



UNIVERSITAS INDONESIA

**FORTIFIKASI DAN KETERSEDIAAN ZAT BESI PADA BAHAN
PANGAN BERBASIS KEDELAI DENGAN MENGGUNAKAN
FORTIFIKAN $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ CAMPURAN $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} +$
 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ DAN NaFeEDTA**

TESIS

**AZHAR DARLAN
NPM. 0906651220**

**PROGRAM PASCA SARJANA
DEPARTEMEN KIMIA
FMIPA-UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**FORTIFIKASI DAN KETERSEDIAAN ZAT BESI PADA BAHAN
PANGAN BERBASIS KEDELAI DENGAN MENGGUNAKAN
FORTIFIKAN $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ CAMPURAN $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} +$
 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ DAN NaFeEDTA**

Tesis

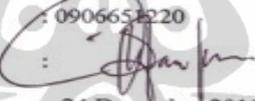
**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
magister sains**

**AZHAR DARLAN
NPM. 0906651220**

**PROGRAM PASCA SARJANA
DEPARTEMEN KIMIA
FMIPA-UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
2012**

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

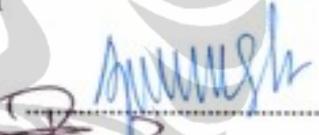
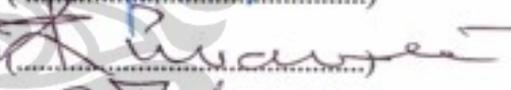
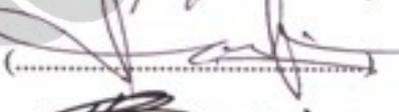
Nama : AZHAR DARLAN
NPM : 0906651220
Tanda Tangan : 
Tanggal : 24 Desember 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : AZHAR DARLAN
NPM : 0906651220
Program Studi : MAGISTER KIMIA
Judul Tesis : Fortifikasi dan Ketersediaan zat besi pada bahan berbasis kedelai dengan menggunakan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Rer. Net Agustino Zulys, MSc (.....) 
Pembimbing II: Dr. Riwandi Sihombing..... (.....) 
Penguji : Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS..... (.....) 
Penguji : Dr. Endang Saepudin..... (.....) 
Penguji : Dr. Ridla Bakri, M.Phil..... (.....) 
Penguji : Asep Saefumillah S.Si., M.Si., Ph.D. (.....) 

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 13 Januari 2012

KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan Tesis ini. Penulisan Tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan Tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikannya. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Rer. Nat. Agustino Zulys, MSc, selaku pembimbing I yang dengan sabar membimbing dan memberikan masukan, saran, arahan, serta diskusi yang sangat berarti bagi penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya tesis ini. Juga mohon dimaafkan bila selama ini ada yang tidak berkenan dihati
- (2) Dr. Riwandi Sihombing, selaku dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
- (3) Dr. Yuni Krisyuningsih Krisnandi M.Sc sebagai dosen pembimbing akademik, yang banyak memberi arahan semasa perkuliahan;
- (4) De SDM Polri yang telah memberi sebahagian beasiswa selama pendidikan;
- (5) Puslabfor Mabes Polri, yang telah memberi dispensasi waktu bertugas, sehingga saya dapat menyelesaikan perkuliahan;
- (6) Istri dan anak-anak saya yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral; dan
- (7) Teman-teman sesama mahasiswa S-2 Kimia UI yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

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

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

Nama : Azhar Darlan
NPM : 0906651220
Program Studi : S2
Departemen : Kimia
Fakultas : MIPA
Jenis karya : Tesis

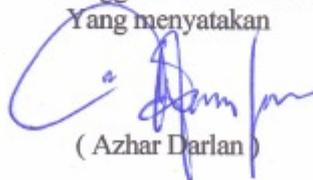
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul : Fortifikasi dan Ketersediaan zat besi pada bahan berbasis kedelai dengan menggunakan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan 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 : 25 Desember 2011

Yang menyatakan



(Azhar Darlan)

ABSTRAK

Nama : Azhar Darlan
Program Studi : S-2 Kimia
Judul : Fortifikasi dan Ketersediaan zat besi pada bahan pangan berbasis kedelai dengan menggunakan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA

Tujuan utama dari penelitian ini untuk mengetahui efektifitas fortifikan zat besi dengan menggunakan variasi fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA serta ketersediaan zat besi dalam sistim tubuh manusia dengan menggunakan metoda *in vitro* untuk mendapatkan fortifikan ideal pada sampel berbasis kedelai seperti pada susu kedelai cair dan tempe. Fortifikasi disini dipengaruhi oleh keberadaan fitat sebagai inhibitor besi yang terdapat pada kedelai. Kandungan fitat ditentukan metoda Davies dan Reid dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dengan memakai larutan standar NaFitat 0,2 mM dan Ketersediaan secara *in vitro* dengan menggunakan metoda Svanberg. Kandungan fitat didapat pada susu kedelai cair 48,5 mg/100 mL dan tempe 188,4 mg/10 g. Molar rasio pada susu kedelai cair 9,22 dan tempe 2,34. Fortifikasi ideal dalam 10 g tempe adalah rentangan 70-150 mg untuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 65 – 125 mg untuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 25-45 mg untuk NaFeEDTA . Fortifikasi ideal dalam 100 mL susu cair kedelai adalah rentangan 225-450 mg untuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 175-350 mg untuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 130-320 mg untuk NaFeEDTA

Kata Kunci : NaFeEDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, fitat, fortifikasi, *in vitro*, ketersediaan

ABSTRACT

Name : Azhar Darlan
Study Program : S-2 Chemistry
Title : Fortification and availability iron in soybean basis using fortifican $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mixture $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and NaFeEDTA

The main goal of this research to know the effectiveness of fortification using variety of fortifican such $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mixture $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and NaFeEDTA also availability of iron compound in body system by using in vitro method to get ideal fortification in soy bean based sample such soymilk and tempe. This fortification influence by phytate as iron inhibitor in soybean. Phytate content was determined by Davie and Ray method using spectrophotometer Uv-Vis, standar curve was measure using the Naphytate standar solution (0,2 mM) and availability in vitro using Svanberg method. The phytate content in soymilk 48,5 mg/100 ml and tempe 188,4 mg/10 g of sampel. Phytate/iron molar ratio in soymilk 9,22 and tempe 2,34. The ideal fortification in 10 g tempe was range 70-150 mg for $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 65 – 125 mg for $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 25-45 mg for NaFeEDTA . The Ideal fortification in 100 mL soy milk was range 225-450 mg for $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 175-350 mg for $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 130-320 mg for NaFeEDTA

Keyword : NaFeEDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, phytate, fortification, in vitro, availability

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Ruang Lingkup Penelitian.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Fortifikasi	8
2.1.1 Pengertian dan tujuan fortifikasi.....	6
2.1.2 Zat Besi (Fe).....	8
2.1.2.1 Defisiensi zat besi.....	9
2.1.2.2 Metabolisme Zat Besi dalam Tubuh.....	10
2.1.3 Fortifikasi zat besi.....	10
2.1.4 Fortifikasi zat besi yang digunakan.....	10
2.1.4.1 Ferro Sulfat.....	11
2.1.4.2 EDTA.....	12
2.1.4.3 FeNaEDTA.....	13
2.2 Kedelai.....	14
2.2.1 Bahan Pangan Berbasis Kedelai.....	16
2.2.1.1 Tempe.....	16
2.2.1.2 Susu Kedelai.....	18
2.3 Fitat.....	19
2.4 Ketersediaan zat besi secara <i>in vitro</i>	20
2.5 Instrumentasi Analisis.....	21
2.5.1 Spektrofotometer <i>UV-Visible</i>	21
2.5.2 Spektrofotometer Serapan Atom (AAS).....	24
III. METODE PENELITIAN	28
3.1 Metode Penelitian.....	28
3.2 Alat dan Bahan.....	28
3.2.1 Alat.....	28
3.2.2 Bahan.....	29
3.2.3 Alat uji.....	29

3.3	Prosedur Kerja.....	29
3.3.1	Pengukuran kurva kalibrasi Fe.....	29
3.3.2	Penentuan Kadar Awal Fe Total.....	29
3.3.3	Pembuatan kurva kalibrasi Fitat.....	30
3.3.4	Penentuan Kadar Fe-Fitat Sample	31
3.3.5	Fortifikasi sample dengan variasi penambahan Fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA	31
3.3.6	Pengukuran Fe total non Fitat	32
3.3.7	Penentuan Ketersediaan Fe secara <i>In Vitro</i>	33
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1	Penentuan Kadar Fe Total.....	35
4.2	Kurva kalibrasi Fitat.....	39
4.3	Penentuan Kadar Asam Fitat.....	40
4.4	Fortifikasi zat besi dengan variasi jenis fortifikan dan konsentrasinya.....	44
4.4.1	Variasi fortifikasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	44
4.4.2	Variasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	46
4.4.3	Variasi NaFeEDTA	48
4.5	Ketersediaan Fe non Fitat Secara <i>In Vitro</i>	50
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1	Kesimpulan.....	57
5.2	Saran.....	57
	DAFTAR REFERENSI	59

DAFTAR GAMBAR

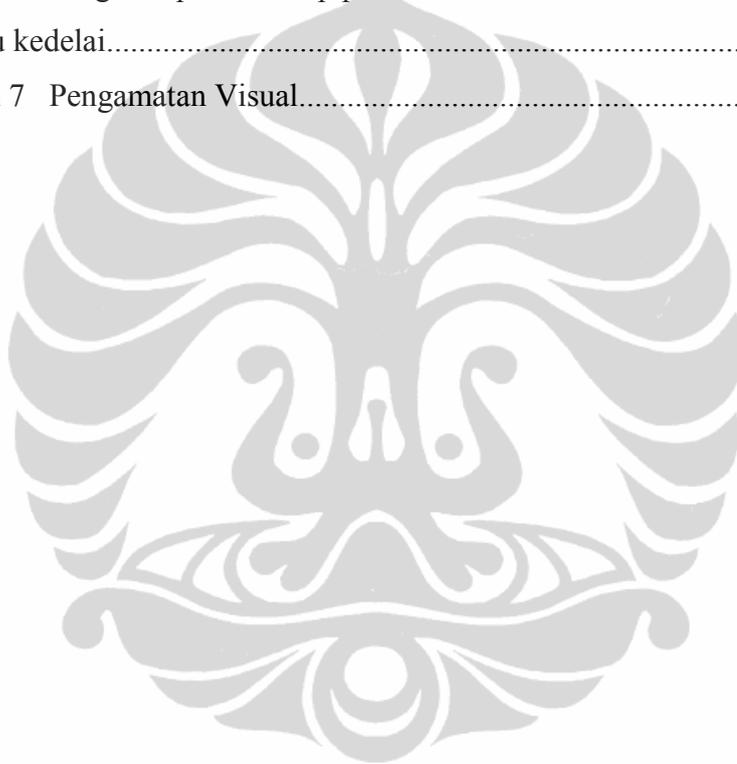
1. Gambar 2.1	Struktur EDTA.....	12
2. Gambar 2.2	Distribusi kelima spesi EDTA sebagai fungsi pH.....	13
3. Gambar 2.3	Buah kedelai dan biji kedelai.....	15
4. Gambar 2.4	Struktur kimia Fitat.....	20
5. Gambar 4.1	Kurva kalibrasi Standar Fe.....	36
6. Gambar 4.2	$[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ dalam air.....	38
7. Gambar 4.3	Ion kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ dalam air.....	38
8. Gambar 4.4	Spektra <i>Visible</i> kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ pada $(\lambda)_{\text{max}}$ 495 nm.....	39
9. Gambar 4.5	Kurva kalibrasi Fitat setelah dikonversikan dalam bentuk Absorbas terhadap mmol/L Fitat.....	40
10. Gambar 4.6	Molar rasio fitat terhadap zat besi.....	42
11. Gambar 4.7	Fe-fitat terhadap sulfat.....	46
12. Gambar 4.8	Kenaikan zat besi non Fitat setelah <i>in vitro</i> pada fortifikasi susu kedelai cair 100 ml (10 g kedelai) berbagai fortifikan	54
13. Gambar 4.9	Kenaikan zat besi non Fitat setelah <i>in vitro</i> pada fortifika 10 g tempe (10 g kedelai) berbagai fortifikan.....	54

DAFTAR TABEL

1.	Tabel 2.1	Komposisi Kedelai per 100 gram Bahan.....	16
2.	Tabel 4.1.	Kadar Fe pada sampel awal.....	36
3.	Tabel 4.2	Kadar Fe total pada sampel yang berasal dari 10 g kedelai	37
4.	Tabel 4.3	Pembacaan absorban <i>spektrofotometer UV-Vis</i> sampel pada $(\lambda)_{\max}$ 495 nm, kandungan fitat yang didapatkan berdasarkan persamaan regresi $Y = -11,02 X + 2,1703$	41
5.	Tabel 4.4	Kadar Fitat yang terukur pada sampel.....	41
6.	Tabel 4.5	Kadar Fe pada sample yang dapat diekstrak oleh fitat....	43
7.	Tabel 4.6	Variasi fortifikasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pada Tempe.....	44
8.	Tabel 4.7	Variasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. pada susu kedelai cair.....	44
9.	Tabel 4.8	Variasi campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. dan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} 2\text{H}_2\text{O}$ pada tempe.....	46
10.	Tabel 4.9	Variasi campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} 2\text{H}_2\text{O}$ pada susu kedelai cair	47
8.	Tabel 4.8	Variasi $\text{FeSO}_4 + \text{EDTA}$ pada Susu Kedelai Cair.....	41
9.	Tabel 4.9	Variasi $\text{FeSO}_4 + \text{EDTA}$ pada Tempe.....	48
10.	Tabel 4.10	Kondisi pH pada sampel susu.....	48
11.	Tabel 4.11	Variasi NaFeEDTA pada tempe.....	49
12.	Tabel 4.12	Variasi NaFeEDTA pada susu kedelai cair.....	49
13.	Tabel 4.13	Data In vitro pada sample susu.....	51
14.	Tabel 4.14	Data In vitro pada sample Tempe.....	52
15.	Tabel 4.15	Estimasi Fortifikan ideal pada Tempe.....	56
16.	Tabel 4.16	Estimasi Fortifikan ideal pada Susu kedelai.....	56

DAFTAR LAMPIRAN

1. Lampiran 1 Metoda Absorsi Fitat.....	63
2. Lampiran 2. Metoda Svanberg.....	64
3. Lampiran 3 Data pembacaan AAS pada sampel.....	65
4. Lampiran 4 Pembacaan Spetra <i>UV-Vis</i> dan Kurva Standar Fitat...	66
5. Lampiran 5 Data pengukuran pH pada susu kedelai	67
6. Lampiran 6 Pengaruh pH terhadap penambahan fortifikan Fe Pada susu kedelai.....	68
7. Lampiran 7 Pengamatan Visual.....	69



BAB I

Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Selain busung lapar, ada lagi jenis kelaparan yang perlu kita cermati keberadaannya, yakni kekurangan zat gizi mikro, atau yang lebih sering disebut sebagai "kelaparan tersembunyi (*hidden hunger*)". Zat gizi mikro (*micronutrient*) adalah zat gizi berupa vitamin dan mineral, yang walaupun kuantitas kebutuhannya relatif sedikit namun memiliki peranan yang sangat penting pada proses metabolisme dan beberapa peran lainnya pada organ tubuh. Kekurangan asupan dan absorpsi zat gizi mikro dapat mengakibatkan gangguan pada kesehatan, pertumbuhan, mental dan fungsi lain (kognitif, sistem imunitas, reproduksi, dan lain-lain).

Salah satu zat gizi mikro yang terpenting adalah zat besi (Fe). Zat besi memiliki peran yang sangat penting pada pembentukan hemoglobin yakni protein pada sel darah merah yang bertugas mengantarkan oksigen dari paru-paru ke otak dan seluruh jaringan tubuh. Kekurangan zat besi dalam jangka panjang akan mengakibatkan terjadinya anemia gizi besi (*iron deficiency anemia/IDA*). Secara umum, dampak yang ditimbulkan dari anemia gizi besi adalah kelesuan sebagai akibat kurangnya pasokan oksigen dalam darah, lemahnya konsentrasi berfikir dan rendahnya produktivitas kerja. Selain itu, pada anak-anak anemia gizi besi dapat mengakibatkan kerusakan sel otak secara permanen, gangguan perkembangan psikomotorik serta gangguan pada sistem imunitas tubuh. Sedang pada ibu hamil anemia gizi besi dapat mengakibatkan kematian bayi dalam kandungan, lahir prematur atau lahir dengan berat badan rendah.
(<http://farmasi.ums.ac.id/content/artikel/20080412.htm>)

Seperti halnya di negara berkembang lainnya, anemia gizi besi merupakan masalah gizi utama di Indonesia. Diperkirakan 25-35% penduduk Indonesia menderita anemia gizi besi, dengan prevalensi terbesar pada ibu hamil dan balita. Selain berdampak pada rendahnya kualitas sumber daya manusia, anemia gizi besi juga memberikan

dampak yang besar pada perekonomian nasional.

(<http://kfindonesia.org/index.php?pgid=11&contentid=13>)

Ada 2 jenis pendekatan yang dapat dilakukan guna mengatasi dan mencegah kekurangan zat besi, yakni pendekatan berbasis medis (*pharmaceutical based approach*) yakni dengan suplementasi, dan pendekatan berbasis pangan (*food based approach*) yakni dengan perbaikan makanan/pangan dan fortifikasi pangan.

Penanganan defisiensi zat besi melalui suplementasi tablet besi merupakan cara yang paling efektif untuk meningkatkan kadar zat besi dalam jangka pendek. Suplementasi biasanya ditujukan pada golongan yang rawan mengalami defisiensi besi seperti ibu hamil dan ibu menyusui. Di Indonesia, pemerintah melakukan program suplementasi gratis pada ibu hamil melalui Puskesmas dan Posyandu, dengan menggunakan tablet besi folat (mengandung 60 mg zat besi dan 0,25 mg asam folat). Kendala utama dari efektifitas metoda ini adalah dibutuhkan biaya yang cukup tinggi dan perlu motivasi yang berkelanjutan dalam mengkonsumsi suplemen.

