan/atau trigliserida puasa, 2) indeks yang dikalkulasi menggunakan kadar insulin dan glukosa selama tes toleransi glukosa oral. Indeks yang termasuk ke dalam kelompok pertama yaitu *homeostasis model assessment* (HOMA), *quantitative insulin sensitivity check index* (QUICKI) dan Mc Auley, sedangkan kelompok kedua meliputi indeks Matsuda, Belfiore, Cederholm, Avignon dan Stumvoll.

2.1.4 Homeostasis Model Assessment

Homeostasis Model Assessment (HOMA) merupakan metode pengukuran *surrogate* yang paling banyak digunakan untuk menilai derajat resistensi insulin dan fungsi sel β pankreas pada penelitian klinis maupun epidemiologis (Hanley *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2004). Metode ini pertama kali dikembangkan oleh

Matthews *et al.* (1985) sebagai model struktural mekanisme umpan balik negatif antara hepar dan sel β pankreas. Hubungan level insulin dan glukosa plasma pada kondisi basal mencerminkan keseimbangan produksi glukosa hepatik dan sekresi insulin.

Homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) adalah model matematis yang merefleksikan derajat resistensi insulin. Pada keadaan basal, kadar glukosa plasma diatur oleh kadar glukosa hepatik yang dimediasi hormon insulin. Oleh sebab itu, kondisi resistensi insulin ditunjukkan dengan berkurangnya efek supresif hormon insulin pada produksi glukosa hepatik. Model ini memiliki koefisien korelasi $r=0,88$ ($p=0,0001$) dengan HEC (Matthews *et al.*, 1985) dan $r=0,77$ ($p<0,001$) dengan FSIGTT (Bonara *et al.*, 2000) dengan sensitivitas mencapai 90% (Antunes *et al.*, 2016).

Homeostasis model assessment-beta cell (HOMA-B) adalah model matematis yang merefleksikan fungsi sel β pankreas. Pada individu dengan diabetes, disfungsi sel β pankreas mencerminkan berkurangnya respon sel β terhadap stimuli sekresi insulin oleh peningkatan kadar glukosa plasma. Model ini memiliki korelasi yang cukup baik dengan metode standar seperti *hyperglycemic clamps* ($r = 0.62\text{--}0.69$) (Matthews *et al.*, 1985; Stumvoll *et al.*, 2000) dan *continuous infusion glucose model assessment* ($r = 0.87$) (Matthews *et al.*, 1985).

2.2 Pati Resisten

2.2.1 Struktur Pati Resisten

Pati adalah polisakarida yang dibentuk oleh sejumlah molekul glukosa dengan ikatan α 1-glikosidik. Terdapat dua fraksi penyusun pati yakni amilosa yang memiliki ikatan molekul α 1-4-D dan amilopektin yang memiliki ikatan α 1-4-D dan α 1-6-D. Proporsi amilopektin menentukan struktur kristal pati dimana pati tipe A ditemukan pada bahan makanan golongan serealia, tipe B pada umbi-umbian dan pati kaya amilosa sedangkan tipe C terdapat pada golongan kacang-kacangan (Nugent, 2005). Pati dapat dibedakan berdasarkan daya cernanya oleh enzim α -amilase menjadi pati yang dicerna dengan cepat, pati yang dicerna dengan lambat, dan pati resisten (Sajilata *et al.*, 2006).

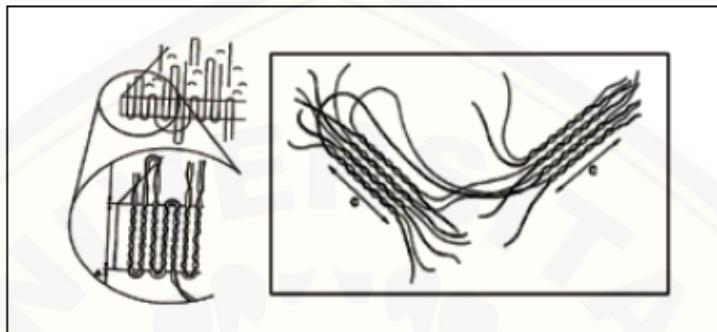
Pati resisten (RS) didefinisikan sebagai pati dan produk pati yang tahan terhadap hidrolisis enzim pencernaan di usus halus pada manusia normal (Asp, 1992). Pati resisten dapat mencapai kolon dan berperan sebagai substrat pada fermentasi mikroba yang hasil akhirnya berupa hidrogen, karbon dioksida, metana, dan SCFA (Englyst *et al.*, 1996; Nugent, 2005). Tingkat resistensi pati dipengaruhi oleh susunan polimer alami pati, dimana pati tipe B dan C dengan kadar amilosa tinggi lebih resisten terhadap hidrolisis enzim α -amilase, glukoamilase dan sukrase-isomaltase di usus halus (Brown, 2004).

2.2.2 Klasifikasi Pati Resisten

Pati resisten diklasifikasikan dalam empat kelompok berdasarkan pada asal dan proses pembuatannya, yaitu pati resisten tipe I, II, III, dan IV (Sajilata *et al.*, 2006; Zaragoza *et al.*, 2010). Pati resisten tipe I merupakan pati yang terdapat secara alamiah dan secara fisik terperangkap dalam sel-sel tanaman dan matriks dalam bahan pangan kaya pati, terutama dari biji-bijian dan sereal. Pati resisten tipe II merupakan pati dengan granula tipe B yang secara alami sangat resisten terhadap pencernaan oleh enzim α -amilase. Pati resisten tipe III merupakan produk derivat pati yang terbentuk melalui proses retrogradasi granula pati seperti kentang yang telah dimasak dan didinginkan, *cornflakes*, dan produk makanan yang mengalami proses pemanasan panjang dan berulang (Gambar 2.2). Pati resisten tipe IV adalah pati yang termodifikasi secara kimia seperti pati ester maupun pati ikatan silang (Brown, 2004).

Meskipun pati resisten (RS) dapat ditemukan secara alami pada bahan makanan kaya pati, terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi kadar (*net amount*) dan tingkat resistensi RS diantaranya jumlah dan jenis inisial pati, bagaimana bahan makanan diproses, disimpan maupun dicerna serta reaksi dengan bahan aditif ekstrinsik seperti fosfor (Nugent, 2005). Pati resisten tipe III merupakan jenis yang paling menarik perhatian karena mampu mempertahankan karakteristik organoleptik ketika ditambahkan pada bahan makanan (Lehmann *et al.*, 2002). Pati resisten tipe III relatif tahan panas dibandingkan tipe lainnya sehingga stabil selama proses pengolahan pangan (Zaragoza *et al.*, 2010). Pati

resisten tipe III merupakan jenis RS yang paling banyak digunakan sebagai bahan baku fungsional berbasis RS. Kandungan RS tipe III dalam bahan pangan alami umumnya rendah, oleh karena itu perlu ditingkatkan kadarnya melalui teknik modifikasi (Setiarto *et al.*, 2015).



Gambar 2.2 Struktur RS tipe III (Sajilata *et al.*, 2006)

2.2.3 Modifikasi *Autoclaving-cooling*

Teknik modifikasi pati dengan siklus *autoclaving-cooling* telah dilaporkan oleh banyak peneliti seperti Zabar *et al.* (2008), Sugiyono *et al.* (2009), Vatanasuchart *et al.* (2012), dan Asbar (2014). Prinsip dari teknik ini adalah pati disuspensikan dahulu dalam air (dengan rasio pati:air = 1:2-1:5). Suspensi tersebut kemudian dipanaskan dengan menggunakan autoklaf yang mengakibatkan pati tergelatinisasi secara sempurna dan keluarnya fraksi amilosa dari granula pati. Selanjutnya pasta pati didinginkan yang dapat menyebabkan fraksi amilosa mengalami retrogradasi membentuk RS tipe III yang bersifat lebih stabil terhadap panas, sangat kompleks, dan tahan terhadap hidrolisis enzim α -amilase (Setiarto *et al.*, 2015).

Faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan RS tipe III adalah suhu autoklaf dan konsentrasi pati. Suhu yang digunakan pada umumnya di atas titik leleh kristal amilopektin dan di bawah titik leleh enzim untuk menghasilkan RS tipe III (Haynes *et al.*, 2000). Pembentukan RS paling optimum pada suhu autoklaf sebesar 121°C dan konsentrasi suspensi pati dalam air sebesar 20% (b/v). Konsentrasi suspensi pati yang lebih kecil atau lebih besar dari 20% (b/v)

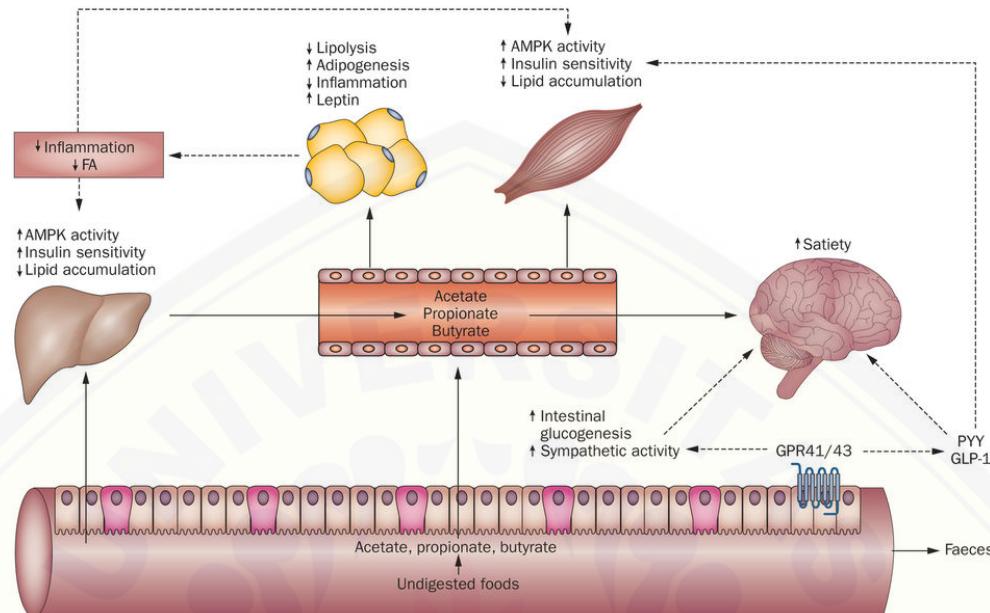
menyebabkan jumlah amilosa yang keluar dari granula tidak optimum sehingga kadar RS tipe III yang terbentuk menurun (Zaragora *et al.*, 2010).

2.2.4 Analisis Daya Cerna Pati

Keberadaan komponen RS dalam bahan makanan dapat dianalisis secara langsung menggunakan *scanning electron microscope*. Kadar RS dalam pati dapat diketahui melalui uji fisikokimia yang terdiri dari uji kandungan serat pangan dan RS dengan metode AOAC (1995), uji kadar amilosa dengan metode iodo kalorimetri dan kadar amilopektin dengan metode *by difference* (Faridah *et al.*, 2013; Shanita *et al.*, 2011). Untuk mengetahui pengaruh perlakuan modifikasi pati terhadap kadar RS yang dihasilkan dapat dilakukan analisis daya cerna pati. Daya cerna pati merupakan suatu kemampuan suatu enzim pemecah untuk menghidrolisis pati menjadi unit-unit yang lebih kecil. Daya cerna pati dipengaruhi oleh proses pengolahan, kadar serat, lemak dan protein pangan, adanya zat anti-gizi pangan seperti pitat dan tannin serta rasio amilosa dan amilopektin (Rhama, 2014).

Prinsip analisa penentuan daya cerna pati secara *in vitro* adalah mereaksikan sampel dengan enzim α -amilase sehingga pati akan terhidrolisis. Maltosa yang dihasilkan direaksikan dengan asam dinitrosalisolat kemudian intensitas warnanya diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Daya cerna pati sampel dihitung sebagai persentase terhadap pati murni. Daya cerna pati dapat dijadikan sebagai parameter awal keberadaan pati resisten. Semakin tinggi daya cerna pati menunjukkan semakin tinggi pula pati diubah menjadi glukosa, sehingga semakin tinggi kemampuan pati untuk menaikkan glukosa darah. Semakin rendah daya cerna pati maka RS dalam bahan semakin tinggi dan relatif lebih sempurna tersuspensi di dalam air dan lebih homogen (Asbar, 2014).

2.2.5 Efek Pati Resisten terhadap Resistensi Insulin



Gambar 2.3 SCFA dan Interaksi Interorgan (Canfora *et al.*, 2015)

Pati resisten akan difermentasi oleh mikroba kolon dan menghasilkan produk akhir berupa *short chain fatty acids* (SCFA) (Macfarlane and Macfarlane, 2012). Jenis SCFA yang paling banyak dihasilkan adalah asetat, butirat dan propionat (>95%) sedangkan format, valerat dan caproat menyusun <5% sisanya (Cummings *et al.*, 1987). Absorbsi SCFA di kolon tergolong efektif dengan hanya 5-10% yang ditemukan di feses (Wong *et al.*, 2006). *Short-chain fatty acids* yang berasal dari sekum, kolon ascending dan kolon transversum disalurkan menuju vena mesenterica superior sedangkan SCFA pada kolon descending dan sigmoid disalurkan melalui vena mesenterica inferior dan vena cava inferior. Asetat, butirat dan propionat memiliki reseptor di kolonosit yang dikenal dengan *G-protein coupled receptors-41* (GPR41) dan *G-protein coupled receptors-43* (GPR43) (Canfora *et al.*, 2015).

