Pengaruh pH dan Lama Perebusan Kacang Panjang terhadap Efisiensi Regenerasi Hb Rattus norvegicus dan Pengikatan Fe oleh Serat Pangan

The Effect of Acidity and Length of Boiling Time of Yard Long Bean on Haemoglobin Regeneration Efficiency's Rattus norvegicus and Iron Binding by Dietary Fiber

Leny Yuanita

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam , Universitas Negeri Surabaya

Abstract

The aim of the study is to find the condition of appropriate treatment to yard long bean with pH variation 4; 7 and length of boiling time to gain the highest haemoglobin regeneration efficiency's Rattus norvegicus at diet high in dietary fiber, and based on investigation iron binding by dietary fiber macromolecules. The finding of the present study showed that decreasing pH and increasing boiling time will increase haemoglobin regeneration efficiency, due to the changes of iron binding pattern through decreasing K_{eff} and K_{ads}. The highest of haemoglobin regeneration efficiency at raw-pH 4 treatment,due to function of enhancer substances on iron non heme absorption. Iron binding pattern by dietary fiber macromolecules through formation of complex compound was more prominent than physically adsorption, involving two types of spesific binding sites, one of which showed a higher affinity.

Key words: haemoglobin regeneration efficiency, iron binding, dietary fiber

---

Pendahuluan

Diet tinggi serat pangan mengakibatkan efek fisiologis positif dan negatif. Di antara efek negatif yang ditimbulkan adalah penurunan ketersediaan mineral, akibat absorpsi oleh serat pangan. Menurut Dreher (1987), pengikatan mineral Fe merupakan penyebab utama penurunan absorpsi dan ketersediaan Fe.

Pengikatan mineral oleh serat pangan dipengaruhi oleh pH medium, sumber, tipe serat, konsentrasi serat dan mineral, proses pengolahan, serta zat inhibitor atau promotor. Komponen serat pangan pektat, hemiselulosa, lignin dan selulosa mempunyai pengaruh fisiologis berbeda. Pemasakan pada berbagai derajat keasaman medium mempengaruhi tekstur, komposisi dan struktur kimia komponen serat pangan sehingga berakibat pada sifat fisiko kimia serta mengubah pengaruh fisiologis serat pangan pada sepanjang saluran pencernaan.

Pemasakan mengakibatkan perubahan komponen dinding sel tanaman antara lain: 1) denaturasi protein, 2) degradasi pektat pada pH netral, 3) hidrolisis ikatan glikosidik hemiselulosa dan pektat pada pH asam, 4) reaksi antar konstituen dinding sel. Pengolahan bahan pangan mempengaruhi bentuk kimia Fe dalam berbagai senyawa, sehingga berpengaruh terhadap ketersediaan Fe (Latunde-Dada, 1986).

Fe merupakan komponen penting pembentuk hemoglobin, dan efisiensi pengubahan Fe diet menjadi Fe Hb pada defisiensi Fe menunjukkan ketersediaan Fe. Fe bahan nabati terdapat dalam bentuk bukan hem, absorpsinya dipengaruhi oleh senyawa dalam bahan pangan. Fe hem diabsorpsi pada mukosa usus sebesar 5-35%, Fe bukan hem hanya 2-20%, tergantung pada status Fe individu, perbandingan inhibitor dan promotor absorpsi pada bahan pangan (Beard dan Tobin, 2003).

Menurut Torre *et al.* (1995) sedikitnya ada 3 mekanisme interaksi makro molekul serat pangan dan ion logam, yaitu adsorpsi fisik, pembentukan kompleks dan penukar ion. Serat pangan sayuran tergolong penukar kation yang lemah dan monofungsional, maka di antara ketiga mekanisme interaksi tersebut, yang memberi pendekatan secara sederhana adalah adsorpsi fisik dan pembentukan kompleks.

