

## KARAKTERISTIK SIFAT PREBIOTIK TEPUNG DALUGA HASIL MODIFIKASI HEAT MOISTURE TREATMENT

[Prebiotic Characteristics of Daluga Flour Modified by Heat Moisture Treatment]

Nestri Purnamasari<sup>1)</sup>, Didah Nur Faridah<sup>2)\*</sup>, dan Betty Sri Laksmi Jenie<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2)</sup> Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 31 Juli 2018 / Disetujui 17 Januari 2019

### ABSTRACT

*Daluga (Cyrptosperma merkusii. (Hassk.) Schott) is one of tubers originating from Siau Island, Manado, North Sulawesi. The resistant starch of daluga can be utilized as a potential source of prebiotic. However, naturally daluga has low resistant starch content and a modification is necessary for improving its content. The aim of the study was to examine the effect of heat moisture treatment (HMT) on the resistant starch content and prebiotic properties of modified daluga flour. The HMT modification was carried out at 121°C for 60 min in an autoclave, and the modified flour was then compared with the untreated native flour (TD). The results showed that autoclaved TD-HMT flour had 8.81% higher resistant starch content as compared to that of TD. The increment also affected the prebiotic characteristics of the modified flour. The TD-HMT showed resistant to gastric acid up to 92%, augmentations of prebiotic activity, index and effect, as well as *L. plantarum* BSL growth improvement up to 3 log CFU/mL. The gastric acid resistant autoclaved TD-HMT is able to stimulate probiotic LAB growth, confirming its prebiotic potential for acid bacteria fermentation.*

**Keywords:** daluga, modified daluga flour, prebiotic properties, resistant starch

### ABSTRAK

Daluga (*Cyrptosperma merkusii. (Hassk.) Schott*) adalah salah satu umbi yang berasal dari Pulau Siau, Manado, Sulawesi Utara. Pati resisten pada daluga dapat dimanfaatkan sebagai sumber prebiotik. Secara alami kandungan pati resisten umbi tergolong rendah sehingga diperlukan teknik modifikasi untuk meningkatkannya. Tujuan dilakukannya penelitian yaitu mengkaji pengaruh modifikasi *heat moisture treatment* (HMT) terhadap kadar pati resisten serta sifat prebiotik tepung daluga termodifikasi. Perlakuan modifikasi HMT dilakukan dengan pemanasan 121°C selama 60 menit menggunakan otoklaf yang dibandingkan dengan tepung daluga tanpa perlakuan (TD). Berdasarkan hasil analisis, TD-HMT otoklaf memiliki kadar pati resisten sebesar 8,81% lebih tinggi dibandingkan dengan TD. Peningkatan pati resisten berpengaruh terhadap sifat prebiotik TD-HMT otoklaf. Hasil evaluasi sifat prebiotik menunjukkan TD-HMT otoklaf memiliki ketahanan asam lambung sebesar 92%, meningkatkan aktivitas, efek dan indeks prebiotik, serta meningkatkan pertumbuhan *L. plantarum* BSL hingga 3 log CFU/mL. Kemampuan TD-HMT otoklaf dalam menstimulasi pertumbuhan BAL probiotik dan ketahanan terhadap cairan asam lambung menunjukkan bahwa TD-HMT otoklaf diduga berpotensi sebagai kandidat prebiotik.

**Kata kunci:** daluga, pati resisten, sifat prebiotik, tepung daluga modifikasi

### PENDAHULUAN

Prebiotik merupakan komponen pangan tidak tercerna yang bermanfaat bagi kesehatan karena dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik pada saluran pencernaan (FAO, 2007). Pasar pangan global menggunakan produk prebiotik sebagai ingredien pangan, suplemen dan makanan. Secara komersial produk prebiotik yang banyak di pasaran

antara lain galaktooligosakarida, inulin dan rafinosa. Anadón *et al.* (2016) melaporkan bahwa prebiotik menjadi salah satu segmen yang berkembang dipasar dunia. Menurut Global Market Insights, INC (Delaware, USA) diperkirakan pada tahun 2024 penjualan produk prebiotik dapat mencapai 8,5 miliar USD (GMInsights, 2017). Permintaan yang semakin meningkat mendorong produsen dan peneliti melakukan pengembangan sumber prebiotik baru. Sumber prebiotik yang banyak menarik perhatian dan dikembangkan adalah pati resisten (*resistant starch/RS*) (Agustina, 2016). Setiap bahan pangan memiliki

\*Penulis Korespondensi:  
E-mail: didah\_nf17@yahoo.com

kandungan RS yang berbeda-beda. Kandungan RS dapat ditingkatkan melalui beberapa metode modifikasi yaitu fisik (*heat moisture treatment/HMT* atau perlakuan kelembaban panas), *annealing* atau (perlakuan panas dengan kadar air >65%), siklus pemanasan dan pendinginan), enzimatis, dan kimia. Pada saat ini, modifikasi secara fisik lebih banyak dilakukan karena efektif, sederhana, dan aman dibandingkan metode modifikasi enzimatis dan kimia (Kaur *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016). Modifikasi RS secara fisik sebagian besar menghasilkan RS tipe III. Modifikasi RS menyebabkan adanya perubahan sifat fisikokimia dan perubahan pada struktur bahan pangan yang akan mempengaruhi ketahanannya terhadap hidrolisis enzim (Chung *et al.*, 2009).

Penelitian HMT pada bahan pangan sudah banyak dilakukan dan terbukti dapat meningkatkan RS (Xiao *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2016; Hung *et al.*, 2016). Beberapa penelitian dengan modifikasi gabungan secara fisik dan enzimatis juga dilaporkan meningkatkan kandungan RS pada tepung talas, tepung pisang, dan tepung millet (Setiarto *et al.*, 2018; Nurhayati *et al.*, 2014; Amadou *et al.*, 2013). Jenie *et al.* (2012) melaporkan tepung pisang tanduk yang dimodifikasi dengan fermentasi campuran bakteri asam laktat (BAL) dilanjutkan dengan pemanasan otoklaf dan pendinginan 1 siklus dapat menurunkan indeks glikemik serta meningkatkan kadar serat pangan. Uji viabilitas BAL (Kim *et al.*, 2009), analisis efek dan indeks prebiotik (Roberfroid, 2007), aktivitas prebiotik terhadap patogen (Huebner *et al.*, 2007) serta analisis asam lemak rantai pendek (Zheng *et al.*, 2010) terhadap RS juga sudah banyak dilakukan sebelumnya.

RS termasuk dalam prebiotik karena tidak terhidrolisis oleh enzim dalam saluran pencernaan atas sehingga dapat dimanfaatkan oleh beberapa bakteri probiotik seperti *Bifidobacteria* sp. dan *Lactobacillus* sp. sebagai substrat yang menghasilkan gas (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>) dan asam lemak rantai pendek (Birt *et al.*, 2013). RS memiliki banyak manfaat bagi tubuh antara lain mencegah sembelit, memodifikasi metabolisme lipida dan mengurangi resiko kanker usus besar (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011). Efek lain yang diberikan oleh RS bagi kesehatan tubuh yaitu peningkatan penyerapan kalsium dan magnesium pada usus besar (Scholz *et al.*, 2016), mengurangi nafsu makan, serta dapat mencegah obesitas (Bodinham *et al.*, 2010).