Short chain fatty acids dapat mempengaruhi resistensi insulin melalui pengaturan pada metabolisme glukosa dan insulin di jaringan perifer. *Short chain fatty acids* dapat mempengaruhi kadar glukosa melalui peningkatan produksi

glucagon-like peptide-1 (GLP-1) dan peptida YY (PYY) di usus. *Glucagon-like peptide-1* dapat mempengaruhi nafsu makan melalui hambatan pada pengosongan lambung dan sekresi asam lambung. Hal ini mengakibatkan respon glisemik yang ditimbulkan menjadi lebih lambat. Peptida YY dapat menyebabkan supresi neuropeptida Y (NPY) dan aktivasi neuron *propiomelanocortin* (POMC) di nukleus arkuata hipotalamus yang memicu penurunan nafsu makan (Canfora *et al.*, 2015).

Pada individu dengan obesitas, regulator T cell (T_{REG} Cell) yang bertugas mengatur imunitas antimikroba dan inflamasi jaringan mengalami penurunan (Chaudhry and Rudensky, 2013). Hal ini menyebabkan masuknya makrofag dan pelepasan adipositokin yang bertanggungjawab dalam terjadinya inflamasi jaringan. Pemberian asetat, butirat dan propionat selama tiga minggu dapat meningkatkan jumlah dan juga fungsi sel T_{REG} kolon (Mazurek *et al.*, 2003). Butirat mampu meningkatkan fungsi barier epitel usus melalui modulasi protein dan musin *junction* sehingga mencegah terjadinya kebocoran toksin bakteri patogen. Peningkatan toksin bakteri terutama golongan lipopolisakarida di sirkulasi berhubungan dengan kejadian *low-grade inflammation* dan resistensi insulin (Canfora *et al.*, 2015).

Penelitian menemukan bahwa reseptor GPR41/43 juga ditemukan di jaringan adiposa, otot dan hepar sehingga SCFA dapat mempengaruhi metabolisme energi dan utilisasi glukosa secara langsung (Canfora *et al.*, 2015). Studi *in vitro* pada sel makrofag tikus menunjukkan asetat dan butirat mampu mencegah pelepasan adipositokin TNF, IFN- γ , MCP-1, IL-6 dan resistin serta mencegah translokasi NF- $\kappa\beta$ ke dalam nukleus yang menginduksi terjadinya resistensi insulin. Asetat memiliki efek antilipolisis hingga 50% melalui aktivasi reseptor GPR43 dan peningkatan ekspresi *lipoprotein lipase inhibitor* yang mencegah terjadinya lipolisis intraseluler. Propionat dapat meningkatkan *lipid buffering capacity* sehingga menurunkan *lipid overflow* dan akumulasi lemak ektopik (Ge *et al.*, 2008).

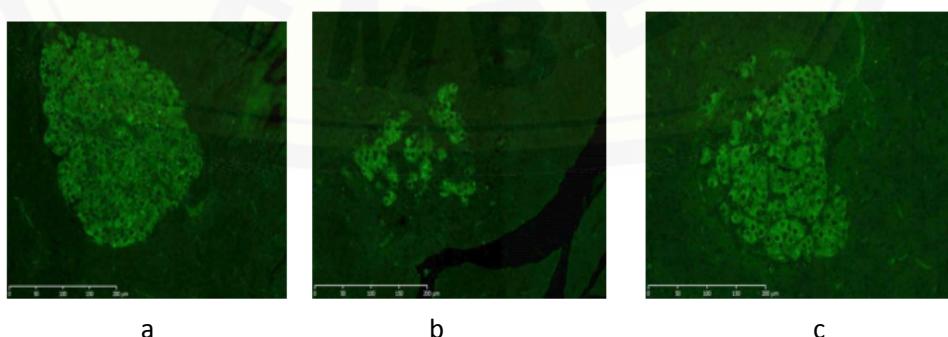
Pada jaringan otot, asetat dan butirat dapat meningkatkan oksidasi asam lemak melalui fosforilasi AMPK dan mekanisme dependen PPAR δ . *Peroxixome*

proliferator-activated receptor (PPAR) merupakan sekelompok reseptor yang mengkode gen yang berperan dalam pengaturan metabolisme lemak (Herawati, 2011). Asetat dan butirat meningkatkan ambilan glukosa melalui GLUT4 dan penyimpanan glikogen pada otot yang dimediasi GPR41/43. Selain itu, asetat dan propionat dapat mengurangi akumulasi lemak ektopik dengan mengurangi suplai lemak (Canfora *et al.*, 2015).

Pada jaringan hepar, SCFA menurunkan glukoneogenesis melalui peningkatan fosforilasi AMPK hepatis (Besten *et al.*, 2013). Fosforilasi AMPK akan meningkatkan translokasi GLUT4 ke membran sel sehingga akan meningkatkan ambilan glukosa dalam jaringan. Propionat berperan sebagai prekursor untuk glukoneogenesis *de novo* dan mengurangi lipogenesis melalui hambatan pada ekspresi *fatty acid synthase*. Asetat dan butirat dapat memicu upregulasi gen target PPAR α yang menyebabkan peningkatan oksidasi asam lemak dan peningkatan simpanan glikogen (Canfora *et al.*, 2015).

2.2.6 Efek Pati Resisten terhadap Fungsi Sel β Pankreas

Pengaruh pemberian pati resisten terhadap fungsi sel β pankreas sampai saat ini masih belum banyak diketahui. Penelitian yang dilakukan oleh Shen (2010) dengan pemberian pati resisten pada tikus Goto-Kakizaki (GK) selama 70 hari menunjukkan adanya peningkatan massa sel β pankreas maupun peningkatan *pancreatic insulin content*. Pada pemeriksaan imunohistokimia didapatkan peningkatan densitas sel pada pulau Langerhans seperti terlihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Densitas sel β pankreas pada (a) tikus Wistar yang diberi diet EC (*energy control*), (b) tikus GK yang diberi diet EC, dan (c) tikus GK yang diberi diet RS (Shen, 2010).

Peningkatan massa dan densitas sel menunjukkan adanya perbaikan fungsi sel β pankreas dalam memproduksi insulin. Peningkatan massa sel β pankreas diperlukan untuk memproduksi lebih banyak insulin sebagai upaya kompensasi resistensi insulin jaringan dan hiperglikemia di sirkulasi. Proliferasi, hipertrofi dan hiperplasia sel akan menyebabkan peningkatan sekresi insulin fase 1 (*acute insulin secretion response*) dan berperan sentral dalam homeostasis glukosa. Kapasitas sel β pankreas untuk berproliferasi menentukan progresivitas dan onset diabetes melitus tipe 2 (Blandino-Rosano *et al.*, 2012).

Mekanisme perbaikan fungsi sel β ini diperantara oleh fermentasi RS oleh mikroba kolon menghasilkan butirat. Butirat melalui reseptor GPR41/43 akan meningkatkan konsentrasi plasma GLP-1. Efek akut dari plasma GLP-1 adalah stimulasi sekresi insulin via *glucose-dependent manner* (Drucker, 2003). Efek yang lain adalah peningkatan biosintesis insulin, stimulasi transkripsi gen insulin, peningkatan ekspresi mRNA GLUT4 dan glukokinase, stimulasi proliferasi sel β , induksi neogenesis islet pankreas dari prekursor sel duktal, dan efek inhibisi apoptosis sel yang menyebabkan peningkatan massa sel β pankreas (Perfetti *et al.*, 2000; Farilla *et al.*, 2003). Buteau *et al.* (2004) menyatakan bahwa GLP-1 dapat mencegah apoptosis sel β pankreas yang diinduksi oleh gluko- dan lipotoksitas.

2.3 Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

2.3.1 Deskripsi

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdisivi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledone</i>
Ordo	: <i>Euphorbiales</i>
Famili	: <i>Euphorbiaceae</i>
Genus	: <i>Manihot</i>
Spesies	: <i>Manihot esculenta</i> Crantz

Singkong termasuk ke dalam famili *Euphorbiaceae*. Batangnya tegak setinggi 1,5-4 m. bentuk batang bulat dengan diameter 2,5-4 cm, berkayu dan bergabus. Batang berwarna kecoklatan atau keunguan dan bercabang ganda tiga. Akar tanaman masuk ke dalam tanah sekitar 0,5-0,6 m dan digunakan untuk menyimpan bahan makanan (karbohidrat). Akibatnya, ukuran akar terus membesar seiring dengan semakin bertambahnya usia pohon. Akar yang besar inilah yang disebut sebagai umbi singkong (Najiyati dan Danarti, 1999).

Tanaman singkong termasuk tanaman tropis yang berasal dari Brazil (Amerika Selatan). Pada abad 16, singkong mulai dibudidayakan di Afrika dan di India pada awal abad ke-19. Pada masa itu singkong menjadi makanan pokok yang penting di daerah tersebut dan di Asia tenggara (Vincent dan Yamaguci, 1998). Singkong merupakan salah satu sumber karbohidrat lokal Indonesia yang menduduki urutan ketiga terbesar setelah padi dan jagung. Peranan singkong menjadi semakin besar berkaitan dengan daya gunanya di bidang industri, baik industri kecil, menengah, maupun industri besar, tidak terbatas pada industri dalam negeri, tetapi juga di negara lain sebagai komoditas ekspor andalan. Singkong merupakan tanaman multiguna yang dapat digunakan untuk memenuhi kebutuhan hidup sehari-hari, makanan ternak, dan sebagai bahan baku berbagai macam industri (Suprapti, 2005).

2.3.2 Varietas Singkong

Sejak tahun 1978, Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian telah memproduksi 10 varietas unggul singkong. Varietas tersebut memiliki tingkat produktivitas tinggi antara 22-102 ton/ha. Varietas tersebut antara lain Adira 1, Adira 2, Adira 4, Malang 1, Malang 2, Malang 4, Malang 6, Darul Hidayah, UJ-3, dan UJ-5. Varietas untuk pangan antara lain Adira 1, Malang 1, Malang 2, dan Darul Hidayah. Sedangkan Adira 2, Adira 4, Malang 4, Malang 6, UJ-3, dan UJ-5 digunakan untuk industri. Selain varietas unggul, di pasaran juga dikenal beberapa varietas lokal, diantaranya Apuy, Mentega, Muara, Bogor, Valenca, Gading, dan sebagainya (Direktorat pertanian, 2005).

2.3.3 Pati Singkong

Umbi singkong kaya akan karbohidrat yaitu sekitar 80-90% (bb) dengan pati sebagai komponen utamanya. Pati singkong dapat dihasilkan dengan melakukan proses ekstraksi dari ubi singkong. Komposisi utama dari pati singkong umumnya terdiri dari amilosa, amilopektin dan sisanya komponen minor seperti air, abu, protein, dan lemak (Subagio, 2007). Secara alami, 9,69% pati singkong bersifat resisten terhadap enzim α -amilase (Setiarto *et al.*, 2015).

Tabel 2.1 Komposisi kimia pati singkong

Komponen	%
Kadar Pati	79,81
Kadar Air	13
Kadar Abu	0,2
Kadar Lemak	0,8
Kadar Protein	1
Kadar serat	3,4

Sumber : Subagio (2007); Kustyawati *et al.* (2013)

Rasio amilosa dan amilopektin dalam pati berpengaruh terhadap sifat fisik dan kimia pati. Struktur amilosa yang linier membuat ikatan antar monomer glukosa lebih kuat sehingga sulit dicerna oleh enzim α -amilase, sedangkan amilopektin yang memiliki struktur bercabang, ukuran molekul lebih besar dan ikatan antar monomer yang lebih terbuka menyebabkan amilopektin lebih mudah dicerna oleh enzim pencernaan (Rimbawan dan Siagian, 2004). Pati dengan kandungan amilosa tinggi memiliki kemampuan menyerap air dan mengembang lebih baik karena amilosa mampu membentuk ikatan hidrogen yang lebih besar dibanding amilopektin. Hal ini menyebabkan pati dengan kadar amilosa tinggi akan lebih resisten dan lebih mudah mengalami retrogradasi (Nugent, 2005).