Kacang panjang (*Vigna sesquipedalis* (L) Fruhw) merupakan sayur berkadar serat pangan tinggi (± 49% bobot kering); dikonsumsi tanpa atau melalui pemasakan dengan variasi suhu, lama pemasakan, dan derajat keasaman. Cara pengolahan mempengaruhi afinitas pengikatan Fe oleh makromolekul (Torre *et al*., 1995)

Penelitian bertujuan memperoleh: 1) kondisi perlakuan yang tepat terhadap kacang panjang melalui variasi pH dan lama perebusan sehingga

diperoleh efisiensi regenerasi Hb (HRE) *Rattus norvegicus* tertinggi pada diet tinggi serat pangan, dan 2) kajian berdasarkan pengikatan Fe oleh makromolekul serat pangan (*in-vitro*).

Metode Penelitian

Kacang panjang diperoleh secara acak dari populasi *Vigna sesquipedalis* (L) Fruhw varietas hijau super, kualitas baik, usia panen, dan ditanam di Tosaren Kediri. Variasi pH dan lama perebusan kacang panjang dilakukan pada kombinasi pH 4 dan 7 dengan lama perebusan 0 menit (mentah), 5, 15 dan 25 menit. Larutan pH 4, pH 7 berturut-turut adalah buffer sitrat dan aquabides bebas Fe.

Hewan coba diperoleh secara acak dari populasi *Rattus norvegicus* strain Wistar, jantan, umur ± 3 minggu, sehat, pemeliharaan dan diet sama.

Rancangan penelitian *in-vivo* adalah *Pre test-post test control group design*; sedangkan untuk penelitian *in-vitro* adalah faktorial 2 x 4.

Penelitian *In-Vivo*

Hewan coba *Rattus norvegicus* memasuki masa adaptasi selama 7 hari. Selanjutnya diberi pakan rendah Fe selama 50 hari dan air minum aquabides bebas Fe (*ad libitum*). Sampel hewan coba yang mengalami penurunan kadar Hb hingga mendekati defisiensi Fe (rerata Hb: 8,962 g/dl) secara random dibagi 8 kelompok dengan Fe Hb setara. Jumlah sampel 88 ekor. Masa perlakuan 31 hari, dengan pakan yang mengandung kacang panjang kadar tinggi serat pangan (± 18%). Analisis kadar Hb oleh laboratorium klinik di Surabaya, metode fotoelektrik-sianmethemoglobin.

HRE ditentukan melalui perhitungan: HRE = (Fe Hb akhir- Fe Hb awal)/(Fe *intake*) x 100%. Melalui asumsi 6,7% bobot badan adalah darah dan Hb mengandung 3,35 mg Fe/g, maka mg Fe Hb = BB x (6,7 ml darah/ 100 g BB) x (g Hb/ 100ml) x (3,35 mg Fe/ 1 g Hb) (De Oliveira, 1995).

Penelitian *In-Vitro*

Analisis Fe terlarut melalui metode *in-vitro* Miller *et al*. (1981), kondisi dan enzim sesuai sistim pencernaan, dan digunakan membran dialisis Spektra/Por 6000-8000 MWCO. Analisis kadar Fe melalui pembentukan Fe-batofenantrolin, menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 533 nm. Berdasarkan kadar Fe terlarut dibuat grafik Langmuir ($^{Fe\ ditambahkan}/_{Fe\ terikat}$ vs. Fe ditambahkan) dan Scatchard ($^{Fe\ terikat}/_{Fe\ bebas}$ vs. Fe terikat), sehingga diperoleh konstanta adsorpsi (K_{ads} = kemiringan/intersep) dan konstanta stabilitas efektif (K_{eff} = - kemiringan).

Analisis Data

Uji pengaruh interaksi pH dan lama perebusan terhadap HRE digunakan Anava *Two Way* dan uji Duncan (α = 5%); sedangkan terhadap pengikatan Fe oleh serat pangan digunakan metode grafik Langmuir-Scatchard dan diskriptif kualitatif.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian *In-Vivo*

Tabel 1 menunjukkan: interaksi pH dan lama perebusan berpengaruh terhadap persentase HRE. Untuk proses perebusan, peningkatan HRE terjadi pada penurunan pH dan peningkatan lama perebusan; sedangkan untuk proses tanpa perebusan, pada penurunan pH.