Perbaikan pangan berupa modifikasi dan diversifikasi pangan merupakan metoda yang paling ideal. Namun, seringkali dalam prakteknya memiliki berbagai keterbatasan, antara lain sulitnya merubah kebiasaan kesukaan seseorang akan jenis makanan serta mahalnya bahan pangan yang kaya akan zat besi dengan bioavailabilitas tinggi seperti daging-dagingan. (<http://farmasi.ums.ac.id/content/artikel/20080412.htm>)

Atas dasar itulah maka perlu dilakukan terobosan teknologi yang murah, memberikan dampak yang nyata, diterima oleh masyarakat dan berkelanjutan. Diantara berbagai solusi perbaikan gizi, fortifikasi merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan. Pengertian fortifikasi adalah upaya meningkatkan mutu gizi makanan dengan menambahkan pada makanan tersebut satu atau lebih zat gizi mikro tertentu. (<http://farmasi.ums.ac.id/content/artikel/20080412.htm>)

Di negara maju, upaya fortifikasi Fe pada aneka produk pangan terbukti sukses mencapai target dalam upaya memerangi anemia. Kunci keberhasilan program ini terletak pada fakta bahwa makanan yang terfortifikasi Fe harus memberikan sejumlah Fe yang cukup dan mudah diserap oleh tubuh. Kuantitas ini tergantung pada banyaknya Fe yang ditambahkan pada bahan pangan yang difortifikasi dan *bioavailabilitas* Fe tersebut bila

makanan terfortifikasi tersebut dikonsumsi. Fortifikan Fe yang dirokemendasikan oleh WHO ada dalam berbagai kategori senyawa yaitu yang mudah larut dalam air, kurang larut dalam air tetapi larut dalam asam encer, sama sekali tidak larut dalam air tetapi larut dalam asam encer dan bentuk *encapsulated*. Pemilihan fortifikan Fe ini tergantung pada jenis bahan pangan yang menjadi target fortifikasi, karena berpengaruh terhadap efektifitas fortifikasi Fe dilihat dari besar kecilnya availabilitas Fe.
(<http://farmasi.ums.ac.id/content/artikel/20080412.htm>)

Di Indonesia, fortifikasi zat besi misalnya telah diberlakukan pada beberapa produk pangan seperti mie instant, susu bubuk dan terigu. Namun demikian, sampai sekarang fortifikasi masih belum banyak berperan dalam penanggulangan anemia gizi besi di masyarakat, terlihat dengan masih tingginya angka prevalensi anemia gizi besi. Salah satu penyebabnya adalah karena bahan pangan yang digunakan sebagai wahana (*vehicle*) belum dikonsumsi secara luas dan kontinu oleh seluruh lapisan masyarakat, khususnya masyarakat ekonomi lemah. Agar strategi fortifikasi ini lebih efektif, perlu dicari pangan “wahana” baru yang lebih umum dan banyak dikonsumsi masyarakat. Dilihat dari tingkat ekonomi dan kultur masyarakat Indonesia, kandidat potensial sebagai wahana tersebut adalah bahan pangan berasal dari kedelai. Masyarakat Indonesia termasuk sebagai salah satu bangsa yang banyak mengkonsumsi kacang kedelai. Pemanfaatan kedelai untuk makanan di Indonesia paling tinggi di negara ASEAN. Kacang kedelai dikonsumsi dalam berbagai bentuk produk olahan diantaranya tempe, tahu, kecap, susu kedelai. Oleh karena itu penelitian fortifikasi Fe pada produk olahan makanan berbasis kedelai tersebut sangat penting untuk dilakukan.
(<http://kfindonesia.org/index.php?pgid=11&contentid=13>)

1.2 Perumusan masalah

Efektifitas fortifikasi ini sangat dipengaruhi oleh kuantitas dari senyawa fitat yang mampu mengurangi ketersediaan (*availability*) zat besi, sehingga perlu diketahui rasio Fe-fitat pada sampel (susu kedelai cair dan tempe) agar jumlah fortifikan yang ditambahkan dapat memenuhi jumlah asupan zat besi yang dibutuhkan sehari-hari (dengan mengetahui kadar “Fe total non fitat” yang terukur). Fe total non fitat adalah Fe yang tidak terikat dengan fitat yang dapat diabsorpsi tubuh.

Penelitian ini dilakukan atas dasar belum tersedianya bahan acuan fortifikasi Fe pada bahan pangan berbasis kedelai terutama fortifikasi zat besi terdapat pada senyawa $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA , dalam pembuatan acuan berikut ini :

1. Aplikasi efektifitas $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA untuk fortifikasi Fe pada pangan berbasis kedelai.
2. Pengaruh keberadaan asam fitat yang terkandung dalam sampel sebagai pengikat Fe terhadap ketersediaan (*availability*) Fe secara *in vitro*
3. Penentuan kombinasi yang sesuai antara jenis agen pengkelat dengan jenis bahan pangan dengan kuatitas ketersediaan zat besi secara *in vitro* sebagai determinan.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk :

1. Membandingkan efektivitas penambahan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA untuk fortifikasi zat besi pada susu cair kedelai dan tempe.
2. Mencari kondisi terbaik rasio fortifikasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA pada susu kedelai cair dan tempe.
3. Mengetahui pengaruh keberadaan asam fitat yang terkandung dalam sampel terhadap ketersediaan zat besi.
4. Penentuan jumlah fortifikan ideal difortifikasi pada sampel tempe dan susu cair kedelai sebelum mengalami ketersediaan secara *in vitro*

1.4 Ruang Lingkup Penelitian

Pada penelitian ini melakukan pengembangan fortifikasi dan ketersediaan secara *in vitro* zat besi yang ada pada senyawa $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA serta mencari kadar Fe yang tepat untuk difortifikasikan pada produk pangan berbasis kedelai yaitu susu kedelai cair (mewakili produk kedelai dalam bentuk cair) dan tempe (mewakili produk kedelai dalam bentuk padat)

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fortifikasi

2.1.1 Pengertian dan Tujuan Fortifikasi

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

Fortifikasi pangan umumnya digunakan untuk mengatasi masalah gizi mikro pada jangka menengah dan panjang. Tujuan utama adalah untuk meningkatkan tingkat konsumsi dari zat gizi yang ditambahkan untuk meningkatkan status gizi populasi. Peran pokok dari fortifikasi pangan adalah pencegahan defisiensi, dengan demikian menghindari terjadinya gangguan yang membawa kepada penderitaan manusia dan kerugian sosio ekonomis. Namun demikian, fortifikasi pangan juga digunakan untuk menghapus dan mengendalikan defisiensi zat gizi dan gangguan yang diakibatkannya. <http://farmasi.ums.ac.id/content/artikel/20080412/htm>.

Prihananto (2004), berpendapat: ada 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

Amerika Serikat merupakan negara pertama yang melakukan fortifikasi, yaitu pada tahun 1920 dengan dikeluarkannya peraturan tentang fortifikasi garam dengan zat iodium. Fortifikasi pangan terbukti sebagai strategi yang paling efektif untuk mengatasi masalah kekurangan zat gizi mikro di Eropa, Amerika Utara dan Amerika Latin serta beberapa negara maju lainnya. Sebagai contoh, program fortifikasi margarin dengan vitamin A berhasil menghilangkan riketsia di Inggris, Kanada, dan Eropa Utara. Untuk di Indonesia sendiri pada tahun 2001, Komisi fortifikasi Indonesia (KFI), UNICEF, Pusat Studi Kebijakan Pangan dan Gizi IPB dan Forum Komunikasi Pangan di Indonesia bekerjasama melakukan studi fortifikasi di beberapa wilayah Indonesia. Hasil yang didapat dalam studi tersebut yakni fortifikasi pada beberapa jenis bahan pangan dapat berperan untuk mengatasi masalah kekurangan zat gizi mikro di Indonesia. Adapun beberapa yang menjadi kelebihan fortifikasi pangan ini, populasi sarannya luas, tidak diperlukan sarana program khusus dalam pemberian, serta tingkat penerimaan dan tingkat kesinambungannya tinggi. Untuk fortifikasi zat besi sendiri telah berhasil menurunkan prevalensi anemia defisiensi besi secara drastis di Swedia dan Eropa dengan menggunakan tepung sebagai bahannya.

<http://kfindonesia.org/index.php?pgid=11&contentid=13>

Di negara berkembang, yang memiliki masalah gizi dan kemampuan ekonomi masyarakat rendah, maka fortifikasi merupakan program wajib (intervensi pemerintah).

Program pemerintah ini tentunya akan terlaksana dengan baik apabila didukung semua pihak, termasuk di dalamnya industri dan para pelaksana teknis di lapangan.

Dibandingkan dengan strategi lain yang digunakan untuk penanggulangan anemia gizi besi, fortifikasi pangan dipandang oleh para ahli gizi sebagai strategi yang paling praktis, ekonomis dan efektif untuk memenuhi kebutuhan asupan harian zat besi. Fortifikasi pangan dianggap sebagai suatu metode yang sukses untuk mengurangi defisiensi mikronutrien dan merupakan salah satu elemen penting dalam kebijakan pangan di negara-negara Asia dan Pasifik. Fortifikasi pangan telah digunakan sebagai langkah intervensi yang menjamin keamanan pangan bagi seluruh penduduk dengan biaya yang efisien dan berkelanjutan. Salah satu faktor sukses pada program fortifikasi adalah pemilihan makanan pembawa (*carrier*) dan fortifikan yang tepat. (<http://farmasi.ums.ac.id/content/artikel/20080412/htm>, Hurrell R. F, 1997)

2.1.2 Zat Besi (Fe)

Zat besi merupakan mineral logam mikro yang paling banyak terdapat dalam tubuh manusia dan hewan, yaitu sebanyak 3-5 g di dalam tubuh manusia. Zat besi mempunyai beberapa fungsi esensial di dalam tubuh diantaranya sebagai alat angkut oksigen dari paru-paru ke jaringan tubuh, sebagai alat angkut elektron di dalam sel dan sebagai terpadu berbagai reaksi enzim di dalam jaringan tubuh. Kekurangan zat besi dalam jangka panjang akan mengakibatkan terjadinya anemia gizi besi/AGB (iron deficiency anemia/IDA). Selain pada manusia, zat besi juga memiliki peranan dalam proses sintesis klorofil dalam tumbuhan, (Almatsier, S., 2006).

Pada kesehatan 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 *serealia*. *Bioavailabilitas* zat besi di dalam tubuh ditentukan oleh efisiensi penyerapan zat besi di dalam usus. (Sri Palupi. N, 2008).

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 phorpyrin 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. (Sri Palupi. N, 2008).

2. *Non Heme Iron*

Senyawa ini secara alami terdapat di dalam daging, kacang - kacangan, sayur dan buah-buahan. *Bioavailabilitas* non heme iron dipengaruhi oleh keberadaan senyawa *inhiibitor* seperti fitat, tannin, dan polifenol (Sri Palupi. N, 2008).

2.1.2.1 Defisiensi zat Besi

Defisiensi besi atau sering disebut juga anemia gizi besi (AGB) yaitu suatu kondisi dimana seseorang mengalami ketidak cukupan jumlah besi untuk memenuhi kebutuhan tubuh. Anemi gizi besi terutama disebabkan oleh makanan yang dikonsumsi kurang mengandung zat besi terutama dalam bentuk besi-heme, dan adanya gangguan absorpsi. Selain itu juga diakibatkan oleh kenaikan kebutuhan besi seperti pada masa pertumbuhan, kehilangan darah yang berlebihan (menstruasi, melahirkan), dan terinfeksi parasit kronis seperti malaria, cacing tambang (Almatsier, S., 2006).

Menurut “International conference on Nutrition” (ICN), defisiensi besi merupakan salah satu bentuk masalah gizi yang menjadi perhatian dunia. INC melaporkan sekitar 2 milyar penduduk dunia mengalami anemia, yang kebanyakan disebabkan oleh defisiensi anemi besi. Kejadian defisiensi besi tanpa anemia jauh lebih besar. Populasi yang rentan terhadap AGB adalah bayi dan balita, anak usia sekolah, remaja putri dan wanita dewasa serta ibu hamil dan menyusui, pekerja berpenghasilan rendah serta orang lanjut usia , <http://kfindonesia.org/index.php?pgid=11&contentid=13>.

Indikator paling umum yang digunakan untuk mengetahui kekurangan zat besi adalah pengukuran jumlah dan ukuran sel darah merah, dan nilai hemoglobin. Nilai hemoglobin kurang peka terhadap tahap awal kekurangan zat besi, akan tetapi berguna untuk mengetahui berat anemia. Nilai hemoglobin yang rendah menggambarkan kekurangan zat besi yang sudah lanjut. Indikator yang paling peka adalah mengukur nilai *ferritin* dalam serum darah. Nilai ini menggambarkan persediaan zat besi dalam tubuh. Nilai yang rendah menggambarkan simpanan zat besi yang rendah. (Almatsier, S., 2006)

2.1.2.2 Metabolisme Zat Besi dalam Tubuh

Besi dalam makanan yang dikonsumsi dalam bentuk ikatan feri (umumnya dalam pangan nabati) maupun ikatan fero (umumnya dalam pangan hewani). Besi yang berbentuk feri oleh getah lambung (HCI) direduksi menjadi bentuk fero yang mudah diserap oleh sel mukosa usus. Adanya vitamin C juga dapat membantu proses reduksi tersebut. Di dalam sel mukosa fero dioksidasi menjadi feri lalu bergabung dengan apoferritin membentuk protein yang mengandung besi yaitu ferritin. Selanjutnya, untuk masuk ke plasma darah besi dilepaskan dari ferritin dalam bentuk fero, sedangkan apoferritin yang terbentuk kembali akan bergabung lagi dengan feri hasil oksidasi dalam sel mukosa. Setelah masuk ke dalam plasma, besi fero segera dioksidasi menjadi feri untuk digabungkan dengan protein spesifik yang mengikat besi yaitu transferrin .

Tubuh manusia sehat mengandung $\pm 3,5$ g besi yang hampir seluruhnya dalam bentuk ikatan kompleks dengan protein, adapun pada bayi baru lahir lebih kurang 250 mg dari jumlah tersebut (60-70%) dinamakan besi fungsional, karena berefek pada fungsi tubuh, sedangkan sisanya disimpan disebut besi nonessensial. Jumlah besi yang setiap hari diganti (turn over) sebanyak 30-40 mg. Dari jumlah ini hanya sekitar 1-1,5 mg yang berasal dari makanan. Banyaknya besi yang dimanfaatkan untuk pembentukan hemoglobin umumnya sebesar 20-25 mg per hari, (Almatsier, S., 2006).

2.1.3. Fortifikasi Zat Besi

Dibandingkan dengan strategi lain yang digunakan untuk perbaikan anemia gizi besi, fortifikasi zat gizi besi dipandang oleh beberapa peneliti merupakan strategi termurah untuk memulai, mempertahankan, mencapai/mencakup jumlah populasi yang besar, dan menjamin pendekatan jangka panjang. Fortifikasi Zat besi tidak menyebabkan efek samping pada saluran pencernaan. Inilah keuntungan pokok dalam hal

keterterimaannya oleh konsumen dan pemasaran produk-produk yang diperkaya dengan besi. Penetapan target penerima fortifikasi zat besi, yaitu mereka yang rentan defisiensi zat besi, merupakan strategi yang aman dan efektif untuk mengatasi masalah anemia besi. Pilihan pendekatan ditentukan oleh prevalensi dan beratnya kekurangan zat besi. Tahapan kritis dalam perencanaan program fortifikasi besi adalah pemilihan senyawa besi yang dapat diterima dan dapat diserap. Harus diperhatikan bahwa wanita hamil membutuhkan zat besi sangat besar selama akhir trimester kedua kehamilan. Terdapat beberapa zat besi yang umum digunakan untuk fortifikasi besi seperti besi fumarat, besi sulfat besi glukonat, besi laktat, besi ammonium sulfat, dan lain-lain. (Sri Palupi. N, 2008)

2.1.4 Fortifikan besi yang digunakan

2.1.4.1 *Ferro sulfat*

Pemberian sediaan besi oral terutama menggunakan bentuk garam-garam fero karena memiliki bioavailabilitas yang lebih baik daripada garam feri; kelarutan garam fero lebih tinggi dari garam feri dan mampu diabsorpsi tubuh 3 kali lebih tinggi daripada garam feri, terutama pada kondisi lambung kosong. Garam fero utama yang banyak digunakan adalah fero sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) karena harganya relatif lebih murah daripada bentuk garam fero lainnya, selain itu garam fero juga memberikan efektifitas dan toleransi yang setara dengan fero fumarat ataupun fero glukonat (Dary, Omar., 2002; McDiarmid dan Johnson, 2002).

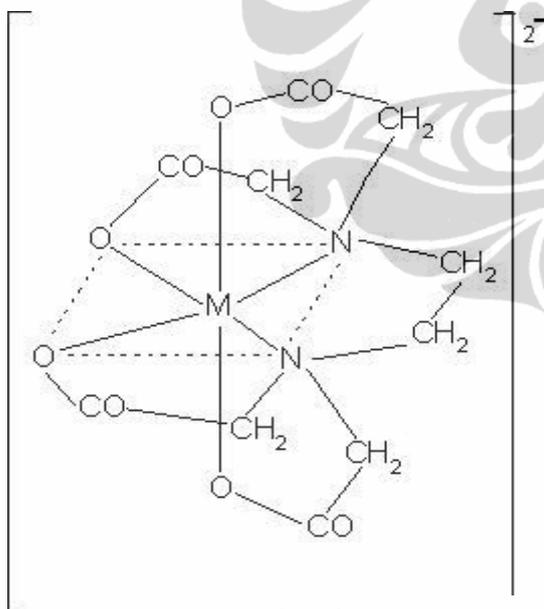
Tinjauan kimia Fero Sulfat heptahidrat:

Nama Kimia	: Besi (II) sulfat (1:1) heptahidrat
Rumus molekul	: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Berat molekul	: 278.01 g/mol
Sifat fisika	: kristal padat
Titik leleh	: 64 °C
Titik didih	: 300 °C
pH	: 3.7
Kelarutan	: Mudah larut dalam air, tidak larut dalam etanol, sangat mudah larut dalam air mendidih
Stabilitas	: Stabil pada tekanan dan temperatur kamar. Pada udara lembab, fero sulfat (biru kehijauan) teroksidasi menjadi feri sulfat (kuning kecoklatan).

2.1 4.2 Etilendiamintetraacetic Acid

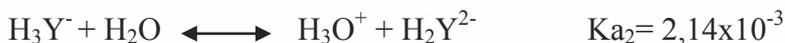
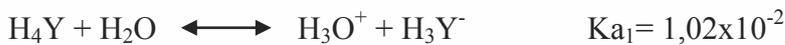
Etilendiamintetraacetic acid (EDTA) adalah asam berproton 4 (H_4Y) biasanya ditemukan dalam bentuk garam $Na_2H_2Y \cdot 2H_2O$ merupakan ligan heksadentat. EDTA dapat secara mudah mengkelat atau mengikat zat besi yang terlarut dalam lambung dan usus, hingga dua atau tiga kali lipat bahan pangan banyak mengandung inhibitor dalam jumlah tinggi dengan catatan zat besi berasal dari sumber yang mudah larut dalam air (Whittaker P., *et al*, 1990)

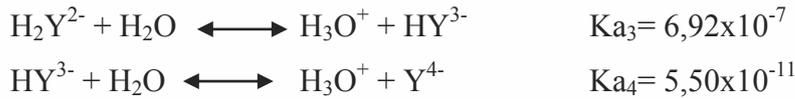
Molekulnya memiliki enam sisi potensial untuk berikatan dengan ion logam, yaitu empat pada gugus karboksil dan dua gugus amin. EDTA merupakan asam tetraprotik, biasa disingkat H_4Y , garam dinatriumnya adalah Na_2H_2Y , dan memberi ion pembentuk kompleks H_2Y^{2-} dalam larutan air, ia bereaksi dengan semua logam dalam rasio 1:1



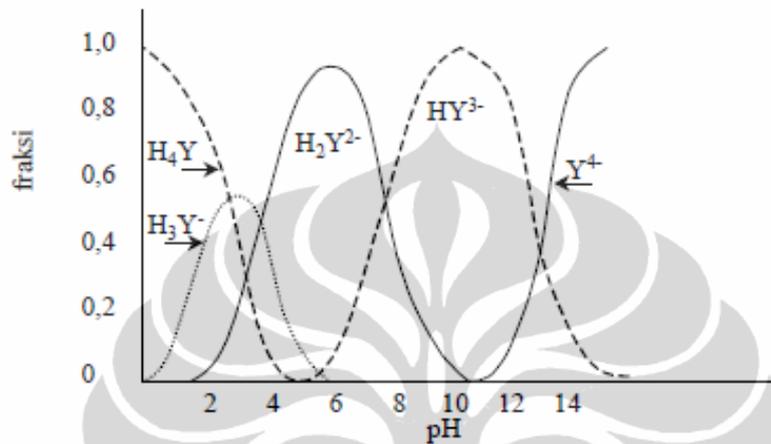
Gambar . 2.1 Struktur ion EDTA
(Sumber : Skoog, West, Holler. 1996)

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





Distribusi spesies-spesies yang terdapat dalam larutan ditentukan oleh pH (gambar 2.2)



Gambar 2.2. Distribusi kelima spesi EDTA sebagai fungsi pH (Sumber : Skoog, West, Holler, 1996)

Distribusi di atas menunjukkan bahwa spesi H_2Y^{2-} dominan pada pH asam yaitu sekitar pH 3 – 6. Hanya pada pH lebih dari 10 fraksi Y^{4-} merupakan komponen terbesar dalam larutan.