Tabel 2.2 Kandungan amilosa dan amilopektin pada singkong

Komponen	%
Kadar Amilosa	28,57%
Kadar Amilopektin	51,24%

Sumber: Kustyawati *et al.* (2013)

2.4 Tikus Model Diabetes

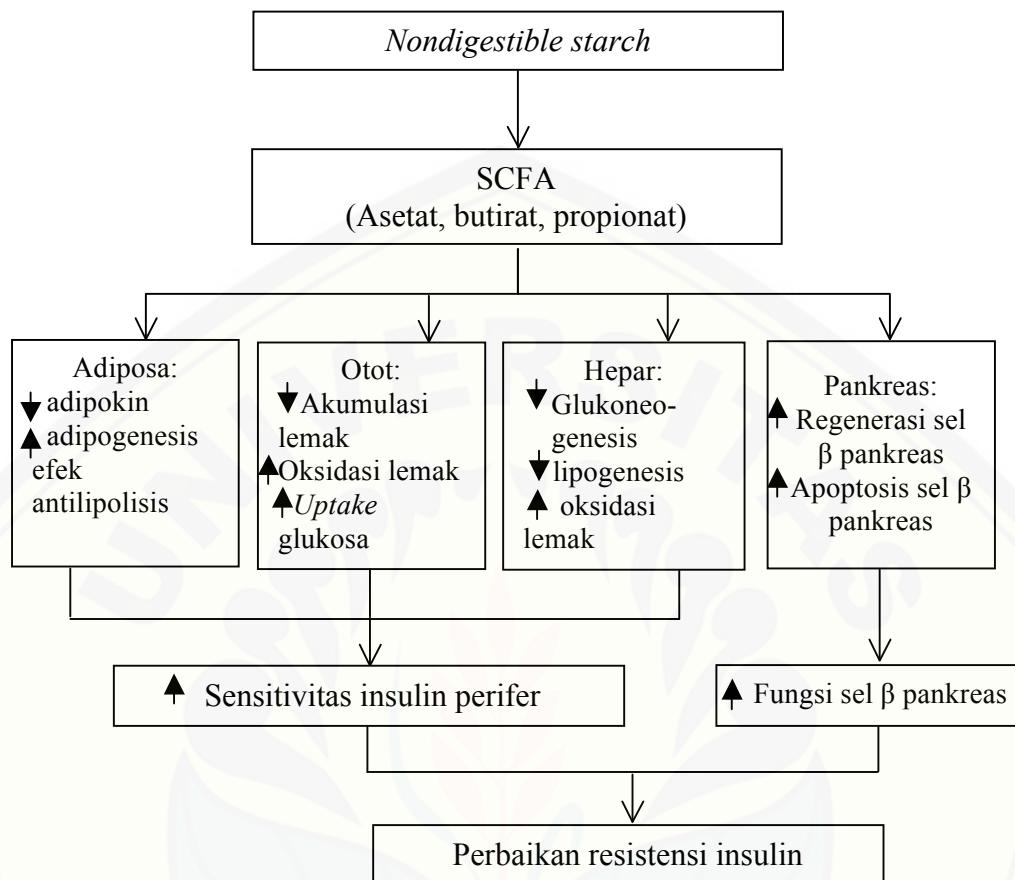
Beberapa model diabetes telah tersedia untuk memahami efek berbagai agen terapeutik diantaranya model genetik, non genetik, induksi diet, induksi kimia dan sebagainya (Srinivasan dan Ramarao, 2007). Kombinasi diet tinggi lemak (HFD) dan streptozotocin (STZ) dosis rendah merupakan salah satu model diabetes yang banyak dipakai dalam pengujian efek agen antidiabetes. Patogenesis tikus model diabetes ini akan menyerupai proses perkembangan penyakit dan karakteristik metabolik diabetes melitus tipe 2 (Zhang *et al.*, 2008).

Diet tinggi lemak dapat menyebabkan obesitas yang memicu peningkatan kerja *sterol regulatory element binding protein-1* (SREBP-1). *Sterol regulatory element binding protein-1* merupakan faktor transkripsi yang mengatur sintesis asam lemak, lipoprotein lipase dan metabolisme asam lemak. Peningkatan kerja SREBP-1 menyebabkan hipertrofi dan hiperplasi adiposit sehingga terjadi penumpukan lemak viseral. Simpanan trigliserida di jaringan lemak dapat dihidrolisis oleh lipoprotein lipase menjadi gliserol dan asam lemak yang dapat menginduksi terjadinya resistensi insulin melalui mekanisme kompetisi dengan substrat pada siklus glukosa-asam lemak di membran sel. Pemberian HFD bisa dilakukan dalam durasi pendek (2-4 minggu) atau panjang (>3 bulan) dan dilanjutkan dengan injeksi STZ dosis rendah (30-35 mg/kgBB) (Srinivasan *et al.*, 2005).

Streptozotocin merupakan bahan toksik yang telah banyak digunakan untuk menginduksi diabetes melitus. Streptozotocin masuk ke dalam sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT2 karena memiliki struktur yang mirip dengan molekul glukosa. Oleh sebab itu, induksi diabetes menggunakan preparat STZ tidak hanya menyebabkan kerusakan sel β pankreas tetapi juga memicu kerusakan pada sel lain yang mengekspresikan GLUT2 seperti sel hepatosit dan tubulus ginjal (Lenzen, 2008). Mekanisme diabetogenik STZ adalah alkilasi DNA melalui gugus nitrourea dan glikosilasi protein yang menimbulkan kerusakan DNA sel β pankreas. Kerusakan DNA dapat mengaktifasi *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) yang kemudian menekan *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD $^+$) seluler, selanjutnya mengakibatkan penurunan jumlah *adenosine triphosphate*

(ATP), dan akhirnya terjadi nekrosis sel β pankreas (Skosvø, 2014). Penggunaan STZ dipilih untuk menghindari keterbatasan yang terjadi pada metode ideal (model genetik) yaitu onset penyakit yang sulit diprediksi. Aloksan merupakan preparat yang bisa dijadikan alternatif induksi diabetes selain STZ, akan tetapi obat ini memiliki *window safety* yang rendah karena jarak dosis efektif yang mendekati dosis toksik (Anonymous, 2016).

2.5 Kerangka Teori

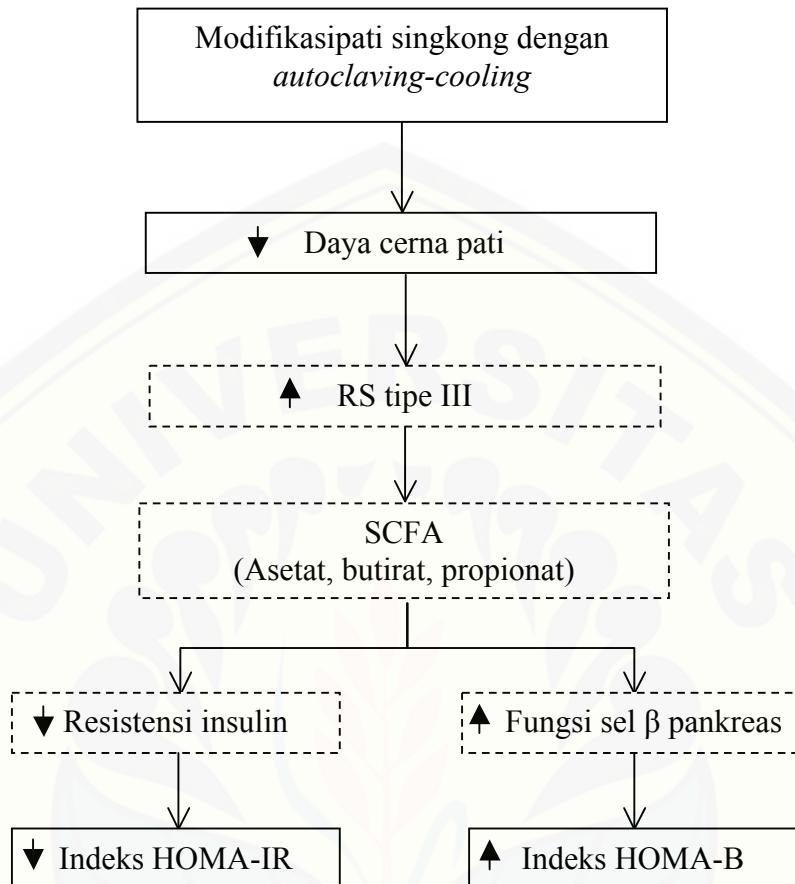


Gambar 2.5 Kerangka Teori (Shen, 2010; Canfora *et al.*, 2015)

Keberadaan komponen *nondigestible starch* seperti serat pangan, selulosa, maltodekstrin, inulin dan pati resisten dapat menurunkan daya cerna pati oleh enzim amilosa di usus halus sehingga dapat mencapai kolon. Di kolon, komponen pati tersebut akan difermentasi oleh mikroba kolon menjadi *short chain fatty acids* (SCFA). Pada jaringan adiposa, SCFA dapat mengurangi produksi sitokin dan kemokin proinflamasi melalui hambatan pada infiltrasi makrofag, meningkatkan adipogenesis yang dimediasi oleh PPAR γ , dan mencegah lipolisis melalui hambatan pada enzim lipoprotein lipase. Pada jaringan otot, SCFA dapat meningkatkan *lipid buffering capacity* sehingga *lipid overflow* dan akumulasi lemak ektopik menurun. Selain itu, SCFA dapat meningkatkan oksidasi asam

lemak melalui peningkatan fosforilasi AMPK dan peningkatan ekspresi PPAR δ . Fosforilasi AMPK juga mampu meningkatkan *uptake* glukosa melalui translokasi vesikel GLUT4. Pada jaringan hepar, SCFA dapat meningkatkan fosforilasi AMPK yang menyebabkan penurunan glukoneogenesis dan peningkatan oksidasi asam lemak. *Short chain fatty acids* memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas enzim *fatty acid synthase* yang memicu lipogenesis yang dapat menurunkan akumulasi jaringan lemak. Mekanisme tersebut menyebabkan peningkatan sensitivitas jaringan perifer terhadap hormon insulin. Selain mempengaruhi sensitivitas jaringan terhadap hormon insulin, SCFA juga dapat memperbaiki fungsi sel β pankreas melalui peningkatan sekresi hormon GLP-1 yang dapat menstimulasi peningkatan massa sel β pankreas melalui stimulasi proliferasi sel dan hambatan pada apoptosis sel. Peningkatan sensitivitas jaringan perifer terhadap hormon insulin dan peningkatan fungsi pankreas dapat memperbaiki kondisi resistensi insulin.

2.6 Kerangka Konseptual



Keterangan:



yang diteliti



yang tidak diteliti

Gambar 2.6 Kerangka Konseptual

Modifikasi *autoclaving-cooling* pada pati singkong akan menurunkan daya cerna pati singkong oleh enzim α -amilose di usus halus. Hal ini terjadi karena peningkatan kadar RS tipe III yang akan difерментasi oleh mikroba kolon menjadi *short chain fatty acids* (SCFA) yang mayoritas terdiri oleh asetat, butirat dan propionat. Ketiga asam lemak ini akan menurunkan derajat resistensi jaringan terhadap hormon insulin sehingga terjadi penurunan indeks HOMA-IR. Selain itu, SCFA juga dapat memperbaiki fungsi sel β pankreas yang dapat dilihat melalui peningkatan indeks HOMA-B.

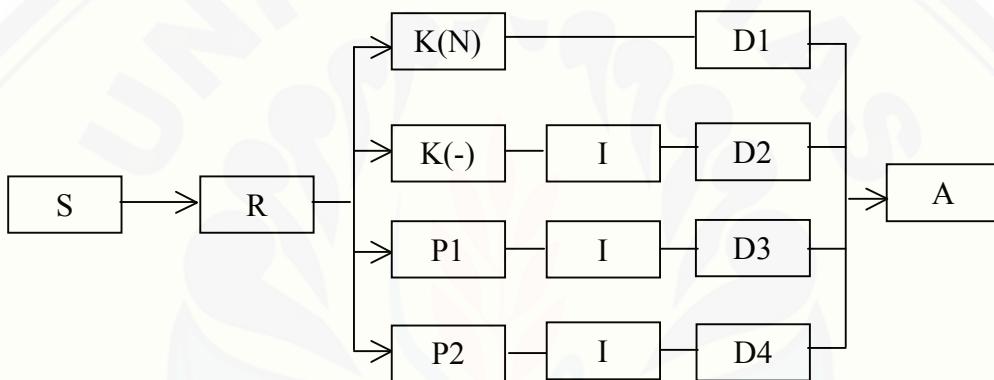
2.7 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan efek pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-IR dan HOMA-B tikus model diabetes.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang akan digunakan adalah *quasy experimental post-test only control group design*. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan efek pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-IR dan HOMA-B pada tikus model diabetes. Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut.



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : sampel

R : *random assignment*

K(N) : kelompok kontrol normal (tikus sehat dengan diet pakan standar)

K(-) : kelompok kontrol negatif (tikus diabetes dengan diet pakan standar)

P1 : kelompok perlakuan 1 (tikus diabetes dengan diet pati singkong alami)

P2 : kelompok perlakuan 2 (tikus diabetes dengan diet pati singkong termodifikasi).

I : induksi diabetes

D1-D4 : pemberian diet sesuai kelompok

A : analisis data

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-April 2017. Pemeliharaan hewan coba, perlakuan hewan coba dan pengambilan sampel dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Proses ekstraksi dan modifikasi pati singkong, pengukuran kadar glukosa darah puasa dan kadar insulin puasa dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas Jember. Analisis daya cerna pati dilakukan di laboratorium analisis terpadu Fakultas Teknik Pertanian, Universitas Jember.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus wistar putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diambil dari sentra pembiakan tikus di Malang.