Umbi daluga merupakan umbi yang berasal dari Kepulauan Siau, Manado, Sulawesi Utara. Umbi daluga tumbuh di daerah rawa dan sering dimanfaatkan sebagai makanan pokok karena mengandung karbohidrat tinggi. Daluga selain dimanfaatkan sebagai pangan tradisional juga telah dikembangkan menjadi beras analog (Lumba *et al.*, 2013). Kandungan kadar RS dalam umbi secara alami umumnya tergolong cukup rendah, sehingga perlu dilaku-

kan teknik modifikasi untuk meningkatkan kadar pati resisten daluga. Teknik modifikasi yang akan dilakukan pada penelitian ini menggunakan teknik modifikasi secara HMT. Tujuan dari penelitian ini untuk mengkaji pengaruh HMT terhadap kadar pati resisten serta sifat prebiotik tepung daluga tanpa perlakuan (TD) dan tepung daluga hasil modifikasi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu umbi daluga yang diperoleh dari Kepulauan Siau, Manado, Sulawesi Utara pada Januari 2016. Kultur bakteri yang digunakan terdiri dari bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* BSL koleksi Dr. Sri Laksmi Suryaatmaja (Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan IPB) dan bakteri patogen *Escherichia coli* ATCC 25922 koleksi Laboratorium Pilot Plan Seafast Center (IPB).

### Preparasi sampel daluga

Irisan daluga dengan ketebalan lebih kurang 5 mm direndam di dalam NaCl 1% (3:4) selama 60 menit untuk menghilangkan kandungan kristal oksalat. Setelah proses perendaman irisan tipis daluga dipisahkan dari larutan NaCl 1%, lalu dicuci dengan akuades sebanyak 2-3 kali kemudian ditiriskan. Pada kelompok tepung daluga tanpa perlakuan (TD) irisan tipis daluga pasca perendaman NaCl 1% dan pencucian dengan akuades langsung dikeringkan menggunakan oven (70°C, 16 jam) hingga mencapai kadar air lebih kurang 12%, kemudian ditepungkan dan diayak ukuran 80 mesh.

Modifikasi secara HMT dilakukan menggunakan otoklaf suhu 121°C selama 60 menit (TD-HMT otoklaf) (Syahbanu, 2015). Sebanyak 250 g irisan daluga bebas oksalat dengan kadar air 20% dimasukkan dalam kemasan berbahan plastik HDPE dan disimpan selama semalam pada suhu ruang. Proses modifikasi dilakukan menggunakan otoklaf (MC 40, ALP Co., Ltd, Tokyo-Jepang) pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 60 menit, selanjutnya dilakukan pengeringan dengan pengering rak (*tray dryer*) pada suhu 50°C selama 5 jam. Kedua sampel modifikasi HMT dihaluskan dan diayak dengan saringan berukuran 80 mesh.

### Pembuatan kurva standar glukosa

Analisis RS dilakukan berdasarkan metode dari Goñi *et al.* (1996). Larutan glukosa murni sebanyak 0,5 mL ditempatkan dalam tabung reaksi yang masing-masing mengandung 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 µg larutan glukosa. Masing-masing tabung reaksi tersebut ditambahkan 0,5 mL fenol 5%, kemudian divorteks. Sebanyak 2,5 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat ditambahkan secara cepat ke dalam

tabung reaksi tersebut (terjadi reaksi eksoterm yang menghasilkan panas). Larutan tersebut didiamkan selama 10 menit, kemudian divorteks. Sampel disimpan pada suhu ruang selama 20 menit sebelum diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (HITACHI U-2900, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo Jepang) pada panjang gelombang 490 nm. Persamaan dan kurva standar larutan glukosa dibuat sebagai hubungan antara konsentrasi larutan glukosa (pada sumbu x) dan absorbansi (pada sumbu y).

### Analisis kadar RS

Sebanyak 50 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan ditambahkan 5 mL larutan bufer KCl-HCl pH 1,5 dan 0,1 mL pepsin (4000 U/10 mL bufer KCl-HCl). Kemudian larutan diaduk menggunakan vorteks, sampel diinkubasi pada suhu 40°C selama 60 menit pada penangas bergoyang. Sampel kemudian didinginkan pada suhu ruang. Sebanyak 4,5 mL larutan bufer fosfat pH 6,9 dan 0,5 mL larutan porcine  $\alpha$ -amilase (15,2 mg  $\alpha$ -amilase per mL bufer fosfat) ditambahkan kedalam sampel. Sampel kemudian diaduk dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam sambil terus digoyang. Setelah disentrifus (15 menit, 3000x g), bagian residu sampel diambil dan dicuci dengan 10 mL akuades. Proses sentrifus diulang lagi dengan prosedur yang sama dan residu kembali diambil dan dicuci. Residu hasil sentrifus kemudian ditambahkan 3 mL akuades dan 1,5 mL larutan KOH 4 M, kemudian diaduk dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu, sampel ditambahkan 2,75 mL HCl 2 M dan 1,5 mL bufer sodium asetat pH 4,75 serta 40  $\mu$ L enzim amiloglukosidase secara berturut-turut. Sampel diaduk menggunakan vorteks dalam penangas air bergoyang sebelum diinkubasi pada suhu 60°C selama 45 menit. Setelah itu sampel disentrifus (15 menit, 3000x g), bagian supernatan diambil dan dimasukkan kedalam labu takar. Bagian residu dicuci dengan 10 mL akuades, lalu disentrifus kembali. Sebanyak 25-1000 mL sampel diencerkan dengan akuades (pengenceran tergantung pada kandungan RS sampel). Sebanyak 25-1000 mL sampel diencerkan dengan akuades.

Sebanyak 0,5 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 mL fenol 5% dan divorteks. Sebanyak 2,5 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat ditambahkan segera ke dalam tabung reaksi sampel. Larutan sampel kemudian didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang, lalu di vorteks dan didiamkan kembali selama 20 menit pada suhu ruang. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm. Kadar glukosa ditentukan dengan menggunakan kurva standar.