Pada tanpa perebusan diperoleh persentase HRE tertinggi, walaupun juga didapatkan K_{ads} dan K_{eff} tertinggi (Tabel 2). Terdapatnya asam organik sayuran (khususnya asam askorbat) kondisi tanpa perebusan sangat berperan pada peningkatan persentase HRE. Asam organik rantai pendek pada sayuran yaitu asam askorbat, sitrat, malat, laktat, tartrat, meningkatkan ketersediaan Fe bukan hem karena efektif sebagai pengkelat yang membentuk kompleks larut dan stabil pada pH asam maupun alkalis. Shils *et al*. (1998) mengemukakan, khususnya asam askorbat, bersifat stabil pada pH asam, sebagai pereduksi, pengkelat dan penghalang ikatan Fe dengan ligan pengendap misalkan fitat, tanin, oksalat, karbonat; sedangkan menurut Puyfoulnoux *et. al* (2001), di antara promotor absorpsi Fe bukan hem, yang paling berperan absorpsi Fe dan regenerasi Hb adalah asam askorbat.

Tabel 1 Rerata persentase HRE (pengaruh pH dan lama perebusan)

pH	Lama perebusan (menit)				F;p
	0	5	15	25	
7	9,989±1,583[c]	4,081±0,938[a]	5,068±1,827[a]	7,135±1,665[b]	F^{*}=26,127;
4	11,934±2,814[d]	4,617±1,945[a]	5,555±2,231[a]	8,806±0,981[c]	p^{*}=0,000

Keterangan: [a-d] Nilai rerata ± standar deviasi dari 11 replikasi. Tanda huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) ; * F hitung, taraf signifikansi p untuk interaksi pH dan lama perebusan (Anova *TwoWay*)

Disamping peran asam-asam organik, fruktosa dan sorbitol yang terdapat pada kondisi tanpa perebusan, juga meningkatkan absorpsi Fe melalui pembentukan kompleks kelat Fe(III) yang larut dan stabil pada pH duodenum. Seperti dikemukakan oleh Mahan dan Stump (1992), agar Fe bukan hem dapat diabsorpsi harus berbentuk senyawa larut Fe (II) atau berbentuk kelat, misalkan dengan asam askorbat, sakarida atau asam amino yang mengandung gugus -SH. Maka berarti bahwa kelarutan Fe pada kondisi tanpa perebusan, disebabkan oleh pengkelat fruktosa dan sorbitol, serta asam-asam organik yang berfungsi sebagai pereduksi dan atau pengkelat dengan bobot molekul rendah. Fe larut tersebut secara efektif terabsorpsi, sehingga meningkatkan persentase HRE pada kondisi tanpa perebusan.

Kestabilan asam organik tergantung pada suhu; sesuai Monsen (1988) bahwa asam askorbat yang mengalami oksidasi hampir tidak mempunyai pengaruh dalam memperkuat absorpsi Fe. Namun, pada peningkatan lama perebusan dihasilkan peningkatan persentase HRE. Menurut Frolich (1995), proses pemasakan mempengaruhi ketersediaan Fe terutama disebabkan reorganisasi komponen serat pangan dan pemecahan asam fitat, sehingga mengubah sifat pengkelat komponen-komponen tersebut. Valencia *et al.* (1999) mengemukakan, pada perebusan terjadi perubahan inositolpentafosfat dan inositolheksafosfat (asam fitat) menjadi inositoltetrafosfat dan trifosfat, dan dapat membentuk kompleks larut dengan Fe(III).