3.3.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi yang bertujuan untuk homogenisasi sampel yang akan digunakan. Kriteria inklusi sampel penelitian meliputi berat badan 150-200 g, jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan, dan kondisi sehat fisik ditandai dengan nafsu makan baik dan berperilaku normal. Kriteria eksklusi adalah tikus yang sakit selama masa adaptasi, dan kriteria *drop out* adalah tikus mengalami diare yang ditandai dengan feses tak berbentuk dan mengalami kematian selama masa penelitian.

3.3.3 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan menggunakan *software G*power* (Faul *et al.*, 2007) sebesar 16 ekor.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian diet pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah indeks *homeostasis model assessment-insulin resistance* (HOMA-IR) dan *homeostasis model assessment-beta cell* (HOMA-B).

3.5 Definisi Operasional

No	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
1	Diet pati singkong alami	pemberian makanan hasil ekstraksi singkong sebanyak 20 g dikombinasi dengan pakan standar 10 g.	rasio
2	Diet pati singkong termodifikasi	pemberian makanan hasil modifikasi pati singkong dengan teknik <i>autoclaving-cooling</i> sebanyak 20 g dikombinasi dengan pakan standar 10 g.	rasio
3	Indeks HOMA-IR	parameter sensitivitas jaringan target terhadap hormon insulin yang dihitung menggunakan formula $I_0 (\mu\text{U/mL}) \times G_0 (\text{mg/dL}) / 2430$ (Cacho <i>et al.</i> , 2008).	rasio
4	Indeks HOMA-B	Parameter fungsi sel β pankreas dalam memproduksi hormon insulin yang dihitung menggunakan formula $20 \times I_0 (\mu\text{U/mL}) / (G_0 (\text{mg/dL}) - 3,5)$ (Song <i>et al.</i> , 2007).	rasio
5	Kadar insulin puasa	kadar insulin yang diambil dari darah intracardiac setelah tikus dipuasakan selama 8 jam dan diukur menggunakan Elabscience® rat INS (insulin) ELISA kit (ng/mL).	rasio
6	Kadar glukosa darah puasa	kadar glukosa yang diambil dari darah intracardiac setelah tikus dipuasakan selama 8 jam dan diukur menggunakan metode GOD-PAP (mg/dL).	rasio
7	Tikus model diabetes	tikus yang diinduksi diabetes dengan diet kuning telur bebek 0,01 mL/gBB/hari dan diinjeksi dengan STZ (30 mg/kgBB dalam sodium buffer citrat 0.1 M pH 4.5) secara intraperitoneal (Sa'adah dan Pratiwi, 2016).	-

3.6 Instrumen Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. alat yang digunakan untuk pemeliharaan tikus seperti kandang, tempat makan, tempat minum dan spuit 3 cc untuk injeksi STZ secara intraperitoneal;
- b. alat yang digunakan untuk menimbang adalah timbangan (untuk tikus) dan neraca OHAUS (untuk diet);
- c. alat yang digunakan dalam ekstraksi dan modifikasi pati singkong yaitu saringan tahu, saringan tepung, *freezedryer*, autoklaf, bak plastik, *freezer*, *blender* dan timbangan;
- d. alat yang digunakan untuk analisis daya cerna pati adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, bulb, pipet ukur ukuran 1 mL, 5 mL, dan 10 mL, *beaker glass* 250 mL, penangas air, spektrofotometer, pipet tetes dan gelas ukur;
- e. alat yang digunakan untuk mengukur kadar insulin puasa yaitu spuit 5 cc, tabung EDTA, *sentrifuger*, container, mikropipet, mikro tip, inkubator dan ELISA *reader*;
- f. alat yang digunakan untuk mengukur kadar glukosa darah puasa yaitu scalpel, glukometer merk Nesco® Multicheck, spuit 5 cc, tabung EDTA, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *sentrifuger*, vortex, mikropipet, mikro tip, tabung cuvet, dan spektrofotometer.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi:

- a. bahan yang digunakan untuk pemberian diet adalah pakan standar turbo 521, kuning telur dan singkong;
- b. bahan yang digunakan untuk analisis daya cerna pati adalah reagen dinitrosalisilat, larutan potassium sodium tartarat 40%, *buffer phosphate* 0.1 M pH 7.0, larutan enzim α -amilase, larutan maltosa standar;

- c. bahan yang digunakan untuk induksi diabetes adalah streptozotocin merk Bioword seri 18883-66-4 dan *sodium buffer citrat* 0,1 M pH 4,5;
- d. bahan yang digunakan untuk terminasi hewan coba adalah kloroform;
- e. bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar insulin puasa adalah insulin ELISA *kit for rats* merk Elabscience;
- f. bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar glukosa puasa adalah larutan dekstrosa, glukosa strip merk Easy Touch®, GOD-PAP *kit* merk Diasys.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Ekstraksi Pati Singkong

Pembuatan pati singkong dengan cara umbi dikupas, dicuci hingga bersih dan dihancurkan. Selanjutnya disaring dan diekstraksi dengan air (dengan rasio singkong:air = 1:4) selama 24 jam. Endapan pati selanjutnya dikeringkan dibawah sinar matahari atau menggunakan oven (suhu 40°C). Pati singkong yang telah kering disaring dengan saringan 100 mesh.

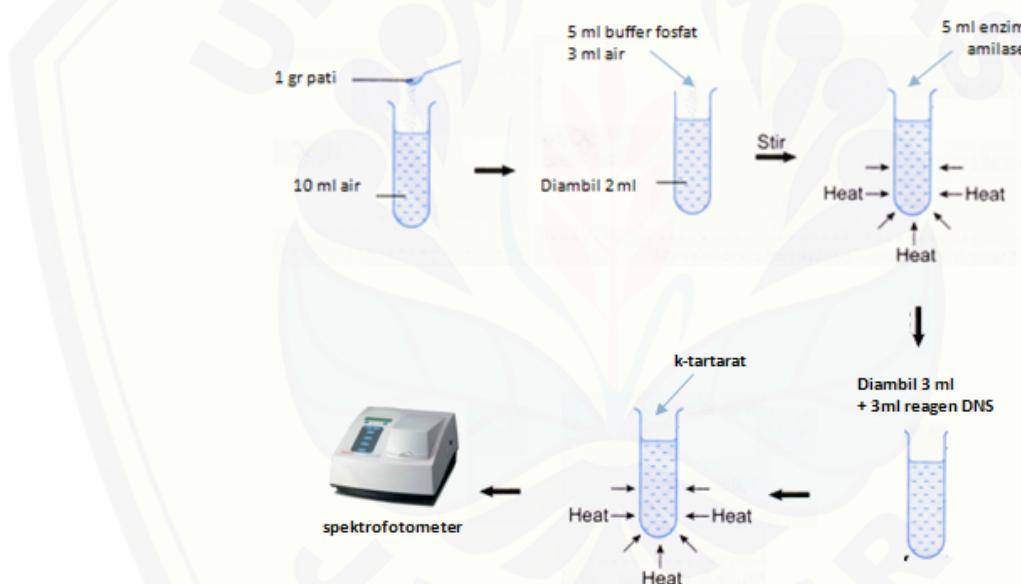
3.7.2 Modifikasi Pati Singkong

Prosedur modifikasi mengacu pada metode Lehmann (2002). Pati singkong disuspensikan dengan air (20% b/v). Kemudian suspensi dipanaskan menggunakan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C. Setelah dipanaskan, pasta pati didinginkan dan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam. Kemudian pasta pati dikeringkan menggunakan *freezedryer* pada suhu 55-65°C selama 24 jam, dihaluskan dan disaring menggunakan saringan 100 mesh.

3.7.3 Analisis Daya Cerna Pati

Persiapan sampel dilakukan dengan melarutkan masing-masing 1 g pati singkong atau pati singkong termodifikasi ke dalam 10 mL air. Langkah pertama memasukkan 2 mL sampel, 3 mL akuades dan 5 mL buffer fosfat ke dalam tabung

reaksi lalu dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya memanaskan tabung reaksi dengan *waterbath* pada suhu 37°C selama 15 menit. Langkah kedua yaitu menambahkan 5 mL enzim α -amilase dan dipanaskan pada suhu 37°C selama 30 menit. Langkah ketiga yaitu mengambil 3 mL larutan dari tabung reaksi dan 3 mL reagen DNS. Selanjutnya menutup tabung dengan alumunium foil dan memanaskan dengan penangas air pada suhu 100°C selama 10 menit sehingga terbentuk warna merah kecoklatan. Langkah keempat adalah memasukkan larutan potassium sodium tartarat. Setelah dingin, mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer 600 nm. Kadar maltosa dari campuran reaksi dihitung menggunakan kurva standar maltosa murni.



Gambar 3.2 Pemeriksaan Daya Cerna

3.7.4 Pembuatan Tikus Model Diabetes

Sebelum penelitian, hewan coba diaklimatisasikan dengan kondisi tempat penelitian, pakan dan minum selama 7 hari. Tikus dipelihara dalam ruangan yang bersuhu $25\pm1^{\circ}\text{C}$ dan diberi cahaya selama 12 jam (06.00-18.00 WIB). Hewan coba tersebut dikandangkan secara tertutup dengan kondisi cahaya tidak terkontrol, ventilasi udara di dalam kandang cukup, dan temperatur udara pada suhu kamar.

Pembuatan tikus model diabetes sesuai dengan metode yang dilakukan Sa'adah dan Pratiwi (2014) yaitu dengan cara memberikan diet kuning telur bebek sebanyak 1% berat tubuh atau 0,01 mL/gBB/hari. Berat badan tikus ditimbang setiap seminggu sekali. Empat minggu setelah pemberian diet, tikus dipuaskan selama 6 jam (07.00-13.00 WIB), kemudian diinjeksikan dengan STZ dosis rendah (35 mg/kgBB dalam sodium buffer citrat 0.1 M pH 4.5) secara intraperitoneal. Kemudian ditunggu selama 1 minggu dan diukur toleransi glukosa oral untuk mengkonfirmasi adanya keadaan resistensi insulin. Tikus dipuaskan selama 12 jam, dilanjutkan dengan pembebanan dekstrosa sebanyak 2 g/kgBB peroral. Sampel darah diambil melalui insisi ekor tikus dan dibaca menggunakan glukometer.

3.7.5 Pemberian Diet Pati Singkong Alami dan Pati Singkong Termodifikasi

Menurut Rachmawati (2008), kebutuhan makan tikus wistar 20-30 g/ekor/hari sehingga kebutuhan energi tikus per hari adalah 68,6 kkal. Pada penelitian ini kelompok kontrol diberikan diet pakan standar sebanyak 30g selama 28 hari. Pakan perlakuan diformulasikan untuk mencapai isokalori dengan 2/3 dari total kalori digantikan pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi (Mustaghfirah *et al.*, 2014). Oleh karena itu, kelompok P1 diberikan diet pati singkong alami sebanyak 20 g dikombinasi dengan 10 g pakan standar, sedangkan kelompok P2 diberikan diet pati singkong termodifikasi sebanyak 20 g dikombinasi dengan 10 g pakan standar. Diet diberikan secara *ad libitum* selama 28 hari. Sisa makanan ditimbang setiap harinya.

3.7.6 Pengambilan Sampel

Tikus diterminasi menggunakan cairan kloroform, kemudian diambil darah *intracardiac* sebanyak 5 cc dan dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Darah kemudian di *sentrifuge* untuk memisahkan cairan plasma dengan komponen sel darah. Kemudian cairan plasma diambil dan disimpan di dalam container.

3.7.7 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Puasa (GDP)

Kadar GDP ditentukan dengan metode *glucose-oxidase-phenol 4-aminoantipyrine* (GOD-PAP). Prinsip metode ini adalah glukosa ditentukan setelah oksidasi enzimatis dengan adanya *glucose oxidase*. Hidrogen peroksidase akan mengkatalisis *phenol* dan *4-aminoantipyrine* menjadi *quinoneimine*, indikator kalorimetrik yang berwarna merah violet. Prosedur yang dilakukan adalah mencampur 10 µL larutan sample atau standar dengan 1000 µL reagen dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25°C atau 10 menit pada suhu 37°C. Kemudian mengukur absorbansi sampel dan standar dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm. Adapun perhitungan kadar GDP dengan formula:

$$\text{konsentrasi GDP} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times \text{konsentrasi standar (mg/dL)}$$

3.7.8 Pengukuran Kadar Insulin Puasa

Pengukuran kadar insulin puasa menggunakan metode sandwich *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Mikro plate pada ELISA kit telah dilengkapi dengan antibodi spesifik insulin. Prosedur yang dilakukan adalah menambahkan 100 µL larutan standar atau sampel ke dalam sumuran plate yang sesuai, kemudian ditutup dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C. Menambahkan 100 µL *Biotinylated detection antibody* ke dalam sumuran dan diinkubasi kembali. Setelah 1 jam, plate dicuci kembali sebanyak 3 kali. Tambahkan 100 µL *HRP conjugate* ke dalam sumuran lalu ditutup dan diinkubasi selama 30 menit. Cuci lagi plate sebanyak 5 kali. Menambahkan 90 µL reagen substrat ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 15 menit berikutnya. Kemudian ditambahkan 50 µL stop solution ke dalam sumuran, *optical density* (OD) dibaca menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Kadar insulin puasa dihitung dengan membandingkan nilai OD dengan kurva standar.

