

## Bioavailabilitas Mineral Ca (*in vitro*) pada Jagung (*Zea mays L*), dengan Penambahan Asam Sitrat dan Fitase *Bacillus subtilis* HG

Yulia Ratri Kurniawati

### Corresponding author:

yulia.ratri.kurniawati-2017@pasca.unair.ac.id  
Sekolah Pascasarjana, Magister Pengembangan Sumber Daya Manusia, Universitas Airlangga

### DOI

<http://dx.doi.org/10.33474/jki.v10i1.10975>

### Histori Artikel

Received: 24-04-2021

Reviewed: 14-05-2021

Accepted: 25-05-2021

Published: 28-05-2021

### Keywords

bioavailabilitas mineral Ca;  
phytate acid; citric acid; phytase.

**Abstract. Background & Aims:** Mineral Ca is the most abundant mineral in the human body. Lack of mineral Ca in the human body in the long term will result in loss and calcification. Corn is food ingredient that contains vegetable calcium, it is widely consumed by Indonesians. The purpose of the research to obtain information on the bioavailability of the mineral Ca (*in vitro*) in corn (*Zea mays L*) with the addition of citric acid and phytase's *Bacillus subtilis* HG isolate.

**Methods:** The research consists of two steps. The first step is to determine the best treatment in reducing phytate acid in corn with variations of the submersion duration and the citric acid concentrate, with the variation of phytase enzyme concentrations. The second step is to determine the bioavailability of mineral Ca through *in vitro* proses. The data analysis used two way anova and one away anova.

**Results:** The results of the research: 1) the best treatment to reduce phytate acid in found in the immersion of corn with 9% citric acid for 12 hours in the amount of 32.45%, whereas in the variation of the concentration of phytase enzyme 250µL/50mL in the amount 50.09%. 2) The highest bioavailability of mineral Ca through *in vitro* is in amount of 56.880% with 9% citric acid for 12 hours and with the increment of phytase enzyme 250µL/50mL.

**Conclusion:** The increase in bioavailability of mineral Ca in corn (*Zea mays L*) was influenced by the addition of citric acid concentration, submersion duration, and the concentration of phytase enzyme. Research on mineral bioavailability can be further developed by examining other foodstuffs containing phytate acid, and carried out by more sophisticated methods and analyzed, and the methods that have been done can be used to study the degradation of phytate to other bivalent minerals.

Tubuh manusia memiliki banyak kandungan mineral kalsium yang 99% berada di dalam jaringan keras, terutama tulang dan gigi dalam bentuk hidroksiapatit [ $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ ]. Kalsium berperan penting dalam proses metabolisme tubuh, penghantar isyarat saraf, kontraksi otot, penggumpalan darah dan menjaga permeabilitas membrane sel (Almatsier, 2001). Tubuh manusia yang kekurangan kalsium dalam jangka panjang akan mengakibatkan pengerosan dan pengapuran pada tulang, serta kerusakan pada gigi.

Kandungan kalsium nabati pada makanan

dapat diperoleh dari sayuran daun hijau, kacang-kacangan, dan biji-bijian, salah satunya adalah jagung. Jagung merupakan sumber karbohidrat, dengan kandungan gizi utamanya adalah pati (72-73%), kadar gula sederhana (glukosa, fruktosa, dan sukrosa berkisar 1-3%), protein jagung (8-11%), jagung juga mengandung asam lemak, vitamin, dan mineral esensial seperti K, Na, P, Ca, Zn, dan Fe. Kandungan mineral Ca biji jagung berkisar antara 20.1-28.7 mg/100g (Suarni, 2001).

Tanaman jagung terutama di dalam bagian intinya sekitar 90% terdapat asam fitat dan

fitin (asam fitat dalam bentuk garam) yang merupakan penyimpanan fosfor (Sangadji, 2004). Pada kondisi alami, asam fitat mempunyai sifat sebagai *chelating agent*, yaitu memiliki kemampuan mengikat mineral bervalensi dua salah satunya adalah kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), selain itu asam fitat dapat membentuk ikatan baik dengan protein dan pati sehingga tidak dapat diserap oleh tubuh serta bioavailabilitasnya menurun. Asam fitat dianggap sebagai antinutrisi bahan pangan, sehingga diperlukan suatu usaha untuk menurunkan kadar asam fitat dalam jagung dengan harapan nilai cerna serta bioavailabilitas mineral dapat meningkat.

