



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**EFEKTIFITAS  $FeSO_4$  DAN  $FeSO_4 + Na_2EDTA$  SEBAGAI FORTIFIKAN  
ZAT BESI PADA SUSU KEDELAI DAN TEMPE**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains**

**NANY NURUL HUSNA  
0606069174**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPOK  
JULI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Nany Nurul Husna

NPM : 0606069174

Tanda Tangan : 


Tanggal : Juli 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Nany Nurul Husna  
NPM : 0606069174  
Program Studi : Kimia  
Judul Skripsi : Efektifitas  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  sebagai Fortifikan Zat Besi pada Susu Kedelai dan Tempe Kedelai

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Rer. Nat Agustino Zulys, M.Sc. (  )  
Pembimbing : Dr. Ridla Bakri, M. Phil. (  )  
Penguji : Drs. Ismunaryo, M, M. Phil. (  )  
Penguji : Drs. Sunardi, M.Si. (  )  
Penguji : Dr. Yuni K. Krisnandi (  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : Juli 2011

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT yang senantiasa telah memberikan nikmatnya kepada kita semua. Semoga kita selalu diliputi oleh ridho serta hidayah-Nya. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana sains Departemen kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Tanpa terasa, masa – masa belajar di bangku perkuliahan sudah mencapai penghujung. Begitu banyak kenangan juga proses pembelajaran yang saya dapatkan selama berada di kimia UI. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini.

Begitu banyak doa dan dukungan yang telah diberikan untuk menyelesaikan skripsi ini, karena itu saya haturkan terima kasih kepada :

- (1) Dr. Rer. Nat Agustino Zulys, M.Sc serta Dr. Ridla Bakri, M. Phil. selaku dosen Pembimbing Penelitian yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Drs. Riswiyanto, M.Sc sebagai Pembimbing Akademis atas perhatian dan bantuannya selama ini.
- (3) Dosen Pengajar di Departemen Kimia yang telah banyak membagi ilmu dan senantiasa membimbing mahasiswa untuk tetap terus belajar dan berkarya.
- (4) Yang Tersayang Papa dan Mama selalu mengasihi, mendukung setiap hal yang saya lakukan dan terus mengiringi dengan do'a serta cinta yang tanpa henti selama ini. Terima kasih untuk pengertiannya juga kesabarannya selama ini.

Semoga ini menjadi kado terindah untuk mama dan papa.

- (5) Untuk adik – adik ku : Ghina, Robi, dan Farhan, semangat terus untuk menggapai cita – ciat kalian. Insya Allah teteh dukung dan bantu sekuat tenaga.
- (6) Mba Ati, mba Emma, mba Cucu, mba Ina, pak Hedi, pak Amin, pak Trisno “ Babeh “, saya ucapkan terima kasih.
- (7) Kakak-kakak serta teman – teman di lab. Afiliasi, saya ucapkan terimakasih telah banyak membantu dan memberi kemudahan kepada saya demi terselesaikannya penelitian ini.
- (8) Rekan penelitian lantai 3 yang selalu menghadirkan riang tawa di setiap kondisi meski menghadapi kesulitan. Ina, Zetri, Sherly, Nadiroh, ka atin, ka sabri, evi, ka destya, dante, bu nana, bu indri, bu Ita, Fitri, wiwit, nadya, ka omi.
- (9) Teman – teman seperjuangan : Linda, Tika, Desi bettivia, Nita, Desi wulan, Hogan dan Dian. Semoga Allah tetap menjadikan kita saudara satu sama lain hingga syurgaNya kelak. Nany sayang kalian karena Allah
- (10) Untuk rekan satu lab : Novi. Terima Kasih buat semuanya. Semangat !!
- (11) Untuk teman – teman : PELANGI'06 : ida,eka, ami, agus, ali, tino, eka,dkk. Karena Pelangi, begitu berarti.
- (12) Teman – teman SALAM UI TBW 2010 : bang Erlangga, vivid, rhevy, tino, anti, rini, ega, wahyu. Maaf untuk kerja – kerja yang masih belum optimal.
- (13) Untuk adik – adik kimia 2007,2008,2009 terima kasih untuk semangat yang telah diberikan.
- (14) Untuk patner da'wah sejati ku yang selalu memberi semangat dan membantu juga ada di saat- saat sulit dan senang, semoga Allah mengizinkanmu untuk menjadi imamku di dunia dan di akhirat.

Saya menyadari bahwa tidak cukup rasanya melukiskan perjuangan di kampus selama ini. Pun begitu menyadari bahwa sesungguhnya proses belajar itu tidak terhenti sampai di sini.

**Penulis**

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nany Nurul Husna  
NPM : 0606069174  
Program Studi : S1  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

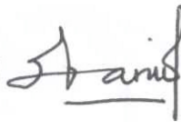
demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Efektifitas  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  sebagai fortifikan Zat Besi pada Susu Kedelai dan Tempe

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : Juli 2011  
Yang menyatakan



( Nany Nurul Husna )

## ABSTRAK

Nama : Nany Nurul Husna  
Program Studi : Kimia  
Judul : Efektifitas  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  sebagai fortifikan Zat Besi pada Susu Kedelai dan Tempe.

Fortifikasi zat besi dilakukan sebagai upaya untuk mengatasi defisiensi zat besi yang dapat menyebabkan anemia. Penambahan fortifikan  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  ke dalam sampel susu dan tempe kedelai dilakukan dengan melakukan variasi jumlah fitat dan variasi jumlah fortifikan yang ditambahkan. Pengujian kadar Fe dilakukan dengan cara memisahkan antara Fe bebas ( Fe yang tidak terikat dengan fitat ) serta Fe-Fitat dengan pelarut amil alkohol dan diukur dengan menggunakan AAS. Pengujian kadar fitat pada susu dan tempe dilakukan dengan Spektrofotometer UV-Visible. Hasil yang didapat jumlah Fe bebas semakin berkurang dengan bertambahnya fitat. Fortifikasi paling efektif diperoleh pada penambahan 0,2 mol  $\text{FeSO}_4$  dan 0,1 mol  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  untuk 100 mL susu sedangkan untuk 50 gram sampel tempe pada penambahan 0,2 mol  $\text{FeSO}_4$  tanpa penambahan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

Kata Kunci :  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , fortifikasi, susu, tempe  
xiii+57 halaman : 4 gambar ; 10 tabel  
Daftar Pustaka : 20 (1985 – 2009)

## ABSTRACT

Name : Nany Nurul Husna  
Program Study : Chemistry  
Title : Effectiveness of  $\text{FeSO}_4$  and  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  as iron fortificant in Soy Milk and Tempe.

Iron fortification can prevent iron deficiency anemia. The addition of fortificant  $\text{FeSO}_4$  and  $\text{FeSO}_4$  in to the sample is using variation of fortificant and variation of phytic acid. The analysis of iron concentration by separate free iron ( iron wich non-bonding with phytic acid ) and iron-phytat with amil alcohol and measured using Atomic Absorption Spectrophotometry. The evaluation of concentration of phytic acid sampel is using UV- Visible Spectrophotometer. The result is the amount of free iron decrease by the increase of phytat. The most effective fortification is obtained by the addition of 0,2 mol  $\text{FeSO}_4$  and 0,1 mol  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  for 100 mL soy milk and for 50 gram tempe is obtained by the addition of 0,2 mol  $\text{FeSO}_4$  without addition of  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

Key Words :  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , fortification, soy milk, tempe  
xiii+57 pages : 4 pictures; 10 tables  
Bibliography : 20 (1985-2009)



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
DEWAN PENGUJI .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Fortifikasi .....	4
2.1.1 Definisi dan Tujuan Fortifikasi .....	4
2.1.2 Jenis – jenis Fortifikan .....	5
2.1.3 Faktor – faktor Pemilihan Fortifikan.....	5
2.2 Zat Besi.....	6
2.3 Kacang Kedelai .....	7
2.4 Susu kedelai.....	8
2.5 Tempe Kedelai.....	9
2.6 Ferrous Sulfat .....	9

2.7	Fitat.....	10
2.8	Etilendiamintetraacetic Acid .....	11
2.9	Instrumentasi analisis .....	13
2.9.1	Spektrofotometer UV- Visible .....	13
2.9.2	Spektrofotometer Serapan Atom.....	13
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....		16
3.1	Alat dan Bahan .....	16
3.1.1	Alat – alat yang digunakan.....	16
3.1.2	Bahan yang digunakan .....	16
3.1.3	Alat uji.....	16
3.2	Prosedur Kerja .....	16
3.2.1	Pembuatan Fe standar.....	16
3.2.2	Penentuan kurva kalibrasi Fe.....	17
3.2.3	Penentuan kadar Fe awal pada tempe.....	17
3.2.4	Penentuan kadar Fe awal pada susu .....	17
3.2.5	Pembuatan kurva kalibrasi fitat .....	18
3.2.6	Penentuan kadar fitat awal pada tempe.....	18
3.2.7	Penentuan kadar fitat awal pada susu.....	19
3.2.8	Fortifikasi pada susu kedelai dengan variasi fitat.....	19
3.2.9	Pembuatan tempe + fortifikan dengan variasi fitat.....	20
3.2.10	Fortifikasi pada susu kedelai dengan variasi FeSO <sub>4</sub> .....	20
3.2.11	Pembuatan tempe + fortifikan dengan variasi Fe .....	20
3.2.12	Penentuan Fe bebas pada sampel susu.....	21
3.2.13	Penentuan Fe bebas pada sampel tempe .....	21
3.2.14	Penentuan Fe-Fitat pada sampel susu .....	22
BAB IV PEMBAHASAN.....		23
4.1	Pembuatan Tempe .....	23
4.2	Penentuan kadar Fe awal sampel.....	23
4.3	Penentuan kadar fitat awal pada sampel.....	24
4.4	Penentuan kadar Fe bebas pada Fortifikasi susu kedelai dan tempe dengan variasi fitat.....	26

4.5 Penentuan Kadar Fe bebas pada Fortifikasi Susu dan Tempe dengan variasi penambahan $\text{FeSO}_4$ dan $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . .....	27
4.6 Penentuan Kadar Fe bebas pada Fortifikasi Susu dan Tempe dengan variasi penambahan $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$ dan $\text{FeSO}_4$ ( tanpa $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) . .....	27
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	34



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur Asam Fitat.....	11
Gambar 2.2. Struktur EDTA.....	12
Gambar 2.3. Distribusi kelima spesi EDTA sebagai fungsi pH.....	13
Gambar 2.4 Kemungkinan sisi ikatan antara Fe dengan fitat.....	33

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Komposisi Kimia Biji Kedelai Basah dan Kering .....	8
Tabel 4.1. Konsentrasi Fe awal pada sampel.....	22
Tabel 4.2. Kadar fitat yang diperoleh pada sampel.....	23
Tabel 4.3. Konsentrasi kadar Fe bebas pada Fortifikasi dengan variasi fitat.....	24
Tabel 4.4. Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi dengan variasi $\text{FeSO}_4$ dan $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ....	25
Tabel 4.5. Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi Susu dengan variasi penambahan $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$ dan $\text{FeSO}_4$ ( tanpa $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) .....	26
Tabel 4.6. Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi Tempe dengan variasi penambahan $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$ dan $\text{FeSO}_4$ ( tanpa $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ).....	27
Tabel 4.7. % hasil Fe bebas pada sampel susu + $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$ dan susu tanpa $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .....	28
Tabel 4.8. % hasil Fe bebas pada sampel tempe + $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$ dan tempe tanpa $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .....	28
Tabel 4.9. Kondisi pH pada sampel susu.....	29
Tabel 4.10. Kadar Fe-Fitat pada sampel susu + 0,2 mol $\text{FeSO}_4 + 0,1$ mol $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .....	32