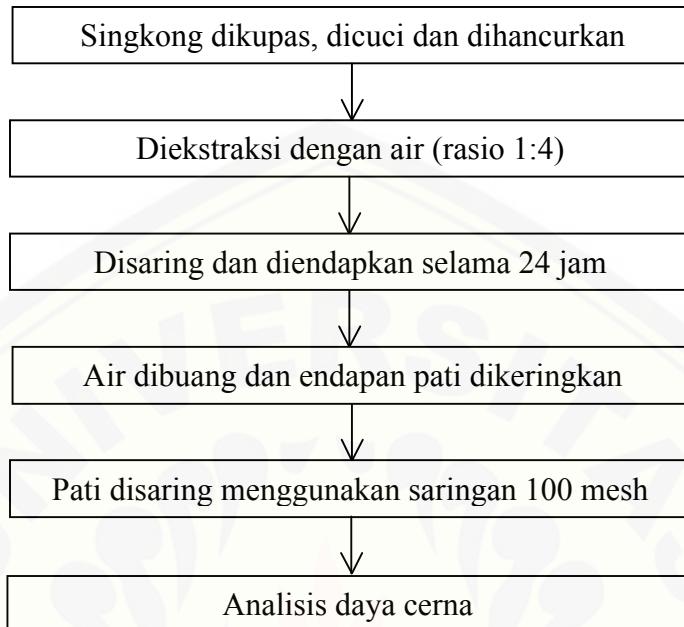
3.8 Analisis Data

Hasil pengukuran kadar glukosa darah dan insulin puasa digunakan untuk perhitungan indeks HOMA-IR dan HOMA-B. Data yang diperoleh disajikan

dalam bentuk tabel dan grafik. Analisis dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Data diuji normalitas *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas *Levene*. Data HOMA-IR yang terdistribusi normal dan homogen, dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dan uji beda *PostHoc Tukey*. Data HOMA-B yang terdistribusi normal namun tidak homogen, dianalisis menggunakan uji non parametrik *Kruskal Wallis* dan uji *Mann Whitney U test*.

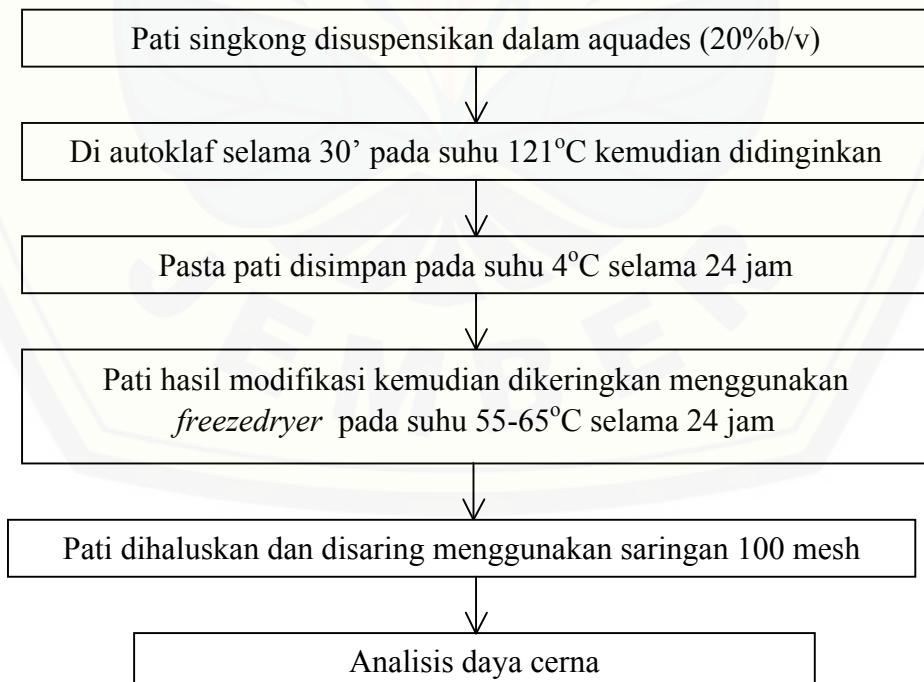
3.9 Kerangka Pemecahan Masalah

3.9.1 Ekstraksi Pati Singkong



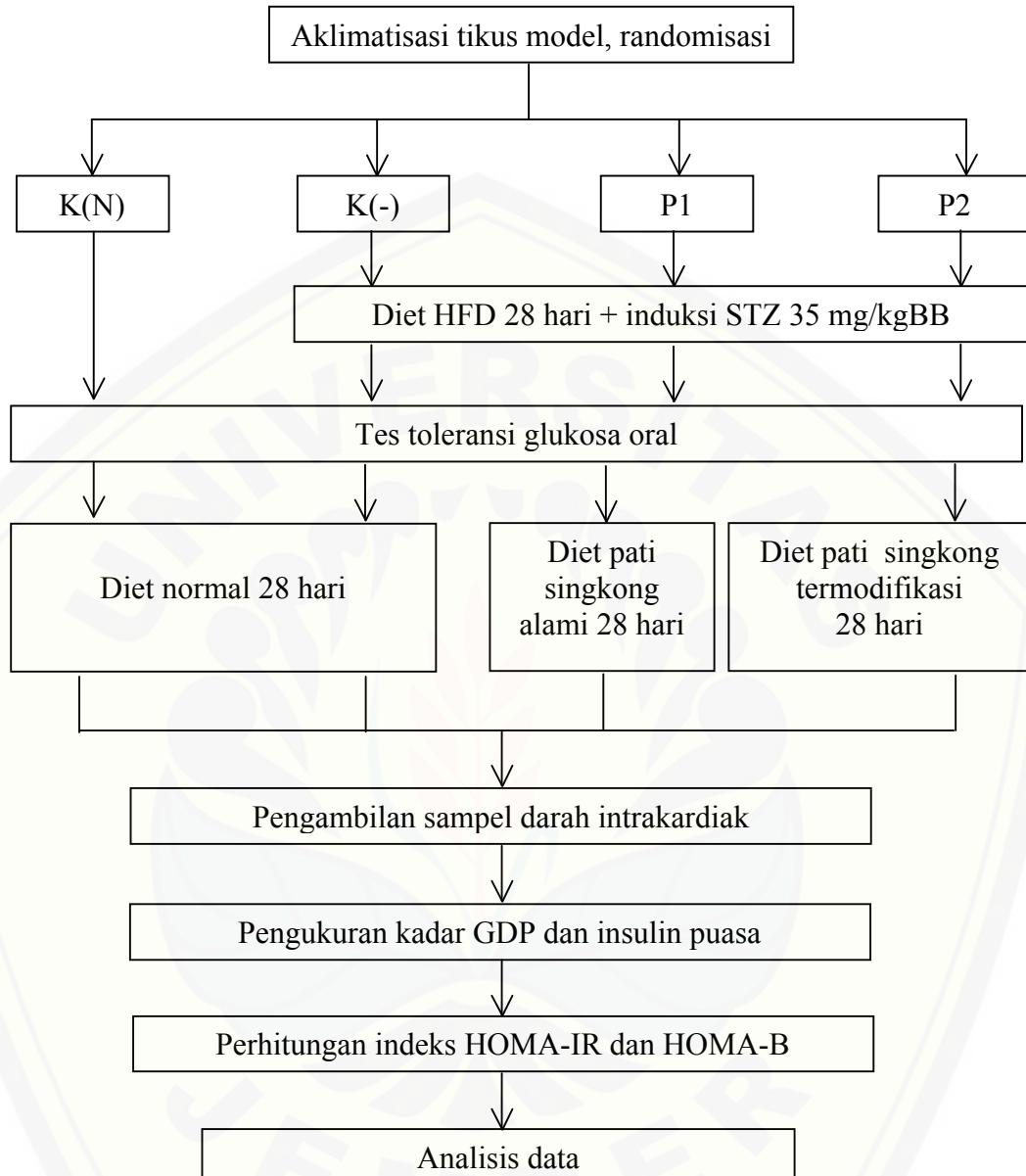
Gambar 3.3 Alur Ekstraksi Pati Singkong

3.9.2 Modifikasi Pati Singkong



3.4 Alur Modifikasi Pati Singkong

3.9.3 Perlakuan Hewan Coba



3.5 Alur Perlakuan Hewan Coba

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- a. Tidak terdapat perbedaan signifikan pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-IR tikus model diabetes. Meskipun demikian, pemberian pati singkong termodifikasi cenderung lebih menurunkan indeks HOMA-IR dibanding pemberian pati singkong alami.
- b. Tidak terdapat perbedaan signifikan pemberian pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* terhadap indeks HOMA-B tikus model diabetes.

5.2 Saran

- a. Pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi *autoclaving-cooling* dapat dijadikan inovasi terapi nutrisi medis pada penderita diabetes mellitus untuk meningkatkan sensitivitas insulin dan fungsi sel β pancreas.
- b. Diperlukan penelitian lebih lanjut pengaruh pemberian diet pati singkong terhadap gambaran histopatologi jaringan pankreas.
- c. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai analisis kadar RS pada pati singkong alami maupun pati singkong termodifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggasarah, A.B. 2015. Rasio Prevalensi Resistensi Insulin pada Subjek dengan Obesitas Abdominal. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Almatsier, S. 2009. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka.
- American Diabetes Association. 2014. Glicemic Index and Diabetes. <http://www.diabetes.org/food-and-fitness/food/what-can-i-eat/understanding-carbohydrates/glycemic-index-and-diabetes.html> [diakses pada 8 Oktober 2017]
- Anonymous, 2016. *Streptozotocin Used in Mice and Rats*. Australia: University of Melbourne.
- Antunes, L.C., J.L. Elkfury, M.N. Jornada, K.C. Folleto, dan M.C. Bertoluci. 2016. Validation of HOMA in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in wistar rats. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. 60(2): 138-142.
- Asbar, R. 2014. Peningkatan Pati Resisten Tipe III pada Tepung Singkong Modifikasi (Mocaf) dengan Perlakuan Pemanasan-Pendinginan Berulang dan Aplikasinya pada Pembuatan Mi Kering. *Thesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Asp, N.G. 1992. Resistant Starch. Proceedings of the 2nd Plenary Meeting of EURESTA: European FLAIR Concerted Action, 11 on Physiological Implications of the Cosumption of Resistant Starch in Man. Preface. *European Journal of Clinical Nutrition*. 46: S1.
- Badman, M.K. dan J.S. Flier. 2005. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*. 307: 1909-1914.
- Besten, G.D., K.V. Eunen, A.K. Groen, K. Venema, D.J. Reijngoud, dan B.M. Bakker. 2013. The role of short chain fatty acids in the interplay between diet, gut mikrobiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 54(9): 2325-2340.
- Blandino-Rosano, M., E.U. Alejandro, A. Sathyamurthy, J.O. Scheys, B. Gregg, dan A.Y. Chen. 2012. Enhanced beta cell proliferation in mice overexpressing a constitutively active form of Akt and one allele of p21 (Cip). *Diabetologia*. 55: 1380-1389.
- Bodinham, C.L., L. Smith, E.L. Thomas, J.D. Bell, J.R. Swann, A. Costabile, D. Russel-Jones, M. Umpleby, dan M.D. Robertson. 2014. Efficacy of

- increased resistant starch consumption in human type 2 diabetes. *Endocrine Connections*. 3: 75-84.
- Bonara, E., G. Targher, M. Alberiche, R.C. Bonadonna, F. Saggiani, M.B. Zenere, T. Monauni dan M. Muggeo. 2000. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 23(1): 57-63.
- Brown, I.L. 2004. Applications and uses of resistant starch. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist International*. 87(3): 727-732.
- Buteau, J., W. El-Assaad, C.J. Rhodes, L. Rosenberg, E. Joly, dan M. Prentki. 2004. Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. *Diabetologia*. 47: 806-815.
- Cacho, J., J. Sevillano, J. de Castro, E. Herrera, dan M.P. Ramos. 2008. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology Metabolism*. 295(5): E1269-76.
- Canfora, E.E., J.W. Jocken dan E.E. Blaak. 2015. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*. 11: 577-591.
- Chaudhry, A. dan A.Y. Rudensky. 2013. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*. 123: 939-944.
- Crouse, J.R., C.D. Gerson, L.M. DeCarli, dan C.S. Lieber. 1968. Role of acetate in the reduction of plasma free fatty acids produced by ethanol in man. *The Journal of Lipid Research*. 9: 509-12.
- Cummings, J.H., E.W. Pomare, W.J. Branch, C.P. Naylor, dan G.T. Macfarlane. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 28: 1221.
- Deeds, MC., J.M. Anderson, A.S. Armstrong, D.A. Gasineau, H.J. Hiddinga, A. Jahangir, N.L. Eberhardt, dan Y.C. Kudva. 2011. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory Animals*. 45: 131-140.
- DeFronzo, R.A. 2009. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 58(4): 773-795.