Banyaknya fraksi spesies EDTA dalam larutan dapat ditentukan oleh persamaan berikut

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

:

2.1.4.3 NaFeEDTA

Dari beberapa penelitian terakhir terungkap bahwa NaFeEDTA {sodium iron (Fe^{3+}) ethylenediaminetetraacetic acid} dapat meningkatkan bioavailabilitas zat besi fortifikan (Hurrell, R. H., Reddy, M. B., 2000). Hal ini disebabkan karena ion kompleks (FeEDTA^-) sulit/tidak dapat diikat oleh senyawa fitat yang juga bersifat sesama agen pengopleks maupun senyawa penghambat lainnya, akibatnya absorpsi zat besi oleh tubuh

menjadi tidak terganggu. Fortifikan NaFeEDTA juga tidak menimbulkan perubahan warna dan citarasa, serta tidak mengakibatkan pengendapan selama penyimpanan produk makanan.

2.2. Kedelai

Kedelai merupakan tumbuhan semak semusim mempunyai akar tunggang yang membentuk akar-akar cabang yang tumbuh menyamping tidak jauh dari permukaan tanah. Pertumbuhan ke samping dapat mencapai jarak 40 cm, dengan kedalaman hingga 120 cm. Tanaman kedelai dapat tumbuh setinggi 30–100 cm. Batang tumbuhan bersegi, berwarna hijau keputih-putihan. Daun tanaman kedelai berbentuk oval berwarna hijau. Tiap tangkai daun terdiri dari tiga helai daun, permukaan daun berbulu halus pada kedua sisi berbentuk bulat telur, ujung tumpul, tepi rata dengan panjang 5-10 cm. Bunga kedelai termasuk bunga sempurna, yaitu setiap bunga terdiri bungan jantan dan bunga betina. Bunga terletak pada ruas-ruas batang, berwarna ungu atau putih, bunganya relatif padat. Kelopak agak berbulu dengan panjang mencapai 7 mm. Penampang bunga kedelai berwarna kemerah-merahan.

Buah kedelai berbentuk polong. Setiap tanaman mampu menghasilkan 100 – 250 polong. Polong kedelai berbulu dan berwarna kuning kecoklatan atau abu-abu. Selama proses pematangan buah, polong yang mula-mula berwarna hijau akan berubah menjadi kehitaman. Biji kedelai berkeping dua, terbungkus kulit biji. Embrio terletak diantara keping biji. Bentuk biji kedelai umumnya bulat lonjong tetapi ada pula yang bundar atau bulat agak pipih. Menurut varietasnya, ada dua jenis kedelai yaitu kedelai hitam dan kedelai putih (<http://nurmadanischool.wordpress.com/2011/02/08/kedelai.htm>)

Sistematika tanaman kedelai (kedelai putih) adalah sebagai berikut:

Familia	: Leguminosae
Subfamili	: Papilionoidae
Genus	: Glycine
Species	: <i>Glycine max L. Merril</i>



Gambar 2.3 Buah kedelai dan biji kedelai

<http://nurmadanischool.wordpress.com/2011/02/08/kedelai.htm>

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. Kedelai mengandung protein 35 % bahkan pada varitas unggul kadar proteinnya dapat mencapai 40 - 43 %. Dibandingkan dengan beras, jagung, tepung singkong, kacang hijau, daging, ikan segar, dan telur ayam, kedelai mempunyai kandungan protein yang lebih tinggi, hampir menyamai kadar protein susu skim kering. Bila seseorang tidak boleh atau tidak dapat makan daging atau sumber protein hewani lainnya, kebutuhan protein sebesar 55 gram per hari dapat dipenuhi dengan makanan yang berasal dari 157,14 gram kedelai.

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, kecuali mesin pengupas, penggiling, dan cetakan, (Yenrina, 2006).

Tabel 2.1. Komposisi Kedelai per 100 gram bahan (Yenrina, 2006)

No	KOPONEN	KADAR (%)
1	Protein	35-45
2	Lemak	18-32
3	Karbohidrat	12-30
4	Air	7-10
5	Fitat	1,0 – 2,3*

*(Coulibaly A., *et al* 2011; Sri Raharjo, 1997)

2.2.1 Bahan Pangan Berbasis Kedelai

2.2.1.1 Tempe

Tempe kedelai merupakan jenis makanan hasil proses fermentasi yang sangat digemari di Indonesia karena memiliki cita rasa yang khas dan relatif murah harganya. Di samping itu tempe kedelai sudah dikenal oleh masyarakat Indonesia sebagai makanan yang bergizi tinggi

Tempe fermentasi biji – bijian dengan menggunakan jamur *Rhizopus oligosporus*. Di Indonesia tempe yang sangat digemari adalah berasal dari kedelai, selain kedelai tempe dapat dibuat dari gandum, beras dan biji - bijian lain, meskipun kualitasnya tidak sebaik yang dibuat dari kedelai.

Tempe kedelai mempunyai flavour yang lebih baik dari pada kedelai mentah, kandungan bahan padatan terlarutnya lebih tinggi oleh karena selama penempean terjadi perubahan senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana yang sifatnya lebih mudah larut, sehingga tempe lebih mudah dicerna. Tempe juga banyak mengandung vitamin B12, mineral seperti Ca dan Fe, tidak mengandung kolesterol dan relative bebas dari racun kimia, (<http://id.wikipedia.org/wiki/Tempe>).

Tempe terbuat dari kacang-kacangan mentah yang dicampur dengan menggunakan inokulan *Rhizopus oligosporus*. Kacang-kacangan tersebut kemudian diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu pada suhu sekitar 30°C (86 °F). Tempe bermutu tinggi bila kacang terlekat dengan jalinan miselium putih. Jika proses fermentasi

dibiarkan terlalu lama, spora hitam mungkin terbentuk dipermukaan. Spora tersebut tidak berbahaya namun mempengaruhi kenampakan dan penerimaan konsumen,

Tempe mempunyai ciri-ciri berwarna putih, tekstur kompak dan flavour spesifik. Warna putih disebabkan adanya miselia jamur yang tumbuh pada permukaan biji kedelai. Tekstur yang kompak juga disebabkan oleh miselia-miselium jamur yang menghubungkan antara biji kedelai. Sedangkan flavor yang spesifik disebabkan oleh terjadinya degradasi komponen-komponen dalam kedelai selama fermentasi.

Proses pengolahan tempe pada umumnya meliputi tahap pencucian, perendaman bahan mentah, perebusan, pengulitan, pengukusan, penirisan dan pendinginan, inokulasi, pengemasan, kemudian fermentasi selama 2-3 hari. Perendaman mengakibatkan ukuran biji menjadi lebih besar dan struktur kulit mengalami perubahan sehingga lebih mudah dikupas. Perebusan dan pengukusan selain melunakkan biji dimaksudkan untuk membunuh bakteri kontaminan dan mengurangi zat anti gizi. Penirisan dan pendinginan bertujuan mengurangi kadar air dalam biji dan menurunkan suhu biji sampai sesuai dengan kondisi pertumbuhan jamur.

Aktivitas fisiologis kapang pada proses fermentasi tempe dimulai sejak diinokulasikannya inokulum (ragi tempe) pada kedelai yang telah siap difermentasikan yaitu kedelai masak yang telah dikuliti dan ditiriskan. Spora kapang tersebut mulai tumbuh berkecambah dengan membentuk benang-benang hifa yang tumbuh memanjang membalut dan menembus biji kedelai. Apabila benang-benang tersebut sedemikian padat, maka terbentuklah tempe yang kompak, putih dan dengan aroma khas tempe. Secara keseluruhan tahapan ini disebut proses fermentasi.

Rhizopus oligosporus adalah jamur utama yang berperan dalam proses fermentasi tempe. Ciri yang khas dari genus *Rhizopus* adalah pertumbuhan koloninya cepat, mempunyai stolon, rhizoid dan sporangiosfor dengan banyak spora, umumnya berukuran besar, berwarna putih waktu masih muda, kemudian menjadi hitam dan coklat serta collumela berwarna coklat, (<http://id.wikipedia.org/wiki/Tempe>).

Ada sekitar 100.000 produsen tempe yang tersebar seluruh Indonesia, Tempe diproduksi hampir semuanya diproduksi dalam skala industri rumah tangga (*home industri*) dengan produksi 10 kg atau 4 metrik tons per hari. Tempe kaya dengan sumber protein bisa menyuplai kurang lebih 10% kebutuhan protein penduduk Indonesia. Tempe

dikonsumsi tidak dalam bentuk makanan mentah tapi telah dimasak seperti digoreng, direbus, diuapkan atau dipanggang (Astuti, Mary., Meliala A., 2000).

2.2.1.2 Susu Kedelai

Susu kedelai adalah salah satu hasil pengolahan yang merupakan hasil ekstraksi dari kedelai. Protein susu kedelai memiliki susunan asam amino yang hampir sama dengan susu sapi sehingga susu kedelai seringkali digunakan sebagai pengganti susu sapi bagi mereka yang alergi terhadap protein hewani. Susu kedelai merupakan minuman yang bergizi tinggi, terutama kandungan proteinnya. Selain itu susu kedelai juga mengandung lemak, karbohidrat, kalsium, fosfor, zat besi, provitamin A, vitamin B kompleks, dan air.

Susu kedelai harganya lebih murah daripada susu hewani. Selain untuk konsumsi sendiri, susu kedelai juga dapat menjadi ladang usaha yang prospektif bila dikelola dengan baik. Kendala utama yang dihadapi produsen adalah cepat rusaknya susu kedelai apabila susu kedelai tidak disimpan di lemari pendingin. Susu kedelai yang rusak ditandai dengan berubahnya bau, warna, rasa, atau mengental, kemudian terjadi pemisahan air dengan endapan sari kedelai.

Kedelai dipilih sebagai bahan baku susu karena kedelai memiliki kandungan gizi yang tinggi. Susu kedelai memiliki bentuk menyerupai susu sapi, cara menyiapkannya mudah sehingga memungkinkan untuk menjadi minuman bergizi di negara-negara berkembang. Pembuatan susu kedelai pada dasarnya adalah memproses biji kacang kedelai untuk diambil sarinya. Proses pembuatan susu kedelai meliputi tahap-tahap: penyortiran, pencucian, perendaman, penghancuran hingga berbentuk bubur, kemudian penyaringan sehingga diperoleh sari kacang kedelai, (<http://staff.uny.ac.id/sites/default/files/tmp/KOMPOSISI%20DAN%20NUTRISI%20PA DA%20SUSU%20KEDELAI.pdf>)

Susu kedelai dapat dibuat dengan teknologi dan peralatan yang sederhana, serta tidak memerlukan keterampilan khusus.. Untuk memperoleh susu kedelai yang baik, kita perlu menggunakan kedelai yang berkualitas baik. Dari 1 kg kedelai dapat dihasilkan 10 liter susu kedelai cair, (<http://www.deptan.go.id/bpsdm/>).

2.2 Fitat

Fitat merupakan salah satu non polisakarida dari dinding tanaman seperti silikat dan oksalat. Asam fitat termasuk *chelate* yang kuat yang bisa mengikat ion metal divalent membentuk kompleks fitat sehingga logam tidak bisa diserap oleh tubuh. Asam fitat merupakan zat anti gizi karena mempunyai kemampuannya menurunkan kelarutan logam, sehingga ketersediaan logam menjadi rendah. Asam fitat (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate) merupakan tempat penyimpanan sebagian besar (60-90 %) fosfor tanaman serealia dan leguminosa. Dalam biji fitat merupakan sumber fosfor dan inositol utama bagi tanaman, terdapat dalam bentuk garam dengan kalium, kalsium, magnesium, dan logam lain. Pada kondisi alami, asam fitat akan membentuk ikatan baik dengan mineral logam bervalensi dua (Ca, Mg, Fe), maupun protein menjadi senyawa yang sukar larut. Akibatnya mineral logam dan protein tidak dapat diserap tubuh, atau nilai cernanya rendah. Oleh karena itu, asam fitat dianggap sebagai antinutrisi pada bahan pangan (Coulibaly A, *et al* 2011; Graf, *et al* 1987).

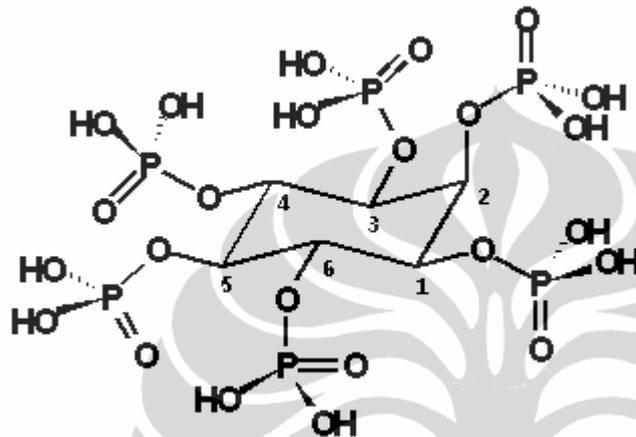
Sifat rakhitogenik pada asam fitat disebabkan karena adanya kemampuan membentuk garam yang tidak larut, aktivitas rakhitogenik ini dapat dirusak oleh enzim fitase yang umum terdapat pada semua biji-bijian. Asam fitat dalam kedelai dapat dihilangkan dengan fermentasi (misalnya pada pembuatan kecap, tempe, tauco), perkecambahan dan perendaman dalam air hangat.

Banyak penelitian tentang kandungan asam fitat yang telah dilakukan terhadap kacang kedelai. Kadar asam fitat pada kedelai berbeda-beda untuk varietas yang berbeda namun sebahagian besar berkisar 1,0 – 2,3 % (b/b). Setelah kedelai diolah menjadi produk makanan seperti susu kedelai, tahu, maupun tepung kedelai dan tempe maka kadarnya masih berkisar 0,5-2,9 % ini menunjukkan bahwa proses pengolahan pada produk pangan kedelai non fermentasi tidak mempengaruhi kadar asam fitatnya, hanya produk fermentasi yang menunjukkan adanya penurunan (Coulibaly A., *et al* 2011; Sri Raharjo, 1997)

Anderson mengusulkan struktur fitat yaitu $C_6H_{18}O_{24}P_6$. Berdasarkan resonansi inti magnetik (NMR) dan kristalografi sinar – X dapat dibuktikan bahwa struktur yang diusulkan Anderson merupakan struktur yang lebih sesuai dengan fitat yang ada di alam, khususnya tumbuhan (Erdman J.W., 1979)

Erdman (1979) menyatakan bahwa struktur asam fitat lebih sesuai dengan yang diusulkan Anderson. Asam fitat dengan struktur ini mengalami dissosiasi pada pH netral, suatu bukti bahwa kation dapat berikatan kuat dengan asam fitat diantara 2 gugus fosfat atau berikatan dengan asam fitat pada satu gugus fosfat.

Di bawah ini merupakan gambar struktur kimia asam fitat



Gambar 2.4 Struktur kimia asam fitat

Metoda analisis asam fitat secara kualitatif maupun kuantitatif pada umumnya didasarkan peneraan Fe^{+3} -fitat yang bersifat tidak larut dalam air. Talamond (1982) dan Calsson N.G (2001) mengembangkan metoda analisis fitat dengan metode fasa balik dan pengukuran indeks refraksinya (Coulibaly A., *et al* 2011)

2.4. Ketersediaan zat Besi secara *in Vitro*

Ketersediaan mineral menunjukkan jumlah mineral dalam bahan pangan yang dapat ditransfer dari usus ke dalam darah untuk selanjutnya diedarkan keseluruh organ tubuh yang membutuhkan. Ketersediaan mineral dipengaruhi kebutuhan gizi seseorang, kecukupan sekresi enzim-enzim pencernaan dan berbagai komponen lain dalam bahan pangan. Selain itu ketersediaan mineral juga dipengaruhi oleh besarnya kandungan mineral dan bentuk kimia di dalam bahan pangan (Narasinga R, 1981)

Rendahnya ketersediaan (*availability*) zat besi salah satu faktor dominan kekurangan zat besi. Penyerapan dari *non-haem*-Fe pada pangan sangat dipengaruhi oleh adanya senyawa penghambat dan peningkatan penyerapan zat besi yang ada dalam bahan

pangan, contohnya: protein, gula, asam sitrat mempunyai kemampuan peningkatan penyerapan zat besi, adanya asam fitat, tanin dan serat akan menghambat penyerapan zat besi (Hazedl T. *et al.*, 1986)

Metoda *in vitro* merupakan simulasi sistim pencernaan tubuh dan penyerapan zat besi dari kompleknya bahan pangan. Kedua faktor penghambat dan peningkatan penyerapan absorsi zat besi menunjukkan adanya respon yang sama seperti yang ditunjukkan absorsi zat besi dengan metoda *in vivo*. Adanya korelasi sinifikan didapat antara absorsi zat besi oleh tubuh dengan metoda *in vivo* dan ketersediaan zat besi dengan metoda *in vitro* oleh karena itu metoda *in vitro* dipebolehkan dipakai karena analisisnya lebih mudah, cepat dan membutuh murah dalam memperkirakan pontensi ketersediaan zat besi dalam pangan (Miller *et al.* 1981, Hazedll *et al.* 1986 dan Narasinga R, 1981)

Evaluasi ketersediaan hayati (*bioavailability*) mineral pangan dapat ditentukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Secara *in vitro*, dilakukan simulasi pencernaan dalam lambung menggunakan enzim pencernaan yaitu pepsin secara tunggal atau diikuti dengan tripsin sendiri atau bersama kimotripsin dalam buffer dengan pH sesuai. Jumlah mineral yang terlepas dari matriks pangan dan terdapat secara bebas dalam wadah dapat dipisahkan. Kemudian mineral target dianalisa dengan metoda spektrofotometri serapan atom (SSA) (Svanberg U,1993).

2.5 Instrumentasi analisis

2.5.1 Spektrofotometer UV- Visible

Spektrofotometer UV-Vis berbeda dengan SSA dimana instrumen SAA berkaitan dengan absorpsi oleh atom sedangkan Spektrofotometer *Ultra Violet-Visible* (UV-Vis) berkaitan dengan absorpsi oleh molekul. Sifat absorpsi kedua materi tersebut sangat berbeda sehingga memerlukan teknik yang berbeda pula untuk mengukurnya. Absorpsi oleh molekul menyebabkan dua jenis perubahan energi elektronik (perubahan dalam energi elektron pada molekul) dan vibrasional (perubahan dalam jarak antar inti dua atau lebih atom dalam molekul). Transisi elektronik memerlukan lebih banyak energi dan terjadi dalam wilayah spektral *visible-ultra violet* (tampak-lembayung). Perubahan vibrasional dalam molekul berasal dari absorbs radiasi infra merah yang berenergi rendah (Csuros and Csuros, 2002). Instrumen spektrofotometer *UV-Vis* dalam penelitian ini

digunakan untuk mendeterminasi serapan kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ secara kuantitatif dan kualitatif pada daerah gelombang sinar tampak (*visible*)

Spektrofotometer UV-Vis didisain untuk pengukuran pada wilayah sinar violet dan *visible*. Beberapa instrument mengukur absorpsi pada 200-1000 nm. Untuk pengukuran dibawah 320 nm, instrument ini harus dilengkapi dengan sumber radiasi ultra violet yang umumnya berupa *deuterium discharge lamp* sedangkan untuk wilayah *visible* digunakan *tungsten filament lamp*.

