

PENGARUH KONSUMSI *FUNCTIONAL FOOD* TEPUNG GANYONG TERHADAP PENURUNAN KADAR KOLESTEROL

Meutia Zuhra, Inong Sri Rahayu, Aulia Rahmi

Program Studi D-III Keperawatan, STIKes Muhammadiyah Lhokseumawe
Program Studi S1 Ilmu Keperawatan, STIKes Muhammadiyah Lhokseumawe
E-mail: mzuhraa@gmail.com; israyu83@gmail.com; rahmiaulia9122@gmail.com

Abstract

Canna tubers (*Canna edulis* Kerr.) can be used as functional food for non-pharmacological treatment of hypercholesterolemia because canna tubers contain soluble fiber and antioxidant activity. This study aims to determine the effect of routine administration of functional food canna flour on changes in cholesterol levels in rats with hyperuricemia. This study used a one-way completely randomized design. Treatment with suspension of canna flour and sampling was carried out on days 1, 3, 7, 14, and 21. The determination of cholesterol levels in the blood of rats used the enzymatic method. Data on average cholesterol levels between treatment groups were statistically analyzed using the Kruskal-Wallis test (non-parametric) and followed by the Mann-Whitney test ($p < 0.05$). The results showed that canna flour can change blood cholesterol levels of rats suffering from gout by inducing potassium oxonate. The dose of canna flour that can reduce blood cholesterol levels is 0.75 g/KgBW and 1.5 g/KgBW, this is indicated by a significant decrease in the total AUC value in the group compared to the negative control. Overall, it can be concluded that the cholesterol-lowering activity of canna depends on the dose given, only in a certain dose range.

Keywords: Canna Edulis Kerr , Tepung Ganyong, Kolesterol, Functional Food

Abstrak

Umbi ganyong (*Canna edulis* Kerr) dapat menjadi functional food pada pengobatan hiperkolesterol secara non farmakologi karena umbi ganyong memiliki kandungan serat larut dan aktivitas antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian secara rutin functional food tepung ganyong terhadap perubahan kadar kolesterol pada tikus yang mengalami hiperurisemia. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola satu arah. Perlakuan pemberian suspensi tepung ganyong dan sampling tersebut dilakukan pada hari ke 1, 3, 7, 14, dan 21. Penetapan kadar kolesterol dalam darah tikus menggunakan metode enzimatis. Data kadar kolesterol rata-rata antara kelompok perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis (non parametrik) dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney ($p < 0.05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tepung ganyong dapat mengubah kadar kolesterol darah tikus yang menderita gout dengan induksi kalium oksonat. Dosis tepung ganyong yang dapat menurunkan kadar kolesterol darah yaitu 0,75 g/KgBB dan 1,5 g/KgBB, hal ini ditunjukkan dengan menurunnya nilai AUC total secara signifikan pada kelompok tersebut dibandingkan dengan kontrol negatif. Secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa aktivitas penurunan kolesterol dari ganyong tergantung pada dosis pemberian, hanya pada kisaran dosis tertentu.

Kata Kunci : Canna Edulis Kerr, Tepung ganyong, Kolesterol, Functional Food

PENDAHULUAN

Gout merupakan penyakit sendi yang menyebabkan gangguan metabolic, hal ini ditunjukkan dengan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL berhubungan positif dengan kadar asam urat [1]. Hiperurisemia pada pasien asam urat memiliki korelasi dengan gangguan metabolic [2]. Pasien dengan hiperuricemia dikaitkan dengan penyakit metabolic seperti hyperlipidemia dan diabetes, misalnya 61% pasien hiperurisemia memiliki hyperlipidemia [3].