Kadar RS (% bb) =

$$\frac{\text{kadar glukosa } \left( \frac{\text{mb}}{\text{mL}} \right)}{\text{bobot sampel (mg)}} \times \text{vol total reaksi (mL)} \times \text{FP} \times 100\% \times 0,9$$

### Isolasi RS dari TD dan TD-HMT otoklaf

Isolasi RS dari TD-HMT otoklaf dilakukan berdasarkan metode dari Gofii *et al.* (1996). Sebanyak 50 mg sampel disuspensikan dengan 5 mL bufer KCl-HCl pH 1,5 dan 0,1 mL pepsin (4000 U/10 mL bufer KCl-HCl, Sigma, Germany) selanjutnya diinkubasi pada suhu 40°C selama 60 menit, kemudian ditambahkan 4,5 mL bufer fosfat pH 6,9 dan 0,5 mL larutan enzim  $\alpha$ -amilase (Sigma) dan diinkubasi dengan inkubator bergoyang selama 16 jam pada suhu 37°C. Sampel disentrifus selama (15 menit, 3000x g), residu diambil dan dicuci menggunakan akuades (diulang 2-3 kali). Residu hasil sentrifus ditambahkan 3 mL akuades dan 1,5 mL larutan KOH 4 M, kemudian diaduk dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu, sampel ditambahkan 2,75 mL HCl 2 M dan 1,5 mL bufer sodium asetat pH 4,75 serta 40  $\mu$ L enzim amiloglukosidase (Sigma). Sampel diaduk menggunakan vorteks dalam penangas air bergoyang pada suhu 60°C selama 45 menit kemudian sentrifus (15 menit, 3000x g). Bagian residu dicuci dengan 10 mL akuades, lalu disentrifus kembali. RS yang diperoleh dikeringkan pada suhu 50°C selama 5 jam.

### Ketahanan RS TD dan TD-HMT otoklaf terhadap cairan asam lambung artifisial

Ketahanan RS TD dan TD-HMT otoklaf terhadap cairan asam lambung artifisial dilakukan berdasarkan metode dari Wichienchot *et al.* (2010). RS yang diisolasi dari TD dan TD-HMT otoklaf dipersiapkan dengan melarutkan sampel ke dalam akuades steril (1% b/v). Cairan asam lambung (simulasi) merupakan buffer asam hidroklorida yang tiap g/L mengandung: NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 8,25 g/L; NaHPO<sub>4</sub> 14,35 g/L; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 g/L; dan MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,18 g/L. Bufer asam klorida ditera pada pH 1, 2, 3, dan 4 dengan menggunakan 5 M HCl. Sebanyak 5 mL bufer HCl pada tiap perlakuan pH ditambahkan ke dalam 5 mL larutan sampel, selanjutnya diinkubasi dalam penangas air (*waterbath*) pada suhu 37±1°C selama 6 jam. Sebanyak 1 mL sampel diambil secara periodik pada jam ke- 0; 0,5; 1; 2; 4 dan 6. Presentase hidrolisis sampel dihitung berdasarkan jumlah gula reduksi dibagi dengan total gula dikali 100%.

### Uji viabilitas BAL probiotik

TD dan TD-HMT otoklaf bebas gula sederhana diuji sebagai prebiotik melalui uji viabilitas BAL berdasarkan metode dari Jenie *et al.* (2012). Sebanyak 50 mL m-MRSB + 2,5% (b/v) TD-HMT otoklaf dan 50 mL akuades + 2,5% (b/v) TD-HMT otoklaf disteril-

kan. Sebanyak 2,5 mL kultur mikroba uji *L. plantarum* BSL yang berumur 24 jam berisi  $10^5$  cfu/ml dipipet dan dimasukkan ke dalam media pertumbuhan yang berisi TD dan TD-HMT otoklaf. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah inkubasi 24 jam, 1 mL larutan dipipet dan dimasukkan ke dalam 9 mL larutan pengencer NaCl 0,85% untuk pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-8}$ . Setiap pengencer ditumbuhkan pada media MRSA dengan mengambil 1 mL larutan sampel kemudian di masukkan kedalam cawan steril selanjutnya ditambahkan media MRSA dengan metode tuang. Enumerasi dilakukan secara duplo pada pengenceran  $10^{-6}$ - $10^{-8}$ , inkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 48 jam. Perhitungan koloni dilakukan setelah 48 jam dalam CFU/mL.

### Uji aktivitas prebiotik terhadap bakteri patogen

Aktivitas prebiotik merupakan kemampuan prebiotik dalam membantu pertumbuhan organisme yang dihubungkan dengan organisme lain dan dibandingkan dengan glukosa. Dimana karbohidrat memiliki aktivitas prebiotik positif jika dimetabolisme oleh *Lactobacillus* serta secara selektif dimetabolisme oleh probiotik namun tidak oleh bakteri lain (Huebner *et al.*, 2007). Analisis dilakukan dengan menambahkan 5% (v/v) kultur *L. plantarum* BSL dalam media m-MRSB yang mengandung 2,5% (w/v) glukosa atau 2,5% (w/v) TD-HMT otoklaf. Setelah diinkubasi selama 24 jam, sampel dienumerasi dalam media MRSA. Pengujian juga dilakukan pada kultur bakteri patogen *E. coli* ATCC 25922. Sebanyak 2% kultur *E. coli* ATCC 25922 (v/v) ditambahkan dalam tabung berbeda yang mengandung m-TSB dengan 2,5% (w/v) glukosa atau 2,5% (w/v) TD-HMT otoklaf. Kultur diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dan dienumerasi dalam media TSA setelah 0 (t0) dan 24 (t1) jam inkubasi.

Nilai aktivitas prebiotik =

$$\left( \frac{N \log \text{CFU/mL TPM t1} - N \log \text{CFU/mL TPM t0}}{N \log \text{CFU/mL glukosa t1} - N \log \text{CFU/mL glukosa t0}} \right) - \left( \frac{E \log \text{CFU/mL TPM t1} - E \log \text{CFU/mL TPM T0}}{E \log \text{CFU/mL glukosa t1} - E \log \text{CFU/mL glukosa t0}} \right)$$

dimana, N = Jumlah *L. plantarum* BSL (CFU/mL); E = Jumlah *E. coli* ATCC 25922 (CFU/mL).

### Uji efek dan indeks prebiotik

Pengujian efek dan indeks prebiotik dilakukan dengan mengamati serta melihat perubahan jumlah populasi *L. plantarum* BSL pada media m-MRSB (T1) dan media m-MRSB yang mengandung 2,5% TD-HMT otoklaf (T2). Setelah inkubasi 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ , sampel dienumerasi pada media MRSA. Hal yang sama juga dilakukan pada sampel TD.

$$\text{Efek prebiotik} = \log \left( \left( \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right)_{\text{T2}} - \log \left( \left( \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right)_{\text{T1}} \right)$$

$$\text{Indeks prebiotik} = \frac{\text{Log} \left( \left( \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right)_{\text{T2}} - \text{Log} \left( \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right)_{\text{T1}} \right)}{\text{Berat sampel (g)}}$$