- Dewi, M. 2007. Resistensi insulin terkait obesitas: mekanisme endokrin dan instrinsik sel. *Jurnal Gizi dan Pangan*. 2(2): 49-54.
- Direktorat Pengolahan Dan Pemasaran Hasil Pertanian. 2005. *Pengembangan Usaha Pengolahan Tepung Tapioka*. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Drucker, D.J. 2003. Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology*. 144: 5145-5148.
- Englyst, H.N., S.M. Kingman, G.J. Hudson dan J.H. Cummings. 1996. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*. 75: 749-755.
- Faridah, D.N., W.P. Rahayu, dan M.S. Rahadi. 2013. Modifikasi pati garut (*Marantha arundinacea*) dengan perlakuan hidrolisis asam dan siklus pemanasan-pendinginan untuk menghasilkan pati resisten tipe 3. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 23(1):61-69.
- Farilla, L., A. Bulotta, B. Hirshberg, S.L Calzi, N. Khoury, H. Noushmehr, C. Bertolotto, U.D. Mario , D.M. Harlan, dan R. Perfetti. 2003. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*. 144(12): 5149-58.
- Faul, F., E. Erdfelder, A.G. Lang, dan A. Buchner. 2007. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*. 39: 175-191.
- Food and Agricultural Organization. 2008. Food Consumption Nutrient Sheets. http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/documents/food_security_statistics/FoodConsumptionNutrients_en.xls [Diakses pada 15 November 2017]
- Gao, Z., J. Yin, J. Zhang, R. E. Ward, R. J. Martin, M. Lefevre, W. T. Cefalu, dan J. Ye. 2009. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 58(7): 1509-1517.
- Ge, H., X. Li, J. Weiszmann, P. Wang, H. Baribault, J. Chen, H. Tian, dan Y. Li. 2008. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*. 149(9): 4519-4526.
- Gunawan, S., Nafrialdi dan Elysabeth. 2009. *Farmakologi dan Terapi, Edisi 5*. Jakarta: Universitas Indonesia.

- Gutch, M., S. Kumar, S.M. Razi, K.K. Gupta, dan A. Gupta. 2015. Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 19(1): 160-164.
- Haffner, S.M., E. Kennedy, C. Gonzalez , M.P. Stern, dan H. Miettinen. 1997. A prospective analysis of the HOMA model: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 19: 1138-1141.
- Handayani, W., A. Rudijanto, dan M.R. Indra. 2009. Susu kedelai menurunkan resistensi insulin pada tikus diabetes melitus tipe 2. *Jurnal kedokteran Brawijaya*. 25(2):61-66.
- Hanley, A.J., K. Williams, C. Gonzalez, R.B.Jr. D'Agostino, L.E. Wagenknech, M.P Stern, dan S.M. Haffner. 2003. Prediction of type 2 diabetes using simple measures of insulin resistance: combined results from the San Antonio Heart Study, the Mexico City Diabetes Study, and the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes*. 52: 463-469.
- Haynes, L., N. Gimmier, J.P. Locke, M.R. Kweon, L. Slade, dan H. Levine. 2000. Process for making enzyme-resistant starch for reduced-calorie flour replacer. *United States Patent* 6,013,299. Nabisco Technology Company, Wilmington, Del.
- Herawati, H. 2011. Potensi pengembangan produk pati tahan cerna sebagai pangan fungsional. *Jurnal Litbang Pertanian*. 30(1): 31-39.
- Institute of Medicine. 2005. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids (Macronutrients)*. Washington DC: National Academies Press.
- Itam, E.H., A.H. Itam, M.O. Odey, N.R. Ejemot, M.F. Asenye, dan N.N. Ezike. 2012. Effect of processing method on the glycemic index of some carbohydrate staples (*Manihot esculenta*, *Ipomoea batata* and *Dioscorea rotundata*) in both normal and diabetic subject. *Annals of Biological Research*. 3:5507-5510.
- Jeon, S.M. 2016. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental and Molecular Medicine*. 48:e246.
- Krenzt, A.J., G. Clough, dan C.D. Byrne. 2007. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 9(6): 781-791.
- Kustyawati, M.E., M. Sari, dan T. Haryati. 2013. Efek Fermentasi dengan *Saccharomyces cereviceae* terhadap karakteristik biokimia tapioka. *Agritech*. 33(3): 281-287.

- Lehmann, U., G. Jacobasch, dan D. Schmiedl. 2002. Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(18): 5236-5240.
- Leong, Y.H., A.A. Karim, dan M.H. Norziah. 2007. Effect of pullulanase debranching of sago (*Metroxylon sagu*) starch at subgelatinization temperature on the yield of resistant starch. *Starch/Starke*. 59(1): 32.
- Lenzen, S. 2008. The mechanism of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51(2): 216-226.
- Macfarlane, G.T. dan S. Macfarlane. 2012. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist International*. 95(1): 50–60.
- Manaf, A. 2006. *Insulin: Mekanisme Sekresi dan Aspek Metabolisme*. Dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III. Editor A.W. Sudoyo, B. Setyohadi, I. Alwi, M. Simadibrata, dan S. Setiati. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Mather, K. 2009. Surrogate Measure of insulin resistance. *American Journal of Physiology Metabolism*. 296: E398-E399.
- Matthews, D.R., J.P. Hosker, A.S. Rudenski, B.A. Naylor, D.F. Treacher, dan R.C. Turner. 1985. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28: 412-9.
- Mazurek, T., L. Zhang, A. Zalewski, J.D. Mannion, J.T Diehl, H. Arafat, L. Sarov-Blat, S. O'Brien, E.A. Keiper, A.G. Johnson, J. Martin, B.J. Goldstein, dan Y. Shi. 2003. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 108(20): 2460-2466.
- Melmed S., K.S. polonsky, P.R Larsen, dan H.M. Kronenberg. 2011. *Williams Textbook of Endocrinology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Merendino, J.J., dan J. Jibrin. 2009. *The Best Life Guide to Managing Diabetes and Pre-Diabetes*. New York: Simon & Schuster.
- Merentek, E. 2006. Resistensi insulin pada diabetes melitus tipe 2. *Cermin Dunia Kedokteran*. 150: 38-41.
- Mochizuki K., Y. Sato, S. Takase, dan T. Goda. 2010. Changes in mucosal a-glucosidase activities along the jejunal-ileal axis by an Hm-HACS diet intake are associated with decreased lipogenic enzyme activity in

- epididymal adipose tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 6923–7.
- Mustaghfiqh, I. T dan E. Probasari. 2014. Pengaruh pemberian tepung tempe dan pati garut (*Marantha arundinacea*) termodifikasi terhadap kadar glukosa darah tikus hiperglikemi. *Journal of Nutrition*. 6(3): 76-82.
- Najiyati, S. dan Danarti. 1999. *Palawija Budidaya dan Analisis Usaha Tani*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Nasoetion, A. dan E. Damayanti. 2008. *Ilmu Gizi Dasar*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nugent, A.P. 2005. Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*. 30(1): 37-54.
- Olatunbosun, S. T. 2017. Insulin Resistance. <https://emedicine.medscape.com/article/122501-overview#a5> [Diakses pada 14 Oktober 2017]
- Perfetti, R., J. Zhou, M.E. Doyle, dan J.M. Egan. 2000. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*. 141: 4600-4605.
- Polat, E.S., O.B. Cilil, dan M. Garip. 2013. Fatty acid composition of yolk of nine poultry species kept in their natural environment. *Animal Science Papers and Reports*. 31(4): 363-368.
- Raben, A., A. Tagliabue, N.J. Christensen, J. Madsen, J.U. Holst, dan A. Astrup. 1994. Resistant starch: the effect on postprandial glycemia, hormonal response, and satiety. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 60: 544–551.
- Rahmawati, Y. 2009. Pengaruh Pemberian Tepung Bekicot (*Achatina fulica*) terhadap Peningkatan Kadar Hemoglobin Tikus Strain Wistar yang diberi Diet Non Protein. *Skripsi*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Rhama, D.D. Astuti, dan S. Lusiawati. 2014. *Daya Cerna Pati*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Robertson, M.D., A.S. Bickerton, A.L. Dennis, H. Vidal, dan K.N. Frayn. 2005. Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 82(3): 559-67.

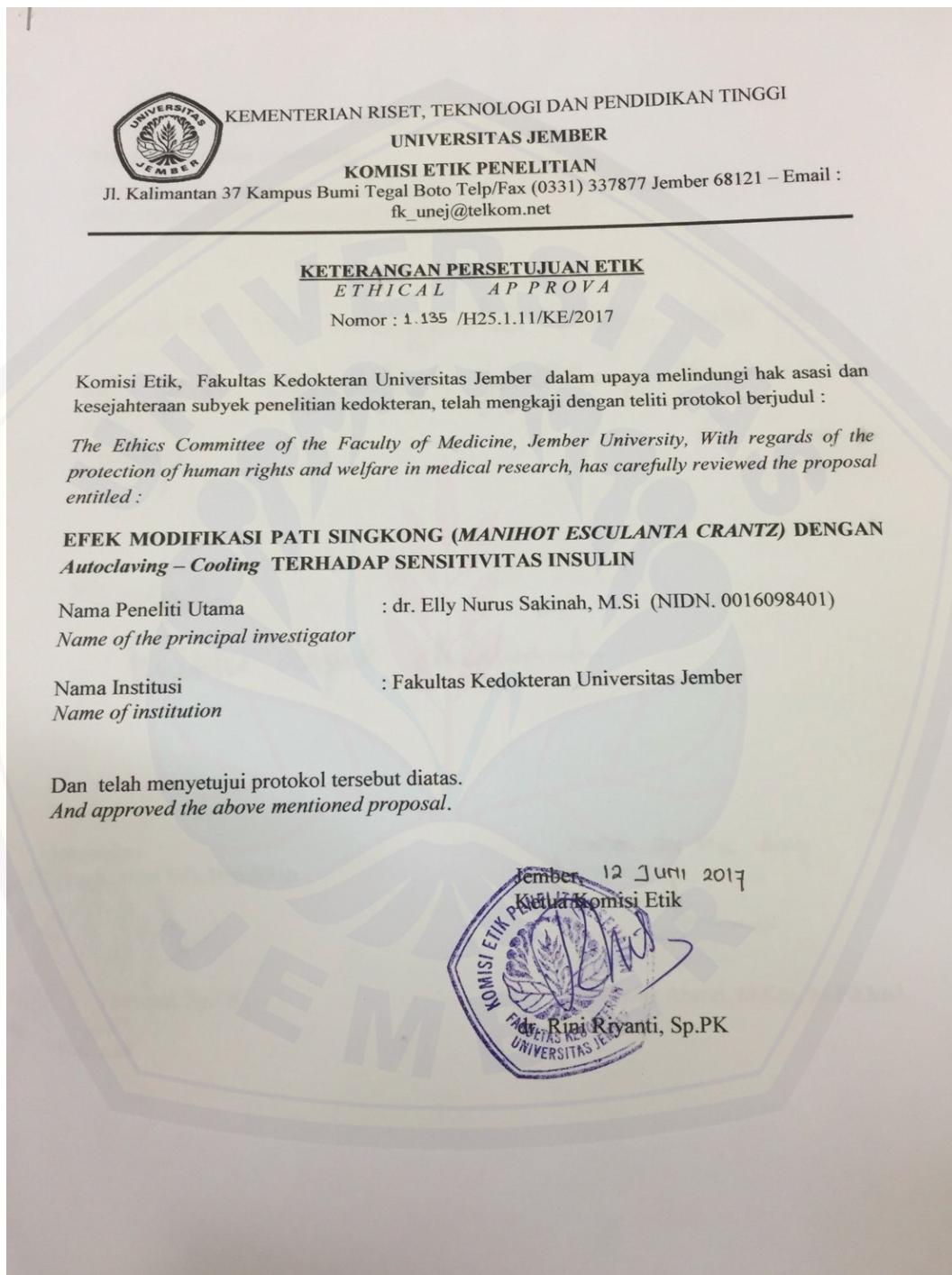
- Roden, M. 2004. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal tissue. *News Physiological Sciences*. 19: 92-96.
- Sa'adah, N.N. dan R. Pratiwi. 2014. Kandungan ROS dan Apo B-100 Serum, serta Indeks Aterogenik Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Hiperlipidemia dengan Asupan Pelet Nasi dan Bekatul Beras Hitam (*Oryza sativa L.*) "Cempo Ireng". *Tesis*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Sa'adah, N.N., K.I. Purwani, A.P.D. Nurhayati, dan N.M. Ashuri. 2017. Analysis of lipid profile and atherogenic index n hiperlipidemic rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1796) that given the methanolic extract of parijoto (*Medinilla speciosa*). *Proceeding of International Biology Conference*. 15 Oktober 2016. American Institute of Physics Publishing: 020031-1.
- Saini, V. 2010. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 1(3): 68-75.
- Sajilata, M. G., R.S. Singhal, P.R. dan Kulkarni. 2006. Resistant starch-a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5: 1-17.
- Setiarto, R.H., B.S. Jenie, D.N. Faridah, dan I.Saskiawan. 2015. Kajian peningkatan pati resisten yang terkandung dalam bahan pangan sebagai prebiotik. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 20(3): 191-200.
- Shanita, S.N., H. Hasnah, dan C.W. Khoo. 2011. Amylase and amylopectin in selected malaysian foods and its relationship to glycemic index. *Sains Malaysiana*. 40(8): 865-870.
- Shen, L. 2010. Dietary Resistant Starch Improve Maternal Glycemic Control in Goto-Kakizaki Rat. *Disertasi*. USA: Louisiana State University.
- Shimano, H. 2008. SREBPs:physiology and pathophysiology. *Federation of European Biochemist Societies Journal*. 276(3): 616-621.
- Skosvø, S. 2014. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*. 5: 349-358.
- Song, Y., J.E. Manson, L. Tinker, B.V. Howard, L.H. Kuller, L. Nathan, N. Rifai, dan S. Liu. 2007. Insulin sensitivity and insulin secretion determined by homeostasis model assessment (HOMA) and risk of diabetes in a multiethnic cohort of women: the women's health initiative observational study. *Diabetes Care*. 30(7): 1747-1752.