Warna sebuah molekul dalam larutan tergantung pada panjang gelombang yang diserap. Jadi bila larutan sampel sebuah molekul disinari dengan cahaya putih, beberapa panjang gelombang akan diserap dan panjang gelombang sisanya diteruskan ke mata. Warna yang diterima mata ditentukan hanya oleh panjang gelombang yang ditransmisikan. Suatu zat menunjukkan warna yang komplementer terhadap panjang gelombang yang diabsorp. Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi. Dalam alat ini energi radian pada kisaran panjang gelombang yang sangat sempit dipilih dari sebuah sumber dan dilewatkan pada larutan sampel yang disimpan dalam kuvet berbahan *quartz*. Bahan kimia dalam sampel kemudian mengabsorp beberapa *energy radiant* dan sisanya dilewatkan secara keseluruhan. Jumlah dari radiasi yang diabsorp pada panjang gelombang spesifik sebanding dengan konsentrasi bahan kimia (yang menyerap cahaya) yang terdapat dalam sampel tersebut.

Lampu filamen dari bahan *tungsten* adalah sumber cahaya yang umum untuk wilayah tampak (320-2500 nm) tapi umumnya tidak digunakan untuk dibawah 320-330 nm. Sedangkan untuk panjang gelombang yang lebih pendek (180-400 nm) digunakan lampu *deuterium*. Untuk memilih panjang gelombang monokromatik digunakanlah monokromator. Monokromator ini terdiri atas berturut-turut : *entrance slit* berfungsi untuk mengontrol cahaya yang masuk; lensa atau cermin untuk melewatkan cahaya paralel; *dispersion device* untuk memilih cahaya pada panjang gelombang yang berbeda; lensa atau cermin untuk memfokuskan cahaya; *exit slit* untuk mengatur panjang gelombang cahaya yang memasuki kompartemen sampel.

Kompartemen sampel adalah tempat dimana sampel disinari cahaya yang berasal dari monokromator. Larutan sampel ditempatkan dalam kuvet *quartz* yang transparan

yang diketahui panjang dan lebar optikalnya. Kuvet ini harus diletakkan secara tetap dari waktu ke waktu terhadap *path length* sedemikian rupa sehingga sifat reflektif dan refraktif dalam area dimana cahaya tersebut lewat juga tetap. Jika hal ini tidak dipenuhi maka pengukuran absorbansi akan salah karena tidak menggambarkan perubahan konsentrasi. Pada saat tahap men-*zero*-kan instrument, gunakan kuvet yang berisi larutan blanko dan jangan pernah menggunakan kuvet kosong karena refleksi tambahan dari udara ke permukaan gelas akan mentransmisikan radiasi yang lebih sedikit dibandingkan yang ada isinya.

Detektor yang digunakan pada instrumen ini adalah *phototubes*, yang mengubah energi cahaya menjadi energi listrik. Umumnya terdiri atas katoda berbentuk setengah silinder dan anoda berbentuk kawat dalam sebuah tabung gelas. Karena katoda ini mengemisikan elektron maka *phototube* ini disebut juga *photoemissive tube*. Radiasi yang menghantam detektor membangkitkan arus listrik yang akan meningkat setelah melewati *amplifier* dan kemudian ditransmisikan ke *recorder* atau di *display* kan pada spektrofotometer secara digital. Pembacaan dapat diatur baik sebagai *transmittance* ataupun *absorbance*. Peralatan yang modern biasanya dilengkapi dengan *microprocessor* untuk mempercepat kinerja pengukuran alat.

Ada dua jenis instrumen spektrofotometer yang dikenal yaitu *single beam* dan *double beam*. Dalam instrument *single beam*, kinerjanya berdasarkan pada perubahan intensitas *single beam* pada cahaya. Semua energi dari sumber cahaya diarahkan langsung pada *sample cell*. Kekurangan sistem ini adalah adanya perubahan intensitas yang fluktuatif pada voltase aliran listrik, sumber listrik dan lampu, sehingga kesalahan dapat terjadi pada pembacaan. *Drift* pada intensitas lampu *single beam* dapat dikontrol dengan mendisain sumber cahaya yang lebih stabil dan suplai listrik pada lampu dan memanaskan terlebih dulu lampu yang digunakan.

Dalam sistem *double beam*, optik tambahan digunakan untuk membagi cahaya dari lampu menuju ke *sample cell* dan menuju ke *reference cell* (blanko). Cahaya dari monokromator dibagi dua dengan memutar sebuah *chopper*. Pada saat cahaya melewati sampel, sementara saat berikutnya melewati blanko. Kedua berkas cahaya tadi kemudian bergabung lagi pada cermin berputar yang kedua sebelum memasuki detektor. Detektor mencari perubahan intensitas cahaya dan secara otomatis mengkompensasi fluktuasi,

biasanya dengan secara otomatis melebarkan atau menyempitkan *entrance slit* ke monokromator. Bila berkas cahaya melemah intensitasnya, maka *slit* akan membuka dan sebaliknya jika terjadi penguatan intensitas (Csuros and Csuros, 2002).

2.5.2 Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)

Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) adalah suatu metode analisis untuk penentuan unsur-unsur logam dan metaloid yang berdasarkan pada penyerapan (absorpsi) radiasi oleh atom bebas unsur tersebut (LIPI, 1996) .

Kirchoff dan Bunsen pada tahun 1860 mengemukakan bahwa spektrum atom, baik spektrum emisi maupun spektrum absorpsi dapat digunakan sebagai dasar teknik analisis unsur selektif. Pada tahun 1953 Walsh untuk pertama kalinya memperkenalkan analisis cara SSA ini, mendemonstrasikan penggunaannya pada tahun 1954. Pada waktu itu analisis unsur umumnya memakai cara kolorimetri atau spektroskopi emisi. Sekarang absorpsi atom merupakan pilihan utama dalam analisis unsur terutama yang berkadar rendah .

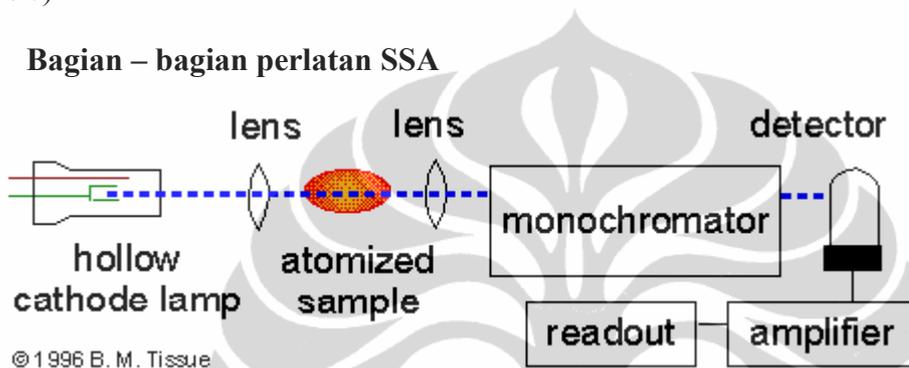
Spektroskopi serapan atom menggunakan unit besaran cahaya yang diserap untuk mengukur konsentrasi atom dalam fasa gas. Karena pada umumnya sampel ada dalam bentuk cairan atau padatan, ion atau atom analit harus diuapkan didalam nyala (*flame*) atau tungku grafit (*graphite furnace*). Atom akan menyerap sinar *uv* atau *visible* karena terjadinya transisi elektronik ketinggian energi yang lebih tinggi. Serapan dan transisi ini spesifik untuk masing-masing elemen. Konsentrasi analit ditentukan dari besarnya jumlah unit serapan..

Pada dasarnya dalam metode SSA, contoh yang berupa larutan yang berupa ion bersama-sama bahan bakar dibuat suatu aerosol dan dimasukkan ke dalam pembakar, disini contoh dijadikan atom bebas. Atom-atom bebas selain dapat mengabsorpsi energi panas, juga dapat mengabsorpsi energi cahaya sehingga terbentuk atom tereksitasi. Cahaya yang diabsorpsi sangat spesifik sekali bagi setiap unsur, yaitu sesuai dengan energi cahaya emisi dari unsur tersebut.

Spektrum absorpsi atom bebas dalam bentuk uap pada suhu dan tekanan yang tidak begitu tinggi terdiri dari garis-garis yang sangat sempit. Garis-garis tersebut biasanya bersangkutan dengan atom-atom yang berada pada tingkat transisi dari tingkat dasar (*ground state*) yang dikenal dengan nama garis resonansi (Csuros and Csuros, 2002).

Panjang gelombang spektrum absorpsi atom unsur-unsur pada kondisi laboratorium relatif sederhana, hanya terdiri dari beberapa garis. Sempitnya garis spektrum dan sederhananya spektrum absorpsi atom menyebabkan teknik ini dapat dikatakan bebas dari gangguan spektrum (*spectral interference*) (LIPI, 1996).

Analisis kuantitatif dalam SSA adalah berdasarkan pada hasil pengukuran absorbansi dari larutan contoh yang diaspirasikan. Konsentrasi unsur yang bersangkutan dalam larutan contoh dapat diperoleh melalui grafik standar atau kurva kalibrasi. Kurva ini dibuat dari hasil pengukuran absorbansi larutan-larutan standar yang diketahui konsentrasinya. Menurut Hukum Beer, maka terdapat hubungan yang linier antara absorbansi dengan konsentrasi unsur dalam larutan. Dengan demikian, dengan mengukur absorbansi maka konsentrasi unsur dalam larutan contoh tersebut dapat dicari (LIPI, 1996)



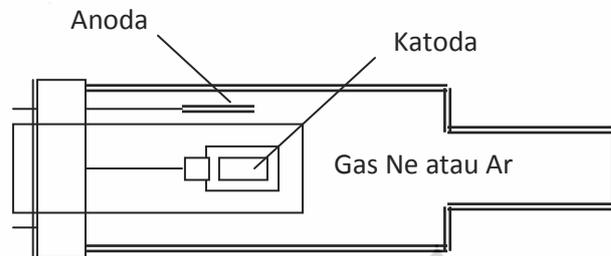
Gambar 2.4 Skema peralatan SSA (Csuros and Csuros, 2002)

a. Sumber cahaya

Sumber cahaya biasanya adalah berupa lampu katoda berongga (*hollow-cathode lamp*) dari elemen yang akan ditentukan. Lampu katoda terbuat dari gelas yang membungkus katoda (suatu logam berbentuk silinder mengandung unsur kimia yang akan dieksitasi) dan sebuah anoda, biasanya anodanya dibuat dari tungsten (W). Kedua elektroda ini diselubungi oleh tabung gelas yang diisi gas argon atau neon pada tekanan rendah (10-15 tor). (Csuros and Csuros, 2002)

Bila lampu katoda dihubungkan dengan listrik tegangan tinggi ± 600 volt, maka mula-mula katoda (–) akan memancarkan berkas elektron yang akan menuju ke anoda dengan kecepatan dan energi tinggi. Dalam perjalanannya tersebut, elektron akan menabrak atom gas (Ne atau Ar) yang mengakibatkan atom tersebut kehilangan elektronnya (akan terjadi ion gas). Ion positif gas akan menabrak katoda dengan kecepatan dan energi tinggi. Akibat dari tumbukan tersebut, maka atom-atom dari kation katoda akan terlempar ke luar (*sputtered*) dari permukaan. Atom-atom tersebut kemudian akan tereksitasi (akibat tabrakan dengan ion positif gas mulia) dan akan kembali ke

keadaan dasar (*ground state*). Kemudian memancarkan sinar emisi dengan panjang gelombang tertentu sesuai dengan unsur pada katoda. Pada penelitian ini digunakan katoda Fe panjang gelombang sinar emisinya 248,3 nm (Csuros and Csuros, 2002).



Gambar 2.5 Lampu Katoda (*Hollow Cathode Lamp*) (Csuros and Csuros, 2002)

b. Atomizer

Spektroskopi serapan atom (SSA) mensyaratkan bahwa atom analit yang diukur harus dalam fasa gas. Ion atau atom didalam sampel harus melalui proses penghilangan pelarut, dan penguapan didalam suatu sistem bertemperatur tinggi seperti *flame* atau *graphite furnace*, Spektrometri serapan atom dengan *flame* hanya dapat untuk analisa larutan, sedangkan spektrometri serapan atom dengan *graphite furnace* dapat untuk analisa larutan, suspensi (lumpur) atau padatan secara langsung. (Csuros and Csuros, 2002)

Serapan atom dengan *flame* menggunakan *burner* jenis slot untuk meningkatkan jarak tempuh cahaya, dan karenanya akan meningkatkan serapan total. Larutan sampel biasanya, dengan bantuan aliran gas, disalurkan kedalam ruang nebulasi/pencampuran untuk mementuk butiran halus sebelum diteruskan ke *flame* (Csuros and Csuros, 2002)

Monokromator yang baik ialah yang mempunyai daya isolasi tinggi biasanya untuk SSA diperlukan yang *band pass*-nya 0,1 nm (untuk filter). Kombinasi yang baik dari grating dan celah yang dipakai dapat pula mengisolasi cahaya dengan baik. (Csuros and Csuros, 2002).

c. Detektor

Detektor pada SSA biasanya dipakai *photomultiplier tube*. Tenaga listrik yang dihasilkan dari detektor kemudian diteruskan ke amplifier setelah itu baru ke sistem pembacaan. Skala yang dibaca dapat dalam satuan % T atau Absorbansi. Untuk SSA

banyak dipakai sistem digital. Selain galvanometer atau voltmeter dapat juga dihubungkan dengan rekorder bahkan komputer (Csuros and Csuros, 2002).

d. Monokromator

Fungsi monokromator ialah untuk mengisolasi sinar yang diperlukan (pada panjang gelombang tertentu) dari sinar yang dihasilkan oleh lampu katoda, jadi apabila ada beberapa panjang gelombang (λ) cahaya, maka yang dilewatkan ke detektor hanyalah cahaya tertentu saja sedangkan λ yang lain akan diserap atau dapat juga ditiadakan. Monokromator yang baik ialah yang mempunyai daya isolasi tinggi biasanya untuk SSA diperlukan yang *band pass*-nya 0,1 nm (untuk filter). Kombinasi yang baik dari grating dan celah yang dipakai dapat pula mengisolasi cahaya dengan baik. (Csuros and Csuros, 2002).

e. Detektor

Detektor pada SSA biasanya dipakai *photomultiplier tube*. Tenaga listrik yang dihasilkan dari detektor kemudian diteruskan ke amplifier setelah itu baru ke sistem pembacaan. Skala yang dibaca dapat dalam satuan % T atau Absorbansi. Untuk SSA banyak dipakai sistem digital. Selain galvanometer atau voltmeter dapat juga dihubungkan dengan rekorder bahkan komputer (Csuros and



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini diawali pemeriksaan kandungan logam besi di beberapa produk yang berbahan dasar kedelai (susu cair kedelai, tempe, susu kedelai bubuk dan kecap). Pilihan selanjut pada tempe yang mewakili produk kedelai bentuk padat dan susu cair kedelai produk kedelai dalam bentuk cair .

Penentuan kadar fitat pada tempe dan susu kedelai cair untuk mengetahui kadar fitat awal pada masing-masing sampel. Kemudian dilakukan penentuan rasio Fe/Fitat untuk menghitung kandungan estimasi Fe yang bisa terekstrak oleh fitat pada susu kedelai cair dan tempe.

Uji ketersediaan (*availability*) zat besi secara *in vitro* sampel susu cair dan tempe dengan penambahan variasi jenis fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ serta fortifikan NaFeEDTA dengan menggunakan enzim pepsin dan pankretin. Uji ini dilakukan untuk mengetahui jumlah fortifikan dibutuhkan untuk mendapati kisaran yang tepat nilai *daily intake* zat besi dalam menanggulangi

anemia zat besi yaitu sebesar 8-15 mg/hari menurut *Reccomendation Dietary Allowance* (RDA) (Hurrel, 1997)

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat – alat yang digunakan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

pengaduk magnetik, stirer, 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, botol-boto Vial, tabung reaksi, *furnace*, kertas saring, timbangan, *sentrifuge*, aluminium foil, *hotplate*, *Shaking waterbath*, dan pH Universal

3.2.2 Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

kedelai, susu kedelai, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Larutan standar induk Fe dari $\{\text{Fe}(\text{NO}_3)_3\}$ 1000 ppm (Merch Ref. HC624851), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaFeEDTA, Aquademin, HNO_3 0,5 M, amil alkohol, ammonium tiosianat, HNO_3 pekat, Na-Fitat (Sigma Ref.3168), HClO_4 60%, HCl 1:1, enzim pepsin, pankreatin, ekstrak bile, NaOH 1M, NaHCO_3 0,1 M

3.2.3 Alat Uji

Alat uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu

- pH meter
- spektrofotometer *UV-Vis* Agilent 8453
- AAS Unicam 989

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Pengukuran Kurva Kalibrasi Fe

1. Larutan standar Fe 1000 mg/L dipipet sebanyak 10 mL ditempatkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan aquades hingga tepat tanda batas. Sehingga diperoleh larutan Fe 100 mg/L.

2. Larutan standar 100 ppm dipipet sebanyak 10 mL ke dalam labu ukur 100 mL ditambahkan aquades hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan Fe 10 mg/L.
3. Larutan standar 10 mg/L dipipet masing - masing 5, 10, 15, 20, 25, 30 dan 35 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, lalu ditepatkan sehingga diperoleh larutan standar 1, 2, 3, 4, 5 , 6 dan 7 mg/L.
4. Nilai absorbansi larutan tersebut diukur dengan SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.

3.3.2 Penentuan Kadar Awal Fe Total

a. Susu Kedelai Cair

Penentuan Fe total dilakukan dengan destruksi basah, destruksi dimulai dengan pengambilan 10 mL sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditambah 25 mL air suling, ditambah 20 mL HNO₃ p. Kemudian dipanaskan di atas *hotplate* hingga volumenya berkurang menjadi $\frac{1}{2}$ dari volume awal. Setelah dingin tambahkan 5 mL HNO₃ p dan 3 mL HClO₄ p sampai filtrat jernih, dan pemanasan kembali hingga mendidih, dinginkan saring. Filtratnya diambil kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL ditepatkan hingga tanda batas, kemudian diukur dengan SSA.

b. Tempe

Sebanyak 2 g sampel tempe yang kering dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 50 mL, ditambahkan 10 mL HNO₃ pekat kemudian dikocok dengan hati – hati. Tambahkan 3 mL HClO₄ 60% lalu panaskan di atas *hot plate* (dalam lemari asam) perlahan – lahan hingga busa tidak timbul lagi. Dipanaskan lebih lanjut hingga uap HNO₃ warna kuning menguap semua. Jika terjadi arang, dinginkan dan tambahkan 10 mL HNO₃ pekat lagi dan lanjutkan pemanasan. Setelah dingin tambahkan 10 mL HCl (1 : 1) saring dan pindahkan ke dalam labu ukur 50 mL tambah aquademin sampai batas 50 ml . Larutan siap diukur dengan menggunakan SAA.

3.3.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi Fitat

Pembuatan kurva kalibrasi fitat berdasarkan metoda Davies dan Reid (Davies *et.al*, 1979; Talamond, 1998)

Larutan standar fitat 5 mM dibuat dengan melarutkan 330,02 mg NaFitat dalam 100 ml aquademin kemudian larutan standar 5 mM diencerkan lagi menjadi 0,2 mM .

Larutan standar fitat 0,2 mM ini digunakan untuk kurva larutan standar fitat. Ambil 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL, 1,0 mL dan 1,2 mL larutan standar fitat dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing dilarutkan menjadi 1,4 mL dengan air destilat kemudian ditambahkan 1 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (konsentrasi Fe^{3+} 50 $\mu\text{g/mL}$) kemudian diaduk. Selanjutnya tabung reaksi ditutup, tempatkan di atas penagas berisi air mendidih selama 20 menit kemudian didinginkan suhu kamar. Tambahkan 5 mL amil alkohol dan 1 mL larutan amonium tiosianat (100 g/L) dan aduk hingga homogen. Selanjutnya *disentrifuge* pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan amil alkohol diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dengan blangko amil alkohol. Sebelumnya cari serapan maksimumnya. Pada kondisi ini range fitat berada pada konsentrasi 0,0286 mM sampai 0,1714 mM

3.3.4 Penentuan Kadar Fe-Fitat Sample

Ekstrak untuk analisis diperoleh dengan cara berikut: Sampel tempe sebanyak 1 g atau 10 mL susu kedelai cair, disuspensikan dalam 50 mL larutan HNO_3 0,5 M. Suspensi ini diaduk menggunakan pengaduk magnetik 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, tambahkan 0,9 mL larutan HNO_3 0,5 M dan 1 mL FeCl_3 (konsentrasi Fe^{3+} 50 $\mu\text{g/mL}$). Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah dinginkan, tambah 5 mL amil alkohol dan 1 mL larutan ammonium tiosianat. Selanjutnya disentrifus pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit.

Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan amil alkohol (lapisan atas) diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*

3.3.5 Fortifikasi sample dengan variasi penambahan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA

a. Fortifikasi pada Tempe kedelai

Kacang kedelai utuh direbus pada suhu 100 °C selama 30 menit kemudian kulitnya dibuang. Kacang yang sudah dikupas direndam di dalam air selama 24 jam. Selanjutnya kacang direbus lagi untuk kedua kalinya pada suhu 100 °C selama 1 jam.

Dinginkan, dan biarkan permukaannya kering, kemudian ditambahkan inokulum jamur *Rhizopus* sebanyak 0,3 gram per 100 gram kacang kedelai rebus. Ragi yang akan ditambahkan pada proses pembuatan tempe dicampur dengan variasi penambahan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA . Penambahan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pada fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ berdasarkan perbandingan molar rasio $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: besi antara 0,5: 1,0 atau perbandingan rasio berat 3,3 : 1 (Sustain, 2001) .

Selanjutnya sampel diaduk sampai homogen dan dibungkus dengan plastik, plastik dilubangi kecil-kecil agar ada rongga udara. Kacang kedelai tersebut difermentasikan selama 2 x 24 jam pada suhu 28 °C sehingga terjadi selaput putih merata di sekeliling tempe kedelai yang berarti bahwa tempe telah jadi.

Tempe yang telah jadi itu dikering dalam oven untuk menguap air selama 1- 2 hari, kemudian dihaluskan.

b. Fortifikasi pada Susu kedelai cair

Sebanyak 100 mL susu kedelai cair ditambahkan variasi fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan NaFeEDTA , diaduk selama ± 45 menit sampai fortifikan homogen dengan susu kedelai cair.

Penambahan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pada fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ berdasarkan perbandingan molar rasio $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: besi antara 0,5 : 1,0 atau perbandingan rasio berat 3,3 : 1 (Sustain, 2001)

3.3.6 Pengukuran Fe total non fitat

a. Sampel tempe

Tempe yang telah difortifikasi variasi penambahan fortifikan (perlakuan 3.3.5.a), masing-masing variasi fortifikan diambil 1 g kemudian disuspensikan dalam 50 mL larutan HNO_3 0,5 M. Suspensi ini diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 2 jam pada suhu ruang kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk menetapkan kadar Fe total non fitat. Filtrat masing sampel ambil 3 ml masukan dalam

tabung. Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah dinginkan, tambah 5 mL amil alkohol. Selanjutnya disentrifus pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan air (lapisan bawah) diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

b. Sampel Susu kedelai cair

Sampel susu cair yang telah difortifikasi variasi fortifikan (perlakuan 3.3.5.b) masing variasi diambil 10 mL, kemudian disuspensikan dalam 50 mL larutan HNO₃ 0,5 M. Suspensi ini diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 2 jam pada suhu ruang kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk menetapkan kadar Fe total non fitat. Filtrat masing sampel ambil 3 mL masukan dalam tabung. Kemudian tabung reaksi ditutup, lalu direndam dalam air mendidih selama 20 menit. Setelah dinginkan, tambah 5 mL amil alkohol. Selanjutnya disentrifus pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk 2 lapisan, lapisan air (lapisan bawah) diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Serapan Atom (SSA)

3.3.7 Penentuan Ketersediaan Fe secara *In Vitro*

Pengukuran ketersediaan (*avalability*) Fe secara *in vitro* ditentukan dengan kelarutan Fe pada kondisi fisiologikalnya dengan memakai enzim pepsin pankreatin dan ekstrak bile menurut metoda yang dijelaskan oleh Svanberg dengan sedikit modifikasi seperti dalam Matuschek *et al.* (2001).

a. Sampel Tempe

Sebanyak masing-masing 1 g sample tempe (yang telah difortifikasi) diendapkan dalam 10 mL H₂O kemudian ditambahkan 10 mL larutan pepsin (0,3 % enzim pepsin dalam 0,1 mol/L HCl). Larutan Pepsin (0,3 % pepsin dalam 0,1 M HCl) ditambahkan langsung dalam sample yang telah diinkubasi dengan enzim. Atur pH 2,0 dengan penambahan 0,1 M NaOH. Campuran diinkubasi dan diaduk dalam *shaking water bath* pada suhu 37 °C selama 90 menit. Setelah 90 menit ditambahkan 3 mL pakreatin dan larutan bile (0,012 g pankreatin dan 0,075 g ekstrak bile dalam 0,1 mol/L NaHCO₃).

pH diatur menjadi 5 dengan NaOH 0,1 M dan campuran disentrifuse kecepatan 5000 putaran/menit selama 20 menit. Endapan disaring dengan menggunakan filter 45 μm dan filtrat dianalisa untuk mengukur kelarutan besi dengan SAA. Jumlah kelarutan besi dalam filtrat dinyatakan sebagai persentase dari jumlah total besi dalam sample

b. Sampel Susu Kedelai Cair

Susu kedelai (yang telah difortifikasi) masing-masing diambil 10 mL kemudian ditambahkan 10 mL larutan pepsin (0,3 % enzim pepsin dalam 0,1 mol/L HCl). Larutan Pepsin (0,3 % pepsin dalam 0,1 M HCl) ditambahkan langsung dalam sample yang telah diinkubasi dengan enzim. Atur pH 2,0 dengan penambahan 0,1 M NaOH. Campuran diinkubasi dan diaduk dalam *shaking water bath* pada suhu 37 °C selama 90 menit. Setelah 90 menit ditambahkan 3 mL pankreatin dan larutan bile (0,012 g pankreatin dan 0,075 g ekstrak bile dalam 0,1 mol/L NaHCO₃). pH diatur menjadi 5 dengan NaOH 0,1 M kemudian lanjutkan inkubasi selama 30 menit, kemudian atur pH 6 dan campuran disentrifuse kecepatan 5000 putaran/menit selama 20 menit. Endapan disaring dengan menggunakan filter 45 μm dan filtrat dianalisa untuk mengukur kelarutan besi dengan SAA. Jumlah kelarutan besi dalam filtrat dinyatakan sebagai persentase dari jumlah total besi dalam sample



4.1 Penentuan Kadar Fe Total

Penentuan kadar Fe total dilakukan dengan metode destruksi basah yaitu pemanasan sampel (organik atau biologis) dengan adanya pengoksidasi kuat seperti asam–asam mineral baik tunggal maupun campuran. Proses ini bertujuan pemutusan ikatan organologam menjadi ion anorganik bebas. Jika dalam sampel dimasukkan zat pengoksidasi, dipanaskan pada temperatur yang cukup tinggi dan dilakukan secara kontinu pada waktu yang cukup lama, sampel akan teroksidasi sempurna sehingga meninggalkan berbagai elemen – elemen pada larutan asam dalam bentuk senyawa anorganik yang sesuai untuk dianalisis (Anderson, 1987).

Dalam penelitian proses destruksi digunakan asam nitrat, hal ini dikarenakan dalam keadaan panas asam ini merupakan oksidator kuat yang dapat melarutkan hampir semua logam dan dapat mencegah pengendapan unsur. Dengan pemanasan hingga mendidih, proses destruksi akan lebih cepat berlangsung

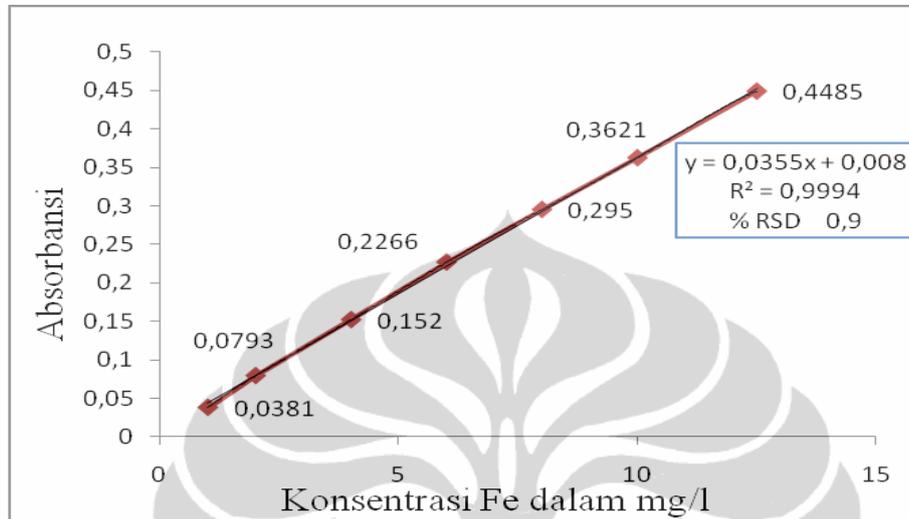
Pemilihan sampel berdasarkan kadar Fe total yang didapat pada uji awal masing sampel (susu cair kedelai, susu bubuk, tempe, kecap). Kadar uji awal Fe total pada kecap cair cukup tinggi (rata-rata 42,15 mg/L) ada kemungkinan telah mengalami fortifikasi zat besi dari pabrik kecap, sehingga pada penelitian ini untuk fortifikasi Fe pada kecap tidak dilakukan. Pemilihan susu kedelai cair dibanding susu kedelai bubuk karena susu kedelai cair lebih mudah homogen pada saat penambahan fortifikan dibanding dengan susu kedelai bubuk. Selain itu, kadar Fe total susu kedelai cair lebih rendah dibanding susu kedelai bubuk. Susu kedelai cair juga lebih familiar bagi masyarakat Indonesia dibanding susu kedelai bubuk.

Pada penelitian ini fortifikasi hanya dilakukan pada susu kedelai cair dan tempe, ini mewakili produk kedelai bentuk padat pada tempe dan susu cair kedelai produk kedelai dalam bentuk cair. Sehingga penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kadar Fe dan mengetahui adanya pengaruh perbedaan kadar fitat akibat perbedaan proses pembuatan susu kedelai cair dan tempe, yaitu adanya proses fermentasi pada tempe dan tidak ada pada susu kedelai cair. Kadar Fe total berdasarkan hasil destruksi masing-masing sampel yang dianalisis ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kadar Fe pada sampel awal

Sampel	Kadar Fe Total (rata-rata)
Kedelai	83,52 mg/kg
Tempe kedelai	68,1 mg/kg
Susu kedelai bubuk	34,3 mg/kg
Susu kedelai cair	4,51 mg/L
Kecap	42,15 mg/L

Kadar Fe total sampel dapat ditentukan dengan metode kurva kalibrasi dengan mensubstitusi nilai Y (Absorbansi) yang didapat dari hasil pengukuran sampel di AAS terhadap persamaan garis regresi dari kurva kalibrasi standar (gambar 4.1)



Gambar 4.1 Kurva kalibrasi Standar Fe

Berdasarkan proses pembuatannya 100 mL susu kedelai itu dibuat dari 10 g kedelai (susu : kedelai = 10 : 1) dan 100 g tempe itu berasal dari 100 g kedelai (1: 1) .

<http://www.deptan.go.id/bpsdm/>

Dari jumlah asal kedelai kita dapat kandungan Fe total untuk masing-masing sampel dari berat kedelai yang sama 10 g maka berat Fe total pada sampel susu cair kedelai, tempe dan kedelai pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Kadar Fe total pada sampel yang berasal dari 10 g kedelai

Sampel	Kadar Fe Total 10 g kedelai
Tempe kedelai	0,681 mg
Susu kedelai cair	0,045 mg
Kedelai	0,83 mg

4.2 Kurva Kalibrasi Fitat

Pada prinsipnya metoda analisis asam fitat didasarkan pada penentuan zat besi yang terikat dengan fitat (Fe^{3+} -fitat) yang bersifat tidak larut dalam air (Thompson dan Erdman, 1982). Fe^{3+} -fitat tersebut dapat diekstrak oleh amil alkohol, sehingga pada penelitian ini kadar fitat ditentukan dengan metode ekstraksi menggunakan pelarut amil alkohol dan air.

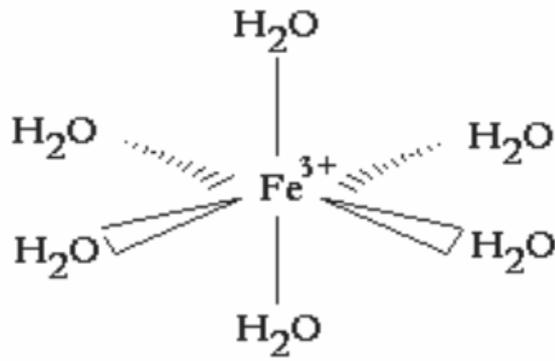
Penelitian ini dilakukan variasi penambahan fitat untuk mendapatkan kurva kalibrasi fitat. Penentuan kadar fitat tidak dilakukan secara langsung tapi melalui pembentukan ion kompleks besi. Sumber besi yang digunakan adalah larutan besi (III) klorida ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$). Penambahan larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ pada penelitian ini akan menyebabkan fitat yang dianalisis berada dalam bentuk kesetimbangan Fe-fitat dengan persamaan reaksi:



Pemberian ammonium tiosianat menyebabkan terbentuk larutan berwarna merah bata. Reaksi yang terjadi pembentukan kompleks antara ion feri $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ dan ion tiosianat (SCN^-) menghasilkan feri tiosianat dengan persamaan reaksi:

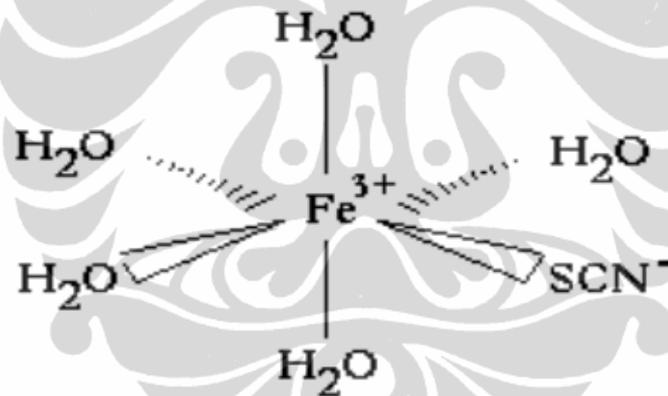


Ion ferri yang telah membentuk kompleks dengan fitat tidak lagi dapat bereaksi dengan ion-ion tiosianat. Ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ adalah ion kompleks berwarna merah bata. Dalam larutan, ion ferri (Fe^{3+}) bertindak sebagai kompleks oktahedral terhidrat yaitu $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Adanya ion tiosianat (SCN^-), satu molekul ligan air akan digantikan ligan SCN^- dan akan menghasilkan ion feri tiosianat ($\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{SCN}^{2+}$).



[Sumber : General chemistry laboratory]

Gambar 4.2 $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ dalam air



[Sumber : General chemistry laboratory]

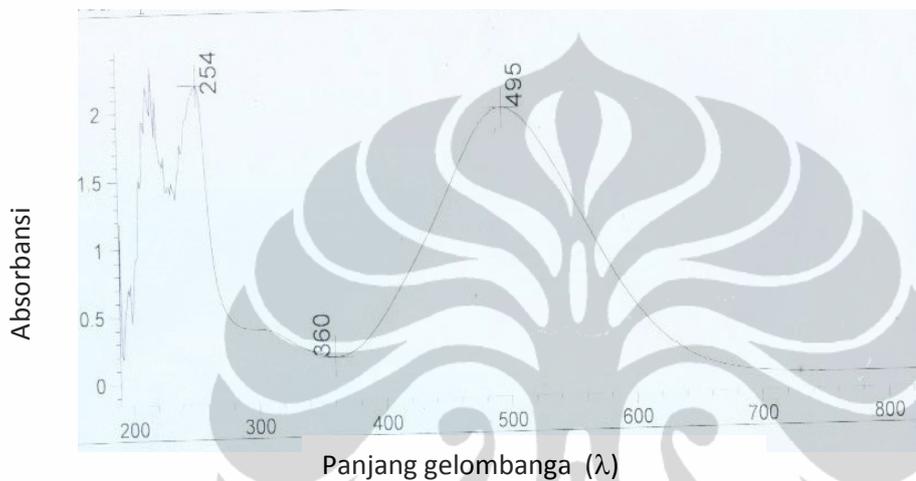
Gambar 4.3 ion kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$

Kesetimbangan dalam fasa amil alkohol



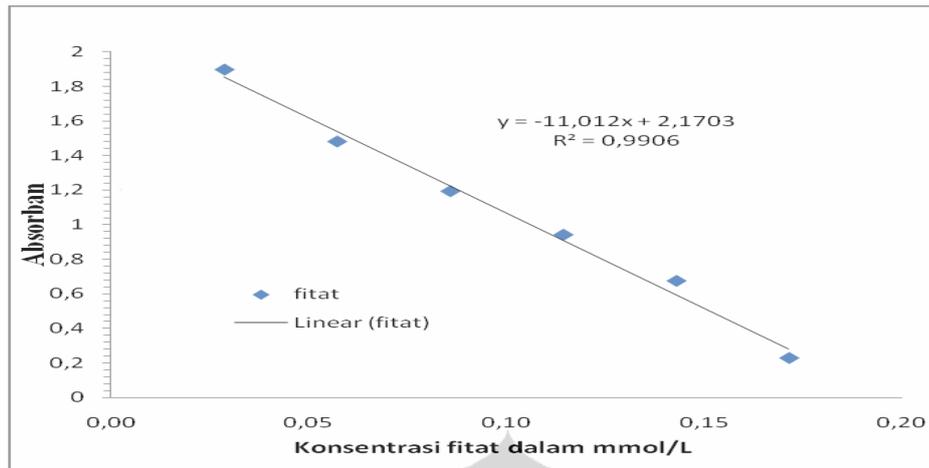
Ion kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ yang terbentuk mudah diekstraksi dengan eter atau amil alkohol. Penggunaan amil alkohol direkomendasikan oleh David dan Reid, karena eter mudah menguap dibanding amil alcohol. Adanya pelarut amil alkohol akan menyebabkan terbentuknya dua fasa yang saling tidak larut (Lampiran 7), fasa amil akohol (atas) dan fasa air (bawah). Lapisan amil alkohol diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri

UV-Visible. Serapan maksimum kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ didapat pada panjang gelombang *visible* 495 nm seperti diperlihatkan gambar 4.4. Pengukuran kadar fitat didapat pada pembentukan kompleks Fe^{3+} fitat dan kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$. Banyak kadar fitat akan mengurangi pembentukan kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$.



Gambar 4.4 Spektra *Visible* kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$
 $(\lambda)_{\text{max}}$ pada 495 nm

Ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ yang terikat pada ligan SCN^- dan fitat berasal dari sumber yang sama yaitu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Berdasarkan prinsip keseimbangan reaksi (lihat persamaan reaksi 2 atau 5), jika fitat (reaktan) yang ditambahkan makin banyak, reaksi akan bergeser ke kanan (pembentuk produk), Fe^{3+} -fitat terbentuk lebih banyak dan kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ yang ada akan semakin berkurang, artinya jumlah ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ dan $[\text{SCN}^-]$ juga akan berkurang. Oleh sebab itu pada kurva kalibrasi fitat dihasilkan kurva yang semakin menurun (absorbansi turun) dengan naiknya konsentrasi fitat yang ditambahkan, secara visual terlihat semakin memudarnya warna merah bata atau kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ yang dihasilkan (Lampiran 7).