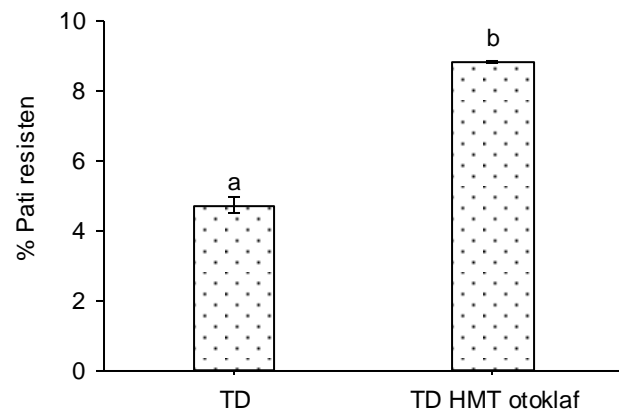
### Analisis data

Data dianalisis menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Jika terdapat perbedaan nyata secara signifikan maka dilanjutkan dengan uji Duncan (DMRT) pada level 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Data diolah menggunakan perangkat lunak SPSS 22.0 (IBM Corporation, New York, US).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kadar pati resisten TD dan TD-HMT otoklaf

TD dan TD-HMT otoklaf memiliki kadar RS sebesar 4,70 dan 8,81% (bk) (Gambar 1). Hasil analisis menunjukkan TD-HMT otoklaf memberikan pengaruh terhadap peningkatan RS dan berbeda nyata dengan TD. TD-HMT otoklaf menghasilkan peningkatan RS sebesar 2 kali lipat dari tepung daluga alami. Berbeda dengan tepung daluga, pati daluga hasil modifikasi mengalami peningkatan yang jauh lebih besar hingga mencapai sekitar 10 kali lipat.



Gambar 1. Kadar pati resisten dari TD dan TD-HMT otoklaf. Huruf yang sama pada gambar menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada  $P < 0,05$

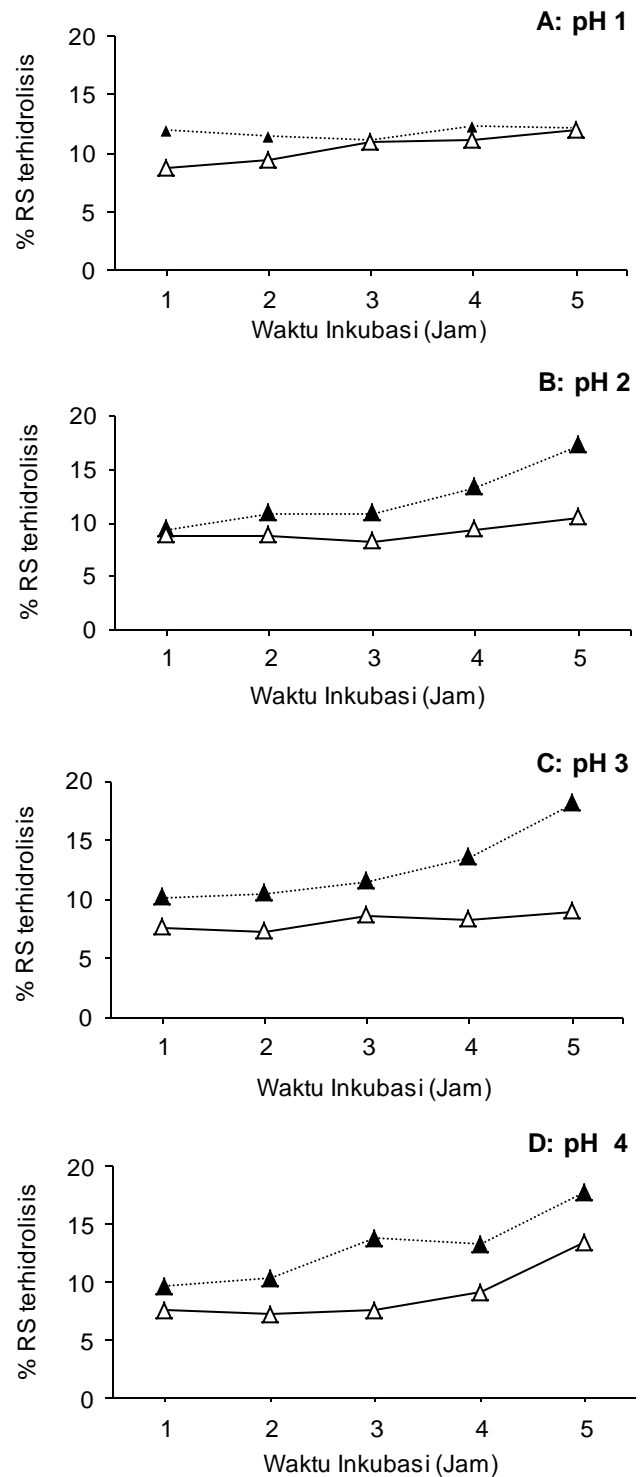
Agustina *et al.* (2016) melaporkan pati daluga dengan perlakuan hidrolisis asam, pemutusan rantai cabang (*debranching*) dilanjutkan pemanasan bertekanan-pendinginan (*autoclaving-cooling*) dan HMT memiliki kadar RS hingga 42,73%, meningkat 12 kali lipat dari pati alami (3,40%). RS yang terukur pada pati daluga modifikasi hanya RS3, adanya pemanasan otoklaf menyebabkan pati tergelatinisasi sempurna dan proses pendinginan mempercepat terjadinya retrogradasi. Sementara itu, tepung memiliki

komponen serat pangan, lemak dan protein yang lebih tinggi dibandingkan pati. Perbedaan komponen antara tepung dan pati mempengaruhi proses gelatinisasi selama pemanasan. Syamsir *et al.* (2012) menyatakan penurunan kapasitas pembengkakan granula disebabkan adanya pembentukan kompleks amilosa-lemak, sehingga menghambat adsorpsi air oleh granula pati. Selain itu, komponen serat pangan yang tinggi pada tepung merupakan salah satu faktor yang memperlambat terjadinya proses gelatinisasi. Proses gelatinisasi sempurna pada tepung dapat dilakukan dengan memperpanjang proses pemanasan atau meningkatkan suhu pemanasan.

Beberapa penelitian modifikasi HMT meningkatkan RS beberapa bahan pangan telah banyak dilakukan. Chung *et al.* (2009) melaporkan jagung, kacang polong, dan lentil yang di HMT suhu 120°C, kadar air 30% meningkatkan pati lambat cerna/SDS (2,5; 2,8; dan 4,7%) dan RS (7,7; 11,2; dan 10,4%). Hung *et al.* (2016) melakukan penelitian terhadap pati beras dengan kombinasi perlakuan asam dan HMT memiliki kadar RS sebesar 30,1-39%. Perlakuan HMT terbukti meningkatkan SDS dan RS tanpa mengganggu struktur granula pati (Zavareze dan Dias, 2011). Pada perlakuan HMT, pemanasan dengan suhu tinggi menyebabkan hidrolisis struktur linier amilosa dan putusannya sebagian ikatan glikosidik bagian luar percabangan  $\alpha$ -1,6 menjadi fraksi yang lebih pendek (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010; Moongngarm, 2013). Faridah *et al.* (2013) melaporkan bahwa saat proses *autoclaving-cooling* menyebabkan berkurangnya bobot molekul pati dan meningkatnya jumlah amilosa rantai pendek sehingga memudahkan pati mengalami retrogradasi. Matalanis *et al.* (2009) menyatakan bahwa retrogradasi amilosa memiliki tingkat yang lebih cepat dibandingkan dengan amilopektin. Fraksi rantai pendek amilosa yang tinggi berpengaruh terhadap peningkatan kadar pati resisten sehingga mudah mengalami proses retrogradasi dan menghasilkan peningkatan RS hingga dua kali lipat.