- Soriano, A.A., R.D. Cruz-Cordero, J.L. Rosado, dan T.G. Gasca. 2016. 4-hydroxyisoleucine from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): effects on insulin resistance associated with obesity. *Molecules*. 21(11): 1596.
- Srinivasan, K. dan P. Ramarao. 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian Journal of Medical Research*. 125: 451-472.
- Srinivasan, K., B. Viswanad, L. Asrat, C.L. Kaul, dan P. Ramarao. 2005. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*. 52: 313-320.
- Stoffers, D.A., B.M. Desai, D.D. DeLeon, dan R.A. Simmons. 2003. Neonatal exendin-4 prevents the development of diabetes in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetes*. 52(3): 734-40.
- Stumvoll, M., A. Mitrakou, W. Pimenta, T. Jenssen, H. Ki-Jarvinen, T. Van Haeften, W. Renn, dan J. Gerich. 2000. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 23: 295-301.
- Subagio, A. 2007. *Industrialisasi Modified Cassava Flour (MOCAF) sebagai Bahan Baku Industri Pangan untuk Menunjang Diversifikasi Pangan Pokok Nasional*. Jember: Universitas Jember.
- Sugiyono, R. Pratiwi, dan D.N. Faridah. 2009. Modifikasi pati garut (*Marantha arundinacea*) dengan perlakuan siklus pemanasan suhu tinggi-pendinginan (autoclaving-cooling cycling). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 20: 17-24.
- Sulistyoningrum, E. 2010. Tinjauan molekular dan aspek klinis resistensi insulin. *Mandala of Health*. 4(2):131-138.
- Suprapti, L. 2005. *Teknologi Pengolahan Pangan Tepung Tapioka dan Pemanfaatannya*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka.
- Tanti, J. F., F. Ceppo, J. Jager dan F. Berthou. 2013. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*. 3(181): 6-20.
- Vatanasuchart, N., B. Niyomwit, dan K. Wongkrajang. 2012. Resistant starch content, in vitro starch digestibility and physico-chemical properties of flour and starch from Thai bananas. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 6(02): 259-271.

- Wallace, T.M., J.C. Levy, dan D.R. Matthews. 2004. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 27: 1487-1495.
- Wang, Z., Y. Yang, X. Xiang, Y. Zhu, J. Men, dan M. He. 2010. Estimation of the normal range of blood glucose in rats. *Wei Shen Yan Jiu*. 39(2): 133-137.
- Wellen, K. E., dan G.S. Hotamisligil. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 112(12): 1785-1788.
- Winarno, F.G. 2008. *Kimia Pangan dan Gizi*. Bogor: M-Brio Press.
- Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam, dan D. J. Jenkins. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 40: 235–243.
- Zabar, S., E. Shimoni, dan H.B. Peled. 2008. Development of nanostructure in resistant starch type III during thermal treatments and cycling. *Macromolecule Bioscience*. 8(2): 163-170.
- Zaragoza, E.F., M.J. Riquelme-Navarrete, E. SanchezZapata, dan J.A. Perez-Alvarez. 2010. Resistant starch as functional ingredient: a review. *Food Research International*. 43(4): 931-942.
- Zhang, M., X. Y. Lv, J. Li, Z. G. Xu, dan L. Chen. 2008. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Experimental Diabetes Research*. 704045.
- Zhang, P. 2011. Glucose tolerance test in mice. *Bio-protocol*. 1(19): e159.
- Zhou, J., R.J. Martin, R.T. Tulley, A.M. Raggio, K.L. McCutcheon, L. Shen, S.C. Danna, S. Tripathy, M. Hegsted, dan M.J. Keenan. 2008. Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism*. 295: E1160-1166.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Keterangan Persetujuan Etik Penelitian





KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email : fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVAL

Nomor : 1.201 /H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

EFEK MODIFIKASI PATI SINGKONG (*Manihot esculenta Crantz*) DENGAN AUTOCLAVING-COOLING TERHADAP INDEKS HOMA-IR TIKUS MODEL DIABETES

Nama Peneliti Utama : Maria Ulfa.
Name of the principal investigator

NIM : 142010101093

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 10 November 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian



Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

Review Proposal :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan (Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan modifikasi pati singkong
- Perlakuan dengan injeksi intraperitoneal dilakukan oleh orang yang terampil (dilakukan dengan cepat dan tepat agar tidak melukai hewan coba).
- Mohon diperhatikan kalibrasi alat dan kontrol kualitas terhadap semua instrument dan reagen yang digunakan..
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian



Jember, 06 November 2017
Reviewer


dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

Lampiran 3.2 Lembar Identifikasi Tumbuhan Singkong

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
Jln. Kalimantan 37 Kampus Tegalboto Kotak Pos 159 Jember 68121
Telp. (0331) 334293 Fax (0331) 330225

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 13 /2017

Ketua Laboratorium Botani Jurusan Biologi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh:

Nama : Maria Ulva
NIP/NIM/NIK : 142010101093
Institusiasal : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Pada tanggal 10 Oktober 2017, berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan Bakhuizen van den Brink Jr. adalah :

No.	Genus	Species	Family
1.	Manihot	<i>Manihot esculenta</i> Crantz.	Euphorbiaceae

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

Jember, 10 Oktober 2017

Ketua Laboratorium Botani

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dwi Setyati".

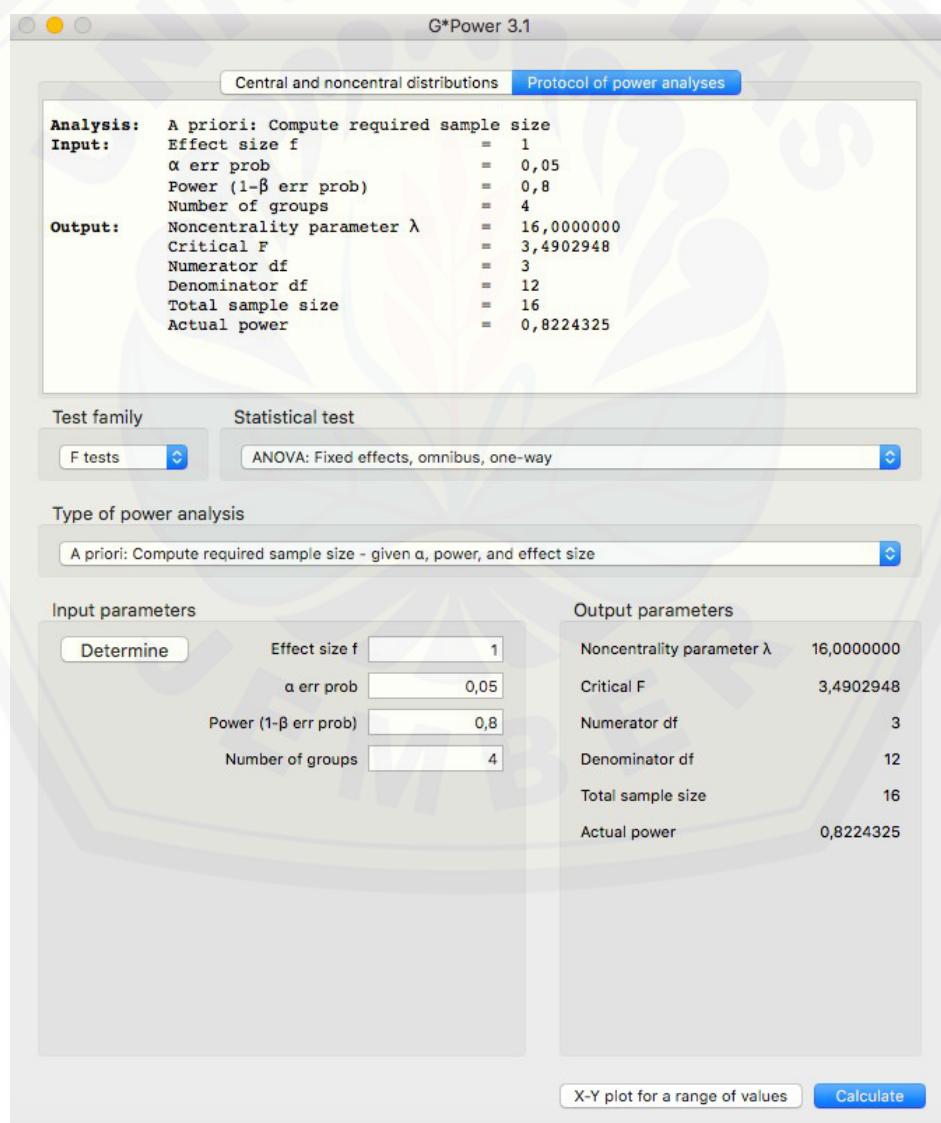
Dra. Dwi Setyati, M.Si.

NIP. 196404171991032001

Determined by Dra. Dwi Setyati, M.Si

Lampiran 3.3 Cara Perhitungan Besar Sampel Penelitian

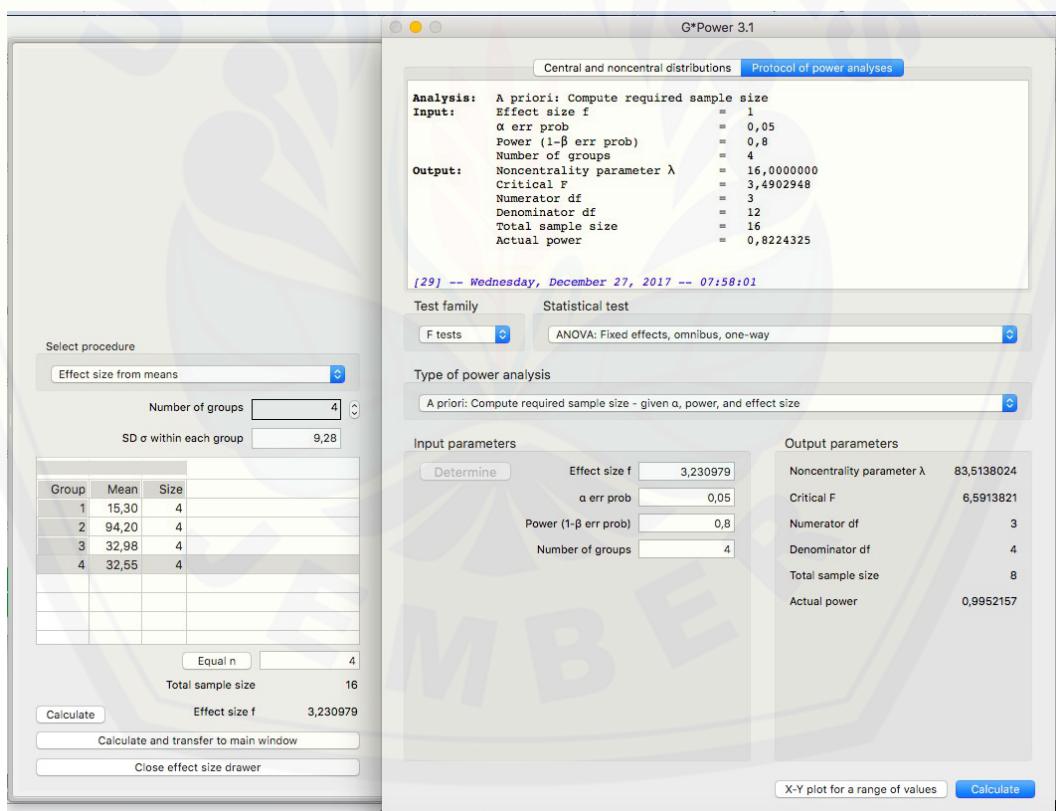
Perhitungan sampel dilakukan menggunakan *software G*power* versi 3.1 dengan rincian sebagai berikut. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui perbedaan efek pemberian diet pati singkong alami dan pati singkong termodifikasi terhadap indeks HOMA-IR dan HOMA-B tikus model diabetes menggunakan f test *One Way Anova* dengan nilai signifikansi $\alpha = 0,05$. Kelompok perlakuan sebanyak empat kelompok. *Effect size* yang diharapkan adalah 1 dengan *power* 0,8. Hasil perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan adalah sebagai berikut.