Gambar 4.5 Kurva kalibrasi Fitat setelah dikonversikan dalam bentuk satuan mmol/L Fitat terhadap Absorban

Semakin kecil absorban yang terukur berarti semakin besar kandungan asam fitat. Kandungan asam fitat yang tinggi (penambahan fitat semakin banyak) menunjukkan bahwa semakin banyak fitat yang bereaksi dengan ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ berasal dari $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ membentuk Fe^{3+} -fitat pada lapisan amil alkohol sehingga ion Fe^{3+} sisa pada lapisan amil alkohol semakin kecil. Dengan demikian ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ sisa yang bereaksi dengan amil alkohol juga semakin sedikit dan diperoleh intensitas warna yang semakin pudar, sehingga pada waktu dibaca absorbansinya maka akan menunjukkan angka yang kecil. Ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ sisa adalah ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ pada lapisan amil alkohol yang tidak berikatan dengan fitat. Ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ sisa terbentuk dalam kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$

4.3 Penentuan Kadar Asam Fitat

Untuk mengetahui kadar fitat pada sample, sampel disuspensikan ke dalam larutan HNO_3 0,5M dan diaduk selama 2 jam kemudian disaring dan diambil filtratnya. Filtrat digunakan untuk penentuan kadar asam fitat dalam sampel. Larutan HNO_3 berfungsi sebagai pelarut yang dapat melarutkan asam fitat pada sampel. Pengadukan selama 2 jam berfungsi untuk mengoptimalkan proses keluarnya asam fitat dari sample. Filtrat yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mL (Fe^{3+} 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dan HNO_3 0,5 M. Asam fitat dari sampel akan berikatan dengan ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ membentuk Fe^{3+} -fitat. Tabung reaksi kemudian direndam dalam penangas air 100°C selama 20

menit setelah dingin ditambahkan amil alkohol dan ammonium tiosianat. Sampel disentrifuse selama 2-3 menit kemudian didiamkan selama 12-13 menit dan lapisan amil alkohol dibaca absorbansinya. Absorbansi maksimum spektra *visible* pembacaan kompleks $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5(\text{SCN})]^{2+}$ berwarna merah bata pada percobaan ini didapat pada panjang gelombang 495 nm.

Kandungan fitat didapatkan dengan mensubstitusi nilai Y (absorbansi yang dibaca) pada persamaan garis regresi pada kurva kalibrasi standar fitat (Gambar 4.5) akan didapat kandungan fitat sample dalam mmol/L (nilai X) (tabel 4.3)

Tabel 4.3 Pembacaan absorban *spektrofotometri UV-Vis* sampel pada

$(\lambda)_{\text{max}}$ 495 nm, kandungan fitat yang didapatkan berdasarkan persamaan regresi $Y = -11,02 X + 2,1703$

Sampel	Absorban (sumbu Y)	Fitat terbaca (sumbu X)
Susu kedelai cair	1,5456	0,571 m mol/L
Tempe	0,451798	0,1459 m mol/L

Hasil Tabel 4.3, nilai fitat didapat dikalikan dengan berat molekul fitat (660,04 g/mol) dan faktor pengenceran pada sampel (tempe diambil 1 g dalam 50 ml pelarut air dan susu diambil 10 ml, diencerkan jadi 50 ml). Hasil hitung konversinya terlihat pada Tabel 4.4. Data Ini menunjukkan kandungan fitat dalam 100 mL susu kedelai cair (berasal dari 10 g kedelai) dan 100 gram tempe (berasal dari 100 g kedelai) <http://www.deptan.go.id/bpsdm/>

Tabel 4.4 Kandungan Fitat yang didapat pada sampel

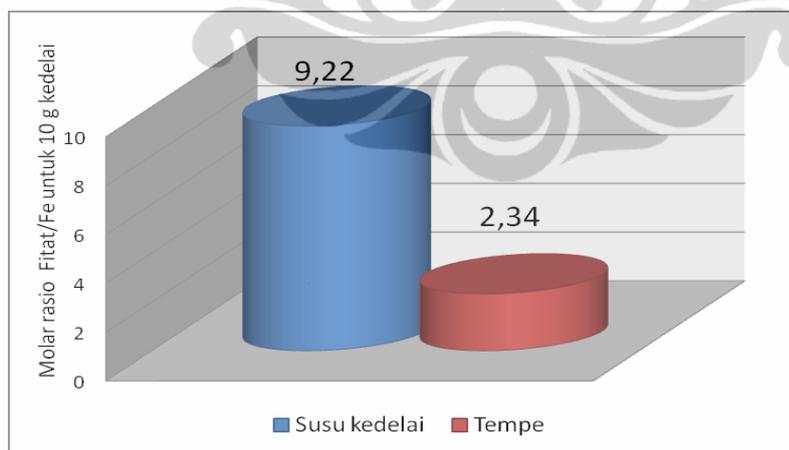
Sampel	Kadar Fitat
Susu kedelai cair	48,5(mg/100 mL) atau 48,5 mg/10 g kedelai pada susu
Tempe	188,4(mg/100 g) atau 18,84 mg/10 g kedelai pada tempe

Tabel 4.4 menjelaskan bahwa dalam jumlah kedelai yang sama (10 g kedelai) dalam proses pembuatan tempe dan susu cair kedelai akan memberikan jumlah fitat yang

berbeda, fitat pada tempe lebih kecil dari susu kedelai cair, karena pada kedelai di tempe proses pembuatannya mengalami fermentasi. Kandungan fitat pada tempe yang didapat dalam percobaan (18,84 mg/10 g kedelai) bila dibandingkan dengan kadar fitat pada kedelai sebenarnya yaitu sebesar 1,00 sampai 2,23 % dari berat kering (Coulibaly A., *et al* 2011; Sri Raharjo, 1997) atau sekitar 100- 223 mg/10 g kedelai, terlihat fitat pada tempe percobaan mengalami penurunan sebesar 81,16 % dari kadar fitat yang ada pada kedelai (ambil perbandingan kandungan fitat kedelai menurut Sri Raharjo terendah 100 mg/10 g kedelai). Hal ini dikarenakan adanya proses fermentasi terjadi pada tempe sementara pada susu kedelai cair tidak terjadi terdapat proses tersebut.

Proses fermentasi yang dihasilkan oleh mikroorganisme pada inokulum (ragi) tempe menyebabkan terbentuknya enzim fitase yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi inositol dan orthofosfat). Semakin lama waktu fermentasi yaitu dari fermentasi 24 jam sampai fermentasi 48 jam, miselia jamur akan menjadi semakin tebal, diikuti dengan terbentuknya spora yang berwarna putih dan tempe kedelai berbau spesifik tempe (Pangastuti, 1996)

Dengan membandingkan kandungan zat besi yang ada pada sample (Tabel 4.2) dengan kandungan fitat pada masing-masing sample tempe dan susu kedelai cair (Tabel 4.4) akan didapat molar rasio fitat/mineral (Fe) pada 10 g kedelai.



Gambar 4.6 Molar rasio fitat terhadap zat besi

Molar rasio fitat/mineral salah satu teknik mengukur ketersediaan hayati (*bioavailability*) mineral dalam tubuh manusia (Morriss&Ellis, 1989 ; Norhaizan, 2009). Untuk Molar rasio fitat/Fe > 1 mengindikasikan bahwa sample makanan mempunyai

bioavailability tidak baik karena ada faktor penghambat (fitat) (Norhaizan, 2009). Terlihat bahwa susu kedelai cair molar rasio fitat/Fe lebih besar dari tempe ini juga memperjelaskan bahwa pada susu kedelai cair mempunyai kandungan perbandingan fitat terhadap zat besi lebih besar dari tempe, ini menunjukkan adanya proses fermentasi pada tempe bisa menekan perbandingan molar rasio fitat/Fe

Berdasarkan persamaan regresi ($Y = -11,02 X + 2,1703$) bila ditarik garis persamaan tersebut sampai $Y = 0$ didapat titik $X = 0,197$ m mol/L. Pada titik tersebut menjelaskan ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ konsentrasi 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (berasal dari perlakuan penambahan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebesar 0,1 ml konsentrasi 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada setiap standar kurva kalibrasi) seluruh dapat terestrak secara teoritis oleh fitat sebanyak 0,197 m mol/L. Dengan membandingkan konsentrasi fitat (0,197 m mol/L) terhadap konsentrasi ion $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ yang terestrak (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) maka akan didapatkan rasio perbandingan $\text{Fe}/\text{fitat} = 0,384$ atau $\text{fitat}/\text{Fe} = 2,604$

Dari perbandingan tersebut kita dapat memperkirakan Fe total yang bisa terestrak oleh fitat untuk sample tempe dan susu kedelai cair.

Tabel 4.5 Kadar Fe pada sample yang dapat diekstrak oleh fitat

Sampel	Kadar Fe terekrak oleh fitat dari 10 g kedelai
Susu kedelai cair	18,48 mg
Tempe	7,234 mg

Dengan asumsi bahwa orang memakan susu 100 ml per hari susu kedelai (10 g kedelai yang terdapat pada susu kedelai) dan 10 g tempe (10 g kedelai yang terdapat pada tempe), secara teoritis untuk fortifikasi zat besi pada susu kedelai sebaiknya diatas 18,48 mg dan 7,234 mg pada tempe supaya didapat zat besi total tidak terikat oleh zat fitat

4. 4 Fortifikasi zat besi dengan variasi jenis fortifikan dan konsentrasinya

4.4.1 Variasi Fortifikasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Variasi konsentrasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ difortifikasi pada sampel susu dan tempe bertujuan untuk mengetahui kadar Fe non-fitat pada matrik sampel. Variasi konsentrasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dilakukan pada 100 mL (10 g kedelai) susu kedelai cair dan 10 gram tempe kedelai. Semakin banyak penambahan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ maka Fe non-fitat pada matrik sampel akan semakin meningkat. Hal ini terlihat pada Tabel 4.6 dan 4.7 untuk sampel tempe dan susu kedelai cair.

Tabel 4.6 Variasi fortifikasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pada Tempe

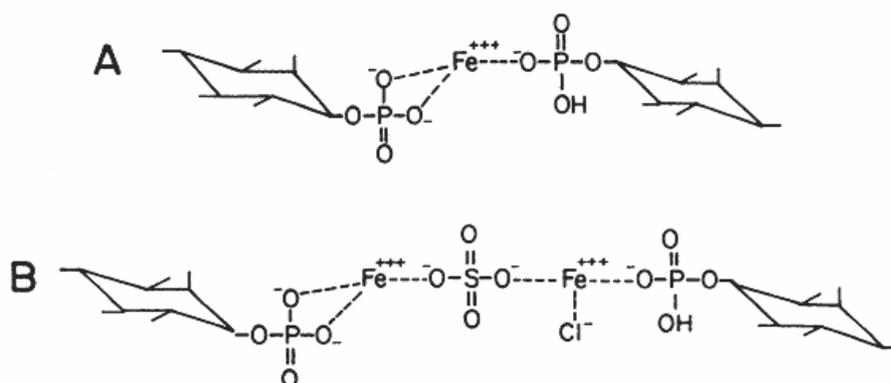
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (mg)	Fe_{total} (mg)	Fe terekstrak non Fitat (mg)	% efektifitas fortifikasi
20	4	2,360	59,00
40	8	4,313	53,92
60	12	5,870	48,92
80	16	6,027	37,67
100	20	6,590	32,95
150	30	7,852	26,17
200	40	8,620	21,55

Tabel 4.7 Variasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pada susu kedelai cair

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (mg)	Fe_{total} (mg)	Fe terekstrak non Fitat (mg)	% efektifitas fortifikasi
50	10	7,735	77,35
100	20	12,629	63,146
200	40	16,430	41,075
300	60	26,740	44,567
400	80	30,742	38,427
500	100	34,170	34,170

Pada Tabel 4.6 dan Tabel 4.7 terlihat pada penambahan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pada matriks sampel tempe dan susu kedelai cair masing-masing dalam variasi pada kisaran 20-200 mg untuk tempe dan 50-500 untuk susu kedelai cair yang setara dengan penambahan Fe total berturut-turut 4-20 mg dan 10-100 mg. Kisaran tersebut dimaksudkan untuk mencari kisaran yang tepat nilai daily intake Fe untuk menanggulangi anemia Fe yaitu sebesar 8-15 mg/hari menurut *Reccomendation Dietary Allowance* (RDA) (Hurrel, 1997). Dari Tabel diatas terlihat bahwa penambahan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ yang dapat memenuhi kisaran *daily intake* tersebut adalah 200-437,8 mg untuk sampel tempe dan 50-100 mg untuk susu kedelai cair. Dengan semakin meningkatnya penambahan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ justru menurunkan efektifitas fortifikasi bila dilihat dari nilai % efektifitas fortifikasi. Hal ini mengindikasikan bahwa % nilai efektifitas fortifikasi tidak bisa dijadikan satu-satunya rujukan dalam menentukan kuantitas adisi fortifikan yang optimum pada kedua jenis sampel tersebut.

Semakin banyak ion Fe yang direaksikan akan makin memberikan kesempatan lebih luas dari mineral tersebut untuk terikat dengan asam fitat. Hal ini terlihat dengan semakin tinggi jumlah Fe yang direaksikan akan semakin tinggi Fe yang terikat oleh fitat yang ditandai dengan berkurangnya % hasil Fe non fitat. Hal tersebut karena adanya gugus sulfat yang dapat merubah koordinasi ligan dengan ion feri. Ikatan sulfat dengan beberapa logam transisi stabil dalam larutan air (Thompson and Erdman JR, 1982). Jika terbentuk ikatan antara sulfat dan ion feri, maka ion feri tidak lagi leluasa untuk mengikat fitat (faktor sterik) sehingga rasio Fe:Fitat yang dibutuhkan untuk berikatan akan meningkat. Tanpa adanya ion sulfat, ion feri dapat mengikat dua anion fitat sedangkan dengan adanya sulfat maka ion feri hanya mampu mengikat satu anion fitat maka dapat disimpulkan Fe yang dibutuhkan untuk mengikat fitat lebih banyak dengan semakin banyaknya sulfat yang ditambahkan sehingga Fe non fitat semakin sedikit.



Gambar 4.7 Pengikatan Fe-fitat terhadap sulfat (Sumber : Thompson and Erdman JR, 1982).

- Ion feri terhubung antara gugus phosphate dengan anion fitat. Hanya satu gugus phosphate yang berikatan dengan anion fitat.
- Jembatan sulfat antara dua ion feri yang terkoordinasi ke dua anion fitat.

Anderson's (1963) mengamati bahwa kelebihan Fe akan melarutkan Fe-fitat. Keempat mol Fe dalam tetraferic fitat relatif labil.

4.4.2 Variasi Fortifikasi Campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Menurut Sustain (2001)

Penentuan variasi campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang digunakan adalah berdasarkan rasio bobot molekul sebesar 1 : 3,3 nilai itu merupakan nilai perbandingan massa yang bereaksi antara $\text{Na}_2\text{EDTA}^{2-}$ dan ion Fe.

Tabel 4.8 Variasi campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pada tempe

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (mg)	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg)	Fe _{total} (mg)	Fe terekstrak non Fitat (mg)	% efektifitas fortifikasi
20	13,2	4	2,491	62,28
40	26,4	8	3,366	42,07
60	39,6	12	4,898	40,82
80	52,8	16	6,529	40,80

100	66	20	7,054	35,27
120	79,2	24	7,803	32,51
140	92,4	28	8,540	30,50

Tabel 4.9 Variasi campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pada susu kedelai cair

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (mg)	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg)	Fe_{total} (mg)	Fe terekstrak non Fitat (mg)	fortifikasi
50	33	10	9,695	96,95
100	66	20	15,263	76,32
200	132	40	19,217	48,04
300	198	60	35,891	59,82
400	264	80	37,932	47,42
500	330	100	37,357	37,36

Kadar Fe non-fitat yang terukur pada variasi penambahan campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ meningkat sebanding dengan meningkatnya jumlah Fe yang ditambahkan. Berbeda dengan variasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pada variasi konsentrasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ terjadi peningkatan kadar Fe non fitat lebih besar yang disebabkan adanya ion $\text{H}_2\text{EDTA}^{2-}$. Ion $\text{H}_2\text{EDTA}^{2-}$ berfungsi sebagai *masking agent* atau agen pengkelat terhadap ion besi sehingga ion besi non-fitat pada terlihat semakin bertambah besar. Hal ini terlihat pada Tabel 4.8 dan 4.9. Menurut Richard (2000) pada penelitian produk makanan gandum dan kedelai, pemberian $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pada fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ molar rasio 1: 0,5 dapat meningkatkan absorsi zat besi sebesar 5 - 7 %. EDTA mempunyai kemampuan berikatan secara stokiometri hampir setiap logam di dalam sistem priodik. Ion Fe^{3+} berikatan kuat dengan EDTA di range pH lambung ($\text{pH} \pm 2$) tapi dengan adanya peningkatan pH di usus, ikatan Fe- EDTA akan

melemah dan ion $\text{H}_2\text{EDTA}^{2-}$ akan membentuk kompleks dengan logam lain. Pembentukan kompleks logam tersebut sangat tergantung pada konstanta pembentukan kompleks masing-masing logam dengan ligand EDTA, pH dan molar rasio ion $\text{H}_2\text{EDTA}^{2-}$: logam (West & Sykes, 1960, Hurrel et al, 2000).

Pemeriksaan pH pada sampel susu membuktikan adanya interaksi antara $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ seperti pada Table di bawah ini :

Tabel 4.10. Kondisi pH pada sampel susu

Penambahan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (mg)	Penambahan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg)	pH
0	0	6,65
17,17	10,39	6,00
34,34	20,78	5,68
68,68	41,56	5,14
137,8	83,12	4,48

Pengaruh pH pada penambahan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pada 100 mL susu kedelai cair adalah semakin menurun dengan bertambahnya konsentrasi fortifikan. Dari tabel dapat diketahui terjadi penurunan pH pada saat penambahan fortifikan Nilai pH saat terjadinya reaksi adalah daerah pH dimana $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ memiliki fraksi $\text{H}_2\text{EDTA}^{2-}$ (H_2Y^{2-}) distribusi dominan pada kondisi pH 3-6 (Skoog, 1996).

Secara teori satu mol asam fitat dapat mengikat empat mol Fe. Dengan adanya fermentasi (pada tempe) ataupun perendaman (susu kedelai) tidak mampu menghilangkan asam fitat secara total. Residu fitat kemungkinan masih tercampur dengan besi yang terlarut. Kelarutan mineral (Fe) tidak hanya ditentukan dari rasio asam fitat : mineral. Telah dilaporkan pula bahwa inositol phosphate yang lebih rendah (inositol mono-, bi-, tri dan tetrphosphate) diproduksi selama proses fermentasi, meskipun ada dalam jumlah yang sedikit akan meningkatkan kapasitas ikatan mineral dari inositol phosphate yang lebih tinggi (IP5 dan IP6: myo-inositol pentaphosphate) (Sandberg *et al.* 1999). Semua bentuk besi fosfat kelarutannya rendah dalam air tapi sangat baik larut dalam pelarut non polar (seperti pelarut eter dan amil alkohol).

4.4.3 Variasi Fortifikasi NaFeEDTA

Fortifikan NaFeEDTA diharapkan semakin memperbesar jumlah kadar Fe non-fitat yang bisa diadsorpsi oleh tubuh. EDTA dalam senyawa kompleks ini merupakan masking agent terhadap ion Fe. Variasi kadar NaFeEDTA bertujuan membandingkan efektifitas dari ketiga jenis fortifikan yang digunakan dalam penelitian ini. Tabel 4.11 dan Tabel 4.12 memperlihatkan bahwa kisaran penambahan optimum fortifikan NaFeEDTA pada tempe dan susu berturut-turut adalah 120-220 mg dan 67-133 mg.