## DAFTAR LAMPIRAN

- LAMPIRAN 1                      Kurva kalibrasi Fe standar  
Kurva kalibrasi Fitat standar
- LAMPIRAN 2                      Kurva Konsentrasi Fe Bebas berdasarkan variasi  
fitat  
Kurva Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi Susu  
dan Tempe dengan variasi penambahan  $\text{FeSO}_4$  dan  
 $\text{Na}_2\text{EDTA}$
- LAMPIRAN 3                      Kurva konsentrasi Fe bebas pada fortifikasi susu  
dengan variasi penambahan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  dan  
 $\text{FeSO}_4$  ( tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )  
Kurva konsentrasi Fe bebas pada fortifikasi tempe  
dengan variasi penambahan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$   
dan  $\text{FeSO}_4$  ( tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )
- LAMPIRAN 4                      Kurva % hasil Fe bebas pada sampel susu +  $\text{FeSO}_4$   
+  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dan susu tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   
Kurva % hasil Fe bebas pada sampel tempe +  
 $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  dan tempe tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$
- LAMPIRAN 5                      Gambar Fortifikasi Susu  
Gambar destruksi susu
- LAMPIRAN 6                      Gambar analisis kadar fitat

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Pada saat ini permasalahan mengenai kekurangan zat gizi mikro mulai menjadi perhatian. Akibat dari defisiensi salah satu zat gizi mikro, yaitu zat besi adalah anemia besi. Anemia merupakan penyakit defisiensi besi yang paling lazim di dunia. Menurut “International conference on Nutrition” (ICN), lebih dari 2 milyar penduduk dunia beresiko anemia besi atau menderita berbagai bentuk anemia besi (Yeung, 2003). Sementara itu, hampir setengah dari populasi wanita dan anak – anak di negara yang sedang berkembang mengalami defisiensi zat besi ( anemi besi ). Anak-anak penderita anemia besi menderita gangguan perkembangan fisik dan mental (Albiner, 2003). Selain itu, menurut Albiner (2003), wanita hamil dan bayi yang menderita anemia besi akan mengalami pengurangan yang nyata pada kemampuannya melawan infeksi.

Permasalahan mengenai zat gizi mikro di Indonesia masih cukup besar, kurang zat besi semua umur sebanyak 100.286.688; kurang Yodium semua umur sebanyak 73.643.126 dan kurang vitamin A pada anak-anak sebanyak 9.026.825 (Depkes RI, 2003). Tingginya angka prevalensi kekurangan gizi di Indonesia dapat disebabkan oleh rendahnya daya beli masyarakat terhadap sumber protein hewani, sehingga masyarakat lebih banyak mengkonsumsi bahan bahan pangan nabati, khususnya pada masyarakat berpenghasilan rendah.

Sumber protein yang umumnya dikonsumsi masyarakat Indonesia yaitu kacang – kacangan, biji- bijian, serta ikan. Sumber protein yang nabati didominasi oleh kedelai. Kandungan kedelai antara lain, memiliki kandungan asam lemak essensial linoleat dan linolenat, kandungan protein yang tinggi, serta berbagai vitamin dan mineral yang dibutuhkan oleh tubuh (Bentley, 1975; Schimshaw and Young, 1976; Ferrier, 1975 dalam Yenrina dkk

(2006)). Indonesia merupakan negara yang menduduki peringkat pertama dalam pemanfaatan kedelai sebagai bahan makanan (American Soybean Association, 1999). Produk pangan berbasis kedelai yang populer di Indonesia diantaranya adalah susu bubuk kedelai, tahu, kecap kedelai dan tempe (Yenrina dkk, 2006).

Dilatarbelakangi oleh permasalahan di atas, maka perlu dilakukan berbagai upaya perbaikan gizi. Salah satu upaya perbaikan gizi adalah fortifikasi zat besi. Di negara maju, upaya fortifikasi zat besi pada aneka produk pangan terbukti sukses mencapai target dalam upaya memerangi anemia. Kunci keberhasilan program ini terletak pada fakta bahwa makanan yang terfortifikasi zat besi harus memberikan sejumlah Fe yang cukup dan mudah diserap oleh tubuh. Fortifikasi zat gizi besi dipandang oleh beberapa peneliti merupakan strategi termurah untuk memulai, mempertahankan, mencapai/mencakup jumlah populasi yang terbesar, dan menjamin pendekatan jangka panjang.

Fortifikasi tersebut dilakukan pada bahan pangan berbasis kedelai. Harga bahan pangan tersebut yang relatif terjangkau dan sesuai dengan daya beli masyarakat di Indonesia khususnya yang berpenghasilan rendah serta metode fortifikasi yang juga relative murah dinilai sebagai strategi yang “*cost-effective*” karena dapat memberikan manfaat lebih besar dengan biaya yang sama.

Dalam era teknologi saat ini, banyak ilmuwan telah meneliti berbagai fortifikasi pada makanan. Seperti halnya fortifikasi vitamin A pada minyak goreng, fortifikasi zat besi pada tepung terigu dan kecap oleh Hermana dan Komari (1993).

Pada fortifikasi bahan pangan berbasis kedelai, ketersediaan biologis Fe dipengaruhi oleh zat anti gizi yang dapat menurunkan nilai gizi makanan, yaitu asam fitat (Stephen, 1985). Hal ini dikarenakan asam fitat mempunyai kemampuan mengikat kuat mineral logam seperti kalsium, besi, dan magnesium membentuk senyawa tidak larut yang tidak dapat diserap oleh dinding usus (Wolf, 1979). Oleh karena itu ketersediaan zat besi dalam makanan dapat berkurang.



Dalam studi awal yang telah dilakukan sebelumnya (INACG, 1993) diketahui bahwa untuk mencegah besi untuk berikatan dengan asam fitat pada kacang – kacangan digunakan NaFeEDTA ataupun kombinasi antara  $\text{FeSO}_4$  dengan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Untuk itulah penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui efektifitas  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  sebagai fortifikan pada bahan pangan berbasis kedelai serta mempelajari pengaruh asam fitat pada ketersediaan Fe pada bahan makanan tersebut.

### **1.2 Perumusan Masalah**

1. Bagaimana efektifitas fortifikasi zat besi oleh  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  terhadap kandungan Fe bebas pada susu kedelai dan tempe kedelai?
2. Bagaimana pengaruh keberadaan fitat terhadap kandungan Fe bebas yang terdapat dalam susu kedelai dan tempe kedelai ?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui kandungan Fe bebas yang terdapat dalam susu kedelai dan tempe kedelai yang telah difortifikasi dengan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$ .
2. Mengetahui pengaruh keberadaan fitat terhadap kandungan Fe bebas yang terdapat dalam susu kedelai dan tempe kedelai yang telah difortifikasi.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Fortifikasi**

##### **2.1.1 Definisi dan Tujuan Fortifikasi**

Menurut WHO (2006), fortifikasi adalah sebuah upaya yang sengaja dilakukan untuk menambah mikronutrien yang penting, yaitu vitamin dan mineral dalam makanan, sehingga dapat meningkatkan kualitas nutrisi dari pasokan makanan dan bermanfaat bagi kesehatan masyarakat dengan risiko yang minimal untuk kesehatan.

Menurut Albiner (2003), secara umum fortifikasi pangan dapat diterapkan untuk tujuan-tujuan berikut:

1. Untuk memperbaiki kekurangan zat-zat gizi dari pangan.
2. Untuk mengembalikan zat-zat yang awalnya terdapat dalam jumlah yang signifikan dalam pangan akan tetapi mengalami kehilangan selama pengolahan.
3. Untuk meningkatkan kualitas gizi dari produk pangan olahan (pabrik) yang digunakan sebagai sumber pangan bergizi.
4. Untuk menjamin *equivalensi* gizi dari produk pangan olahan yang menggantikan pangan lain, misalnya margarin yang difortifikasi sebagai pengganti mentega.

Mengacu pendapat Untoro (2002) dan Soekirman (2003), beberapa hal yang harus diperhatikan dalam fortifikasi pangan yaitu

1. Pangan merupakan makanan yang sering dan banyak dikonsumsi penduduk termasuk penduduk miskin,
2. Pangan hasil fortifikasi, sifat organoleptiknya tidak berubah dari sifat aslinya,
3. Pangan yang difortifikasi aman untuk dikonsumsi dan ada jaminan terhadap kemungkinan efek samping negatif,

4. Pangan yang difortifikasi, diproduksi dan diolah oleh produsen yang terbatas jumlahnya,
5. Tersedia teknologi fortifikasi sesuai dengan pangan pembawa dan fortifikan yang digunakan,
6. Harus ada sistem monitoring yang tegas terhadap pabrik-pabrik fortifikasi,
7. Ada kerjasama yang nyata antara pihak pemerintah, non pemerintah dan swasta,
8. Perlu mekanisme untuk melakukan evaluasi perkembangan fortifikasi
9. Pangan hasil fortifikasi, harganya tetap terjangkau oleh kelompok target.
10. Dari sisi konsumen diyakini tidak akan terjadi konsumsi berlebihan.

### **2.1.2 Jenis – jenis Fortifikan**

Menurut WHO (2006), berdasarkan kelarutannya, fortifikan dibagi menjadi tiga jenis:

1. larut dalam air. Contohnya :  $\text{FeSO}_4$ , dan  $\text{NaFeEDTA}$ .
2. tidak larut dalam air namun larut dalam asam. Contohnya : Ferrous Fumarate, Ferrous Succinate.
3. tidak larut dalam air dan tidak larut dalam asam. Contohnya : Ferric Orthophosphate, Ferric Pyrophosphate.

### **2.1.3 Faktor – faktor Pemilihan Fortifikan**

Menurut Purnomo (2002) beberapa faktor penting dalam pemilihan fortifikan yaitu:

1. fortifikan tidak mempengaruhi produk akhir, dalam hal sifat sensoris,
2. tidak bereaksi dengan bahan - bahan lain, dan
3. *visible* secara ekonomi.

Selain beberapa hal di atas, menurut Prihananto (2004), hal lain yang perlu diperhatikan dalam pemilihan fortifikan antara lain :

1. kualitas produk setelah penyimpanan tidak mengalami perubahan sifat fisik dan kimia, dan
2. stabilitas vitamin dan mineral setelah penyimpanan, yaitu 90 hari penyimpanan tidak berubah.

## 2.2 Zat Besi

Zat besi memiliki kegunaan yang penting dalam kehidupan. Selain memiliki manfaat di bidang industri, zat besi juga memiliki peranan yang sangat penting sebagai mikro nutrisi dalam tubuh antara lain bermanfaat dalam transport oksigen, pembentukan ATP, DNA sintetis. Selain pada manusia, zat besi juga memiliki peranan dalam proses sintesis klorofil dalam tumbuhan.

Pada manusia, defisiensi zat besi dapat menyebabkan anemia, gangguan sistem imun, serta dapat meningkatkan resiko kanker dan hepatitis. Zat besi tidak rusak oleh proses pemanasan (kecuali heme iron), radiasi cahaya, oksigen, maupun keasaman. Tetapi dapat hilang oleh pemisahan secara fisik misalnya pada milling pada sereal. *Bioavailabilitas* zat besi di dalam tubuh ditentukan oleh efisiensi penyerapan zat besi di dalam usus.

Ditinjau berdasarkan mekanisme penyerapannya, zat besi dikelompokkan menjadi dua jenis, yaitu :

### 1. *Heme Iron*

Heme iron merupakan zat besi yang terdapat di dalam hemoglobin dan myoglobin. Sumber dari Heme Iron adalah daging-dagingan. Heme Iron diserap sebagai iron porphyrin kompleks yang dipecah oleh enzim *heme oxygenase* di dalam sel mukosa usus. Senyawa ini akan meninggalkan sel mukosa dalam bentuk kimia yang sama dengan non heme iron.