Reorganisasi komponen serat pangan meliputi perubahan ionisasi gugus –OH,–COOH, dan kestabilan ikatan serta pemutusan ikatan antar monomer atau polimer. Hidrolisis ikatan glikosidik pektat pada pH 4 dan eliminasi-ß pada pH 7, hidrolisis asam terhadap hemiselulosa, serta kelabilan ikatan antar rantai selulosa mengakibatkan penurunan persentase Fe terikat pada perebusan pH 4 dan 7. Menurut Camire dan Clydesdale (1981), perubahan jumlah Fe terikat oleh lignin pada perebusan adalah akibat perubahan faktor sterik struktur lignin. Perubahan ikatan antar monomer dan polimer mengakibatkan perubahan jarak letak gugus-gugus fungsional yang mampu berikatan dengan Fe, sehingga menurunkan Fe terikat, meningkatkan absorpsi Fe serta persentase HRE.

Peningkatan HRE pada peningkatan lama perebusan, juga akibat terbentuknya protein terdenaturasi (utama pH 4) yang rentan terhadap enzim proteolitik sehingga mudah terbentuk kompleks larut Fe(III) peptida atau asam amino dengan M_r rendah.

Persentase HRE perlakuan pH 4 pada berbagai lama perebusan lebih tinggi daripada pH 7. Selain terjadi denaturasi protein, kondisi pH 4 sangat menguntungkan bagi kestabilan asam organik, sehingga berperan meningkatkan absorpsi Fe. Buffer sitrat yang belum terdegradasi juga meningkatkan HRE, akibat tingginya perbandingan citrat/Fe sehingga terbentuk kelat larut $[FeCit_2]^{-5}$ pada kondisi pH duodenum. Pada perebusan kondisi pH asam, terjadi pula reaksi fruktosa dan glukosa membentuk diasetilformosin dan berbagai senyawa redukton yang mereduksi Fe(III) → Fe(II), sehingga meningkatkan kelarutan dan absorpsi Fe.

Penelitian *In-Vitro*

Pada Tabel 2 didapatkan dua harga K_{eff} dan $K_{eff} > K_{ads.}$ Hal ini berarti bahwa pembentukan kompleks lebih dominan daripada adsorpsi dan terdapat dua tipe sisi ikatan pada makromolekul serat pangan untuk pengikatan Fe (Torre *et al*., 1995).

Pada penurunan pH dan peningkatan lama perebusan, terjadi penurunan K_{eff} dan K_{ads}. Hal ini disebabkan pada pH asam terjadi: 1) peningkatan H^+ dalam persaingan dengan ion logam terhadap sisi koordinasi, dan 2) penurunan adsorpsi elektrostatik kation Fe oleh serat pangan. Meningkatnya lama perebusan mengakibatkan: 1) faktor sterik gugus yang kurang menguntungkan, dan 2) berkurangnya porositas permukaan makromolekul serat pangan.

Tabel 2. K_{eff} dan K_{ads} untuk Pengikatan Fe oleh Serat Pangan Kacang Panjang

Perlakuan		Konstanta stabilitas efektif		Konstanta adsorpsi
PH	LP(menit)	$K_{eff\,1}$	$K_{eff\,2}$	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

Komponen serat pangan yang sanggup berikatan kuat dengan Fe adalah hemiselulosa dan lignin, sehingga berpengaruh pada ketersediaan Fe. Berarti 2 tipe sisi ikatan spesifik pada serat pangan adalah kontribusi gugus fungsional lignin dan hemiselulosa yaitu hidroksil, karboksil, oksigen karbonil, eter dan ß-glikosidik.

Harga $K_{eff\,1} > K_{eff\,2,}$ berarti stabilitas pengikatan pada tipe sisi ikatan pertama lebih besar daripada kedua. Menurut Sipos *et al*.(1995), jika kelat Fe(III) polisakarida mempunyai kestabilan tinggi, maka pembentukan kelat melibatkan gugus OH ter-deprotonisasi atau oksigen ß-glikosidik. Hal ini

berarti bahwa tipe sisi ikatan pertama mengandung gugus OH terdeprotonisasi dan/atau oksigen ß-glikosidik; sedangkan tipe sisi ikatan kedua adalah tipe sisi ikatan yang mengandung gugus COOH dan/atau ikatan melalui oksigen karbonil atau eter.