Terapi untuk gout yang digunakan selama ini adalah obat golongan urikostatik, antiinflamasi non steroid (AINS), kortikosteroid, inhibitor siklooksigenase-2 (COX-2), dan kolkisin. Terapi farmakologi yang umumnya digunakan adalah allopurinol. Terapi alternatif dengan pengobatan non farmakologi dapat dilakukan dengan pengaturan gaya hidup serta pola makan yang terkontrol, bagi penderita gout sangat penting dalam mempertimbangkan manfaat dan resikonya, karena penyakit gout sangat terkait dengan peningkatan risiko penyakit kardiovaskular dan kematian. Penerapan diet tinggi serat dapat mempengaruhi profil lipid. Makanan yang tinggi serat terbukti dapat mengubah kadar kolesterol terutama makanan tinggi serat dalam sediaan larutan [4].

Pada penelitian sebelumnya ganyong dapat menjadi bahan baku untuk makanan yang dikonsumsi pada terapi Soluble dietary fiber (SDF) dan memiliki aktivitas antioksidan [5]. Ganyong adalah tanaman herba berumbi dengan kandungan karbohidrat yang lebih tinggi (88,2%) dibandingkan umbi-umbian lainnya. Keunggulan tersebut menjadi alasan untuk menjadikan ganyong sebagai pengganti beras dalam rangka diversifikasi pangan [6]. Lebih lanjut secara klinik dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam manajemen terapi penyakit hiperkolesterol dalam hal pengobatan secara non farmakologi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Pada penelitian ini digunakan

dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yang merupakan variabel yang dapat diubah-ubah dalam penelitian (meliputi variasi dosis perlakuan pada hewan uji tikus) akan didapatkan hasil berupa variabel terikat (variabel yang memiliki nilai yang berubah-ubah sebagai akibat dari variabel bebas) yang berupa efek peningkatan atau penurunan kadar kolesterol dalam darah.

Tikus jantan galur Sprague Dawley umur 10-12 minggu dipelihara dalam kandang berkelompok didalam laboratorium. Tiga puluh enam ekor tikus jantan dibagi menjadi 6 kelompok. Kelompok 1 sebagai kontrol normal yang menerima pelarut dan air. Kelompok 2 sebagai control negative hanya diberikan inductor hiperuricemia kalium oksonat 250 mg/kgBB. Kelompok 3 sebagai kontrol positif diberi allopurinol 5 mg/kgBB. Kelompok 4 diberi suspensi tepung ganyong 0,75 gram/kgBB. Kelompok 5 diberi suspensi tepung ganyong 1,5 gram/kgBB. Kelompok 6 diberi suspensi tepung ganyong 2,5 gram/kgBB. Dosis kalium oksonat yang dapat membuat hiperurisemia pada hewan uji yaitu 250 mg/kgBB. Dosis Allopurinol yang digunakan pada perlakuan hewan uji tikus dengan kondisi hiperurisemia yaitu 5 mg/kgBB tikus. Induksi hiperuricemia dilakukan dengan cara melarutkan kalium oksonat 250 mg/KgBB dalam CMC-Na 0,5%, diberikan melalui rute intraperitoneal pada setiap perlakuan hewan uji, dua jam setelah pemberian tepung ganyong pada hari ke-0, 3, 14, 21. Pemberian Allopurinol 5 mg/kgBB dan suspensi tepung ganyong secara oral dilakukan selama 7 hari berturut-turut. Pemberian suspensi tepung ganyong dilakukan 2 kali sehari. Pengambilan sampel darah pada tikus, dilakukan 2 jam setelah induksi kalium oksonat.

Analisis Data dilakukan dengan mengolah data absorbansi yang dicatat dan dihitung menjadi kadar kolesterol darah dalam satuan mg/dL. Kadar standar kolesterol yang tertera pada leaflet reagen CHOD-PAP yaitu 200 mg/dL kadar kolesterol total kemudian dilakukan analisa

dengan menggunakan uji statistik. Pengujian diawali dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui distribusi data dan uji Levene untuk mengetahui homogenitas data. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan uji statistik parametrik namun apabila tidak maka dilakukan uji statistik nonparametrik. Pada uji statistik parametrik, dilakukan uji Anova satu jalur untuk mengetahui apakah ada perbedaan kadar kolesterol pada tiap – tiap kelompok dan uji t Tukey untuk mengetahui letak perbedaan tersebut, sedangkan apabila dilanjutkan dengan uji statistik nonparametrik maka digunakan uji Kruskal Wallis untuk mengetahui apakah ada perbedaan kadar kolesterol pada tiap-tiap kelompok dan uji Mann Whitney untuk mengetahui letak perbedaan tersebut.