Kandungan heme di dalam heme iron dapat *terdenaturasi* oleh proses pemanasan pada suhu tinggi dan waktu yang lama sehingga berpengaruh terhadap *bioavailabilitas* heme iron.

*Bioavailabilitas* heme iron tidak dipengaruhi oleh komposisi bahan makanan.

## 2. *Non Heme Iron*

Senyawa ini secara alami terdapat di dalam daging, kacang - kacaangan, sayur dan buah-buahan. *Bioavailabilitas* non heme iron dipengaruhi oleh keberadaan senyawa inhibitor seperti fitat, tannin, dan polifenol.

### 2.3 **Kacang Kedelai**

Biji kedelai berkeping dua dan terbungkus oleh kulit biji, serta mempunyai ukuran yang bervariasi, tergantung dari varietasnya. Kulit ari biji kedelai warnanya bisa bermacam-macam tergantung jenis atau varietas kedelainya, sebagian besar terdiri atas selulosa dan lignin

Kacang kedelai termasuk bahan makanan yang mempunyai susunan zat gizi yang lengkap dan mengandung hampir semua zat-zat gizi yang diperlukan oleh tubuh manusia dalam jumlah yang cukup. Selain itu kedelai dapat juga digunakan sebagai sumber lemak, vitamin, mineral dan serat.

Kacang kedelai (*Glycine max* L) dikenal sebagai sumber utama protein nabati yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai industri pangan dan nonpangan. Industri pangan tradisional seperti industri tahu, tempe, kecap dan tauco sudah tersebar dimana-mana dalam bentuk industri kecil atau rumah tangga.

Kedelai dapat diolah menjadi tempe, keripik tempe, tahu, kecap, susu, dan lain-lainnya. Proses pengolahan kedelai menjadi berbagai makanan pada umumnya merupakan proses yang sederhana, dan peralatan yang digunakan cukup dengan alat-alat yang biasa dipakai di rumah tangga.

**Tabel 2.1.** Komposisi Kimia Biji Kedelai Basah dan Kering per 100 g.  
( Sumber : Sinarti )

<b>Komponen</b>	<b>Basah</b>	<b>Kering</b>
Air (g) Vitamin A (IU)	20,00	7,50
Kalori (kal)	286,00	331,00
Protein (g)	30,20	34,90
Lemak (g)	15,60	18,10
Karbohidrat (g)	30,10	34,80
Kalsium (mg)	196,00	227,00
Fosfor (mg)	506,00	595,00
Besi (mg)	6,90	8,00
Vitamin A (IU)	95,00	110,00
Vitamin A (IU)	0,99	1,07

#### 2.4 Susu kedelai

Susu kedelai merupakan salah satu produk olahan dari kacang kedelai.

Nilai nutrisi yang terkandung dalam susu kedelai antara lain :

1. 38% Protein nabati (protein kedelai)
2. 18% Lemak tak jenuh
3. 15% Serat
4. 15% Karbohidrat
5. Mineral dan senyawa lainnya seperti kalsium, isoflavon, dan lecithin.
6. Vitamin seperti Vitamin D, Vitamin E dan Vitamin B.

## 2.5 Tempe Kedelai

Tempe merupakan produk olahan kedelai yang dibuat melalui proses fermentasi oleh beberapa jenis kapang *Rhizopus*, seperti *Rhizopus oligosporus*, *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer* (kapang roti), atau *Rh. arrhizus* atau sering disebut sebagai ragi tempe.

Kapang yang tumbuh pada kedelai menghidrolisis senyawa-senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana yang mudah dicerna oleh manusia. Tempe kaya akan serat pangan, kalsium, vitamin B dan zat besi. Berbagai macam kandungan dalam tempe mempunyai nilai obat, seperti antibiotika untuk menyembuhkan infeksi dan antioksidan pencegah penyakit degeneratif.

Secara umum, tempe berwarna putih karena pertumbuhan miselia kapang yang merekatkan biji-biji kedelai sehingga terbentuk tekstur yang memadat. Degradasi komponen-komponen kedelai pada fermentasi membuat tempe memiliki rasa dan aroma khas. Berbeda dengan tahu, tempe terasa agak masam.

## 2.6 Ferrous Sulfat

*Ferrous sulfat* atau *Iron ( II ) sulphate* memiliki formula  $\text{FeSO}_4$ , memiliki berbagai macam bentuk anhidrat, salah satunya dalam bentuk  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Ferrous sulfat dalam bentuk yang demikian memiliki massa molar sebesar 278,05 g/mol. Berbentuk kristal berwarna hijau dengan titik leleh  $70^\circ \text{C}$ .

$\text{FeSO}_4$  memiliki banyak kegunaan, salah satunya sebagai tambahan nutrisi bagi tubuh pada proses fortifikasi.

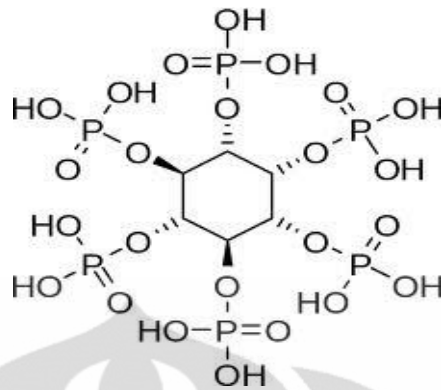
## 2.7 Fitat

Asam fitat merupakan senyawa organik yang terdiri enam senyawa fosfat. Menurut Cahyohadi (2008) bahwa phytat merupakan salah satu non polysaccharida dari dinding tanaman seperti silikat dan oksalat. Asam phytat termasuk chelat (senyawa pengikat mineral) yang kuat yang bisa mengikat ion metal divalent membentuk phytat kompleks sehingga mineral tidak bisa diserap oleh tubuh. Mineral tersebut yaitu Ca, Zn, Cu, Mg dan Fe .

Ketidaklarutan fitat pada beberapa keadaan merupakan salah satu faktor yang secara nutrisi dianggap tidak menguntungkan, karena dengan demikian menjadi sukar diserap tubuh.

Peranan fitat dalam kesehatan yang dianggap positif adalah sebagai antioksidan dimana antioksidan dapat berfungsi menangkal adanya radikal bebas maupun senyawa non radikal yang dapat menimbulkan oksidasi pada biomolekuler seperti protein, karbohidrat, lipida, dan lain-lain. Di samping itu, diduga adanya inositol di dalam senyawa fitat dapat dijadikan sebagai sumber energi bagi atlet yang mengkonsumsi minuman suplemen kaya akan fitat. Akan tetapi, dampak negatif bagi kesehatan adalah kemampuannya mengikat mineral dan protein sehingga nilai kecernaannya dalam tubuh menjadi rendah.



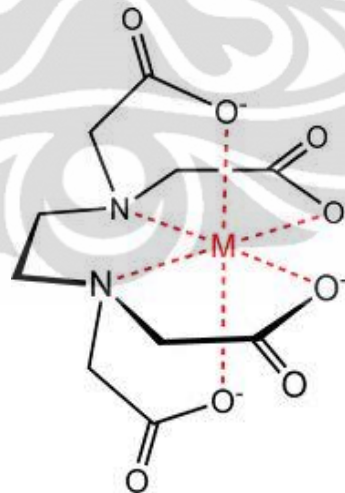


**Gambar 2.2.** Struktur Asam Fitat

(<http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---P/Phytic-Acid.htm>)

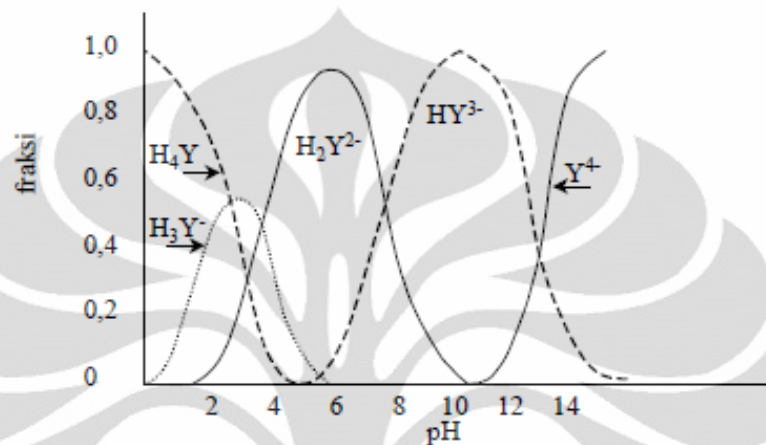
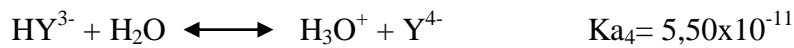
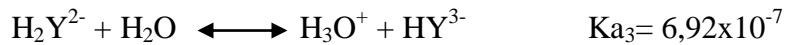
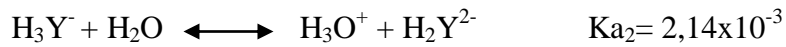
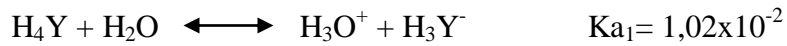
## 2.8 Etilendiamintetraacetic Acid

Etilendiamintetraacetic acid atau yang sering disingkat dengan EDTA merupakan ligan heksadentat. Molekulnya memiliki enam sisi potensial untuk berikatan dengan ion logam, yaitu empat pada gugus karboksilat dan dua gugus amin. EDTA merupakan asam tetraprotik, biasa disingkat  $H_4Y$ .



**Gambar 2.3.** Struktur EDTA (Sumber : Skoog, West, Holler. 1996)

Persamaan ionisasi dan  $K_a$  untuk masing-masing spesi EDTA adalah:



**Gambar 2.4.** Distribusi kelima spesi EDTA sebagai fungsi pH  
(Sumber : Skoog, West, Holler, 1996)

Distribusi di atas menunjukkan bahwa spesi  $\text{H}_2\text{Y}^{2-}$  dominan pada pH asam yaitu sekitar pH 3 – 6. Hanya pada pH lebih dari 10 fraksi  $\text{Y}^{4-}$  merupakan komponen terbesar dalam larutan.

Banyaknya fraksi EDTA dalam larutan dapat ditentukan oleh persamaan berikut :

$$\frac{1}{\alpha_4} = 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a4}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a3}K_{a4}} + \frac{[\text{H}^+]^3}{K_{a2}K_{a3}K_{a4}} + \frac{[\text{H}^+]^4}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4}}$$

## 2.9 Instrumentasi analisis

### 2.9.1 Spektrofotometer UV- Visible

Banyak senyawa organik dapat dianalisis baik secara kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometri Ultra Violet ( 200 – 400 nm ) dan visible. Bila molekul menyerap energi dari daerah tampak dan UV, elektron valensi atau ikatan akan naik ke tingkat energy yang lebih tinggi, disertai dengan vibrasi dan rotasi.

Ketika molekul sampel disinari cahaya yang memiliki energi yang sesuai, terjadi kemungkinan transisi elektronik antara molekul. Beberapa sinarnya akan terabsorb dan ada yang diteruskan. Sinar yang tidak diserap atau ditransmisikan akan terdeteksi pada alat dan menghasilkan spektrum dengan absorbansi spesifik pada setiap panjang gelombang tertentu.