#### Ketahanan RS terhadap cairan lambung artifisial

Analisis ketahanan terhadap cairan lambung artifisial dilakukan pada pH 1, 2, 3, dan 4 waktu inkubasi selama 5 jam. Sampel terlebih dahulu dilakukan isolasi RS secara enzimatik menggunakan metode Goñi *et al.* (1996) dan menghasilkan rendemen RS sekitar 4,70% (TD) dan 8,81% (TD-HMT otoklaf). Sifat prebiotik RS TD dan TD-HMT otoklaf dipengaruhi oleh ketahanannya terhadap hidrolisis cairan asam lambung artifisial. Semakin rendah perlakuan pH dan semakin lama waktu inkubasi maka semakin meningkat jumlah RS yang terhidrolisis. Peningkatan RS yang terhidrolisis ditandai dengan semakin meningkatnya kadar gula pereduksi (Gambar 2).



Gambar 2. Ketahanan RS TD (▲) dan TD-HMT otoklaf (Δ) terhadap cairan asam lambung artifisial

Bahan pangan yang masuk ke dalam lambung berada dalam kondisi asam (pH 1-4) dan akan mencapai usus halus setelah 4 jam. Hasil penelitian menunjukkan TD memiliki ketahanan asam lambung yaitu 88,54; 89,20; 89,69; dan 89,73% setelah inku-

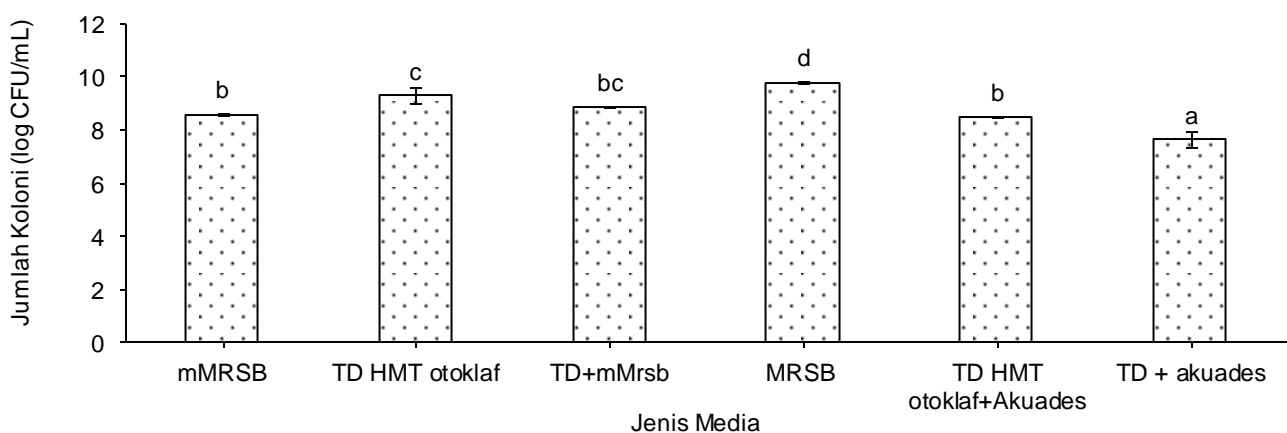
basi selama 2 jam, pH 1-4. Pada TD-HMT otoklaf dengan rendemen RS 8,81% menghasilkan ketahanan asam lambung sekitar 90,58; 91,24; 92,82; dan 92,86% secara berturut-turut pada pH 1-4 setelah inkubasi 2 jam. Cummings dan Macfarlane (2002) melaporkan RS dapat dimanfaatkan sebagai prebiotik apabila memiliki ketahanan hidrolisis terhadap cairan asam lambung sebanyak 85%. Hasil ini dibuktikan oleh penelitian Wichienchot *et al.* (2010) pada oligosakarida pitaya yang memiliki ketahanan hidrolisis asam lambung sebesar 96%. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Agustina (2016) bahwa RS3 pati daluga modifikasi hidrolisis asam, pemanasan bertekanan pendingin, dan HMT memiliki ketahanan asam lambung sebesar 95%. RS hasil modifikasi memiliki struktur lebih kompak yang sulit dihidrolisis oleh enzim pencernaan bagian atas sehingga dapat mencapai usus besar dan secara selektif difermentasi oleh bakteri probiotik. Dengan demikian, RS hasil modifikasi TD dan TD-HMT otoklaf dapat berperan sebagai kandidat prebiotik.

#### Kemampuan pertumbuhan probiotik

Pertumbuhan bakteri probiotik pada media akuades yang ditambah 2,5% TD meningkat 2,1 log CFU/mL, sedangkan pada media akuades ditambah 2,5% TD-HMT otoklaf terjadi peningkatan sebesar 3,0 log CFU/mL. Pada media m-MRSB yang ditambahkan dengan 2,5% TD dan m-MRSB ditambah 2,5% TD-HMT otoklaf peningkatan pertumbuhan *L. plantarum* BSL masing-masing sebesar 3,3 dan 3,8 log CFU/mL (Gambar 3). Kemampuan tumbuh BAL probiotik dalam media yang hanya mengandung TD dan TD-HMT otoklaf menunjukkan hasil yang cukup baik. Hasil penelitian yang sama juga dilaporkan oleh Agustina (2016), RS3 pati daluga dengan hidrolisis asam, pemutusan rantai cabang (*debranching*), pemanasan bertekanan-pendinginan (*autoclaving-cooling*) dan HMT dapat menstimulasi pertumbuhan

*L. plantarum* BSL pada media akuades dan m-MRSB sebesar 1,4 dan 3,32 log CFU/mL, sedangkan pertumbuhan *L. plantarum* BSL pada prebiotik komersial (inulin) masing-masing mencapai 0,66 dan 3,47 log CFU/mL.