HASIL PENELITIAN

Pembuatan dan Analisis Tepung Ganyong

Pembuatan tepung ganyong dengan menggunakan bahan baku umbi ganyong sebanyak 1,5 Kg. Hasil tepung ganyong yang didapatkan sebanyak 200,0 g. Rendemen yang diperoleh pada pembuatan tepung dari umbi ganyong adalah 13,33%. Analisis kuantitatif terhadap tepung ganyong dilakukan di Laboratorium Uji Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Hasil analisis kuantitatif menunjukkan bahwa kandungan yang dominan terdapat dalam tepung ganyong adalah amilum dengan purata kadar 76,26%. Hasil uji ini tersaji pada Tabel I.

Tabel 1. Hasil Analisis Kuantitatif Tepung Ganyong

Sampel/ Kode	Macam Analisa	Hasil Analisa (%)		Mean ± SD
		Replikasi 1	Replikasi 2	
Tepung ganyong	Amilum	76,36	76,16	76,26 ± 0,14

Penetapan Operating Time (OT)

Penetapan Operating Time bertujuan untuk mengetahui waktu serapan yang optimum dari senyawa Kuinonimin (senyawa

berwarna merah) yang merupakan hasil reaksi bertahap antara kolesterol standar dengan reagen CHOD-PAP. Serapan dibaca pada panjang gelombang yang tertera pada leaflet reagen CHOD-PAP (Diasys) yaitu pada panjang gelombang 500 nm, tiap 1 menit. Parameter yang menunjukkan kestabilan senyawa kuinonimin terhadap serapan spektrofotometer yaitu jika pada waktu tertentu absoransi (serapan) larutan yang bernilai sama berturut-turut. Hasil penetapan operating time dari kolesterol standar dengan pereaksi CHOD-PAP pada panjang gelombang 500 nm. Waktu yang dapat memberikan serapan senyawa berwarna merah (kuinonimin) pada spektrofotometri daerah visibel secara optimum terjadi pada menit ke-4 sampai menit ke-6. Jika pembacaan serapan kurang dari OT, maka senyawa kuinonimin belum terbentuk sempurna dan apabila pembacaan serapan melebihi OT, maka senyawa yang terbentuk akan terdegradasi.

Penetapan Kadar Kolesterol Darah

Prinsip penetapan kadar kolesterol darah hewan uji menggunakan metode enzimatik photometric test yaitu kolesterol oksidase phenol aminoantipyrone (CHOD-PAP) adalah kolesterol pada plasma darah bereaksi dengan kolesterol esterase menghasilkan kolesterol bebas yang kemudian bereaksi dengan fenol,4-aminoantipyrine dengan katalis peroksidase membentuk quinoneimine yang berwarna merah. Quinoneimine inilah yang diukur absorbansinya.

Pada penelitian ini, tikus diberi suspensi tepung ganyong selama 21 hari dan diinduksi dengan induktor hiperurisemia kalium oksonat dan dilakukan pengambilan sampel darah dua jam berikutnya. Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke- 0, 3, 14, dan 21. Pengambilan darah pada hewan uji melalui sinus orbitalis dengan menggunakan pipa kapiler hematokrit, ditampung dalam tabung efendrof. Selanjutnya darah di sentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Plasma darah yang sudah dipisahkan dari hasil

sentrifugasi dipindahkan kedalam tabung-tabung kecil dan direaksikan dengan reagen CHOD-PAP, kemudian setelah operating time (OT) dibaca serapan larutan pada panjang gelombang yang didapat pada validasi metode ini. Data serapan (absorbansi) yang didapat dari sampling hari ke-0, 3, 14, 21 kemudian dihitung konversi menjadi data kadar kolesterol darah. Hasil dari perhitungan konversi data kadar kolesterol darah dari masing-masing kelompok didapatkan perubahan dari kadar normal. Purata kadar kolesterol darah lebih terperinci tersaji pada Tabel II.

Profil perubahan kadar kolesterol yang terjadi pada hari ke-3 terlihat pada Tabel III bahwa purata kadar kolesterol darah pada kelompok positif dan ganyong 0,75 g/KgBB lebih rendah dibandingkan kelompok positif. Kadar kolesterol darah kelompok ganyong 1,5 g/KgBB dan ganyong 2,5 g/KgBB lebih tinggi dibandingkan dengan purata kadar kolesterol darah pada kelompok kontrol negatif.

Pada kelompok perlakuan ganyong 0,75 g/KgBB perbedaan purata kadar kolesterol darah lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif, sedangkan purata kadar kolesterol darah pada kelompok perlakuan Ganyong 2,5 g/KgBB lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan hasil berbeda bermakna ($p < 0.05$). Setelah dilakukan uji LSD terhadap data kadar kolesterol darah keseluruhan, dapat diketahui bahwa tepung ganyong dapat mempengaruhi perubahan kadar kolesterol darah pada dosis 0,75 g/KgBB, 1,5 g/KgBB dan 2,5 g/KgBB terhadap kontrol negatif (tikus yang hanya diinduksi hiperurisemia dengan kalium oksonat) dengan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Ganyong dengan dosis 0,75 g/KgBB mengalami perubahan kadar kolesterol darah yang menunjukkan hasil lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dengan perbedaan bermakna pada hari ke-3 ($p = 0,009$), hari ke-14 ($p = 0,000$) dan hari ke-21 tidak berbeda bermakna. Pada dosis 1,5 g/KgBB terjadi perubahan kadar kolesterol darah yang berbeda bermakna,

dengan kadar kolesterol darah lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif, dengan perbedaan bermakna hanya pada hari ke-14 ($p = 0,013$). Perubahan kadar kolesterol darah pada kelompok dosis ganyong 2,5 g/KgBB lebih tinggi dari kontrol negatif pada hari ke-3 dengan perbedaan bermakna ($p = 0,002$).

Tabel 2. Purata Kadar Kolesterol Darah Pada Hari Ke-0, 3, 14, dan 21

Kelompok	Kadar Kolesterol ($\bar{X} \pm SE$)			
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-14	Hari ke-21
Kontrol Normal	68,38 $\pm 3,01$	66,24 $\pm 6,54$	87,62 $\pm 3,85$	84,08 $\pm 11,16$
Kontrol Negatif	86,35 $\pm 2,37$	62,56 $\pm 3,42$	89,77 $\pm 6,29$	86,31 $\pm 3,32$
Kontrol Positif	81,94 $\pm 3,63$	54,49 $\pm 3,39$	77,30 $\pm 4,76$	81,74 $\pm 11,85$
Ganyong 0,75g/KgBB	75,33 $\pm 4,29$	50,46 $\pm 1,36$	53,97 $\pm 8,42$	78,77 $\pm 12,32$
Ganyong 1,5g/KgBB	87,91 $\pm 2,08$	61,78 $\pm 4,26$	66,99 $\pm 5,75$	62,95 $\pm 3,39$
Ganyong 2,5g/KgBB	75,49 $\pm 3,03$	13475 $\pm 9,45$	78,61 $\pm 5,38$	73,57 $\pm 4,68$

Uji statistik data dilanjutkan dengan melakukan uji LSD terhadap AUC total (AUC_{0-21}) data tersebut diperoleh dari hasil perhitungan luas area dibawah kurva dari kurva kadar kolesterol darah pada hari ke-0 sampai hari ke-21 (Gambar 7). Hasil uji LSD AUC total (AUC_{0-21}) tersaji pada Tabel III.

Tabel 3. Hasil Uji LSD Nilai AUC Total (AUC_{0-21}) (mean $\pm$ se)

Kelompok	N	mg.dL ⁻¹ .hari	Keterangan
Normal	6	1649,14 $\pm$ 59,58	↓
Kontrol Negatif	6	1699,98 $\pm$ 107,47	-
Kontrol Positif	6	1549,29 $\pm$ 59,09	↓
Ganyong 0,75 g/KgBB	6	1227,60 $\pm$ 77,78	↓ a ($p = 0,000$)
Ganyong 1,5 g/KgBB	6	1387,60 $\pm$ 62,75	↓ a ($p = 0,010$)

Ganyong 2,5 6 2021,47 ± 98,02 ↑ a (p= 0,009)

Keterangan : ↑ = lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif, ↓ = lebih rendah dibandingkan kontrol negatif, a = berbeda bermakna dibandingkan kontrol negatif.

Perubahan kadar kolesterol yang terjadi, sehingga dapat diamati perbedaan kadar kolesterol semua kelompok. Pada kelompok normal dan kontrol positif perubahan yang terjadi adalah nilai AUC total (AUC₀₋₂₁) lebih rendah dari kelompok negatif namun tidak berbeda bermakna. Pada kelompok ganyong 0,75 g/KgBB, 1,5 g/KgBB dan 2,5 g/KgBB. Perubahan yang terjadi adalah nilai AUC total (AUC₀₋₂₁) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif dan berbeda bermakna dengan perbedaan bermakna masing-masing (p= 0,000) dan (p= 0,010). Hal ini menunjukkan bahwa tepung ganyong dapat mempengaruhi perubahan kadar kolesterol tikus yang menderita penyakit gout yaitu menurunkan kadar kolesterol darah hewan uji.

Sedangkan pada kelompok ganyong 2,5 g/KgBB perubahan yang terjadi adalah nilai AUC total (AUC₀₋₂₁) yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif dengan perbedaan bermakna (p= 0,009). Kadar kolesterol darah hewan uji justru meningkat dibandingkan kontrol negatif. Hal ini kemungkinan aktivitas penurunan kolesterol dari ganyong tergantung pada dosis pemberian. Artinya hanya pada kisaran dosis tertentu, dalam hal ini dosis dibawah 2,5g/KgBB yang mempunyai aktivitas penurunan kolesterol. Sedangkan pada dosis 2,5g/KgBB yang terjadi justru meningkatkan kadar kolesterol darah pada hewan uji.

PEMBAHASAN

Mekanisme Soluble Dietary Fiber Menurunkan Kadar Kolesterol

Menurut penelitian sebelumnya bahwa sebagian kecil masyarakat China dan masyarakat dewasa Prancis yang melakukan diet fiber (*dietary fiber*) dengan mengonsumsi asupan makanan kaya akan

serat mengalami penurunan prevalensi hipertensi, kadar kolesterol darah dan kadar trigliserida darah yang signifikan [7]. Hal tersebut menunjukkan bahwa asupan makanan yang mengandung kadar serat tinggi dapat mempengaruhi perubahan kadar kolesterol darah. Aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ganyong juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi terjadinya perubahan kolesterol darah hewan uji, aktivitas antioksidan dapat menurunkan kadar kolesterol dengan mekanisme aktifitas antioksidan dari senyawa-senyawa aktif yang dimiliki oleh tepung ganyong, meningkatkan metabolisme kolesterol menjadi asam empedu, dan meningkatkan ekskresi asam empedu melalui feses.

Mekanisme Karbohidrat Mempengaruhi Perubahan Kadar Kolesterol

Ganyong memiliki sumber karbohidrat yang dapat mempengaruhi perubahan kadar kolesterol darah (menormalkan kadar kolesterol darah) pada tikus yang diinduksi kalium oksonat. *Canna edulis* dapat dijadikan bahan baku utama dalam produksi makanan yang mengandung serat larut air (*soluble dietary fiber*), yang dapat menjadi bahan tambahan baru untuk penelitian dan pengembangan makanan fungsional (*functional food*). Maka dapat disimpulkan bahwa tepung ganyong dapat menjadi *functional food* yang dapat menurunkan kadar kolesterol darah bagi penderita penyakit gout dan berpotensi sebagai makanan pokok bersumber karbohidrat tinggi untuk masyarakat Indonesia. Tepung ganyong umumnya memiliki kandungan protein yang lebih tinggi dibanding tepung ubi jalar, namun lebih rendah dari daripada tepung terigu, tepung jagung dan ubi kayu, akan tetapi kandungan karbohidratnya lebih tinggi. Ganyong mempunyai kadar tepung 90% dan amilosa 31.3-38.9%. Tepung terdiri dari dua tipe: amilosa, poliglukan berantai lurus yang terdiri dari sekitar 1000 α-D (1→4) glukosa; dan amilopektin, glukukan yang bercabang yang terdiri dari sekitar 4000 unit glukosa dengan banyak cabang dengan ikatan α-D

(1→6). Di dalam granula, tepung terperangkap kuat. Struktur molekular ini membuat tepung sulit untuk diakses oleh enzim-enzim pencernaan seperti amylase. Amilosa dan amilopektin yang terkandung didalam tepung ganyong diduga berperan dalam menurunkan kadar kolesterol hewan uji, diketahui bahwa hasil akhir metabolisme amilosa di dalam tubuh adalah glukosa, dapat dilihat pada gambar 13 bahwa dengan bantuan *enzyme amyloglukosidase* dan *enzyme amylase* dapat terbentuk glukosa (Zhang & Wang, 2013).

KESIMPULAN

Funcinal food tepung ganyong dapat menurunkan kadar kolesterol darah hewan uji tikus yang menderita gout dengan induksi kalium oksonat. Dosis *funcinal food* tepung ganyong yang dapat menurunkan kadar kolesterol darah pada tikus yang menderita penyakit gout dengan induksi kalium oksonat yaitu 0,75 g/KgBB dan 1,5 g/KgBB.

SARAN

Perlu pengkajian lebih lanjut terhadap pengaruh tepung ganyong terhadap penurunan kadar kolesterol, karena dapat menjadi salah satu penyelesaian masalah dalam pola makan penderita kolesterol dan juga menjadi salah satu alternative terapi nonfarmakologi bagi penderita kolesterol.

REFERENSI

1. Son, M., Seo, J., & Yang, S. (2020). Association between dyslipidemia and serum uric acid levels in Korean adults: Korea national health and nutrition examination survey 2016-2017. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228684>
2. Jung, J. H., et al. (2018). Metabolic syndrome: Prevalence and risk factors in korean gout patients. *Korean Journal of Internal Medicine*, 33(4), 815–822. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.062>
3. Elfishawi, M. M., et al, (2018). The rising incidence of gout and the increasing burden of comorbidities: A population-based study over 20 years.

Journal of Rheumatology, 45(4), 574–579. <https://doi.org/10.3899/jrheum.170806>

4. Schoeneck, M., & Iggman, D. (2021). The effects of foods on LDL cholesterol levels: A systematic review of the accumulated evidence from systematic reviews and meta-analyses of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 31(5), 1325–1338. <https://doi.org/10.1016/J.NUMECD.2020.12.032>
5. Dayu Putri, V., & Dyna, F. (2019). Standarisasi ganyong (canna edulis ker) sebagai pangan alternatif pasien diabetes mellitus. *Jurnal Katalisator*, 4(2), 111. <https://doi.org/10.22216/jk.v4i2.4567>
6. Noriko, N., & Alfiah, E. (2020). Upaya meningkatkan kesehatan masyarakat dan sosialisasi sumber bahan pangan menyehatkan (tepung cannalina). *Jurnal Pemberdayaan Masyarakat Universitas Al Azhar Indonesia*, 2(1). <https://doi.org/10.36722/jpm.v2i1.366>
7. Zhang, J., & Wang, Z. W. (2013). Soluble dietary fiber from Canna edulis Ker by-product and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 92(1). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.067>