Metode untuk mendegradasi senyawa fitat dapat dilakukan dengan cara perendaman, diekstraksi dengan asam, serta penambahan enzim fitase. Perendaman merupakan salah satu cara yang sering digunakan untuk mendegradasi senyawa fitat. Menurut Greiner (2006), fitat merupakan senyawa larut air, maka penghilangan fitat secara signifikan dapat dilakukan dengan membuang air rendaman. Bila diperhatikan, semakin lama perendaman maka waktu yang tersedia untuk mendegradasi senyawa fitat semakin besar, sehingga kadar asam fitatnya semakin berkurang, selain itu semakin lama perendaman maka sebagian besar asam fitat juga dapat ikut larut dalam air rendaman.

Perendaman biasanya dilakukan selama semalam yaitu sekitar 12 jam (Sudarmadji, 1998). Menurut Hadisusilo (1996), perendaman maupun proses pembuatan tahu berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan kandungan asam fitat. Tahu yang diolah dengan perendaman 0,1,2,3,5,10 dan 15 jam mengalami penurunan kandungan asam fitat berturut-turut sebesar 64.0; 65.8; 67.8; 71.0; 72.2 dan 72.9 %. Berdasarkan uraian tersebut, dengan adanya penurunan kadar asam fitat dengan proses perendaman, penelitian ini dipilih waktu perendaman selama 4, 8, 12 jam dan tanpa perendaman sebagai kontrol agar dapat diketahui perubahan kadar asam fitat secara kontinu selama 12 jam pada jagung.

Ekstraksi asam fitat juga dapat dilakukan dengan cara melarutkan asam fitat. Ada beberapa jenis pelarut yang dapat digunakan, yaitu dengan beberapa pelarut asam organik, seperti asam sitrat, asam format, asam asetat, asam

laktat, asam oksalat, trikloroasetat atau dapat pula dilarutkan dengan asam anorganik, seperti asam nitrat (Hernaman, 2005). Asam sitrat dipilih sebagai pelarut asam fitat karena asam sitrat memiliki gugus karboksil ( $\text{COO}^-$ ) dan gugus hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) sehingga mampu mengkelat logam pada senyawa fitat (Ismangil, 2005). Asam sitrat dapat menurunkan pH dalam tanaman, sehingga asam sitrat dapat menjadi donor proton kemudian membuat senyawa fitat secara bertahap terdegradasi serta mencegah terbentuknya kompleks Ca-fitat yang tidak larut (Atapattu, 2005). Hasil penelitian Ekholm (2000), menunjukkan bahwa asam sitrat merupakan agen pengkelat logam Ca, Zn, Mg, dan Mn yang paling efisien. Semakin meningkat konsentrasi asam sitrat, maka semakin meningkat pula intensitas penyerangan proton terhadap ikatan mineral, sehingga jumlah proton yang mungkin dilepaskan juga semakin meningkat, sehingga logam yang dapat diikat ion sitrat semakin banyak (Ismangil, 2005). Asam sitrat juga dipilih karena merupakan asam organik lemah yang aman digunakan pada makanan dan kelebihan asam sitrat dapat dengan mudah dimetabolisme dan dihilangkan dari tubuh.

Boling (2000), menjelaskan bahwa penambahan 0, 1, 2, 3, 4, 6 % asam sitrat pada diet tepung *corn-soybean* berat badan dan abu tibia meningkat secara linier ( $p < 0.01$ ). Anak ayam yang memakan diet tepung yang dilengkapi dengan sitrat 6 % mengalami peningkatan 43 % di abu tibia (dari 26.9 % ke 38.6 %) dan peningkatan 22 % dalam kenaikan berat badan (dari 290 g ke 354 g) dibandingkan dengan anak ayam yang mengkonsumsi diet tepung tanpa sitrat. Mineral Zn juga meningkat secara signifikan ( $p < 0.05$ ) dari 151 $\mu\text{g}$  ke 220 $\mu\text{g}$ . Berdasarkan uraian tersebut, maka dalam penelitian ini digunakan rentang kadar asam sitrat antara 0-9 % yaitu 0, 3, 6, 9 % untuk mendapatkan kadar asam fitat yang lebih rendah dan peningkatan kadar mineral yang lebih tinggi pada jagung.