Kesimpulan

Penurunan pH dan peningkatan lama perebusan, meningkatkan efisiensi regenerasi Hb; akibat perubahan struktur serat pangan pada ionisasi gugus –OH dan –COOH, kestabilan ikatan dan pemutusan ikatan antar monomer atau polimer sehingga terjadi penurunan Fe terikat dan perubahan pola pengikatan melalui penurunan K_{eff} dan $K_{ads.}$ Melalui penurunan pH pada proses tanpa perebusan, diperoleh efisiensi regenerasi HB tertinggi, akibat peran substansi pendorong absorpsi Fe bukan hem dalam bahan pangan.

Pengikatan Fe oleh makromolekul serat pangan kacang panjang melalui pembentukan kompleks adalah lebih dominan daripada adsorpsi, melibatkan dua tipe sisi ikatan spesifik dan salah satu tipe sisi ikatan mempunyai afinitas lebih besar.

Daftar Pustaka

Beard, J., and B.Tobin. 2000. Iron Status and Exercise. Am. J. Clin. Nutr., 72 : 594-7.

Camire, A.L., and F.M. Clydesdale. 1981. Effect of pH and Heat Treatment on the Binding of Calsium, Magnesium, Zinc and Iron to Wheat Bran and Fractions of Dietary Fibers. J. Food Sci., 46 : 548 - 51.

De Oliveira, J.E.D., M.L.S. Freitas, J.F. Ferreira, A.L. Goncalves, and J.S. Marchini. 1995. Iron Complex Salts and its Bioavailability to Rats. Internat J. Vit. Nutr. Res., 65: 272-5.

Dreher, M.L. 1987. Handbook of Dietary Fiber. Marcel Dekker Inc. New York.

Frolich, W. 1995. Bioavailability of Micronutrients in a Fibre Rich Diet, Especially Related to Minerals. Eur. J. Clin. Nutr., 49 : S 116 - 22.

Latunde-Dada, G.O., and R.J. Neale. 1986. Availability of Iron From Foods. J. Food Tech., 21 : 255 -68.

Mahan, L.K., and S.E. Stump. 1992. Food, Nutrition, Diet Therapy. W.B. Saunders. Philadelphia.

Miller, D.D., B.R. Schricker, R.R. Rasmussen, and D.Van Campen. 1981. An *In Vitro* Method for Estimation of Iron Availability From Meals. Am. J. Clin. Nutr., 34 : 2248 – 56.

Monsen, E.R. 1988. Iron Nutrition and Absorption: Dietary Factors Which Impact Iron Bioavailability. In: *Dietetics in 90's*. Edited by M.F. Moyal: 19-26. John Libbey Eurotext. London.

Puyfoulhoux, G., M.J. Rouanet, P. Besancon, B. Baroux, J.C. Baccou, and B. Caporiccio. 2001. Iron Availability from Iron - Fortified Spirulina by an *In Vitro* Digestion/ Caco- 2 Cell Culture Model. J. Agric. Food Chem., 49: 1625 - 29.

Shils, M.E., J.A. Olson, M. Shike, and C. Ross. 1998. Modern Nutrition in Health and Disease. Williams & Wilkins. Baltimore

Sipos, P., T.G. Pierre, E. Tombacz, J. Webb. 1995. Rod Like Iron (III) Oxyhydroxide Particles in Iron(III)-Polysaccharide Solutions. J. Inorganic Biochem., 58: 129-38.

Torre, M., A.R. Rodriguez, and F.X. Calixto, 1995. Interactions of the Fe (II), Ca (II) and Fe (III) with High Dietary Fiber Materials: A Physico-chemical Approach. Food Chem., 54: 23– 31.

Valencia, S., U. Svanberg, A.S. Sanberg, and J. Ruales. 1999. Processing of Quinoa (*Chenopodium Quino, Wild*): Effect on *In-Vitro* Iron Availability and Phytate Hydrolysis. Intrn. J. Food Sci. Nutr., 50 (3) 203-11.