Hasil penelitian menunjukkan standar deviasi (SD) antar kelompok adalah 37,13 dengan mean kelompok K(N) 15,30; K(-) 94,19; P1 32,97 dan P2 32,55. *Standar error (σ_x)* dihitung dengan membagi SD sampel (s) dengan akar kuadrat total sampel yang digunakan (N):

$$\sigma_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Nilai σ_x pada penelitian ini adalah 9,28. Angka ini digunakan untuk mengetahui apakah sampel penelitian telah mewakili populasi. Hasil perhitungan G*power menunjukkan jumlah sampel minimal adalah 8 ekor. Pada penelitian ini digunakan sampel sebanyak 16 ekor sehingga sampel penelitian telah memenuhi jumlah sampel minimal yang dibutuhkan.



Lampiran 3.4 Cara Perhitungan Dosis

3.3.1 Dosis Induksi Streptozotocin

Induksi STZ dosis rendah adalah 35 mg/kgBB

Rata-rata berat badan tikus post HFD adalah 175 g

Dosis STZ yang dibutuhkan adalah $\frac{175}{1000} \times 35 = 6,125$ mg/ekor

Kebutuhan untuk 18 ekor tikus adalah $6,125 \times 18 = 110,25$ mg

STZ dilarutkan dalam sodium buffer sitrat dengan konsentrasi 22,5 mg/mL

Volume STZ yang diinjeksi $\frac{6,125}{22,5} = 0,272$ mL

Volume larutan yang dibuat adalah $0,272 \times 18 = 4,9$ mL

3.3.2 Dosis Pemberian Diet Pati Singkong Alami dan Pati Singkong Termodifikasi

a. Tikus (200 g)

Kebutuhan energi harian 68,6 kkal

Setara dengan diet standar 30 g

Penggantian 2/3 isokalori 20 g

Kebutuhan untuk empat ekor tikus adalah $20 \times 4 = 80$ g/hari

Kebutuhan selama 28 hari penelitian adalah $80 \times 28 = 2240$ g

b. Manusia (70 kg)

Kebutuhan energi harian orang Indonesia adalah 2550 kkal (FAO, 2008)

Kebutuhan karbohidrat harian adalah

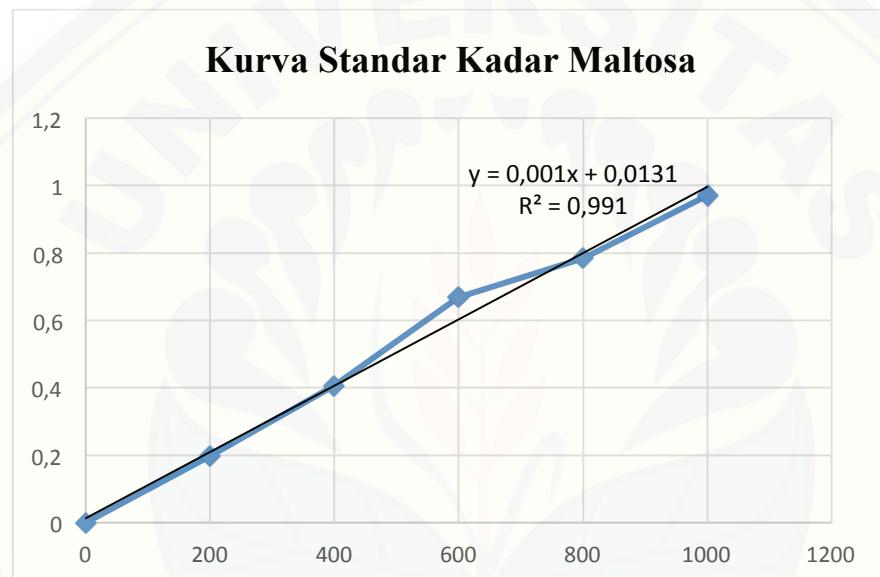
$\frac{45-65\% \times \text{total energi}}{4} = 286,875-414,375$ g (*Institute of Medicine*)

Penggantian 2/3 asupan karbohidrat 191,25-276,25 g

Kebutuhan untuk satu kali makan adalah 63,75-92,08 g

Lampiran 3.5 Cara Perhitungan Daya Cerna Pati

Kadar maltosa standar (ppm)	Absorbansi
0	0
200	0,197
400	0,406
600	0,669
800	0,785
1000	0,971



Persamaan regresi: $y = 0,001x + 0,0131$

$$\% \text{ Daya cerna pati} = \frac{\text{kadar maltosa sampel}}{\text{kadar maltosa pati murni}} \times 100\%$$

Jenis Sampel	Absorbansi
Pati murni	0.22
Pati singkong alami	0.016
Pati singkong termodifikasi	0.078

- a. Kadar maltosa pati murni

$$0,22 = 0,001x + 0,0131$$

$$x = \frac{0,22 - 0,0131}{0,001}$$

$$x = 206,9 \text{ ppm}$$

b. Kadar maltosa pati singkong alami

$$0,089 = 0,001x + 0,0131$$

$$x = \frac{0,089 - 0,0131}{0,001}$$

$$x = 76,9 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ daya cerna} = \frac{76,9}{206,9} \times 100\%$$

$$\% \text{ daya cerna} = 37\%$$

c. Kadar maltosa pati singkong alami

$$0,064 = 0,001x + 0,0131$$

$$x = \frac{0,0641 - 0,0131}{0,001}$$

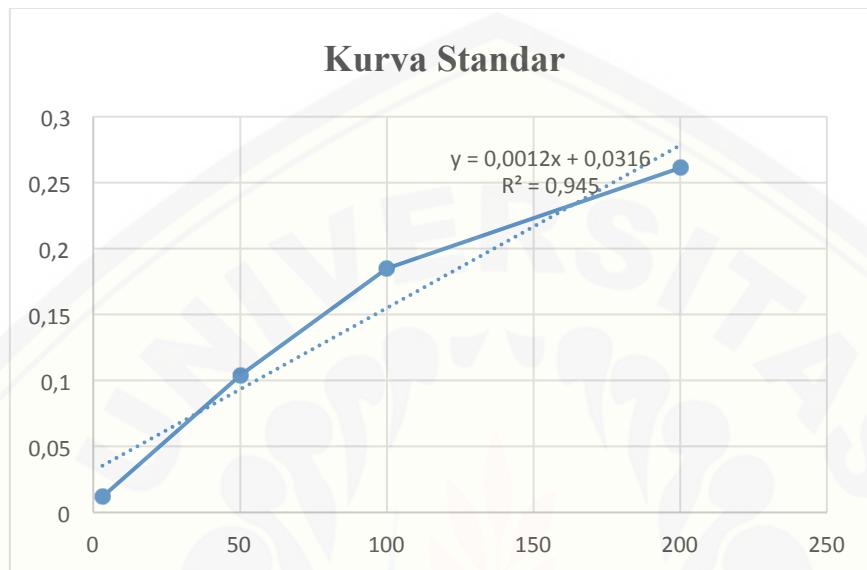
$$x = 51,9 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ daya cerna} = \frac{51,9}{206,9} \times 100\%$$

$$\% \text{ daya cerna} = 25\%$$

Lampiran 3.6 Cara Perhitungan Kadar Insulin Plasma

Konsentrasi (ng/mL)	200	100	50	3,12
OD	0,261	0,185	0,104	0,012



Persamaan regresi: $y = 0,0012x + 0,0316$

Faktor konversi ng/dL ke $\mu\text{U}/\text{mL}$ = 0,047

Sampel	OD	Konsentrasi insulin (ng/dL)	Konsentrasi insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$)
K(N)1	0,056	20,33333	432,6240426
K(N)2	0,051	16,16667	343,9717021
K(N)3	0,052	17	361,7021277
K(N)4	0,048	13,66667	290,7802128
K(-)1	0,081	64,5	1372,340426
K(-)2	0,053	116,16667	2471,631277
K(-)3	0,074	82	1744,680851
K(-)4	0,083	88,66667	1886,524894
P11	0,075	41,16667	875,8865957
P12	0,05	17,83333	379,4325532
P13	0,072	33,66667	716,3121277
P14	0,084	43,66667	929,0780851
P21	0,109	35,33333	751,7729787
P22	0,171	42,83333	911,3474468
P23	0,13	36,16667	769,503617
P24	0,138	15,33333	326,2410638

Lampiran 3.7 Dokumentasi Penelitian



Modifikasi Pati Singkong



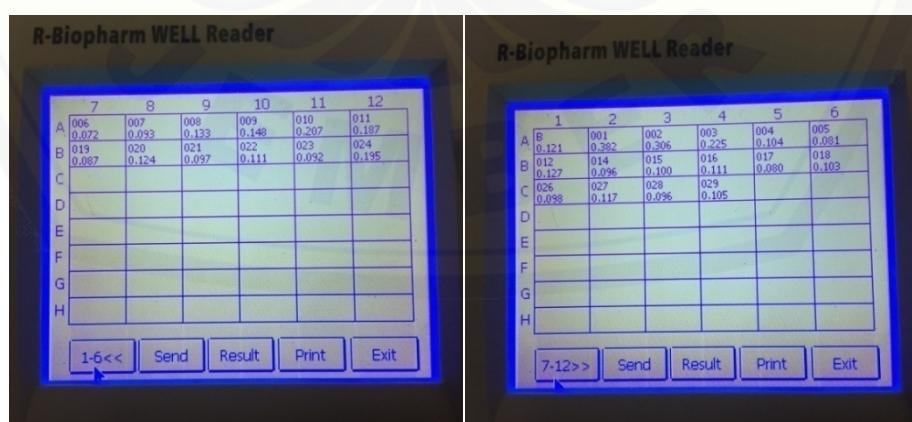
Aklimatisasi Tikus



Pengambilan Sampel



Pengukuran Kadar GDP



Pembacaan Elisa reader

Lampiran 4.1 Analisis Statistik Rata-rata Intake Makanan

Tests of Normality

kelom pok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
makanan	KN	.307	4	.729	4	.024
	K(-)	.271	4	.848	4	.220
	P1	.251	4	.927	4	.574
	P2	.292	3	.923	3	.463

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

kelom pok	N	Mean Rank
makanan	KN	7.50
	K(-)	13.62
	P1	7.50
	P2	5.38
	Total	16

Test Statistics^{a,b}

	makanan
Chi-Square	6.852
df	3
Asymp. Sig.	.077

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
kelompok

Lampiran 4.2 Analisis Statistik Rata-rata Indeks HOMA-IR**Tests of Normality**

kelo mpok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
HOMA KN	.208	4		.950	4	.714
-IR K(-)	.302	4		.916	4	.515
P1	.275	4		.891	4	.390
P2	.259	3		.959	3	.612

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.993	3	12	.073

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14261.000	3	4753.667	8.955	.002
Within Groups	6370.000	12	530.833		
Total	20631.000	15			

Multiple Comparisons

(I) klp	(J) klp	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	K(-)	-78.50000*	16.29161	.002	-126.8682	-30.1318
	P1	-17.50000	16.29161	.711	-65.8682	30.8682
	P2	-17.00000	16.29161	.728	-65.3682	31.3682
K(-)	KN	78.50000*	16.29161	.002	30.1318	126.8682

P1	61.00000*	16.29161	.013	12.6318	109.3682
P2	61.50000*	16.29161	.012	13.1318	109.8682
P1	KN	17.50000	16.29161	.711	-30.8682
	K(-)	-61.00000*	16.29161	.013	-109.3682
	P2	.50000	16.29161	1.000	-47.8682
P2	KN	17.00000	16.29161	.728	-31.3682
	K(-)	-61.50000*	16.29161	.012	-109.8682
	P1	-.50000	16.29161	1.000	-48.8682

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 4.3 Analisis Statistik Rata-rata Indeks HOMA-B**Tests of Normality**

kelom pok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
HOMA-B	KN	.233	4	.	.924	4
	K(-)	.237	4	.	.942	4
	P1	.249	4	.	.908	4
	P2	.336	4	.	.868	4

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
HOMA-B	4.289	3	12	.028

Kruskal-Wallis Test**Ranks**

kelompok	N	Mean Rank
HOMA B	KN	4
	K(-)	4
	P1	4
	P2	4
Total	16	

Test Statistics^{a,b}

	HOMA-B
Chi-Square	10.147
df	3
Asymp. Sig.	.017

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
kelompok

Mann-Whitney Test**Ranks**

kelom pok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
HOMA KN	4	2.50	10.00
B K(-)	4	6.50	26.00
Total	8		

Test Statistics^b

	HOMA-B
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

Ranks

kelom pok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
HOMA KN	4	3.00	12.00
B P1	4	6.00	24.00
Total	8		

Test Statistics^b

	HOMA-B
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

Ranks

kelom pok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
HOMA KN	4	3.50	14.00
B P2	4	5.50	22.00
Total	8		

Test Statistics^b

	HOMA-B
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

Ranks

kelom pok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
HOMA K(-)	4	6.50	26.00
B P1	4	2.50	10.00
Total	8		

Test Statistics^b

	HOMA-B
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

Ranks

kelom pok	N	Mean Rank	Sum of Ranks

HOMA	K(-)	4	6.50	26.00
B	P2	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	HOMA-B
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

Ranks

kelom pok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
HOMA P1	4	4.50	18.00
B P2	4	4.50	18.00
Total	8		

Test Statistics^b

	HOMA-B
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok