

IN VITRO IRON AVAILABILITY AND ADSORPTION PATTERN ON COMBINATION OF ACIDITY AND LENGTH OF BOILING TIME ON YARD LONG BEAN

Ketersediaan Fe *In Vitro* dan Pola Adsorpsi pada Kombinasi Derajat Keasaman dan Lama Perebusan Kacang Panjang

Leny Yuanita

Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
State University of Surabaya, Surabaya

Received 25 February 2005; Accepted 28 April 2005

ABSTRACT

The aim of the study is to find iron availability and binding pattern by dietary fiber macromolecule on combination of acidity and length of boiling time, through K_{ads} and K_{eff} , boiling proceeds at the level of pH 4 and 7 with boiling time at 0 (raw), 5, 15, and 25 minutes. Iron availability and adsorption pattern were analyzed through Miller's *in-vitro* and Langmuir-Scatchard graph methods. The results of the study showed: (1) the highest iron availability occurs at raw-pH4 treatment; (2) decreasing pH and increasing boiling time decrease K_{ads} , K_{eff} , percent iron bound, and increase iron availability; (3) iron binding pattern by dietary fiber macromolecules through formation of complex compound was more prominent than physical adsorption, involving two types of specific binding sites, one of which showed a higher affinity.

Keywords: iron availability, adsorption pattern, dietary fiber, acidity (pH), boiling time

PENDAHULUAN

Serat pangan tidak dapat dicerna oleh enzim saluran pencernaan manusia dan tidak mempunyai nilai gizi, tetapi memberi pengaruh positif bagi kesehatan tubuh, sehingga penggunaan serat pangan sangat dianjurkan bagi kesehatan. Disamping efek fisiologis positif, diet tinggi serat pangan juga mengakibatkan efek fisiologis yang negatif. Di antara efek negatif yang ditimbulkan adalah penurunan ketersediaan mineral, akibat kemampuan makromolekul serat pangan mengabsorpsi berbagai mineral.

Absorpsi mineral oleh serat pangan berhubungan dengan beberapa sifat fisiko-kimia serat pangan, antara lain: kemampuan serat pangan pada pengikatan kation mineral, penurunan waktu transit, dan penurunan konsentrasi mineral dengan meningkatnya timbunan feses. Pengikatan mineral Fe merupakan penyebab utama penurunan absorpsi dan ketersediaan hayati mineral Fe [1]. Pengikatan mineral oleh serat pangan dipengaruhi oleh pH medium, sumber, tipe serat, konsentrasi serat dan mineral, proses pengolahan, dan adanya zat yang menghambat atau meningkatkan pengikatan mineral.

Kacang panjang (*Vigna sesquipedalis* (L) Fruhw) adalah salah satu jenis sayur dengan kadar serat pangan total yang tinggi (49,47% bobot

kering) [2], dikonsumsi sebagai lalapan atau dengan berbagai macam pengolahan dan derajat keasaman. Komponen utama serat pangan sayur adalah senyawa pektat, hemiselulosa, lignin dan selulosa, dan masing-masing mempunyai efek fisiologis berbeda, disebabkan perbedaan sifat fisika dan kimianya. Pengolahan dengan berbagai derajat keasaman medium mempengaruhi tekstur, komposisi dan struktur kimia komponen serat pangan; demikian pula terhadap bentuk kimia Fe dalam ikatannya dengan berbagai senyawa. Pada uji pengaruh kombinasi pH dan lama perebusan terhadap kadar komponen serat pangan kacang panjang, didapatkan bahwa interaksi pH dan lama perebusan berpengaruh terhadap kadar komponen serat pangan [3]. Oleh karenanya, proses pemasakan dengan berbagai derajat keasaman akan mengubah pengaruh fisiologis pengikatan Fe oleh serat pangan pada sepanjang saluran pencernaan.

Jumlah Fe terikat dan terabsorpsi dapat diperoleh melalui metode *in-vitro* penentuan ketersediaan Fe, yang merupakan metode sederhana, cepat dan tidak memerlukan biaya mahal. Miller *et al.* [4] menerapkan metode *in-vitro* dengan mencontoh kondisi proses pencernaan yang terjadi pada gastrointestinal, yaitu melalui pengaturan pH dengan proses dialisis dan penggunaan enzim komersial. Ketersediaan Fe diestimasi dari Fe terdialisis yaitu Fe terlarut

* Email address : elji@sby.dnet.net.id

dengan massa molekul relatif rendah, dan dibandingkan dengan total Fe terlarut. Menurut Schircker *et al.*[5], penentuan ketersediaan Fe secara *in-vitro* metode Miller adalah akurat untuk estimasi ketersediaan Fe bukan hem serta terdapat korelasi positif yang sangat signifikan antara metode *in-vitro* dengan *in-vivo* pada manusia.

Torre *et al.* [6] mengemukakan sedikitnya ada 3 mekanisme interaksi yang mungkin terjadi antara komponen serat pangan sebagai makromolekul dan ion logam sebagai ligan, yaitu melalui adsorpsi fisik, pembentukan kompleks dan penukar ion; sedangkan menurut Thibault *et al.* [7], serat pangan sayuran tergolong penukar kation yang lemah dan monofungsional. Sayuran sebagai bahan alam mengandung berbagai asam organik, oleh karenanya di antara ketiga mekanisme interaksi dalam sistem tersebut, yang dapat memberi pendekatan secara sederhana adalah adsorpsi fisik dan pembentukan senyawa kompleks. Parameter pengikatan spesifik pada adsorpsi fisik yaitu K_{ads} (konstanta adsorpsi) dan pembentukan kompleks yaitu K_{eff} (konstanta stabilitas efektif) dapat diperoleh masing-masing dari geometri grafik Langmuir dan Scatchard.

Penelitian ini bertujuan: 1) mengetahui bagaimana pengaruh kombinasi pH dan lama perebusan kacang panjang terhadap ketersediaan Fe, 2) mendapatkan pola adsorpsi Fe oleh makromolekul serat pangan melalui K_{ads} dan K_{eff} , sehingga dapat digunakan untuk menjelaskan perubahan ketersediaan Fe. Hasil penelitian akan bermanfaat untuk memprediksi perilaku mineral "asam keras" lain terhadap makromolekul serat pangan.

Permasalahan penelitian adalah: Bagaimana pengaruh kombinasi pH dan lama perebusan terhadap persentase Fe terikat, Fe terdialisis, K_{ads} dan K_{eff} . Analisis ketersediaan dan adsorpsi Fe oleh makromolekul serat pangan dilakukan melalui metode *in-vitro* Miller dan grafik Langmuir-Scatchard.

METODE PENELITIAN

Bahan

Kacang panjang diperoleh secara *random sampling* dari populasi kacang panjang (*Vigna sesquipedalis* (L) Fruhw), varietas hijau super, berkualitas baik pada usia panen, dan ditanam di Tosaren-Kediri. Larutan untuk perebusan pH 7 adalah akuabides bebas Fe, dan untuk pH 4 adalah bufer sitrat bebas Fe. Bufer sitrat terdiri dari 13,8666 g/660 mL larutan asam sitrat monohidrat (Merck) dan 9,9994 g/340 mL larutan natrium sitrat dihidrat (Merck). Untuk mencontoh kondisi alat pencernaan digunakan pepsin (Sigma), pankreatin

(Sigma), ekstrak bile (Sigma), dan membran dialisis Spektra/Por 6000-8000 MWCO (Fisher). Pada pengaturan pH bahan digunakan asam klorida dan natrium bikarbonat.

Bahan analisis *in-vitro* terdiri dari campuran tepung kacang panjang, terigu, maizena, ikan, susu skim, kalsium, vitamin dan minyak goreng, dengan perbandingan seperti pada uji ketersediaan hayati Fe [3]. Agar diperoleh kadar serat pangan tinggi dan kandungan protein bahan $\pm 2,00$ g, maka tepung kacang panjang yang digunakan adalah 3,75 g dan berat campuran bervariasi. Terdapat 8 macam bahan analisis *in-vitro* yang berkadar serat pangan tinggi ($\pm 18\%$), iso protein ($\pm 2,00$ g) dan Fe ($\pm 0,75$ mg).

Bahan analisis kadar Fe: serbuk Fe p.a, asam klorida dan asam nitrat pekat, hidroksil amonium klorida (Sigma), batofenantrolin sulfonat (Sigma), natrium asetat, dan asam trikloro asetat.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: freeze dryer, juicer, blender, ayakan 100 mesh, pH meter, sentrifus, ultrasentrifus (Hitachi 55P7), shaker waterbath SWB 20 (Haake), vorteks, oven, hot plate, spektrofotometer sinar tampak Vis 6000 (Kruss), dan berbagai peralatan gelas antara lain labu takar, erlenmeyer, gelas piala, pipet volume.

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan: eksperimen murni di laboratorium, rancangan faktorial 2×4 . Kondisi perlakuan terhadap kacang panjang: faktor pertama adalah derajat keasaman (pH) medium, yaitu 4 dan 7 serta faktor kedua adalah lama perebusan, yaitu 0 menit (tanpa perebusan), 5, 15 dan 25 menit.

Variabel penelitian sebagai berikut: pH dan lama perebusan (v. bebas); Fe terikat, Fe terdialisis, K_{ads} dan K_{eff} (v. terikat); struktur, komposisi komponen serat pangan, metode analisis, pH pengikatan, konsentrasi Fe dan serat pangan (v. kontrol); senyawa-senyawa yang dapat berikatan dengan Fe dan serat pangan pada kondisi fisiologis (v. *confounding*).

Prosedur Penelitian

Kacang panjang hasil perlakuan kombinasi pH dan lama perebusan, dihancurkan dan dikering-bekukan beserta medium atau air rebusan; kemudian digiling hingga lolos dari ayakan 100 mesh. Tepung kacang panjang digunakan untuk pembuatan bahan analisis *in-vitro* Miller.

Disiapkan sejumlah campuran pakan, diaduk hingga homogen. Kemudian ditimbang sejumlah 7,02, 6,92, sampai 6,32 g bahan campuran dan

minyak pada gelas piala 250 mL. Masing-masing campuran tersebut dikukus selama 15 menit, kemudian ditambahkan 3,75 g tepung kacang panjang. Pada campuran ditambahkan aquabides bebas Fe hingga volumenya 75 mL dan diaduk sampai homogen. Selanjutnya bahan ditetesi dengan HCl 6 N sambil diaduk rata dan mencapai pH 2. Sambil diaduk, aliquot sampel dibagi menjadi 4 bagian yaitu: (a) 20 g untuk asam tertitrisasi, (b) 2 x 20 g untuk Fe terdialisis, dan (c) 5 g untuk Fe total.

Penentuan Fe terdialisis.

Ke dalam sampel a dan b ditambahkan 1 mL suspensi enzim pepsin dan gelas piala ditutup dengan plastik yang berlubang. Kemudian diinkubasi selama 2 jam 37 °C dalam *shaker water bath*. Selanjutnya sampel b disimpan dalam *freezer* bersama-sama sampel c hingga saat akan digunakan, dan sebelum digunakan sampel dicairkan.

Terhadap sampel a yang telah diinkubasi, ditambahkan 5 mL pankreatin-bile dan dititer dengan KOH 0,5 N sampai pH 7,5. Kantong dialisis disiapkan dan diisi 20 mL NaHCO₃ dengan konsentrasi yang diperoleh dari hasil titrasi KOH. Kantong dialisis diikat dengan benang dan direndam dalam larutan NaHCO₃ dengan konsentrasi yang sama, hingga saat digunakan.

Sampel b beku (untuk Fe terdialisis) dibiarkan mencair, dan kantong dialisis yang telah disiapkan direndam dalam larutan sampel b. Gelas piala ditutup dengan plastik berlubang, dan diinkubasi hingga sampel b mencapai pH 5 (\pm 30 menit). Ditambahkan 5 mL campuran pankreatin dan ekstrak empedu ke dalam setiap gelas piala dan inkubasi dilanjutkan selama 2 jam. Kantong dialisis dibersihkan dengan akuabides bebas Fe, isi kantong dialisis diukur sebagai volume dialisat. Dua puluh lima mL aliquot untuk merendam kantong dialisis disentrifus dengan kecepatan 12500 x g selama 30 menit, dan diukur volume supernatannya.

Masing-masing 2 mL dialisat dan supernatan dimasukkan dalam tabung sentrifus dan ditambahkan 1 mL protein presipitan, kemudian dibiarkan semalam dan disentrifus pada 3400 rpm selama 10 menit. Masing-masing diambil 2 mL supernatannya, ditambahkan 1 mL larutan batofenantrolin, diaduk dengan vorteks dan dibiarkan 30 menit. Terhadap masing-masing 2 mL larutan Fe standar ditambah 1 mL protein presipitan dan 1,5 mL batofenantrolin. Absorbansi larutan standar, supernatan dan dialisat diukur pada panjang gelombang 533 nm menggunakan spektrofotometer.

Penentuan Fe total

Ditimbang sejumlah sampel dan dipanaskan dalam oven hingga diperoleh berat konstan. Diabukan pada suhu 450 °C selama 1 jam dan kemudian didinginkan. Ditambahkan 1 mL HNO₃ pekat dan dikeringkan di atas *hot plate*. Diabukan kembali pada suhu 450 °C selama 1 jam, dan kemudian didinginkan. Ditambahkan 1 mL HCl pekat dan diaduk. Cawan ditutup, dibiarkan selama 2 jam. Selanjutnya ditambahkan 2 mL aquabides bebas Fe dan diaduk.

Isi cawan dipindahkan ke dalam labu ukur 25 ml dan ditepatkan volumenya dengan HCL 0,1 N. Dikocok hingga homogen. Terhadap 2 ml larutan sampel ditambahkan 1 mL larutan hidroksil amonium klorida 3% dan 1,5 mL larutan batofenantrolin. Konsentrasi Fe total ditentukan berdasarkan pembacaan absorbansi pada λ 533 nm dengan spektrofotometer yang telah dikalibrasi dengan larutan standar.

Perhitungan

Fe terlarut, terdialisis dan total dihitung sebagai berikut.

$$\text{Fe terlarut} = \frac{[(\mu\text{g Fe/mL supernatan} \times \text{mL supernatan}) + (\mu\text{g Fe/mL dialisat} \times \text{mL dialisat})]}{(\mu\text{g /g Fe total} \times \text{g sampel})} \times 100\%$$

$$\text{Fe terdialisis} = \frac{(\mu\text{g Fe/mL dialisat} \times \text{mL dialisat})}{(\mu\text{g /g Fe total} \times \text{g sampel})} \times 100\%$$

$$\text{Fe total } (\mu\text{g/g}) = \frac{(\mu\text{g / mL Fe dalam sampel} \times 25 \text{ mL})}{\text{berat sampel}}$$

Volume supernatan dan dialisat dalam mL; berat sampel dalam gram

$K_{\text{Fe terikat}}^{\text{eff}}$ diperoleh dari kemiringan grafik Scatchard ($\text{Fe terikat} / \text{Fe bebas}$ vs. Fe terikat), sedangkan $K_{\text{Fe terikat}}^{\text{ads}}$ diperoleh dari intersep ordinat grafik Langmuir ($\text{Fe terikat} / \text{Fe terikat}^{\text{ditambahkan}}$ vs. Fe ditambahkan).

Analisis Data

Untuk menguji pengaruh interaksi pH dan lama perebusan terhadap persentase Fe terikat dan terdialisis digunakan Anova *Two Way* dan uji lanjut LSD ($\alpha = 5\%$). Untuk menguji pengaruh interaksi pH dan lama perebusan terhadap pola adsorpsi (K_{ads} dan K_{eff}) digunakan metode grafik Langmuir dan Scatchard.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pH dan lama perebusan terhadap persentase Fe terikat

Hasil pada Tabel 1 menunjukkan: interaksi pH dan lama perebusan berpengaruh terhadap persentase Fe terikat ($p=0,000$). Penurunan pH dan

peningkatan lama perebusan menyebabkan penurunan persentase Fe terikat.

Penurunan Fe terikat pada perebusan dengan medium pH 4 dan 7 disebabkan meningkatnya hidrolisis ikatan glikosidik pektat pada pH 4 dan eliminasi- β pada pH 7, hidrolisis asam terhadap hemiselulosa, kelabilan ikatan antar rantai selulosa. Menurut Camire dan Clydesdale [8], perubahan jumlah Fe terikat oleh lignin pada perebusan merupakan akibat terjadinya perubahan faktor sterik struktur lignin. Perubahan ikatan antar monomer maupun polimer tersebut mengakibatkan perubahan jarak letak gugus-gugus fungsional yang mampu berikatan dengan Fe, sehingga menurunkan Fe terikat.

Pada perebusan juga terjadi perubahan inositolpentafosfat dan inositolheksafosfat menjadi inositoltetrafosfat dan trifosfat, dan membentuk kompleks larut dengan Fe(III). Disamping itu protein mengalami denaturasi pada perebusan (terutama pada pH 4), sehingga protein lebih rentan terhidrolisis oleh enzim proteolitik menjadi asam amino atau peptida. Hasil hidrolisis ini berikatan dengan Fe(III) membentuk kompleks larut dan masa molekul relatif (M_r) rendah.

Pada proses perebusan kondisi pH asam, terjadi pula reaksi antara fruktosa dan glukosa membentuk diasetilformosin dan berbagai senyawa hasil antara yang disebut senyawa reduktion. Senyawa ini mereduksi Fe(III) menjadi Fe(II), sehingga hasil perlakuan perebusan pada pH 4 akan menghasilkan Fe terikat yang lebih rendah daripada pH 7.

Pengaruh pH dan lama perebusan terhadap persentase Fe terdialisis

Kadar Fe terdialisis diperoleh melalui prosedur yang mencontoh kondisi pada sistem pencernaan, sehingga ketersediaan Fe dapat diestimasi dari kadar Fe terdialisis. Pengaturan kondisi pH

lambung (pH 2) berperan pada pelepasan Fe dari bahan makanan selama pencernaan pepsin; dan Fe dibebaskan pada inkubasi pepsin selama 50-180 menit. Menurut Miller *et al.* [4], agar inaktivasi asam terhadap pankreatin dapat dihindari maka diperlukan inkubasi awal dengan pankreatin selama 30 menit, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi pankreatin kembali selama 2,5 jam agar dihasilkan konsentrasi Fe dialisis yang secara akurat dapat diukur oleh batofenantrolin. Membran dialisis 6000-8000 MWCO digunakan untuk memperoleh hasil yang menyerupai pencernaan bahan makanan oleh pepsin pankreatin dengan masa molekul relatif 2550-6250, serta perubahan yang bertahap dari pH asam ke alkalis seperti pada sistem pencernaan [4].

Berdasarkan analisis pada Tabel 2 dikemukakan: (1) Interaksi pH dan lama perebusan berpengaruh terhadap persentase Fe terdialisis ($p = 0,000$); (2) Pada perebusan, penurunan pH dan peningkatan lama perebusan mengakibatkan peningkatan persentase Fe terdialisis; sedangkan tanpa perebusan, terjadi pada penurunan pH; (3) Persentase Fe terdialisis tertinggi pada perlakuan pH 4-tanpa perebusan.

Pada kondisi tanpa perebusan, asam organik berperan efektif dalam meningkatkan Fe terdialisis dengan mencegah polimerisasi feri hidroksi hidrat pada pH duodenum (4,7-7,2); karena asam askorbat, malat, sitrat dapat membentuk kelat dengan Fe(II) dan Fe(III) yang bersifat stabil serta larut pada pH asam maupun alkalis. Menurut Shils *et al.* [9], asam askorbat bersifat stabil pada pH asam, sebagai pereduksi, pengkelat dan penghalang ikatan Fe dengan ligan pengendap misalkan fitat, tanin, oksalat dan karbonat. Di antara berbagai faktor pendorong absorpsi Fe bukan hem, yang paling berperan meningkatkan absorpsi Fe adalah asam askorbat.

Tabel 1 Rerata persentase Fe terikat (pengaruh pH dan lama perebusan)

pH	Lama perebusan (menit)				F;p
	0	5	15	25	
7	85,926 \pm 1,275 ^b	79,890 \pm 0,969 ^{af}	81,478 \pm 0,847 ^e	75,707 \pm 1,485 ^d	F [*] =31,267; p [*] =0,000
4	80,814 \pm 2,637 ^{ae}	79,719 \pm 1,243 ^{ac}	78,583 \pm 2,402 ^{cf}	78,402 \pm 2,402 ^c	

Keterangan: ^{a-f} Nilai rerata \pm standar deviasi dari 8 replikasi. Tanda huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

* F hitung dan taraf signifikansi p untuk interaksi pH dan lama perebusan (Anova Two Way)

Tabel 2 Rerata persentase Fe terdialisis (pengaruh pH dan lama perebusan)

pH	Lama perebusan (menit)				F;p
	0	5	15	25	
7	3,708 \pm 0,492 ^d	2,169 \pm 0,383 ^c	2,235 \pm 0,521 ^c	2,924 \pm 0,489 ^d	F [*] =30,675; p [*] =0,000
4	4,529 \pm 0,301 ^a	1,927 \pm 0,437 ^c	2,811 \pm 0,578 ^d	3,219 \pm 0,694 ^d	

Keterangan: ^{a-d} Nilai rerata \pm standar deviasi dari 8 replikasi. Tanda huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

* F hitung dan taraf signifikansi p untuk interaksi pH dan lama perebusan (Anova Two Way)

Tabel 3 K_{eff} dan K_{ads} untuk pengikatan Fe oleh serat pangan kacang panjang

Perlakuan		Konstanta stabilitas efektif		Konstanta adsorpsi
pH	LP (menit)	$K_{\text{eff}1}$	$K_{\text{eff}2}$	K_{ads}
7	0	13,4099	2,1397	0,2751
7	5	2,8202	1,6671	0,2344
7	15	1,8759	1,1543	0,1784
7	25	1,2557	0,9767	0,1713
4	0	5,1367	2,8830	0,1723
4	5	1,3554	1,7925	0,1290
4	15	1,2884	0,5178	0,0664
4	25	0,5382	0,7286	0,0363

Kompleks kelat Fe (III)-fruktosa dapat terdialisis pada pH duodenum disebabkan stabilitasnya yang tinggi serta kelarutannya pada kondisi asam maupun alkalis; oleh karenanya fruktosa juga berperan meningkatkan Fe terdialisis pada kondisi tanpa perebusan.

Pada perebusan, asam askorbat dan asam-asam organik lainnya mengalami degradasi; oleh karenanya asam askorbat yang telah mengalami oksidasi tersebut hampir tidak mempunyai pengaruh dalam memperkuat absorpsi Fe. Dengan demikian, pada peningkatan lama perebusan, perubahan stabilitas ikatan, kadar dan struktur komponen serat pangan serta penurunan kadar senyawa penghambat dialisis (antara lain protein atau asam fitat) lebih berperan terhadap persentase Fe terdialisis daripada asam organik dan sakarida fruktosa. Hal ini sesuai dengan pendapat Frolich [10] bahwa proses pemasakan mempengaruhi ketersediaan hayati Fe terutama disebabkan karena reorganisasi terhadap komponen serat pangan dan pemecahan asam fitat. Reorganisasi komponen serat pangan meliputi perubahan ionisasi gugus $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, maupun kestabilan ikatan serta pemutusan ikatan antar monomer atau polimer.

Persentase Fe terdialisis pada kelompok perlakuan pH 4 lebih tinggi daripada perlakuan pH 7. Selain terjadi denaturasi protein dan pembentukan senyawa reduktan, kondisi pH 4 sangat menguntungkan bagi kestabilan asam-asam organik yang berperan meningkatkan Fe terdialisis. Misalkan asam askorbat teroksidasi pada pH netral dan alkalis tetapi stabil pada pH asam. Buffer sitrat yang belum terdegradasi juga berperan dalam meningkatkan persentase Fe terdialisis pada perlakuan pH 4, disebabkan tingginya perbandingan $\text{citrato}/\text{Fe}$ sehingga terbentuk kelat larut $[\text{FeCit}_2]^{5-}$ pada kondisi pH duodenum.

Metode grafik untuk pengikatan Fe oleh serat pangan kacang panjang

Berdasarkan metode grafik Scatchard dan Langmuir, diperoleh harga konstanta stabilitas efektif ($-$ kemiringan) dan konstanta adsorpsi (kemiringan/intersep) sebagai berikut pada Tabel 3.

Garis lurus dengan kemiringan positif pada grafik Langmuir menunjukkan bahwa pengikatan Fe oleh serat pangan kacang panjang melibatkan proses adsorpsi yang mengikuti hukum adsorpsi isotherm Langmuir. Konstanta stabilitas efektif terdapat dalam dua harga, menunjukkan bahwa terdapat dua tipe sisi ikatan spesifik pada makromolekul serat pangan kacang panjang untuk pengikatan Fe, melalui pembentukan senyawa kompleks. Hasil pada Tabel 3 menunjukkan bahwa $K_{\text{eff}} > K_{\text{ads}}$, berarti pengikatan Fe oleh serat pangan melalui pembentukan kompleks lebih dominan daripada adsorpsi [6].

Penurunan Fe terikat pada penurunan pH dan peningkatan lama perebusan mengakibatkan penurunan konstanta stabilitas efektif dan konstanta adsorpsi. Hal ini disebabkan pada penurunan pH terjadi: (1) peningkatan H^+ dalam persaingan dengan ion logam terhadap sisi koordinasi, (2) penurunan adsorpsi elektrostatis kation Fe oleh serat pangan, sebagai polisakarida yang bersifat netral pada pH asam. Peningkatan lama perebusan akan mengakibatkan: (1) faktor sterik letak gugus-gugus yang mampu membentuk kelat pada kondisi sebelum atau tanpa perebusan lebih menguntungkan daripada setelah perebusan, (2) berkurangnya porositas permukaan makromolekul serat pangan sehingga terjadi penurunan kekuatan adsorpsi.

Pada kondisi pH 4-tanpa perebusan, didapatkan Fe terikat dan konstanta stabilitas efektif dan adsorpsi tertinggi; namun demikian efek faktor pendorong absorpsi Fe bukan hem sangat berperan pada Fe terdialisis, sehingga diperoleh Fe terdialisis tertinggi.

Di antara keempat komponen serat pangan yang sanggup mengadakan ikatan kuat dengan Fe adalah hemiselulosa dan lignin, sehingga memberi pengaruh pada ketersediaan hayati Fe [1]. Dengan demikian berarti keberadaan 2 tipe sisi ikatan spesifik pada makromolekul serat pangan adalah kontribusi dari gugus-gugus fungsional aktif pada hemiselulosa dan lignin. Gugus-gugus fungsional tersebut adalah hidroksil, karboksil, oksigen karbonil, eter dan β -glikosidik.

Didapatkan pula bahwa pada semua perlakuan pH dan lama perebusan diperoleh konstanta stabilitas efektif pertama lebih besar daripada konstanta stabilitas efektif kedua. Hal ini berarti bahwa pengikatan pada tipe sisi ikatan pertama mempunyai stabilitas lebih besar. Menurut Sipos *et al.*[11], jika kelat Fe(III) polisakarida mempunyai kestabilan tinggi, maka pembentukan kelat tersebut melibatkan gugus hidroksil terdeprotonisasi atau oksigen β -glikosidik. Dengan demikian berarti bahwa tipe sisi ikatan pertama melibatkan keberadaan gugus OH yang terdeprotonisasi dan/atau ikatan melalui oksigen β -glikosidik; sedangkan tipe sisi ikatan kedua adalah tipe sisi ikatan yang melibatkan gugus COOH dan/atau ikatan melalui oksigen karbonil atau eter.

Pada penurunan pH dan peningkatan lama perebusan, terjadi perubahan terhadap kelarutan senyawa Fe (misalkan melalui terbentuknya reduktion, denaturasi protein, pemecahan fitat) dan komponen serat pangan. Perubahan terhadap komponen serat pangan meliputi stabilitas ikatan, ionisasi gugus ($-\text{OH}$ dan $-\text{COOH}$), kadar dan struktur komponen serat pangan. Perubahan ini menyebabkan penurunan afinitas pengikatan Fe melalui adsorpsi fisik dan pembentukan kompleks sehingga menurunkan harga Fe terikat, K_{ads} dan K_{eff} , serta berakibat pada peningkatan Fe terdialisis atau ketersediaan Fe.

Pada kondisi tanpa perebusan, pembentukan kelat Fe-asam organik atau sakarida yang stabil pada pH asam maupun alkalis akan meningkatkan ketersediaan Fe, walaupun terdapat peningkatan Fe terikat, K_{ads} dan K_{eff} . Hal ini disebabkan senyawa kelat Fe tersebut merupakan senyawa terlarut dan efektif terdialisis.

KESIMPULAN

Penurunan pH dan peningkatan lama perebusan menurunkan persentase Fe terikat oleh makromolekul serat pangan, K_{eff} dan K_{ads} . Pada proses perebusan, penurunan pH dan peningkatan lama perebusan meningkatkan ketersediaan Fe; sedangkan pada kondisi tanpa perebusan, peningkatan ketersediaan Fe terjadi pada

penurunan pH. Ketersediaan Fe tertinggi pada perlakuan pH 4-tanpa perebusan.

Pola pengikatan Fe oleh makromolekul serat pangan melalui pembentukan kompleks adalah lebih dominan daripada adsorpsi fisik, melibatkan dua tipe sisi ikatan spesifik dan salah satu tipe sisi ikatan mempunyai afinitas yang lebih besar.

Disarankan bahwa dalam upaya mempertahankan atau meningkatkan absorpsi Fe, maka kombinasi penurunan pH dan peningkatan lama perebusan merupakan faktor yang perlu dipertimbangkan pada proses pengolahan bahan berserat pangan tinggi; khususnya untuk mineral yang mempunyai pola pengikatan melalui pembentukan kompleks dan adsorpsi terhadap makromolekul serat pangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan terima kasih kepada yang terhormat Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr. dan Prof. Dr. Ami Soewandi J.S., atas bimbingannya pada pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dreher ML, 1987, *Handbook of Dietary Fiber*, Marcel Dekker Inc, New York.
2. Muchtadi D, 2000, *Sayur-sayuran Sumber Serat & Antioksidan : Mencegah Penyakit Degeneratif*, Fateta Tek. Pangan & Gizi. Bogor
3. Yuanita L, 2004, *J. Biosains*, 6, 2, 52-58.
4. Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, and Van Campen, D, 1981, *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 2248 – 2256.
5. Schricker BR, Miller DD, Rasmussen RR, and Van Campen, D, 1981, *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 2257- 2263.
6. Torre M, Rodriguez AR, and Calixto FS, 1995, *Food Chem.* 54, 23 – 31.
7. Thibault JF, Lahaye M, and Guillon F, 1992, *Physico-chemical Properties of Food Plant Cell Walls*. In : *Dietary Fiber- A Component of Food Nutritional Function in Health and Disease*. Edited by Schweizer TF and Edwards CA.: 21 – 40,. Spinger-Verlag, London.
8. Camire AL, and Clydesdale FM, 1981, *J. Food Sci*, 46, 548-551.
9. Shiels ME, Olson JA, Shike M, and Ross C, 1998, *Modern Nutrition in Health and Disease*. Williams & Wilkins, Baltimore.
10. Frolich W, 1995, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 49, S 116-122.
11. Sipos P, Pierre TG, Tombacz E, and Webb J, 1995, *J. Inorganic Biochem.*, 58, 129-138.