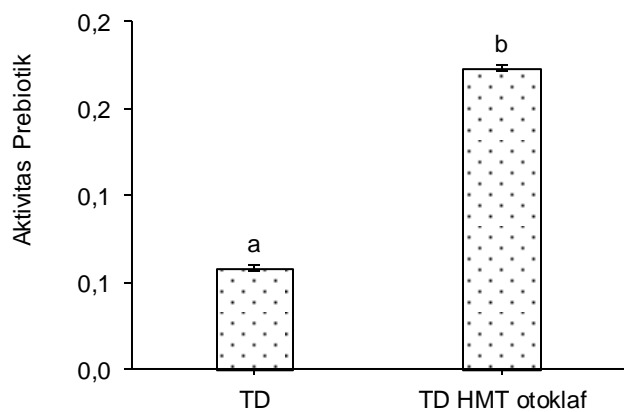
Pertumbuhan pada media m-MRSB lebih berpengaruh terhadap peningkatan BAL probiotik dibandingkan dengan media akuades. Media m-MRSB memiliki banyak nutrisi untuk pertumbuhan BAL probiotik. Nutrisi yang terkandung dalam m-MRSB selain sebagai sumber nitrogen juga terdapat sumber karbon dan mineral (mangan sulfat, triamonium sulfat, magnesium sulfat). Pada media akuades bakteri probiotik memanfaatkan ketersediaan sumber karbon pada sampel untuk kelangsungan hidupnya. TD-HMT otoklaf yang digunakan merupakan tepung daluga yang bebas gula sederhana, sehingga sumber karbon yang digunakan oleh bakteri probiotik berasal dari TD dan TD-HMT otoklaf. Bakteri probiotik memanfaatkan sumber karbon dalam bentuk oligosakarida dari RS dibandingkan dengan polisakarida dari pati dan serat. Hal ini dikarenakan oligosakarida memiliki derajat polimerisasi lebih rendah (>20) dibandingkan polisakarida. Amilosa dan amilopektin yang terhidrolisis selama perlakuan HMT menyebabkan penurunan nilai derajat polimerisasi pada bahan pangan sehingga menghasilkan polisakarida rantai pendek yang dapat dimanfaatkan BAL probiotik sebagai nutrisi. Beberapa penelitian secara *in vivo* dan *in vitro* melaporkan kemampuan tumbuh probiotik pada RS seperti yang dilakukan oleh Wichienchot *et al.* (2010) pada oligosakarida hasil ekstraksi pitaya dapat menstimulasi pertumbuhan probiotik sebanyak 2 log CFU/mL, hasil ini dibuktikan melalui analisis *in vivo* dimana keberadaan RS terbukti dapat meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* pada sekum dan kolon babi (He *et al.*, 2017; Beards *et al.*, 2010).



Gambar 3. Kemampuan tumbuh *L. plantarum* BSL pada media yang mengandung TD dan TD-HMT otoklaf. Huruf yang sama pada gambar menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada  $P < 0,05$

### Aktivitas prebiotik terhadap *E. coli* ATCC 25922

Aktivitas prebiotik pada TD dan TD-HMT otoklaf memiliki nilai sebesar 0,06 dan 0,17 dan berbeda nyata antara keduanya (Gambar 4). Menurut Huebner *et al.* (2007) nilai aktivitas prebiotik dapat bernilai negatif dan positif. Aktivitas prebiotik negatif menunjukkan bahwa bakteri probiotik dapat tumbuh lebih baik pada media yang mengandung glukosa dibandingkan prebiotik, sedangkan nilai positif menunjukkan bahwa komponen bahan pangan (RS) secara selektif dapat dimetabolisme oleh BAL probiotik, tetapi tidak dapat dimetabolisme oleh bakteri usus lain (patogen). TD dan TD-HMT otoklaf masih mengandung karbohidrat lainnya selain RS. Diduga probiotik dan *E. coli* ATCC 25922 memanfaatkan nutrisi dari selain RS untuk pertumbuhannya. Oleh karena itu, perlu dilakukan isolasi pati resisten dari TD dan TD-HMT otoklaf.



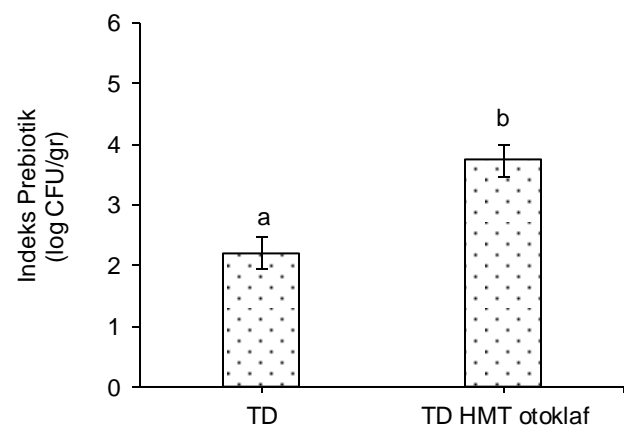
Gambar 4. Aktivitas prebiotik TD dan TD-HMT otoklaf terhadap *L. plantarum* BSL- *E.coli* ATCC 25922. Huruf yang sama pada gambar menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada  $P < 0,05$

Penelitian aktivitas prebiotik juga dilakukan oleh Rubel *et al.* (2014), *L. paracasei* yang ditumbuhkan pada inulin (IRC4) hasil ekstrak umbi yersalem artichoke menghasilkan aktivitas prebiotik bernilai positif, sedangkan Huebner *et al.* (2007) melaporkan *L. plantarum* 12006-*E. coli* dan *L. acidophilus* 33200-*E. coli* yang ditumbuhkan pada media inulin-S memiliki aktivitas prebiotik dibawah nol (negatif). Hal ini menunjukkan bahwa jenis dan strain probiotik yang diujikan mempengaruhi nilai aktivitas prebiotik (Agustina, 2016). Fermentasi RS oleh BAL probiotik di dalam usus besar menghasilkan asam lemak rantai pendek dan menyebabkan terjadi penurunan pH dalam usus sehingga mampu menekan pertumbuhan mikroorganisme patogen secara selektif serta menstimulasi pertumbuhan BAL probiotik (Almeida-Junior *et al.*, 2017). Penelitian secara *in vivo* membuktikan babi yang diberi pakan RS dapat mening-

katkan kandungan asam lemak rantai pendek pada sekum dan kolon (Haenen *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2014). Asam butirat meningkat dari 10,67 menjadi 21,48 mmol/L setelah 12 jam fermentasi (Zhang *et al.*, 2012).

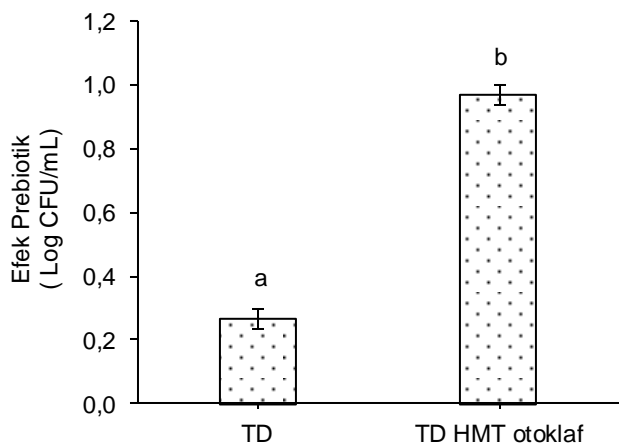
### Indeks dan efek prebiotik

Hasil pengujian TD dan TD-HMT otoklaf menghasilkan indeks prebiotik sebesar 2,20 dan 3,74 log CFU/g (Gambar 5), sedangkan nilai efek prebiotik adalah 0,27 dan 0,97 log CFU/mL (Gambar 6). TD-HMT otoklaf memiliki nilai efek dan indeks prebiotik lebih tinggi dibandingkan dengan TD yang berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri BAL probiotik, dan TD dan TD-HMT otoklaf berbeda nyata secara signifikan.