Boyce (2004), menyatakan bahwa meskipun asam fitat dapat dikurangi dengan berbagai cara, terdapat cara yang efektif untuk menurunkan kadar asam fitat yaitu dengan memanfaatkan enzim fitase yang dapat mendegradasi total asam fitat. Enzim fitase (mio-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase) merupakan suatu

fosfomonoesterase yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi orto fosfat anorganik dan ester-ester fosfat. Tumbuhan juga dapat menjadi sumber fitase, namun keberadaan fitase dalam tumbuhan tidak seimbang dengan kandungan fitatnya sehingga ada kemungkinan aktivitas enzim fitase dihambat oleh kandungan fitat yang tinggi (Widowati, 2001). Dalam mengatasi hal ini maka dibutuhkan enzim fitase eksogen yang diharapkan mampu meningkatkan daya serap usus terhadap mineral dan unsure nutrisi lainnya. Salah satu sumber enzim fitase dapat didapatkan dari *Bacillus subtilis*.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan *screening* bakteri yang berasal dari sisi barat gunung kapur Holiwood Gresik dan didapatkan bakteri penghasil fitase. Berdasarkan hasil pengamatan reaksi Gram, morfologi sel, uji biokimia dan analisa gen 16s-rRNA terhadap spesies bakteri penghasil fitase, dapat disimpulkan bahwa spesies bakteri tersebut adalah *Bacillus subtilis* Holiwood Gresik (selanjutnya disingkat dengan nama *Basillus subtilis HG*) dengan aktivitas tertinggi 0,277448 U/ml (Yuanita, 2007). Adapun pH optimum bagi enzim fitase yang berasal dari *Bacillus subtilis* adalah pH 6,2 dan suhu 37°C (Al Amin, 2009). Kondisi optimum sangat dibutuhkan bagi peningkatan aktifitas enzim fitase.

Menurut hipotesa Rice (2002), dengan kombinasi antara penambahan asam sitrat dan enzim fitase eksogen diharapkan akan mampu menurunkan pH saluran pencernaan serta menciptakan kondisi yang optimal bagi aktivitas enzim fitase sehingga degradasi senyawa fitat dapat berlangsung secara optimum. Boling (2000), menjelaskan bahwa asam sitrat mungkin dapat merubah pH *intestinal* yang lebih baik bagi aktivitas enzim fitase.

Asam fitat dapat membentuk ikatan yang stabil dengan kation divalen serta menurunkan bioavailabilitas mineral sehingga perlu dilakukan proses degradasi senyawa fitat. Bioavailabilitas mineral dalam makanan didefinisikan sebagai perbandingan mineral yang dapat diabsorpsi dan digunakan dalam tubuh. Kelarutan mineral, pH dari *intestinal* lumen, faktor diet, dan waktu absorpsi merupakan beberapa faktor yang mempengaruhi bioavailabilitas mineral (Liang, 2008). Bioavailabilitas mineral dapat

diukur secara *in-vivo* dan *in-vitro*. Pada metode *in-vitro* dikondisikan dengan kondisi fisiologis manusia. Sistem ini mensimulasikan kondisi *gastrointestinal* pada proses pencernaan, yaitu pH serta enzim yang bekerja pada fase *gastric* (lambung), dan fase *intestinal* (usus halus).

Berbagai penelitian telah dilakukan dalam usaha penurunan kadar fitat agar diperoleh bioavailabilitas mineral yang tinggi. Menurut Sandberg (2002), bioavailabilitas mineral dapat ditingkatkan dengan cara mendegradasi senyawa fitat. Efisiensi degradasi senyawa fitat ini dapat dilakukan dengan cara penambahan enzim fitase eksogen. Lieber (2004) juga menyimpulkan bahwa asam sitrat dapat membentuk kompleks dengan logam yang terikat dengan fitat serta mampu menciptakan kondisi yang optimal bagi aktivitas enzim fitase sehingga berpengaruh terhadap efisiensi enzim fitase dalam mendegradasi senyawa fitat didalam saluran pencernaan. Adapun menurut Puspita (2003) menyebutkan bahwa bioavailabilitas kalsium dapat diukur dengan metode *in-vitro* dengan teknik dialisis yang menggunakan kantong dialisis.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka akan dilakukan penelitian dengan judul "Bioavailabilitas Mineral Ca (*In Vitro*) Pada Jagung (*Zea Mays L*), Dengan Penambahan Asam Sitrat Dan Fitase *Bacillus Subtilis Hg*". Pada penelitian ini akan dilakukan degradasi asam fitat pada Jagung (*Zea mays L*) dengan variasi lama perendaman dan konsentrasi asam sitrat serta penambahan enzim fitase dari *Bacillus subtilis HG*. Perlakuan yang menghasilkan degradasi asam fitat terbaik selanjutnya akan diuji bioavailabilitas mineral Ca.