### 2.9.2 Spektrofotometer Serapan Atom

Metode analisis dengan AAS berprinsip pada absorpsi cahaya oleh atom. Atom-atom menyerap cahaya tersebut pada panjang gelombang tertentu, tergantung pada sifat unsurnya. Dengan absorpsi energi, berarti memperoleh lebih banyak energi, suatu atom pada keadaan dasar dinaikkan tingkat energinya ke tingkat eksitasi. Keberhasilan analisis ini tergantung pada proses eksitasi dan memperoleh garis resonansi yang tepat. Setiap alat spektroskopi serapan atom terdiri atas tiga komponen, yaitu unit atomisasi, sumber radiasi, dan sistem pengukur fotometrik. *Atomisasi* dapat dilakukan dengan baik dengan nyala maupun dengan tungku. Untuk mengubah unsur metalik menjadi uap atau hasil disosiasi diperlukan energi panas. Temperatur harus benar-benar terkendali dengan sangat hati-hati agar proses atomisasinya sempurna. Biasanya temperatur dinaikkan secara bertahap, untuk menguapkan dan sekaligus mendisosiasikan senyawa yang dianalisis. Bila ditinjau dari sumber radiasi, haruslah bersifat sumber yang kontinu. Seperangkat sumber yang dapat memberikan

garis emisi yang tajam dari suatu unsur yang spesifik tertentu dikenal sebagai lampu pijar hallow cathode. Dengan pemberian tegangan pada arus tertentu, logam mulai memijar, dan atom-atom logam katodenya akan teruapkan dengan pemercikkan. Atom akan tereksitasi kemudian mengemisikan radiasi pada panjang gelombang tertentu.

Spektroskopi serapan atom atau yang biasa disebut dengan AAS mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode spektroskopi emisi konvensional. Pada metode konvensional, emisi tergantung pada sumber eksitasi. Bila eksitasi dilakukan secara termal, maka ia bergantung pada temperatur sumber. Selain itu eksitasi termal tidak selalu spesifik, dan eksitasi secara serentak pada berbagai spesies dalam suatu campuran dapat saja terjadi.

Sedangkan dengan nyala, *eksitasi* unsur-unsur dengan tingkat eksitasi yang rendah dapat dimungkinkan. Tentu saja perbandingan banyaknya atom yang tereksitasi terhadap atom yang berada pada tingkat dasar harus cukup besar, karena metode serapan atom hanya tergantung pada perbandingan ini dan tidak bergantung pada temperatur. Logam-logam yang membentuk campuran kompleks dapat dianalisis dan selain itu tidak selalu diperlukan sumber energi yang besar.

Teknik Spektroskopi Serapan Atom menjadi alat yang canggih dalam analisis. Ini disebabkan diantaranya oleh kecepatan analisisnya, ketelitiannya sampai tingkat runtu, tidak memerlukan pemisahan pendahuluan. Kelebihan kedua adalah kemungkinannya untuk menentukan konsentrasi semua unsur pada konsentrasi runtu. Ketiga, sebelum pengukuran tidak selalu memerlukan pemisahan unsur yang ditentukan karena kemungkinan penentuan satu unsur dengan kehadiran unsur lain dapat dilakukan asalkan katoda berongga yang diperlukan tersedia. AAS dapat digunakan sampai 61 logam.

Perbandingan antara intensitas sinar yang diteruskan dan intensitas sinar datang serta hubungannya dengan konsentrasi analit yang diukur mengikuti Hukum Lambert-Beer.

***Hukum Lambert – Beer:***

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = a \cdot b \cdot c$$

Dengan

A = absorban

$I_0$  = intensitas sinar datang

I = intensitas sinar yang diteruskan

a = tetapan absorptivitas

b = panjang jalan sinar

c = konsentrasi

Pada lebar nyala api yang tetap, hukum Lambert-Beer dapat disederhanakan menjadi  $A = k \cdot c$  dengan  $k = a \cdot b$ .

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Alat dan Bahan

#### 3.1.1 Alat – alat yang digunakan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : pengaduk magnetik, labu ukur 50 mL, 100 mL, pipet volumetri 5 mL, 10 mL, dan 25 mL. *Erlenmeyer* 50 mL, mortar porselen, *beaker glass* 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, *furnace*, kertas saring, timbangan, *sentrifuge*, aluminium foil, *hotplate*.

#### 3.1.2 Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : kedelai,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Aquademin,  $\text{HNO}_3$  0,5 M, amil alkohol, ammonium tiosianat,  $\text{HNO}_3$  pekat,  $\text{HClO}_4$  60%,  $\text{HCl}$  1:1, susu kedelai.

#### 3.1.3 Alat uji

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu spektrofotometer UV – Visible dan AAS.

### 3.2 Prosedur Kerja

#### 3.2.1 Pembuatan Fe standar

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ditimbang sebanyak 4.3803 gram kemudian dilarutkan dengan 5 ml aqua regia ( $\text{HNO}_3$  :  $\text{HCl}$  (p)) dalam beaker glass lalu dipanaskan hingga larut. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan standar Fe 1000 mg/L. Dari larutan standar Fe akan dibuat seri kepekatan : 0,1,2,3,4,5 mg / L (kurva kalibrasi)

### 3.2.2 Penentuan kurva kalibrasi Fe

Dari larutan standar Fe 1000 gr/L dipipet sebanyak 10 mL larutan kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan aquademin hingga tepat tanda batas. Sehingga diperoleh larutan Fe 100 mg/L. Dari larutan standar 100 ppm dipipet sebanyak 10 mL ke dalam labu ukur 100 mL ditambahkan aquademin hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan Fe 10 mg/L. Dari larutan standar 10 mg/L dipipet masing – masing 5, 10, 15, 20, 25 mL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, lalu ditepatkan sehingga diperoleh larutan standar 1,2,3,4,5 mg/L. Nilai absorbansi larutan tersebut diukur dengan AAS pada panjang gelombang 248,3 nm.

### 3.2.3 Penentuan kadar Fe awal pada tempe

Sampel tempe sebanyak 1 gram ditimbang dengan baik, dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 mL, kemudian ditambahkan 10 mL HNO<sub>3</sub> pekat, dikocok dengan hati – hati. Lalu ditambahkan 3 mL HClO<sub>4</sub> 60% dan dipanaskan di atas *hotplate* ( dalam lemari asam ) perlahan – lahan hingga busa berhenti. Larutan dipanaskan lebih lanjut hingga HNO<sub>3</sub> hampir menguap semua. Jika terjadi arang, dinginkan dan ditambahkan 10 mL HNO<sub>3</sub> pekat lagi dan lanjutkan pemanasan hingga terbentuk asap putih dari HClO<sub>4</sub>. Larutan kemudian didinginkan dan ditambahkan 10 mL HCl ( 1 : 1 ) dan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL . Larutan siap dianalisis.

### 3.2.4 Penentuan kadar Fe awal pada susu

Sampel susu sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 mL, kemudian ditambahkan 10 mL HNO<sub>3</sub> pekat, dikocok dengan hati – hati. Lalu ditambahkan 3 mL HClO<sub>4</sub> 60% dan dipanaskan di atas *hotplate* ( dalam lemari asam ) perlahan – lahan hingga busa berhenti. Larutan dipanaskan lebih lanjut hingga HNO<sub>3</sub> hampir menguap semua. Jika terjadi arang, dinginkan dan ditambahkan 10 mL HNO<sub>3</sub> pekat lagi dan lanjutkan pemanasan

hingga terbentuk asap putih dari  $\text{HClO}_4$ . Larutan kemudian didinginkan dan ditambahkan 10 mL  $\text{HCl}$  ( 1 : 1 ) dan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL. Larutan siap dianalisis.

### 3.2.5 Pembuatan kurva kalibrasi fitat

Larutan standar fitat 0,5 mM dibuat dengan menimbang 3,3 mg standar fitat kemudian dilarutkan dengan aquademin dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL tambahkan aquademin hingga tanda batas. Dari larutan 0,5 mM tersebut, diambil 3 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu 10 mL dan ditepatkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan 0,15 mM. Untuk membuat larutan 0.1 mM, 0.075 mM, dan 0,05 mM masing – masing diambil 2 mL, 1,5 mL, dan 1 mL larutan standar 0,5 mM fitat, kemudian dimasukkan ke dalam labu 10 mL dan ditambahkan aquademin hingga tanda batas. Dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml filtrat ( dari larutan standar yang sudah dibuat ), ditambahkan 0,9 mL  $\text{HNO}_3$  0,5 M dan 1 mL  $\text{FeCl}_3$  0,3 mM. Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah didinginkan, ditambah 5 mL amil alkohol dan 1 mL larutan ammonium tiosianat 0,1 mM. Selanjutnya *disentrifuge* pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan amil alkohol diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 465 nm dengan blangko amil alkohol, 15 menit setelah penambahan ammonium tiosianat.

### 3.2.6 Penentuan kadar fitat awal pada tempe

Kadar asam fitat ditentukan dengan metoda Davies dan Reid, (1979). Sampel tempe sebanyak 1 gr disuspensikan dalam 50 ml larutan  $\text{HNO}_3$  0,5 M. Suspensi ini diaduk menggunakan pengaduk magnet selama 2 jam pada suhu ruang kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk menetapkan kadar asam fitat. Penentuan kadar asam fitat dilakukan dengan cara berikut: Dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml filtrat,



ditambahkan 0,9 mL HNO<sub>3</sub> 0,5 M dan 1 mL FeCl<sub>3</sub> 0,3 mM. Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah didinginkan, ditambah 5 mL amil alkohol dan 1 mL larutan ammonium tiosianat 0,1 mM. Selanjutnya *disentrifuge* pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan amil alkohol diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 465 nm dengan blangko amil alkohol, 15 menit setelah penambahan ammonium tiosianat.

### 3.2.7 Penentuan kadar fitat awal pada susu

Kadar asam fitat ditentukan dengan metoda Davies dan Reid, (1979). Sampel susu sebanyak 10 mL ditambahkan 50 ml larutan HNO<sub>3</sub> 0,5 M. Larutan ini diaduk menggunakan pengaduk magnet selama 2 jam pada suhu ruang kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk menetapkan kadar asam fitat. Penentuan kadar asam fitat dilakukan dengan cara berikut: Dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml filtrat, ditambahkan 0,9 mL HNO<sub>3</sub> 0,5 M dan 1 mL FeCl<sub>3</sub> 0,3 mM. Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah didinginkan, ditambah 5 mL amil alkohol dan 1 mL larutan ammonium tiosianat 0,1 mM. Selanjutnya *disentrifuge* pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan amil alkohol diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 465 nm dengan blangko amil alkohol, 15 menit setelah penambahan ammonium tiosianat.

### 3.2.8 Fortifikasi pada susu kedelai dengan variasi fitat

Ke dalam 100 mL susu kedelai ditambahkan 50 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dan 33 mg Na<sub>2</sub>EDTA, kemudian diaduk dengan pengaduk magnet selama 30-45 menit hingga homogen. Kemudian dilakukan variasi sebagai berikut tanpa penambahan fitat ( 0 mg

fitat ), penambahan fitat sebanyak 10 mg dan penambahan 40 mg fitat.

### 3.2.9 Pembuatan tempe + fortifikan dengan variasi fitat

Kedelai 100 gr dicuci kemudian direndam selama 24 jam. Setelah dicuci dan direndam , kedelai direbus selama 30- 60 menit. Kemudian dicuci kembali dan ditiriskan hingga kering. Ke dalam 0,3 g ragi tempe ditambahkan 50 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 33 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  setelah itu dicampurkan ke dalam 100 g kedelai yang sudah kering hingga merata . Kemudian dilakukan variasi tanpa penambahan fitat ( 0 mg fitat ), 10 mg fitat dan 40 mg fitat. Setelah itu, ditunggu 1-2 hari hingga terbentuk tempe. Setelah itu ditambahkan ragi, fortifikan, dan fitat, kedelai dimasukkan dalam wadah plastik yang sudah dilubangi kecil – kecil terlebih dahulu. Selanjutnya dibiarkan selama 1- 2 hari untuk proses fermentasi.