Gambar 5. Indeks prebiotik dari TD dan TD-HMT otoklaf. Huruf yang sama pada gambar menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada  $P < 0,05$

Manderson *et al.* (2005) melaporkan bahwa bahan pangan yang memiliki nilai indeks prebiotik di atas 2 dapat dinyatakan sebagai prebiotik. Berdasarkan hasil analisis, TD dan TD-HMT otoklaf dapat diindikasikan sebagai sumber prebiotik. Indeks prebiotik merupakan peningkatan populasi bakteri probiotik yang dikorelasikan dengan banyaknya jumlah prebiotik. BAL probiotik memanfaatkan nutrisi dari TD dan TD-HMT otoklaf sebagai sumber karbon bagi pertumbuhannya. Hasil yang sama dilaporkan Sousa *et al.* (2015), kandungan tepung umbi yakon dapat menstimulasi bakteri probiotik, hal ini dibuktikan dengan semakin meningkatnya produksi asam lemak rantai pendek dan asam organik sehingga dapat memberikan efek menguntungkan bagi kesehatan. Zhang *et al.* (2013) melaporkan hal yang sama bahwa keberadaan RS3 mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri di usus besar (*Bifidobacteria*, *L. plantarum*) serta meningkatkan produksi asam lemak rantai pendek.



Gambar 6. Efek prebiotik dari TD dan TD-HMT otoklaf. Huruf yang sama pada gambar menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada  $P < 0,05$

## KESIMPULAN

Modifikasi HMT berpengaruh terhadap perubahan kadar pati resisten yang mempengaruhi ketahanannya terhadap hidrolisis enzim. Modifikasi HMT mampu meningkatkan kadar pati resisten TD-HMT otoklaf sebesar 8,81%. Hasil evaluasi sifat prebiotik menunjukkan bahwa RS pada TD-HMT otoklaf memiliki sifat prebiotik yang lebih baik dibandingkan dengan TD meliputi ketahanan asam lambung (92%), indeks prebiotik (3,74 log CFU/g) dan aktivitas prebiotik sebesar 0,17. Dengan demikian, TD-HMT otoklaf berpotensi sebagai kandidat prebiotik karena memiliki kandungan RS yang cukup tinggi dan dapat menstimulasi pertumbuhan *L. plantarum* BSL.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Ares I, Martínez MA. 2016. Prebiotics. *Nutraceuticals* 2016: 757-775. DOI: 10.1016/b978-0-12-802147-7.0054-1.
- Agustina. 2016. Peningkatan kadar pati resisten tipe III pati daluga (*Cyrtosperma merkusii*. (Hassk) Schott) melalui modifikasi fisik dan kimia serta evaluasi sifat prebiotik secara *in vitro*. [Tesis]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Agustina, Faridah DN, Jenie BSL. 2016. Pengaruh retrogradasi dan perlakuan kelembaban panas terhadap kadar pati resisten tipe III daluga. *J Teknol Industri Pangan* 27: 78-86. DOI: 10.6066/jtip.2016.27.1.78.
- Almeida-Junior LD, Curimbaba TFS, Chagas AS, Quaglio AEV, Di Stasi LC. 2017. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa* sp. AAA) modulates oxidative stress and colonic SCFAs production in the TNBS model of intestinal inflammation. *J Funct Food* 38: 497-504. DOI: 10.1016/j.jff.2017.09.038.
- Amadou I, Gounga ME, Shi YH, Le GW. 2013. Fermentation and heat moisture treatment induced changes on the physicochemical properties of foxtail millet (*Setaria italica*) flour. *Food Bioprod Process* 92: 38-45. DOI: 10.1016/j.fbp.2013.07.009.
- Beards E, Tuohy K, Gibson G. 2010. Bacterial, SCFA and gas profiles of a range of food ingredients following *in vitro* fermentation by human colonic microbiota. *Anaerobe* 16: 420-425. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2010.05.006.
- Birt DF, Boylston T, Hendrich S, Jane JL, Hollis J, Li L, McClelland J, Moore S, Phillips GJ, Rowling M, Schalinske K, Scott MP, Whitley EM. 2013. Resistant starch: promise for improving human health. *Adv Nutr* 4: 587-601. DOI: 10.3945/an.113.004325.
- Bodinham CL, Frost GS, Robertson MD. 2010. Acute ingestion of resistant starch reduces food intake in healthy adults. *Br J Nutr* 103: 917-922. DOI: 10.1017/S0007114509992534.
- Chung HJ, Liu Q, Hoover R. 2009. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. *Carbohydr Polym* 75: 436-447. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.08.006.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 2002. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 87: 25-27. DOI: 10.1079/BJN/2002530.
- Fang L, Jiang X, Su Y, Zhu W. 2014. Longterm intake of raw potato starch decreases back fat thickness and dressing percentage but has no effect on the longissimus muscle quality of growing-finishing pigs. *Livest Sci* 170: 116-123. DOI: 10.1016/j.livsci.2014.10.004.
- [FAO] Food and Agricultural Organization. 2007. Technical Meeting On Prebiotics.
- Faridah DN, Rahayu WP, Apriyadi MS. 2013. Modifikasi pati garut (*Marantha arundinacea*) dengan perlakuan hidrolisis asam dan siklus pemanasan pendinginan untuk menghasilkan pati resisten tipe 3. *J Teknol Industri Pertanian* 23: 61-69.
- Fuentes-Zaragoza E, Riquelme-Navarrete MJ, Sánchez-Zapata E, Pérez-Álvarez JA. 2010. Resistant starch as functional ingredient - a review. *Food Res Int* 43: 931-942. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.02.004.
- Fuentes-Zaragoza EF, Sánchez-Zapata E, Sendra E, Sayas E, Navarro C, Fernández-López J,