Tabel 4.11 Variasi NaFeEDTA pada tempe

NaFeEDTA (mg)	Fe _{total} (mg)	Fe terekstrak non Fitat (mg)	% efektifitas fortifikasi
30	4,516	2,736	60,58
60	9,12	3,881	42,56
90	13,56	5,319	39,22
120	18,06	8,479	46,95
150	22,56	9,479	42,02
220	33,2	15,05	45,33

Tabel 4.12 Variasi NaFeEDTA pada susu kedelai cair

NaFeEDTA (mg)	Fe _{total} (mg)	Fe terekstrak non Fitat (mg)	% efektifitas fortifikasi
67	10	9,4670	94,67
133	20	13,794	68,97
267	40	27,1870	67,97
400	60	31,4261	52,38
533	80	34,9816	43,73
667	100	36,827	36,83

Tabel 4.11 dan Tabel 4.12 menunjukkan bahwa variasi NaFeEDTA pada tempe dan susu menjelaskan Fe dalam bentuk kompleks NaFeEDTA lebih stabil dari bentuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ atau $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, karena ion Fe yang ada dalam kompleks NaFeEDTA tersebut berada dalam bentuk kelat dengan EDTA yang kuat. Hal ini menyebabkan fitat atau senyawa lain lebih sulit untuk menyerang Fe dalam NaFeEDTA daripada menyerang Fe dalam $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Begitu pula jika dibandingkan terhadap data pada penambahan campuran $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang menunjukkan bahwa tidak semua Fe dalam $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ bisa membentuk NaFeEDTA.

Banyaknya Fe yang terikat dengan fitat sebagai Fe^{3+} -Fitat dapat disebabkan karena banyaknya sisi ikatan yang memungkinkan Fe untuk berikatan dengan fitat. Jika dilihat dari strukturnya yang berbentuk cincin dengan 6 gugus fosfat dan terdapat 2 gugus hidroksil. Pada masing – masing gugus fosfat, gugus hidroksil ini mudah melepaskan atom Hidrogen nya sehingga mampu berikatan dengan logam dan membentuk senyawa kompleks. Oleh karena itu, fitat memiliki banyak sisi aktif untuk berikatan dengan logam bila dibandingkan dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

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

kedelai memiliki banyak kandungan *dietary fibers*, asam amino maupun protein yang cukup tinggi.

Satu molekul asam fitat mampu berikatan dengan enam kation divalen dan tiap satu kation dapat menghubungkan dua molekul fitat yang lain tergantung pada tingkat oksidasinya (Graff *et al.*, 1990 dan Raharjo, 1997). Asam fitat mampu berikatan dengan empat kation Fe^{3+} . Menurut Raharjo (1997), upaya untuk mengkristalkan Fe dengan Asam fitat belum berhasil, sehingga bentuk geometri dari garam Fe^{3+} -Fitat belum diketahui.

4.5 Ketersediaan Fe non Fitat Secara *In Vitro*

Metode ketersediaan (*availability*) zat besi berdasarkan estimasi terlepasnya zat besi total dari makanan dengan adanya treatment pepsin-HCl yang merupakan simulasi yang ada pada getah lambung (cairan lambung) (Narasinga Rao, 1981)

Lambung manusia memiliki kondisi yang hampir sama, yaitu kondisi asam, karena adanya sekresi asam lambung oleh sel-sel mukosa lambung. Asam lambung akan membuat pH dalam lumen sekitar 2-2,5 yang merupakan pH optimum untuk aktivitas enzim pepsin. Pada pH ini merupakan kondisi optimum untuk bekerjanya enzim pepsin mengkatalisis hidrolisis sebahagian protein pada sampel. Selain itu kondisi asam dalam lambung diperlukan untuk mengubah bentuk pepsinogen yang belum aktif menjadi pepsin aktif . Sedangkan enzim lain yang juga digunakan adalah cairan pankreatin bile (menyerupai getah yang dikeluarkan oleh kelenjer pankreas) cairan ini mengandung natrium bikarbonat menetralkan cairan dari lambung dan berfungsi memecah ikatan protein sampel (Miller D.D, 1981)

Dalam melakukan inkubasi dalam *shaking waterbath* selama 1,5 jam pada suhu $\pm 37^{\circ}$ C. Selama inkubasi akan terjadi hidrolisis protein oleh enzim pepsin. Kondisi inkubasi disesuaikan dengan kondisi lambung dimana suhu 37° C merupakan suhu normal tubuh manusia. *Shaking Waterbath* merupakan simulasi sampel yang menyerupai gerak peristaltik lambung yang berfungsi untuk menghomogenkan bahan makanan dengan getah lambung agar fungsi getah lambung optimal dan diperoleh campuran yang homogen(Narasinga Rao, 1981).

Penambahan fortifikan pada sampel sebelum di lakukan *in vitro* dengan mempertimbangkan keberadaan fitat dan Fe bisa diekstrak oleh fitat (Tabel 4.5). Penambahan

$\text{Na}_2[\text{EDTA}]^{2-}$ pada fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ berdasarkan perbandingan molar rasio $\text{Na}_2[\text{EDTA}]^{2-}$: besi antara 0,5: 1,0 atau perbandingan rasio berat 3,3 : 1 (Sustain, 2001). Penambahan fortifikan tersebut dilihat pada Tabel 4. 13 dan Tabel 4.14

Tabel 4.13 Data In vitro pada 100 mL susu kedelai cair (10 g kedelai)

Fortifikasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ H_2O (mg/100 mL susu)	Fe yang difortifikasi (mg/100 mL susu)	Fe total non fitat setelah <i>in vitro</i> (mg/100 mL)	% Fe setelah <i>in vitro</i>
50	10	1,78	17,8
100	20	3,835	19,19
150	30	6,04	20,13
200	40	6,356	15,89
250	50	9,075	20,15
300	60	13,11	15,89
350	70	14,135	18,15
400	80	14,875	21,19

Fortifikasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (mg/100 mL susu)	Fe difortifikasi (mg/100 mL susu)	Fe terbaca setelah <i>in vitro</i> (mg/100 mL)	% Fe setelah <i>in vitro</i>
---	--------------------------------------	--	------------------------------

50 +33	10	3,28	32,2
100 + 66	20	4,043	20,2
150 + 99	30	7,504	25,01
200 + 132	40	9,01	22,52
250 + 165	50	10,325	20,647
300 + 198	60	13,455	22,65
350 + 231	70	15,055	21,5

Fortifikasi NaFeEDTA (mg/100 mL susu)	Fe difortifikasikan (mg/100 mL)	Fe terbaca setelah <i>in Vitro</i> (mg/100 mL)	% Fe setelah <i>in vitro</i>
100	15,05	6,79	46,44
150	22,575	8,8	39,33
200	30,1	12,38	41,55
250	37,625	12,42	32,95
300	45,15	13,35	29,57
350	51,265	14,65	27,77
450	67,715	16,16	23,88

Tabel 4.14 Data *in vitro* pada sample 10 g Tempe (10 kedelai)

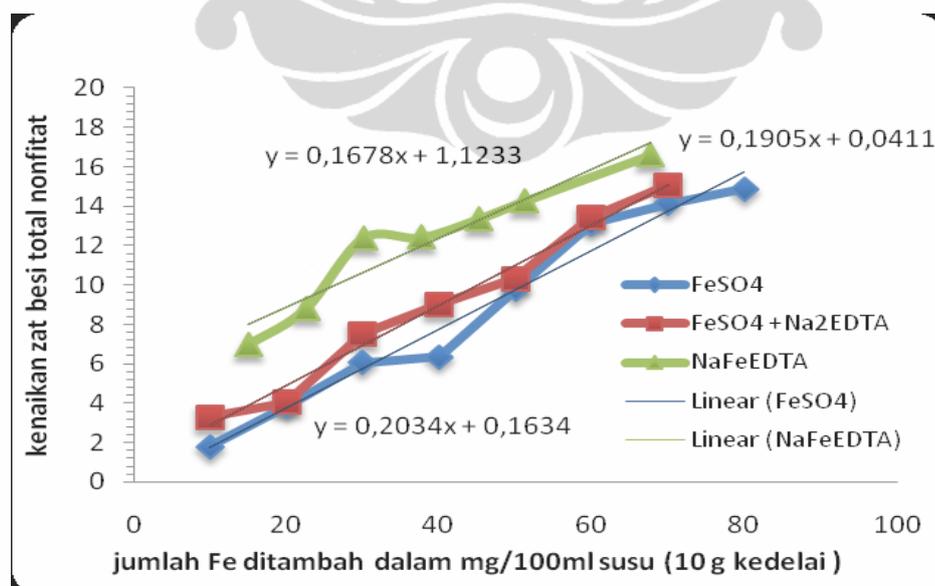
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	Fe yang difortifikasi	Fe total non fitat setelah <i>in vitro</i>	% Fe setelah <i>in vitro</i>
--	-----------------------	---	------------------------------

(mg/10 g tempe)	(mg/10 g tempe)	(mg/10 g tempe)	<i>vitro</i>
20	4	2,00	50,0
40	8	6,00	75,0
60	12	6,858	57,0
80	16	9,604	60,0
100	20	9,804	60,3
120	2	12,0778	50,32

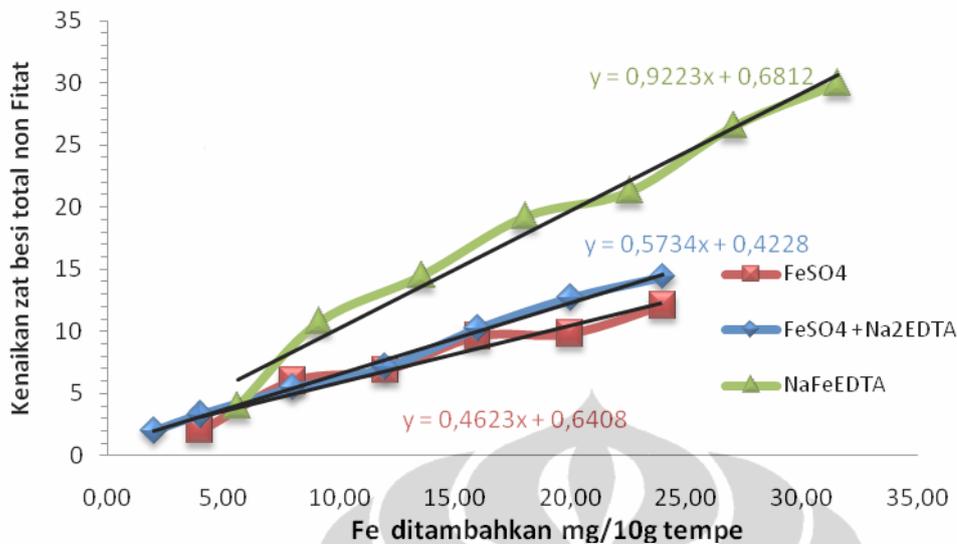
Fortifikasi FeSO ₄ .7 H ₂ O + Na ₂ H ₂ EDTA 2H ₂ O (mg/10 g tempe)	Fe yang fortifikasi(mg/10 g tempe)	Fe total non fitat setelah <i>in Vitro</i> (mg/10 g tempe)	% Fe setelah <i>in vitro</i>
10 + 6,6	2	1,92	96
20 + 13,2	4	3,3	83
40 + 26,4	8	5,46	68
60 + 39,6	12	7,11	59
80 + 52,8	16	10,2	63
100 + 66	20	12,71	63,5
120 + 79,2	24	14,4	60,0

Fortifikasi NaFeEDTA (mg/10g tempe)	Fe difortifikasi mg/10 g tempe	Fe total non fitat setelah in Vitro (mg/10 g tempe)	% Fe setelah in vitro
20	5,6	3,96	77,34
30	9,12	9,06	99,3
40	13,56	13,5	99,9
50	18,06	17,26	95,5
60	22,56	21,26	94,24
70	27,072	26,52	98,0
90	31,56	29,96	94,8

Perbandingan kenaikan ketersediaan zat besi non fitat terhadap berbagai fortifikan yang ditambahkan pada sampel susu cair dan tempe secara *in vitro* terlihat pada Gambar 4.8 dan 4.9



Gambar 4.8 Kenaikan zat besi non Fitat setelah *in vitro* pada fortifikasi susu kedelai cair 100 ml (10 g kedelai) berbagai fortifikan



Gambar 4.9 Kenaikan zat besi non Fitat setelah in vitro pada fortifikasi 10 g tempe (10 g kedelai) berbagai fortifikan

Dari data in vitro terlihat NaFeEDTA lebih baik dari fortifikan lain kemampuannya melepaskan Fe total non fitat dibandingkan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ atau $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Pada kedua sample juga memperjelaskan bahwa pada sample tempe lebih banyak melepaskan Fe total non fitat semua diatas 50% bahkan untuk NaFeEDTA 77-99 % ini mempertegaskan pengaruh fermentasi pada tempe dapat menurunkan inhibitor terhadap logam terutama senyawa fitat yang presentase sangat besar pada makaan berbahan kedelai

Penambahan Fortifikan bentuk kompleks NaFeEDTA jelas lebih efektif dari penambahan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, walaupun penambahan fortifikan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sedikit meningkatkan Fe total non fitat dibandingkan penambahan $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ tanpa $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ini dimungkin ada pembentukan kompleks NaFeEDTA (perlu penelitian lebih lanjut untuk membuktikannya)

Adanya interaksi $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ di dalam sampel susu cair dilihat dengan perubahan pH (lampiran 7)

Berujuk pada rekomendasi asupan yang diperbolehkan pada makanan, *recommended dietary allowance* (RDA) dari National Research Council (Amerikan serikat, Indonesia belum ada) (Hurrell., *et al*, 1997) untuk zat besi diperbolehkan

konsumsi per hari untuk manusia (anak dan dewasa dalam keadaan normal) sekitar 8-15 mg/hari.

Berdasar batasan tersebut dari data-data ketersediaan Fe non fitat hasil penelitian yang dilakukan *in vitro* dapat diperkirakan untuk 10 g tempe (10 g kedelai yang ada pada tempe) dan 100 mL susu kedelai (10 g kedelai yang ada pada susu) dikonsumsi per hari akan didapat jumlah fortifikan ideal difortifikasi pada sampel tempe dan susu cair kedelai dengan membandingkan jumlah Fe total non fitat yang lepas setelah proses *in vitro* dengan jumlah fortifikan yang ditambahkan sebelumnya didapatkan estimasi penambahan fortifikan pada sampel:

Tabel 4.15 Estimasi Fortifikan ideal pada Tempe

No	Fortifikan	10 g tempe (10 g kedelai)
1.	FeSO ₄ . 7 H ₂ O	70 - 150 mg
2	FeSO ₄ . 7 H ₂ O + Na ₂ H ₂ EDTA 2H ₂ O	65 - 125 mg
3	NaFeEDTA	25 - 45 mg

Tabel 4.6 Estimasi Fortifikan ideal pada Susu kedelai

No	Fortifikan	100 mL susu kedelai (10 g kedelai)
1.	FeSO ₄ . 7 H ₂ O	225 - 450 mg

2	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} +$ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	175 - 350 mg
3	NaFeEDTA	130 - 320 mg



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Efektifitas FeNaEDTA lebih baik dibandingkan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai fortifikan zat besi.
2. Penambahan $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai agen pengkhelat memberikan kadar Fe bebas yang lebih baik dibanding $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tanpa $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3. Kadar fitat pada tempe 188,4 mg/10 g tempe dan susu kedelai 48,5 mg/ 100 mL susu kedelai cair.
4. Molaritas rasio fitat terhadap besi pada tempe 2,34 dan susu kedelai cair 9,22
5. Fortifikasi ideal dalam 10 g tempe adalah 70-150 mg untuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 65 – 125 mg untuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 25-45 mg untuk NaFeEDTA
6. Fortifikasi ideal dalam 100 mL susu cair kedelai adalah 225-450 mg untuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 175-350 mg untuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 130-320 mg untuk NaFeEDTA

5.2 Saran

Saran yang bisa disampaikan untuk penelitian selanjutnya adalah :

1. Melakukan fortifikasi dengan bahan pangan berbasis kedelai yang lain karena kadar Fe awal bahan pangan berbasis kedelai masih rendah.

2. Melakukan fortifikasi dengan fortifikan dalam bentuk Fe lainnya (ferrous bisglycinate, ferous fumarat, suksinat) yang juga dapat digunakan sebagai pembanding.
3. Melakukan uji ketersediaan hayati (*bioavalalibility*) fortifikan secara in vivo untuk mengetahui jumlah penambahan fortifikan yang lebih aman dikonsumsi manusia.
4. Adanya ketetapan yang yang jelas dari badan regulator (pemerintah RI) untuk merekomendasi asupan zat besi yang diperbolehkan untuk dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia



DAFTAR REFERENSI

- Abdoulaye, C., Kouakou, B., Chen, J (2011)., Phytate Acid in Cereal Grain: Structure, healthy or harmful ways to reduce Phytate acid in cereal grain and their effects on nutrition quality, *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 1,(1), 1-22.
- Afinah, S., Yazid, A. M., Shobirin, A (2010)., Review Article, Phytate: application in food industry, *International Food Research Journal*, 17, 13-21.
- Anderson G (1963)., Effect of iron/phosphorus ratio and acid concentration on the precipitation of ferric inositol hexaphosphate, *J. Sci. Food Agric.*, 14, 352-359.
- Allen L., B. Benoist, O. Dary, R. Hurrell (Eds) (2006)., *Guidelines on food fortification with micronutrients*. World Health Organization. Food and Agricultural Organization of The United Nations.
- Almatsier, Sunita (2006)., *Prinsip dasar ilmu Gizi*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, Indonesia
- Astuti, Marry., Pengaruh Ratio Molar Fitat: Zn pada Diit Tempe terhadap Pertumbuhan dan Spermatogenesis, *Agritech*, 13(4), 7-12
- Astuti, Marry., Maliala A., Dalais F. S (2000)., Review Article : Tempe, a Nutrition and Healthy Food from Indonesia, *Asia Pacific J Clin Nutr*, 9 (4), 322-325
- Carlsson N.G., E.L. Bergman, E. Skoglund, K. Hasselblad and AS Sandberg (2001)., Rapid analysis of Inositol phosphates. *J. Agric. Food Chem*, 49,1695-1701
- Davies N. T., Reid H (1979)., An evaluation of the phytate, zinc, copper, iron and magnesium contents of, and Zn availability from, soya-based texture-vegetable-protein meat-substitutes or meat-extenders, *Br.J. Nutr*, 4, 579-589.
- Dary, Omar (2002)., Stable food fortification with iron: a fortification decision, *Nutrition Review*, 60 (7), 34-40
- Depkes RI (2003)., *Gizi dalam Angka*, Direktorat Jenderal Bina Kesehatan Masyarakat, Direktorat Gizi Masyarakat, Jakarta.
- <http://farmasi.ums.ac.id/content/artikel/20080412/htm>., Fortifikasi garam dengan

zat besi, Strategi praktis dan efektif menanggulangi anemia,7/11/2011.
2:47 PM.

<http://kfindonesia.org/index.php?pgid=11&contentid=13>., Makanan yang dapat difortifikasi .

<http://obatherbal.biz/konsumsi-susu>. htm., Konsumsi Susu Kurangi Resiko Kanker Payudara, 09/11/2011 9:10 AM

<http://staff.uny.ac.id/sites/default/files/tmp/KOMPOSISI%20DAN%20NUTRISI%20PADA%20SUSU%20KEDELAI.pdf>, 22/12/2011 11:12 AM

<http://id.wikipedia.org/wiki/Tempe> 11/12/2011 2:04 PM

http://www.deptan.go.id/bpsdm/bbpb-binuang/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=95., Pengolahan Susu Kedelai 02/11/2011 4: 56 PM

<http://nurmadanischool.wordpress.com/2011/02/08/kedelai.htm>, *Kedelai, polong yang kaya protein* 11/12/2011 1: 32 PM

Erdman, J, W (1979)., Oilseed Phytate : Nutrition implications, Journal of The American oil chemistry Society, , 56, 736-741.

Frederikson M., NG, Carlsson, A. Almgren and AS Sandberg (2002)., Simultaneous and sensitive analysis of Cu, Ni, Zn, Co, Mn and Fe in food and biological samples by Ion Chromatography. J. Agric. Food Chem

Graf, Ernst, *et.al* (1987)., Phytic acid a natural antioxidant, The Journal of Biological Chemistry, 262 (2.4).

Graf, Ernst., Eaton J, W (1990)., Antioxidan fuction of phytate acid, Free Radical Biology &Medicine, 8, 61-69

Harlan., F Barbara ., Narula Gruleen (1999)., Howard Food Phytate and Its Hydrolysis Product, Nutrition Research, University Washington DC, 19 (6)

Hurrel R. F., Reddy M. B., Burri J and Cook D (2000)., An Evaluasi of EDTA compoun for iron Fortification of Cereal-Based Foods, Brintish Journal of Nuritions, 84, 903-910

Hurrel R. F (1997)., Preventing iron Deficiecy Trough Food Fortification, Nutrition Reviews, , 55(6), 210-222

Hazell T(1987)., Johnson I. T., In vitro estimation of iron avaiibility from an range of plant food: influence of phytate, ascorbate and citrate , Brintish Journal of Nutrition, 57, 223-233

- LIPI (1996)., Puslitbang kimia terapan, Kursus teknik dasar analisa kimia, Bandung 9-17.
- Matuscheck, E., E. Towo., and U. Svanberg. 2001. Oxydation of polyphenols in phytate reduced high tannin cereals : effects on different phenoloic groups and on in vitro available iron, *J. agric. Food Chem*, 49, 5630-5638.
- Minihane, Marie Anne & Gerald Rimbach (2002)., Iron absorption and the iron binding and anti-oxidant propertties of phytic acid, *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 741-748
- Miller D. D., Schricker B, R., Rasmussen R, R (1981)., An in vitro methode for estimation of iron avaibility from meals, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34, 2248-2256
- Narasinga Rao, B. S., Prabhavathi T (1981)., An in vitro methode for predicting the bioavaibility of iron from food, *The American Journal of Clinic Nutrition*, 34, 2248-2256
- Norhazan M. E., Faizadatul A (2009)., Determination of phytate, iron, zinc, calcium contents and their Molar ration in commonly consumed raw and prepare food in Malaysia, *Mal. J. Nutr*, , 15 (2), 213-222
- Sri Palupi, Nurheni (2008)., Fortifikasi Zat Besi, *Food Review Indonesia*.,
- Sri Raharjo (1997)., Review: Peran Asam Fitat sebagai AntiOksidan, *Agritech*, 17 (2), 29-31
- Svanberg U., Lorri W., Sandber A. S (1993)., Latic fermentation of Non-Tanin and High-tanin Cereals: Effects on in vitro estimation of iron avaibility and phytate hydrolysis, *Journal of Food science* , 58 (2) 407-412.
- Sanny S.L., Chan., Ferguson E. L., Baily K., Fahmida U., Harper T. B., Gibson R. S (2007)., The Concentration of iron, calcium, zinc and phytate in cereals and legumes habitually consumed by infants living in East Loombok, Indonesia, *Journal of Food Compositions and Analysis*, 20, 609-617.
- Skoog D. A., Holler F.J., Nieman T. A (1997)., Principle of Instrumental Analysis, 5th edisi, Sounders College publishing.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F.J., Crouch S.R (1996)., Fundamental of Analytical Chemistry, Thomson Learning, Belmont, USA.
- Sustain (2001)., Guidelines for Iron Fortification of Cereal Foo Staples, Sharing United States Technology to Aid in the Improvement of Nutrition
- Prihananto (2004)., Fortifikasi Pangan Sebagai Upaya Penanggulangan Anemia Gizi Besi, IPB, Bogor

Pangastuti, Hestining., Triwibowo, Sitoresmi (1996)., Proses pembuatan kedelai, Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan , Depkes RI.

Talamond, P., Gallon, G., Guyot, J. P (1989)., Comparison of high- performance ion chromatography and absorptiometric methode for the determination of phytate acid in food sample, Analusi, 26 396-400 .

Thompson, D.B., Erdman J.W (1982)., Structural Model for ferric phytate: Implications for phytic acid analysis, American Association of Cereal Chemistry, 59 (6), 525-528

Whittaker P., Vandervee J. E (1990)., Effect of EDTA on bioavailability to rat of fortifications iron used in Egyption balady bread, Brintis journal of nutrition, 63, 587-595.

WHO and Agriculture Organization of the United Nations . 2006. Guidelines on food fortification with micronutrients

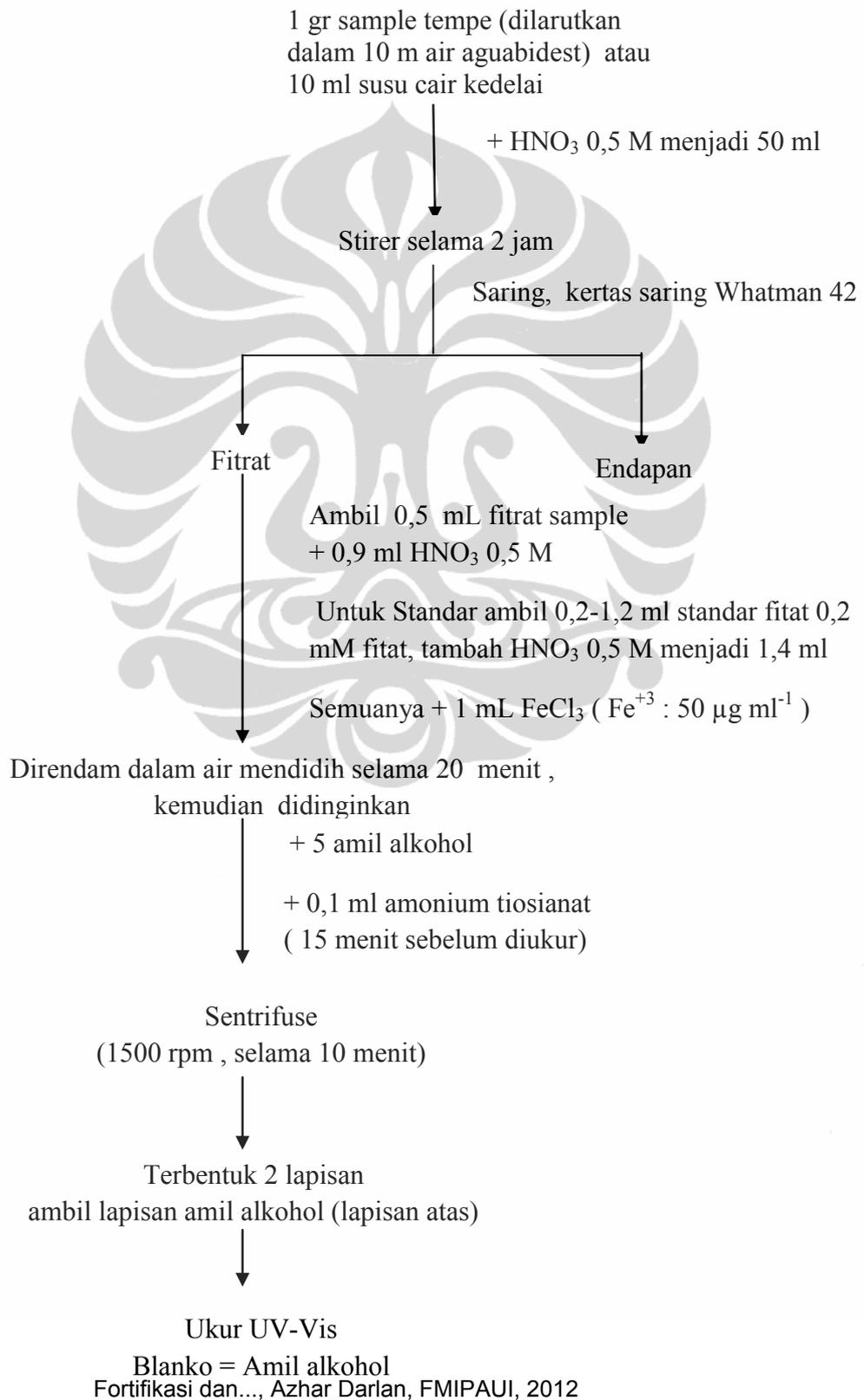
Yenrina, R. Yuliana dan D. Muchtadi (2006)., Pengolahan dan Penerimaan Produk Kedelai pada Rumah Tangga di Perkotaan dan Pedesaan Pulau Jawa Indonesia. Jurnal Gizi dan Pangan, Juli.



Lampiran 1

Metoda Absorsi Fitat

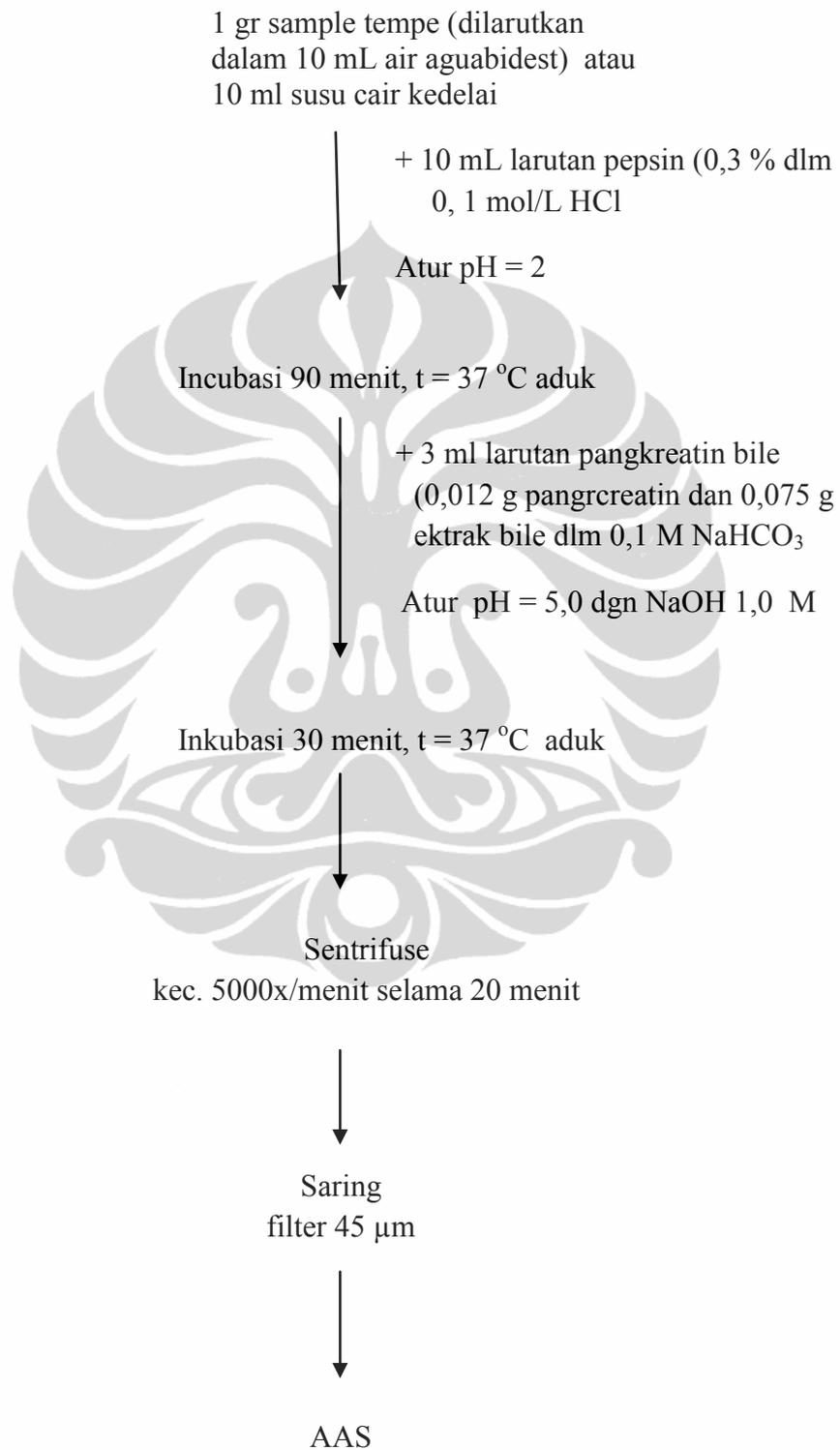
Davied dan Raid Modifkasi Talamond (Analisis,1998)



Lampiran 2

Metoda Svanberg

(Journal of Food Science volume 58, No. 2,1993)



Lampiran 3.

Data pembacaan AAS pada sampel

A. Susu Kedelai diambil di beberapa tempat (telah dikonversikan)

No	Susu cair kedelai	AAS (mg/L)
1	Masyarakat A	3,4122
2	Masyarakat B	4,9792
3	Masyarakat C	5,0834
4	Masyarakat D	4,5576
	Rata-rata	4,508

B. Kecap dari berbagai merek (telah dikonversikan)

No	Merek kecap	AAS (mg/L)
1	Kecap Sedap	32,5806
2	Nasional	27,4805
3	Indofood	30,0785
4	Pasti	130,5938
5	ABC	17,7480
6	Bango	14,4213
	Rata-rata	42,15

C. Tempe produksi masyarakat diambil beberapa tempat (telah dikonversi)

No	Produksi Masyarakat	AAS (mg/Kg)
1	Masyarakat A	59,245
2	Masyarakat B	53,7925
3	Masyarakat C	81,165
4	Masyarakat D	78,2068
5	Rata-rata	68,1

D. Susu bubuk (telah dikonversi)

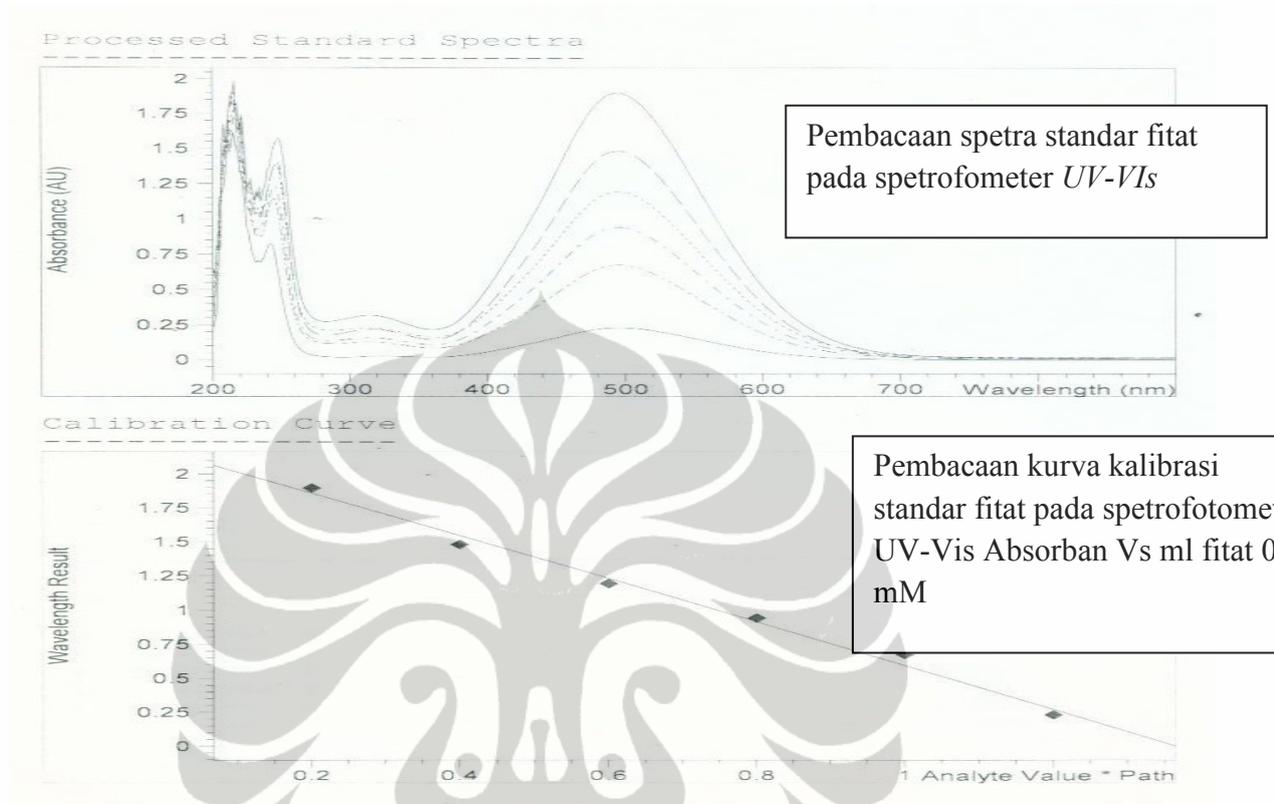
No	Susu Bubuk	AAS (mg/Kg)
1	Susu bubuk A	35,6870
2	Susu bubuk B	32,9130
	Rata-rata	34,3102

C. Kacang kedelai diambil di beberapa pasar tradisional/swalayan

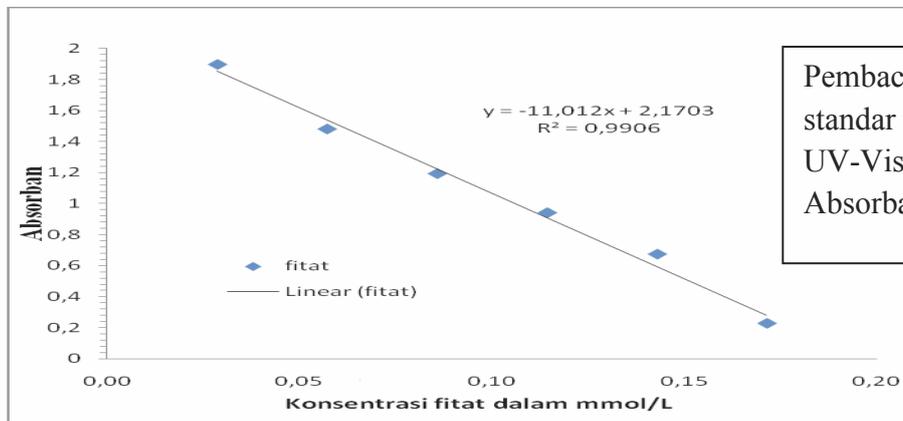
No	Susu cair kedelai	AAS (mg/kg)
1	Pasar A	87,0342
2	Pasar B	84,4323
3	Swalayan A	80,6573

Lampiran 4

Pembacaan Spetra *UV-Vis* dan Kurva Standar Fitat



volume NaFitat 0,02 mM (dalam ml)	Fitat (mmol/L)	absorban (A)
0,2	0,0286	1,8968
0,4	0,0571	1,4807
0,6	0,0857	1,193
0,8	0,1143	0,94147
1	0,1429	0,67446
1,2	0,1714	0,22832
Tempe kedelai	0,0571	1,5456
Susu kedelai	0,1459	0,41798



Lampiran 5

Data Pengukuran pH pada Susu Kedelai

A. $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ditambahkan (mg)	Fe ditambahkan (mg)	pH
0	0	6,66
17,17	3,45	6,66
34,34	6,89	6,38
68,68	13,79	6,18
137,8	27,59	6,14

B. $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ditambahkan (mg)	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ $2\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan (mg)	Fe ditambahkan (mg)	pH
0	0	0	6,66
17,17	10,39	3,45	6,00
34,34	20,78	6,89	6,68
68,68	41,56	13,79	5,14
137,8	83,12	27,59	4,48

B. NaFeEDTA

NaFeEDTA ditambahkan (mg)	Fe ditambahkan (mg)	pH
0	0	6,66
22,9	3,45	6,55
45,8	6,89	6,51
91,76	13,79	6,44
183,4	27,59	6,30