### 3.2.10 Fortifikasi pada susu kedelai dengan variasi $\text{FeSO}_4$

Ke dalam 100 mL susu, ditambahkan fitat sebanyak 66 mg dan dilakukan variasi  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  sebagai berikut:

1.  $\text{FeSO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = 55 mg : 33 mg
2.  $\text{FeSO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = 111mg : 67 mg
3.  $\text{FeSO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = 222 mg : 134 mg

Setelah susu ditambahkan fortifikan, susu diaduk dengan pengaduk magnet selama 30 - 45 menit hingga homogen.

### 3.2.11 Pembuatan tempe + fortifikan dengan variasi Fe

Kedelai 50 gr dicuci kemudian direndam selama 24 jam. Setelah dicuci dan direndam , kedelai direbus selama 30- 60 menit. Kemudian dicuci kembali dan ditiriskan hingga kering.

Ke dalam 0.3 mg ragi ditambahkan fitat sebanyak 66 mg dan dilakukan variasi  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  sebagai berikut:

1.  $\text{FeSO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = 55 mg : 33 mg
2.  $\text{FeSO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = 111 mg : 67 mg
3.  $\text{FeSO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = 222 mg : 134 mg

Kemudian campuran di atas dimasukkan ke dalam kedelai yang sudah kering tersebut lalu dimasukkan dalam wadah plastik yang sudah dilubangi kecil - kecil dan ditunggu hingga 1-2 hari untuk proses fermentasi.

### **3.2.12 Penentuan Fe bebas pada sampel susu**

Sampel susu yang sudah ditambahkan fortifikan ( langkah 3.2.8 dan 3.2.10 ) diambil sebanyak 10 mL disuspensikan dalam 50 ml larutan  $\text{HNO}_3$  0,5 M. Suspensi ini diaduk menggunakan pengaduk magnet selama 2 jam pada suhu ruang kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk menetapkan kadar asam fitat. Penentuan kadar asam fitat dilakukan dengan cara berikut: Dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml filtrat, ditambahkan 0,9 mL  $\text{HNO}_3$  0,5 M dan 1 mL  $\text{FeCl}_3$  0,3 mM. Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah didinginkan, ditambah 5 mL amil alkohol dan 1 mL larutan ammonium tiosianat 0,1 mM. Selanjutnya *disentrifuge* pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan di bawah ( lapisan air ) diukur konsentrasi Fe nya dengan alat AAS. Konsentrasi Fe yang diukur disebut sebagai Fe bebas. Blanko dibuat dengan langkah yang sama namun tanpa sampel.

### **3.2.13 Penentuan Fe bebas pada sampel tempe**

Sampel tempe yang sudah ditambahkan fortifikan ( langkah 3.2.9 dan 3.2.11 ) sebanyak 1 gr disuspensikan dalam 50 ml larutan  $\text{HNO}_3$  0,5 M. Suspensi ini diaduk menggunakan pengaduk magnet selama 2 jam pada suhu ruang kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk menetapkan kadar asam fitat. Penentuan kadar asam fitat dilakukan dengan cara berikut: Dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml filtrat, ditambahkan 0,9 mL  $\text{HNO}_3$  0,5 M dan 1 mL  $\text{FeCl}_3$  0,3 mM. Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah didinginkan, ditambah 5 mL amil alkohol dan 1 mL

larutan ammonium tiosianat 0,1 mM. Selanjutnya *disentrifuge* pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan di bawah ( lapisan air ) diukur konsentrasi Fe nya dengan alat AAS. Konsentrasi Fe yang diukur disebut sebagai Fe bebas. Blanko dibuat dengan langkah yang sama namun tanpa sampel.

#### **3.2.14 Penentuan Fe-Fitat pada sampel susu**

Sampel susu yang sudah ditambahkan fortifikan ( langkah 3.2.8 dan 3.2.10 ) diambil sebanyak 10 mL disuspensikan dalam 50 ml larutan  $\text{HNO}_3$  0,5 M. Suspensi ini diaduk menggunakan pengaduk magnet selama 2 jam pada suhu ruang kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk menetapkan kadar asam fitat. Penentuan kadar asam fitat dilakukan dengan cara berikut: Dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml filtrat, ditambahkan 0,9 mL  $\text{HNO}_3$  0,5 M dan 1 mL  $\text{FeCl}_3$  0,3 mM. Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah didinginkan, ditambah 5 mL amil alkohol dan 1 mL larutan ammonium tiosianat 0,1 mM. Selanjutnya *disentrifuge* pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan atas ( lapisan amil alkohol ) didestruksi seperti pada langkah 3.2.4. Kemudian diukur kadar Fe nya dengan alat AAS. Konsentrasi Fe yang didapatkan disebut sebagai Fe-Fitat ( Fe yang terikat pada fitat ). Untuk blanko, dilakukan hal yang sama, namun tanpa sampel.

## BAB IV PEMBAHASAN

### 4.1 Pembuatan Tempe

Untuk memperoleh tempe yang baik, pencucian kacang kedelai harus dilakukan hingga benar – benar bersih. Wadah plastik yang akan digunakan sebagai wadah tempe harus dilubangi terlebih dulu. Jika proses pencucian maupun pengemasan tidak baik, proses fermentasi tidak akan berjalan dengan baik sehingga tempe tidak akan terbentuk. Selain itu, kacang kedelai yang sudah diberi ragi, harus diletakkan saling berdekatan dan ditutup dengan koran agar membuat kondisi hangat sehingga kapang atau ragi tempe dapat tumbuh dengan baik.

### 4.2 Penentuan kadar Fe awal sampel

Pemeriksaan kadar Fe awal dilakukan dengan cara destruksi. Destruksi merupakan proses untuk analisis logam dengan penambahan asam – asam pekat dengan pemanasan . Tujuannya agar logam Fe dapat terlepas dari keadaannya yang terikat dengan senyawa organik sehingga dapat dengan mudah dibaca oleh alat AAS. Dari proses ini, didapatkan hasil sebagai berikut :

**Tabel 4.1.** Konsentrasi Fe awal pada sampel

Sampel	Konsentrasi Fe ( ppm )
Kecap	8.2215
Susu bubuk	1.4350
tempe	0.2747
Susu kedelai cair	1.1571

Dari hasil yang didapatkan, dapat diketahui bahwa kadar Fe yang terbesar terdapat pada kecap. Oleh karena itu, sampel yang akhirnya digunakan hanya susu

dan tempe. Selain itu, karena kesulitan dalam menghomogenkan fortifikan maka susu bubuk kedelai tidak digunakan, namun digunakan susu kedelai cair.

### 4.3 Penentuan kadar fitat awal pada sampel

Untuk menentukan kadar fitat pada sampel susu dan tempe, sampel ditambahkan dengan  $\text{HNO}_3$  0,5 M. Hal ini bertujuan untuk merusak protein pada sampel, sehingga fitat lebih mudah dianalisis. Setelah penambahan tersebut, dilakukan penambahan  $\text{FeCl}_3$  sehingga fitat yang dianalisis akan berada dalam bentuk Fe-fitat. Kemudian ditambahkan amil alkohol hingga terbentuk dua fasa. Setelah itu lapisan amil alkohol diukur dengan menggunakan *spektrofotometer UV-Visible*. Hal ini menunjukkan bahwa amil alkohol merupakan pelarut Fe-Fitat sehingga dapat digunakan pada analisis kandungan Fe-fitat pada sampel yang telah difortifikasi. Penggunaan *spektrofotometer UV-Visible* untuk menentukan kandungan fitat pada sampel didasarkan pada pembentukan kompleks berwarna antara Fe-Fitat dengan ammonium tiosianat. Analisis sampel dilakukan pada panjang gelombang 465 nm yaitu pada daerah sinar tampak.

**Tabel 4.2.** Kadar fitat yang diperoleh pada 100 mL susu dan 100 g tempe

sampel	Kadar Fitat ( g )
Susu kedelai	0.0618
Tempe	0.3709

Berbeda dengan kurva standar Fe, kurva yang dihasilkan pada standar fitat memiliki kurva yang menurun seperti pada Lampiran 1. Semakin rendah absorpsi yang diperoleh maka konsentrasi fitat semakin menurun. Hal ini dikarenakan Fitat yang terukur sebenarnya dalam bentuk Fe-Fitat. Penambahan  $\text{FeCl}_3$  pada prosedur kerja akan membuat fitat berikatan dengan fitat semnetara sisanya berikatan dengan  $\text{NH}_4\text{SCN}$ .

Reaksi yang terjadi yaitu :



Setelah sempurna bereaksi dengan fitat,  $\text{Fe}^{3+}$  bereaksi dengan  $\text{SCN}^-$  membentuk kompleks  $\text{Fe(SCN)}^{2+}$  yang berwarna merah.

Absorbansi yang terukur pada spektrofotometer UV-Visible sebenarnya milik  $\text{Fe(SCN)Cl}_2$  karena menghasilkan kompleks berwarna merah ( seperti pada lampiran 6. Baik Fe yang terikat pada ligan  $\text{SCN}^-$  maupun pada fitat berasal dari  $\text{FeCl}_3$ , maka semakin banyak Fe yang terikat pada  $\text{SCN}^-$ , semakin sedikit Fe yang terikat pada fitat. Oleh karena itu, dihasilkan kurva yang menurun, dimana seiring dengan naiknya konsentrasi fitat, absorbansi yang diperoleh semakin menurun.

Dari hasil yang diperoleh, dapat diketahui bahwa kadar fitat dalam susu lebih rendah daripada kadar fitat dalam tempe. Hal ini dapat disebabkan karena pada proses pembuatan susu, sudah melalui proses pengenceran dari bentuk aslinya yaitu kacang kedelai. Juga dapat disebabkan banyaknya kacang kedelai yang digunakan oleh produsen susu, tidak sama dengan banyaknya kedelai yang digunakan pada saat pembuatan tempe. Namun, jika kadar fitat pada tempe dibandingkan dengan kadar fitat pada kedelai aslinya yaitu sebesar 1,38 g (Soesilowati,1996), mengalami penurunan sebesar 73,12 %. Hal ini dikarenakan adanya proses fermentasi dan perendaman pada tempe, sementara pada susu tidak terdapat proses tersebut. Proses perendaman mengakibatkan menurunnya kadar fitat karena fitat larut dalam air (Soesilowati,1996). Sementara proses fermentasi yang dihasilkan oleh mikroorganisme pada inokulum ( ragi ) tempe menyebabkan terbentuknya enzim fitase yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi inositol dan orthofosfat (Hestining,1996).

#### 4.4 Penentuan kadar Fe bebas pada Fortifikasi susu kedelai dan tempe dengan variasi fitat.

Fortifikan yang ditambahkan sesuai dengan rekomendasi dari WHO (2006) yaitu perbandingan antara Fe : Na<sub>2</sub>EDTA sebesar 1 : 3.3 atau sebanding dengan penambahan 50 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dan 33 mg NA<sub>2</sub>EDTA. Variasi fitat yang ditambahkan yaitu sebanyak 0 mg, 10 mg dan 40 mg.

Penentuan kadar Fe bebas pada sampel dilakukan seperti pada penentuan kadar fitat awal , namun yang diukur adalah lapisan bawah ( lapisan air ) dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom. Hasil yang didapatkan adalah sebagai berikut

**Tabel 4.3.** Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi susu kedelai dan tempe dengan variasi fitat.

Sampel	Konsentrasi Fe bebas (ppm)
susu + fortifikan + 0mg fitat	2.3581
susu + fortifikan + 10mg fitat	1.5373
susu + fortifikan + 40mg fitat	1.1675
tempe + fortifikan + 0 mg fitat	0.2108
tempe + fortifikan + 10 mg fitat	0.1589
tempe + fortifikan + 40 mg fitat	0.0592

Berdasarkan hasil pengamatan dapat diketahui bahwa penambahan fitat dapat mempengaruhi keberadaan Fe bebas pada sampel. Semakin banyak jumlah fitat yang ditambahkan, maka konsentrasi Fe bebas pada sampel semakin kecil. Hal ini dikarenakan semakin banyaknya Fe yang terikat pada fitat untuk membentuk Fe-Fitat.

Dari data juga dapat diamati bahwa konsentrasi Fe bebas pada sampel susu lebih banyak bila dibandingkan dengan konsentrasi Fe bebas pada tempe. Hal ini dapat disebabkan sampel susu lebih mudah dianalisis karena lebih homogen ketika ditambahkan fortifikan dan fitat daripada tempe yang bentuknya padatan.



#### 4.5 Penentuan Kadar Fe bebas pada Fortifikasi Susu dan Tempe dengan variasi penambahan $\text{FeSO}_4$ dan $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

Penambahan  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dilakukan dengan variasi sebagai berikut :

1.  $\text{FeSO}_4 : \text{Na}_2\text{EDTA} = 55 \text{ mg} : 33 \text{ mg} ( 0.2 \text{ mol} : 0.1 \text{ mol} )$
2.  $\text{FeSO}_4 : \text{Na}_2\text{EDTA} = 111 \text{ mg} : 67 \text{ mg} ( 0.4 \text{ mol} : 0.2 \text{ mol} )$
3.  $\text{FeSO}_4 : \text{Na}_2\text{EDTA} = 222 \text{ mg} : 134 \text{ mg} ( 0.8 \text{ mol} : 0.4 \text{ mol} )$

dan fitat yang ditambahkan tetap yaitu 0,1 mol atau sebanyak 66 mg. Dari perlakuan di atas, didapatkan hasil sebagai berikut :

**Tabel 4.4.** Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi Susu dan Tempe dengan variasi penambahan  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

sampel	$\text{FeSO}_4 : \text{Na}_2\text{EDTA}$ ( mol )	Konsentrasi Fe bebas ( ppm )
Susu	0,2 : 0,1	1.6465
Susu	0,4 : 0,2	1.6130
Susu	0,8 : 0,4	4.4596
Tempe	0,2 : 0,1	0.1723
Tempe	0,4 : 0,2	0.1475
Tempe	0,8 : 0,4	0.3140

Berdasarkan data yang diperoleh dapat diamati bahwa hasil tersebut tidak bertentangan dengan hasil sebelumnya pada variasi fitat dimana semakin banyak jumlah  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  yang ditambahkan pada sampel, maka jumlah Fe bebas juga semakin banyak. Sehingga jika dibuat grafik dengan mengalurkan antara jumlah penambahan  $\text{FeSO}_4$  dengan konsentrasi Fe bebas seperti pada lampiran 3 akan didapatkan grafik yang meningkat seiring dengan penambahan jumlah  $\text{FeSO}_4$ .

#### 4.6 Penentuan Kadar Fe bebas pada Fortifikasi Susu dan Tempe dengan variasi penambahan $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$ dan $\text{FeSO}_4$ ( tanpa $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) .

Untuk mengetahui pengaruh penambahan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  terhadap konsentrasi Fe bebas dilakukan variasi penambahan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  serta  $\text{FeSO}_4$  ( tanpa

Na<sub>2</sub>EDTA ) dengan jumlah fitat tetap ke dalam sampel. Hasil yang didapatkan sebagai berikut

**Tabel 4.5** Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi Susu dengan variasi penambahan FeSO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>EDTA dan FeSO<sub>4</sub> ( tanpa Na<sub>2</sub>EDTA)

Jumlah FeSO <sub>4</sub> ( mol )	Jumlah Fe bebas Dengan Penambahan Na <sub>2</sub> EDTA ( ppm )	Jumlah Fe bebas Tanpa Na <sub>2</sub> EDTA ( ppm )
0.2	1.6465	1.0298
0.4	1.6130	0.6419
0.8	4.4596	2.4167

**Tabel 4.6.** Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi Tempe dengan variasi penambahan FeSO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>EDTA dan FeSO<sub>4</sub> ( tanpa Na<sub>2</sub>EDTA)

Jumlah FeSO <sub>4</sub> ( mol )	Jumlah Fe bebas Dengan Penambahan Na <sub>2</sub> EDTA ( ppm )	Jumlah Fe bebas Tanpa Na <sub>2</sub> EDTA ( ppm )
0.2	0.1723	0.1856
0.4	0.1475	0.1605

Dari hasil yang diperoleh, dapat diketahui bahwa Na<sub>2</sub>EDTA memiliki pengaruh terhadap konsentrasi Fe bebas. Pada sampel susu, pengaruh tersebut terlihat sangat jelas. Namun pada sampel tempe, Na<sub>2</sub>EDTA tidak memiliki pengaruh terhadap konsentrasi Fe bebas.

Susu dengan penambahan Na<sub>2</sub>EDTA menghasilkan konsentrasi Fe bebas yang lebih banyak daripada susu yang ditambahkan FeSO<sub>4</sub> tanpa Na<sub>2</sub>EDTA.

Agar dapat mengetahui seberapa efektif penambahan Na<sub>2</sub>EDTA dalam menghasilkan Fe bebas, maka perlu diketahui % hasil seperti pada tabel di bawah ini

**Tabel 4.7.** % hasil Fe bebas pada sampel susu + FeSO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>EDTA dan susu tanpa Na<sub>2</sub>EDTA

Mol FeSO <sub>4</sub>	Jumlah Fe yang ditambahkan (mg)	Jumlah Fe bebas susu dengan Na <sub>2</sub> EDTA (mg)	Jumlah Fe bebas susu tanpa Na <sub>2</sub> EDTA (mg)	% hasil susu dengan Na <sub>2</sub> EDTA	% hasil susu tanpa Na <sub>2</sub> EDTA
0.2	11.1700	1.6465	1.0298	14.74 %	9.22 %
0.4	22.3400	1.6130	0.6419	7.22 %	2.87 %
0.8	44.6800	4.4596	2.4167	9.98 %	5.41 %

**Tabel 4.8.** % hasil Fe bebas pada sampel tempe + FeSO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>EDTA dan tempe tanpa Na<sub>2</sub>EDTA

Mol FeSO <sub>4</sub>	Jumlah Fe yang ditambahkan (mg)	Jumlah Fe bebas (mg) tempe tanpa Na <sub>2</sub> EDTA	Jumlah Fe bebas (mg) tempe dengan Na <sub>2</sub> EDTA	% hasil tempe tanpa Na <sub>2</sub> EDTA	% hasil tempe dengan Na <sub>2</sub> EDTA
0.2	11.1700	0.1856	0.1723	1.66 %	1.54 %
0.4	22.3400	0.1605	0.1475	0.72 %	0.66 %
0.8	44.6800	N.A.	0.3140	N.A.	0.70 %

Dari data di atas dapat diketahui bahwa % hasil terbanyak terdapat pada penambahan 0,2 mol FeSO<sub>4</sub> + 0,1 mol Na<sub>2</sub>EDTA pada sampel susu. Sedangkan untuk sampel tempe diperoleh % hasil terbanyak pada penambahan 0,2 mol FeSO<sub>4</sub> tanpa Na<sub>2</sub>EDTA. Oleh karena itu, dapat pula diketahui bahwa Na<sub>2</sub>EDTA memiliki pengaruh terhadap keberadaan Fe bebas pada sampel susu sementara tidak berpengaruh terhadap sampel tempe.

Hal ini dapat disebabkan kondisi reaksi dimana sampel susu merupakan cairan sehingga dapat menyebabkan interaksi antara FeSO<sub>4</sub> dengan Na<sub>2</sub>EDTA sementara pada sampel tempe yang berbentuk padatan tidak menyebabkan interaksi.

Pemeriksaan pH pada sampel susu membuktikan adanya interaksi antara  $\text{FeSO}_4$  dengan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  seperti pada table di bawah ini :

**Tabel 4.9.** Kondisi pH pada sampel susu

Penambahan $\text{FeSO}_4$	Penambahan $\text{Na}_2\text{EDTA}$	pH
0	0	5,75
0,2 mol	0,1 mol	5,48
0,4 mol	0,2 mol	5,15
0,8 mol	0,4 mol	4,77

Dari tabel dapat diketahui bahwa pH saat terjadinya reaksi adalah daerah pH dimana  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  memiliki fraksi  $\text{EDTA}^{2-}$  sebagai fraksi dominan dalam larutan seperti yang terlihat pada distribusi fraksi  $\text{H}_4\text{EDTA}$  pada gambar 2.3.

$\text{EDTA}^{2-}$  yang terdapat dalam larutan akan bereaksi dengan  $\text{FeSO}_4$  sehingga kemungkinan menghasilkan kompleks  $\text{NaFeEDTA}$ . Kompleks  $\text{NaFeEDTA}$  ini lebih stabil daripada  $\text{FeSO}_4$  karena ion Fe dalam kompleks tersebut berada dalam bentuk kelat dengan EDTA. Hal ini menyebabkan fitat lebih sukar menyerang  $\text{NaFeEDTA}$  daripada menyerang Fe dalam  $\text{FeSO}_4$  saja tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Oleh karena itu Fe bebas yang dihasilkan pada sampel susu lebih banyak pada penambahan  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  daripada Fe bebas yang dihasilkan dari penambahan  $\text{FeSO}_4$  saja tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

Pada sampel tempe yang berbentuk padatan menyebabkan kondisi reaksi yang tidak dapat mengionkan  $\text{FeSO}_4$  maupun  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  serta tidak memiliki pengaruh pH sehingga tidak terjadi interaksi antara  $\text{FeSO}_4$  dengan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  seperti pada sampel susu. Hal ini mengakibatkan, penambahan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  tidak berpengaruh terhadap peningkatan konsentrasi Fe bebas pada sampel. Namun, belum dapat membuktikan sepenuhnya bahwa penambahan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  pada sampel susu dapat menghasilkan kompleks  $\text{NaFeEDTA}$ . Untuk membuktikan apakah terbentuk kompleks  $\text{NaFeEDTA}$  maka perlu penelitian lebih lanjut.

Dari hasil yang diperoleh dapat diketahui pula bahwa jumlah Fe bebas semakin banyak seiring dengan penambahan  $\text{FeSO}_4$  (jumlah fitat tetap yaitu 66 mg fitat). Namun jumlah Fe bebas ini masih lebih sedikit jika dibandingkan dengan jumlah Fe yang terikat pada fitat.

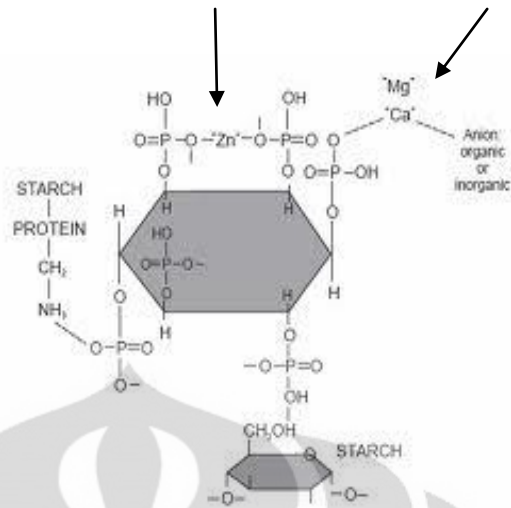
Sebagai contoh, dilakukan pemeriksaan kadar Fe-Fitat pada salah satu sampel susu dengan penambahan 0,2 mol  $\text{FeSO}_4$  didapatkan hasil sebagai berikut :

**Tabel.4.10** Kadar Fe-Fitat pada sampel susu + 0,2 mol  $\text{FeSO}_4$  + 0,1 mol  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

$\text{FeSO}_4$ yang ditambahkan	mg Fe	Fe susu awal (mg)	Total Fe seharusnya	Fe bebas	Fe-Fitat	Total Fe ( Fe bebas + Fe-Fitat)
0.2 mol	11.17	1.1571	12.3271	1.6465	10.4907	12.1372

Banyaknya Fe yang terikat dengan fitat sebagai Fe-Fitat dapat disebabkan karena banyaknya sisi ikatan yang memungkinkan Fe untuk berikatan dengan fitat. Jika dilihat dari strukturnya yang berbentuk cincin dengan 6 atom fosfat dan terdapat 2 -OH pada masing – masing fosfat, gugus -OH ini mudah melepaskan atom H nya sehingga mampu berikatan dengan logam sehingga membentuk kompleks. Oleh karena itu, fitat memiliki banyak sisi untuk berikatan dengan logam bila dibandingkan dengan ikatan logam dengan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

Satu molekul asam fitat mampu berikatan dengan enam kation divalen dan tiap satu kation dapat menghubungkan dua molekul fitat yang lain bergantung pada tingkat oksidasinya (Sri Raharjo, 1997). Asam fitat mampu berikatan dengan empat kation  $\text{Fe}^{3+}$ . Menurut Sri Raharjo (1997), usaha untuk mengkristalkan Fe dengan Asam fitat belum berhasil, sehingga bentuk konformasi dari garam Fe-Fitat belum diketahui.



**Gambar 2.4** Kemungkinan sisi ikatan antara Fe dengan fitat

Meski jumlah Fe bebas yang dihasilkan semakin meningkat seiring dengan bertambahnya  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  yang dimasukkan ke dalam sampel, namun efektifitasnya justru berkurang. Hal ini dapat disebabkan oleh banyaknya kemungkinan sisi ikatan antara ion logam dengan fitat meski banyak  $\text{FeSO}_4$  yang ditambahkan, Fe yang terikat dengan Fitat juga semakin banyak sehingga mengurangi efektifitas penambahan fortifikan.

Selain itu, adanya kemungkinan ion Fe yang terikat pada protein ataupun asam amino yang terdapat pada susu maupun pada tempe menyebabkan efektifitas penambahan fortifikan berkurang. Seperti yang sudah disebutkan dalam bab sebelumnya bahwa kacang kedelai memiliki kandungan asam amino maupun protein yang cukup tinggi.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Penambahan fortifikan paling efektif untuk 100 mL sampel susu kedelai terdapat pada penambahan 0,2 mol  $\text{FeSO}_4$  + 0,1 mol  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .
2. Penambahan fortifikan paling efektif untuk 50 gram sampel tempe terdapat pada penambahan 0,2 mol  $\text{FeSO}_4$  tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .
3.  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  memiliki pengaruh terhadap keberadaan Fe bebas pada sampel susu.

#### **5.2 Saran**

1. Dapat digunakan fortifikan lain untuk mendapatkan jumlah Fe bebas yang optimal agar semakin banyak Fe yang dapat diserap oleh tubuh
2. Dapat dilakukan penggunaan  $\text{NaFeEDTA}$  untuk membandingkan dengan  $\text{FeSO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  untuk dilihat efektifitas Fe bebas yang dihasilkan.
3. Dapat digunakan sampel bahan pangan berbasis kedelai lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

(ASA), A. S. (1999). *Southeast Asia Soyfood Directory 1999-2000*. Singapore: ASA.

(INACG), I. N. (1993). *Iron EDTA for food fortification*. Washington DC: ILSI-Nutrition Foundation.

A.Skoog, d. D. (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. USA: Saunders College Publishing.

Ernst GrafS, K. L. (1987). Phytic Acid A Natural Antioxidant. *The Journal Of Biological Chemistry* , 262, 24.

Hestining Pupus Pangastuti, S. T. (1996). *Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap kandungan asam Fitat dalam tempe kedelai*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Prihananto. (2004). Fortifikasi Pangan Sebagai Upaya Penanggulangan Anemia Gizi Besi.

Purnomo, P.S. 2002. *Pengalaman Fortifikasi Tepung Terigu di Indonesia* Hal. 49-53. *Dalam: Hardinsyah, L. Amalia dan B. Setiawan (Eds). Fortifikasi Tepung Terigu dan Minyak Goreng*. Pusat Studi Kebijakan Pangan dan Gizi (PSKPG) IPB, Komisi Fortifikasi Nasional (KFN) ADB- Manil dan Keystone Center-USA.

Raharjo, Sri. 1997. *Peran Asam Fitat sebagai Antioksidan*. Agritech Vol.17 No2.

RI, D. (2003). *Gizi dalam Angka*. Jakarta: Direktorat Jenderal Bina Kesehatan masyarakat, Direktorat Gizi Masyarakat.

Seely, Stephen, BSc. Et al. 1985. *Diet-Related Deases, The Modern Epidemic*. The Avi Publishing Comp. Inc. Wesport Conecticut, p.56.

Siagian, Albiner. 2003. Pendekatan Fortifikasi pangan untuk Mengatasi Masalah Kekurangan Zat Gizi Mikro. FAKultas Kesehatan MAsyarakat, Universitas Sumatra Utara.

Susilowati Hadisusilo, S. S. (1996). Pengaruh Waktu Perendaman Kedelai (*Gycine max.(L).Maerrili*) pada Kandungan Asam Fitat dalam Sampel dari Setiap Tahap Proses Pembuatan Tahu. *Akta Kimia* , 6, 1-2.



Untoro, R. 2002. *Masalah gizi Mikro di Indonesia dan Potensi Penanggulangannya* Hal.5-20. Dalam: Hardinsyah, L.Amalia dan B.Setiawan (Eds). Fortifikasi Tepung Terigu dan Minyak Goreng. Pusat Studi Kebijakan Pangan dan Gizi (PSKPG) IPB, Komisi Fortifikasi Nasional (KFN) ADB- Manil dan Keystone Center-USA.

Yenrina, R. Yuliana dan D. Muchtadi. 2006. Pengolahan dan Penerimaan Produk Kedelai pada Rumah Tangga di Perkotaan dan Pedesaan Pulau Jawa Indonesia. *Jurnal Gizi dan Pangan*, Juli 2006 (1):36-43.

Yeung, D.L. 2003. *Iron and Mikronutrients: Complementary food fortification*.

Wahidin. 2009. *Analisi Zat Besi dari Susu Sapi Murni dan Minuman Susu Fermentasi Yakult, Calpico, dan Vitacharm secara Destruksi dengan Menggunakan Metode Analisis Spektrofotometri Serapan Atom*. Universitas Sumatera Utara, Medan.

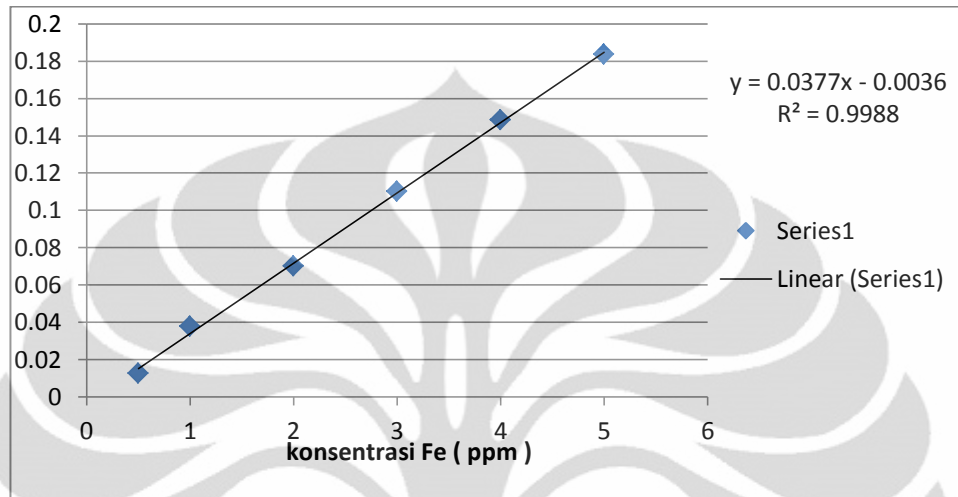
W.HO (2006). *Guidelines on Food Fortification with Micronutrients*. (B. d. Lindsay Allen, Ed.) France: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

Widodo, Wahyu, 2005. *Tanaman Beracun dalam Kehidupan Ternak*. Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang.

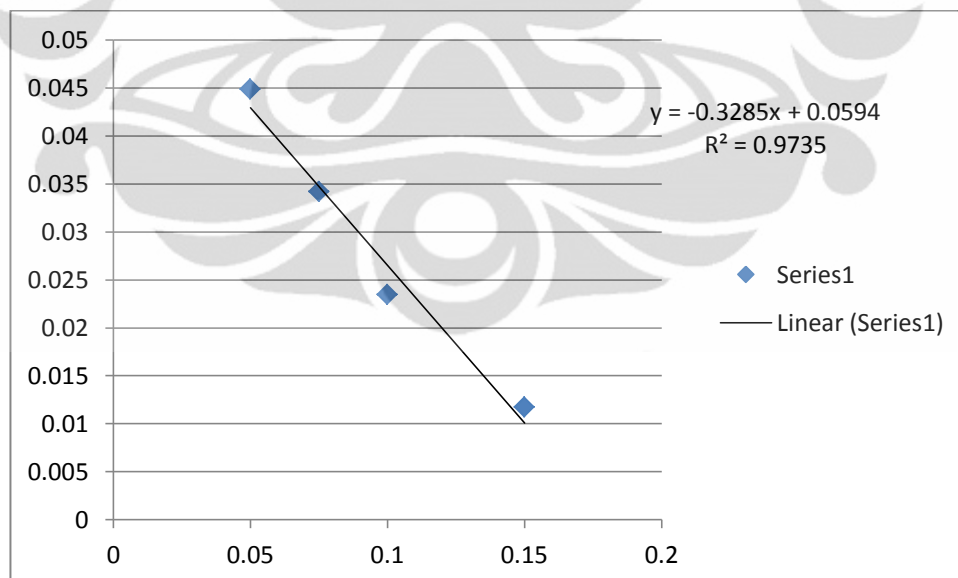
Wolf, W.J. 1979. *Chemistry and Technology of Soybean*. In : *Advances of Cereal Science and Technology*. Acedemic Press, New York.

**LAMPIRAN 1**

Kurva kalibrasi Fe standar

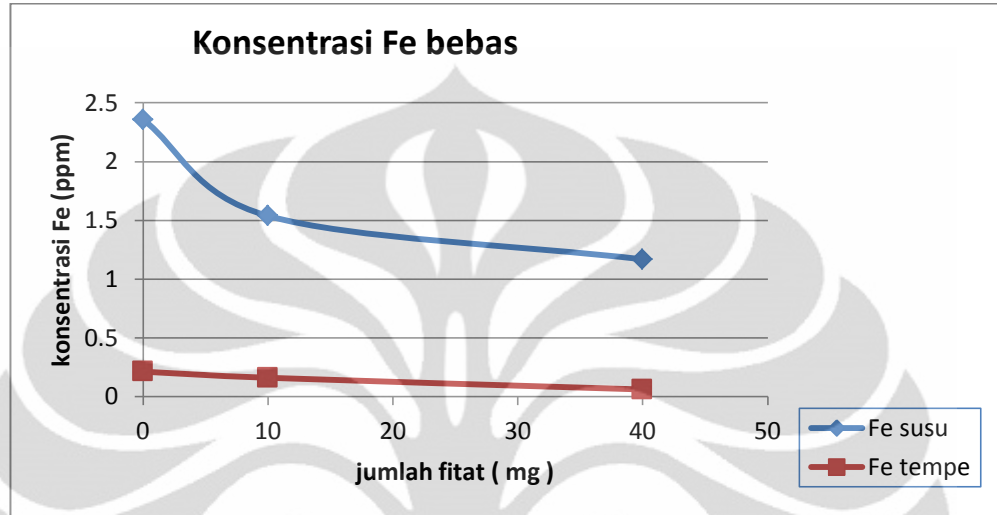


Kurva kalibrasi Fitat standar

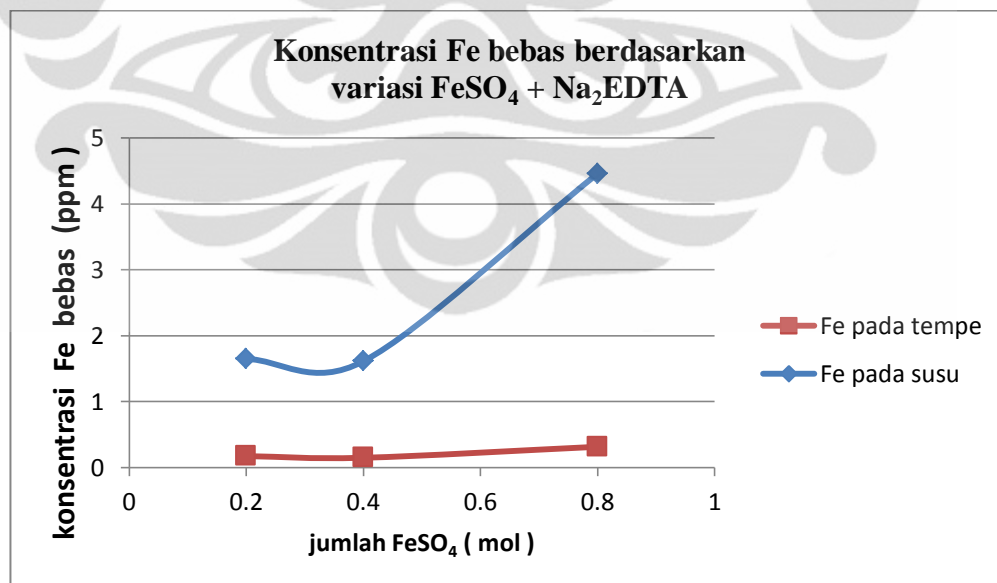


## LAMPIRAN 2

Kurva Konsentrasi Fe Bebas berdasarkan variasi fitat

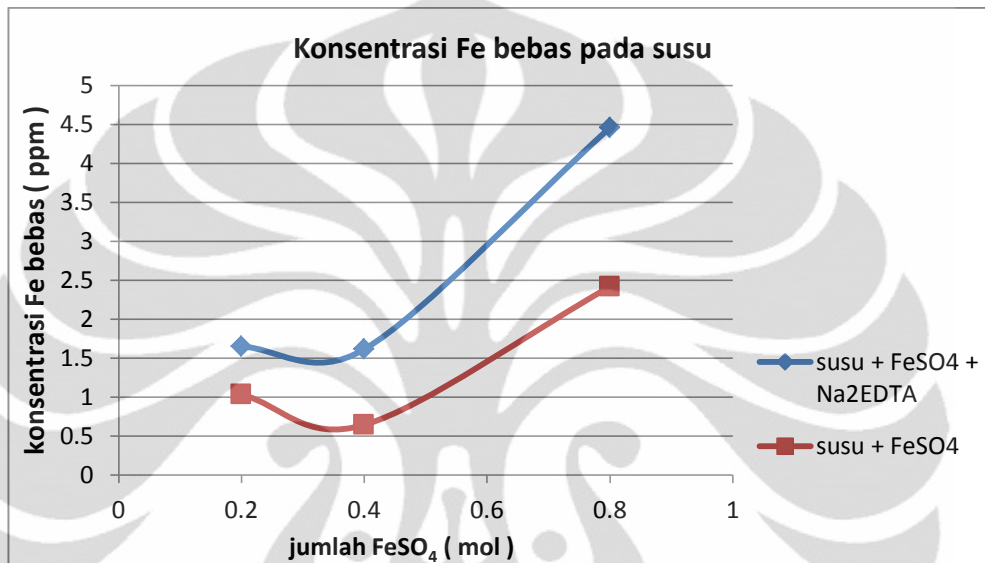


Kurva Konsentrasi Fe bebas pada Fortifikasi Susu dan Tempe dengan variasi penambahan  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

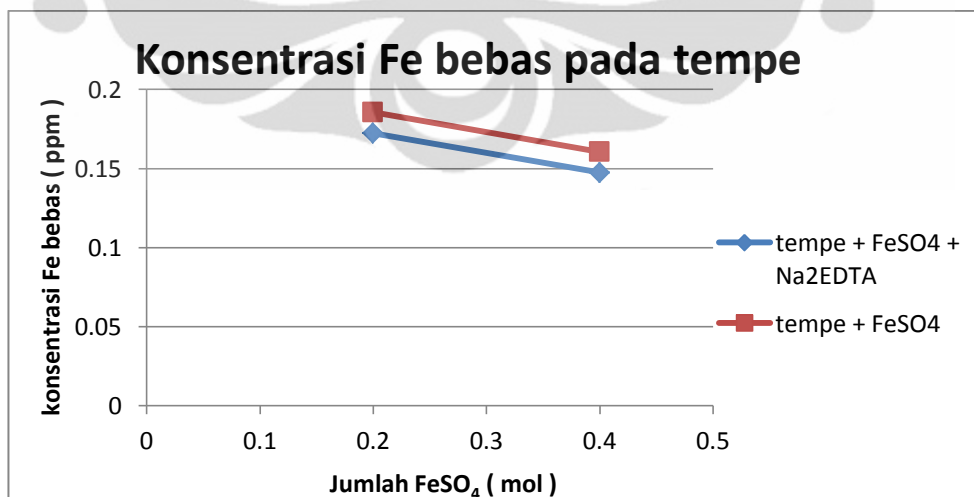


### LAMPIRAN 3

Kurva konsentrasi Fe bebas pada fortifikasi susu dengan variasi penambahan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  dan  $\text{FeSO}_4$  ( tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )

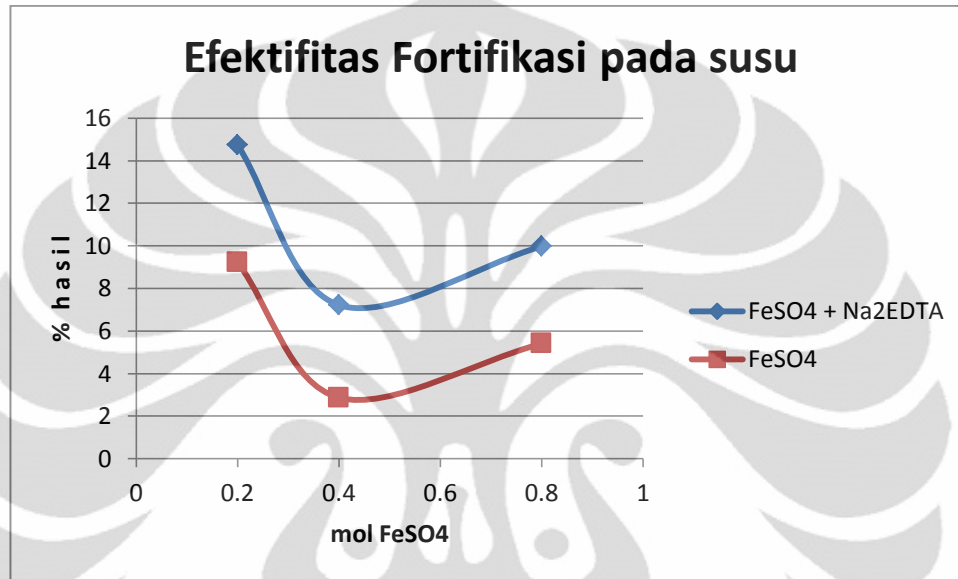


Kurva konsentrasi Fe bebas pada fortifikasi tempe dengan variasi penambahan  $\text{FeSO}_4 + \text{Na}_2\text{EDTA}$  dan  $\text{FeSO}_4$  ( tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )

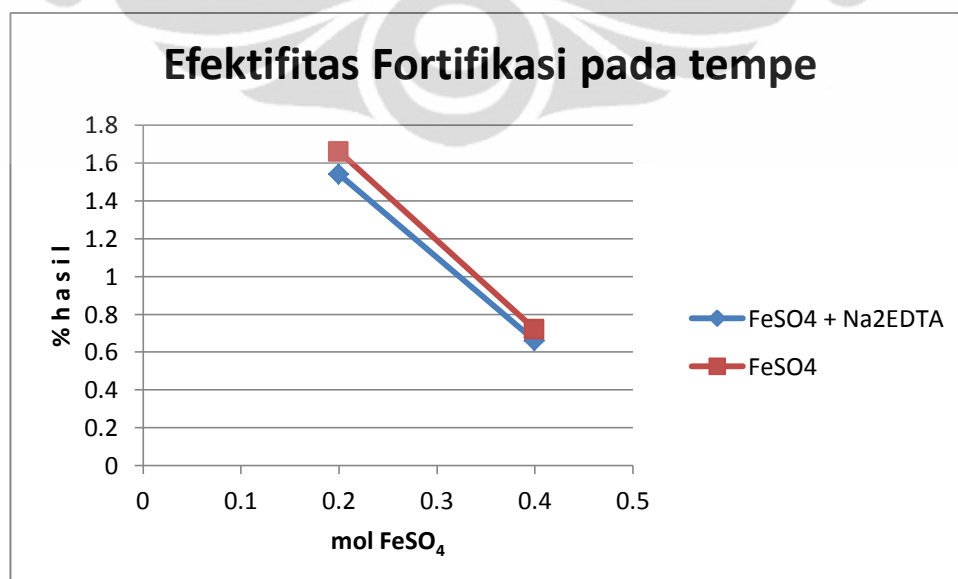


## LAMPIRAN 4

Kurva % hasil Fe bebas pada sampel susu +  $\text{FeSO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dan susu tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

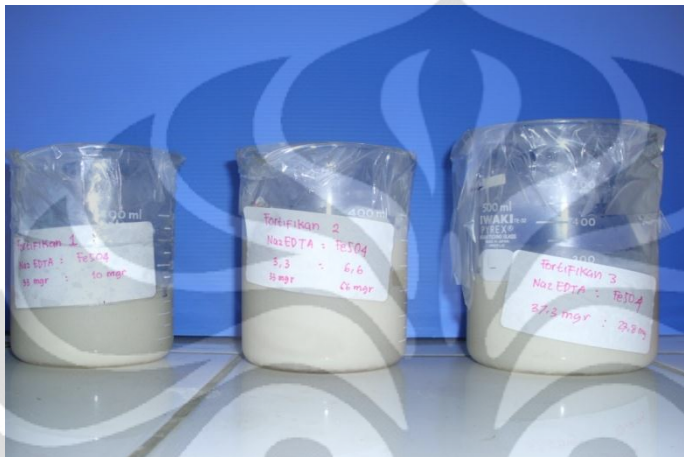


Kurva % hasil Fe bebas pada sampel tempe +  $\text{FeSO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dan tempe tanpa  $\text{Na}_2\text{EDTA}$



**LAMPIRAN 5**

Gambar Fortifikasi Susu



Gambar destruksi susu



**LAMPIRAN 6**

Gambar analisis kadar Fitat awal