- Pérez-Alvarez JA. 2011. Resistant starch as prebiotic - a review. *Starch-Stärke* 63: 406-415. DOI: 10.1002/star.201000099.
- [GMInsights]. 2017. Market research and consulting service provider. Prebiotics market. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/prebiotics-market> [ 4 Oktober 2017].
- Goñi I, García-Diz L, Mañas E, Saura-Calixto F. 1996. Analysis of resistant starch: A method for foods and food products. *Food Chem* 56: 445-449. DOI: 10.1016/0308-8146(95)00222-7.
- Haenen D, Zhang J, Silva CS, Bosch G, Meer IM, Arkel J, Borne JJGC, Gutiérrez OP, Smidt H, Kemp B, Müller M,5, Hooiveld GJEJ. 2013. A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine. *J Nutr* 143: 274-283. DOI: 10.3945/jn.112.169672.
- He X, Sun W, Ge T, Mu C, Zhu W. 2017. An increase in corn resistant starch decreases protein fermentation and modulates gut microbiota during *in vitro* cultivation of pig large intestinal inocula. *Anim Nutr* 3: 219-224. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.06.004.
- Huang TT, Zhou DN, Jin ZY, Xu XM, Chen HQ. 2016. Effect of repeated heat-moisture treatments on digestibility, physicochemical and structural properties of sweet potato starch. *Food Hydrocolloid* 54: 202-210. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.10.002.
- Huebner J, Wehling RL, Hutkins RW. 2007. Functional activity of commercial prebiotics. *Int Dairy J* 17: 770-775. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.10.006.
- Hung PV, Thi N, Huong M, Thi N, Phi L, Ngoc N, Tien T. 2016. Physicochemical characteristics and *in vitro* digestibility of potato and cassava starches under organic acid and heat-moisture treatments. *Int J Biol Macromol* 95: 299-305. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.074.
- Jenie BSL, Reski PP, Kusnandar F. 2012. Fermentasi kultur campuran bakteri asam laktat dan pemanasan otoklaf dalam meningkatkan kadar RS dan sifat fungsional tepung pisang tanduk (*Musa parasidiaca formatypica*). *J Pascapanen* 9: 18-26.
- Kaur N, Ariffin F, Bhat R, Karim AA. 2012. Progress in starch modification in the last decade. *Food Hydrocolloid* 26: 398-404. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.016.
- Kim JH, Sunako M, Ono H, Murooka Y, Fukusaki E, Yamashita M. 2009. Characterization of the C-terminal truncated form of amylopullulanase from *Lactobacillus plantarum* L137. *J Biosci* Bioeng 107: 124-129. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2008.10.019.
- Li S, Gao Q. 2010. Effect of heat-moisture treatment on the formation and properties of resistant starches from mung bean (*Phaseolus radiatus*) Starches. *Int J Nutr Food Eng* 4: 907-914. DOI: 10.5281/ZENODO.1057719.
- Lumba R, Christine FM, Gregoria SSD, Maria FS. 2013. Kajian pembuatan beras analog berbasis tepung umbi daluga (*Cyrtosperma merkusii* (Hassk) Schott). *J Ilmiah unsrat* 2: 1-12.
- Manderson K, Pinart M, Tuohy KM, Grace WE, Hotchkiss AT, Widmer W, Yadhav MP, Gibson GR, Rastall RA. 2005. *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *J Appl Environ Microbiol* 71: 8383-8389. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8383-8389.2005.
- Matalanis AM, Campanella OH, Hamaker BR. 2009. Storage retrogradation behavior of sorghum, maize and rice starch pastes related to amylopectin fine structure. *J Cereal Sci* 50: 74-81. DOI: 10.1016/j.jcs.2009.02.007.
- Moongngarm A. 2013. Chemical compositions and resistant starch content in starchy foods. *Am J Agr Biol Sci* 8: 107-113. DOI: 10.3844/ajabssp.2013.107.113.
- Nurhayati, Jenie BSL, Widowati S, Kusumaningrum HD. 2014. Komposisi kimia dan kristalinitas tepung pisang termodifikasi secara fermentasi spontan dan siklus pemanasan bertekanan pendinginan. *Agritech* 34: 146-150. DOI: 10.22146/agritech.9504.
- Roberfroid M. 2007. Prebiotics: The concept revisited. *J Nutr* 137: 830-837. DOI: 10.1093/jn/137.3.830S.
- Rubel IA, Pérez EE, Genovese DB, Manrique GD. 2014. *In vitro* prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. *Food Res Int* 62: 59-65. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.02.024.
- Scholz-Ahrens KE, Adolphi B, Rochat F, Barclay D V, de Vrese M, Açil Y, Schrezenmeir J. 2016. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats - impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. *NFS J* 3: 41-50. DOI: 10.1016/j.nfs.2016.03.001.
- Setiarto RHB, Jenie BSL, Faridah DN, Saskiawan I, Sulistiani. 2015. Seleksi bakteri asam laktat penghasil amilase dan pululanase dan aplikasinya pada fermentasi talas. *J Teknol Industri Pangan* 26: 80-89. DOI: 10.6066/jtip.2015.26.1.80.

- Setiarto RHB, Jenie BSL, Faridah DN, Saskiawan I, Sulistiani. 2018. Effect of lactic acid bacteria fermentation and autoclaving-cooling for resistant starch and prebiotic properties of modified taro flour. *Int Food Res J* 25: 1691-1697.
- Sousa S, Pinto J, Pereira C, Xavier Malcata F, Bertoldo Pacheco MT, Gomes AM, Pintado M. 2015. *In vitro* evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. *Food Bioprod Process* 95: 96-105. DOI: 10.1016/j.fbp.2015.04.003.
- Syahbanu F. 2015. Modifikasi Pati Garut (*Marantha arundinacea* L.) dengan Hidrolisis Asam, Siklus Autoclaving-Cooling, dan Heat Moisture Treatment (HMT) untuk Menghasilkan Pati Resisten Tipe III (RS3) [Skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Syamsir E, Purwiyatno H, Dedi F, Nuri A, Feri K. 2012. Pengaruh proses heat moisture treatment terhadap karakteristik fisikokimia pati. *J Teknologi dan Industri Pangan*. 13:100-106.
- Wichienchot S, Jatupornpipat M, Rastall RA. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem* 120: 850-857. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.11.026.
- Xiao Y, Liu H, Wei T, Shen J, Wang M. 2017. Differences in physicochemical properties and *in vitro* digestibility between tartary buckwheat flour and starch modified by heat moisture treatment. *LWT-Food Sci Technol* 86: 285-292. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.08.001.
- Zavareze ER, Dias ARG. 2011. Impact of heat moisture treatment and annealing in starches - a review. *Carbohydr Polym* 83: 317-328. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.08.064.
- Zhang H, Xu X, Jin Z. 2012. Fermentation characteristics of resistant starch from maize prepared by the enzymatic method *in vitro*. *Int J Biol Macromol* 51: 1185-1188. DOI: 10.1016/j.ijbio mac.2012.08.031.
- Zhang Y, Wang Y, Zheng B, Lu X, Zhuang W. 2013. The *in vitro* effects of retrograded starch (resistant starch type 3) from lotus seed starch on the proliferation of *Bifidobacterium adolescentis*. *Food Funct* 4: 1609-1616. DOI: 10.1039/c3fo60206k.
- Zheng J, Enright F, Keenan M, Finley J, Zhou J, Ye J, Greenway F, Senevirathne RN, Gissendanner CR, Manaois R, Prudente A, King JM, Martin, R. 2010. Resistant starch, fermented resistant starch, and short-chain fatty acids reduce intestinal fat deposition in *Caenorhabditis elegans*. *J Agr Food Chem* 58: 4744-4748. DOI: 10.1021/jf904583b.
- Zheng Y, Wang Q, Li B, Lin L, Tundis R, Loizzo MR, Zheng B, Xiao J. 2016. Characterization and prebiotic effect of the resistant starch from purple sweet potato. *Molecules* 21: 932. DOI: 10.3390/molecules21070932.