## METODE

Penelitian eksperimen (*true eksperiment*) dengan model rancangan penelitian faktorial dan *post test only control group design*. Sasaran penelitian ini adalah jagung varietas hibrida Pioneer P21. Teknik pengumpulan data diantaranya adalah kadar fitat pada jagung perlakuan dan bioavailabilitas mineral Ca. Untuk teknik analisis data dianalisis dengan analisis statistik.

### 1. Alat

Erlenmeyer, mikro pipet, kompor listrik,

pipet tetes, labu ukur, tabung sentrifugasi, sentrifugasi 8000 rpm, kuvet, spektrofotometri UV-VIS Shimadzu-1700, sentrifugasi ultra, magnetik stirrer, gelas kimia, pH meter, kertas indikator universal, pipet volume, cawan porselin, vial, shaker waterbath, kantong dialisis buatan Spectrum Laboratories, Inc yaitu (*spectra/por 1 dialysis sack, 1-40 ml*) 6000-8000 MWCO (*molecular weight cut of*), buret, sentrifugasi ultra.

## 2. Bahan

Butiran jagung,  $C_6H_8O_7$ , akuades, enzim fitase, Fe, HCl 6N, TCA 3 %,  $FeCl_3$ ,  $Na_2SO_4$ , NaOH 0.6 N, HCl 0.5 N, HCl 0.1 N,  $NH_2OH$  10 %,  $CH_3COONa$  2 M, O-phenanthroline, HCl 6 N, pepsin, pankreatin bile, KOH 0,5 N,  $NaHCO_3$ , protein presipitan, ammonium oksalat,  $NH_3$ ,  $CH_3COOH$ , akuades,  $H_2SO_4$ ,  $KMnO_4$  0,01 N.

## 3. Prosedur Penelitian

### a. Tahap Perlakuan Terbaik

Tahap I.1. 50 gram butiran jagung yang telah lolos ayakan 20 mesh dicuci bersih. Masing-masing jagung yang telah ditimbang dan dicuci bersih direndam dalam asam sitrat 0%, 3%, 6%, 9% selama 0, 4, 8, 12 jam sesuai dengan perlakuan. Tahap I.2. 50 gram jagung dengan perlakuan  $P_x$  (hasil tahap I.1) dilarutkan dengan akuades 50 ml. Masing-masing berat jagung yang telah dilarutkan, ditambahkan enzim fitase dengan konsentrasi ( $50\mu l/50ml$ ,  $100\mu l/50ml$ ,  $150\mu l/50ml$ ,  $200\mu l/50ml$ ,  $250\mu l/50ml$ ). Kemudian diuji kadar asam fitat jagungnya. Uji Kadar Asam Fitat dalam Jagung (Sudarmadji, 1998).

### b. Tahap Penentuan Bioavailabilitas Mineral Ca

Prosedur awal penentuan bioavailabilitas mineral Ca (Muchtadi, 1992). Sampel dengan kandungan proteinnya sekitar 2 gram. Ditambahkan air bebas ion hingga volumenya 75 ml. Sampel diatur hingga pH 2 dengan penambahan HCl 6 N. Aliquot diambil 20 gram dimasukkan ke dalam vial untuk penentuan persentase Ca terdialisa, diambil 20 gram lagi kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala untuk penentuan asam tertitrasi, dan diambil 5 gram dimasukkan ke dalam cawan untuk penentuan total Ca.

Ditambahkan 1 ml aliquot suspensi enzim pepsin ke dalam setiap vial dan gelas kimia, kemudian vial dan gelas kimia segera ditutup, selanjutnya diinkubasi selama 2 jam pada suhu  $37^\circ C$  dalam shaker. Persiapan kantong dialisis buatan Spectrum Laboratories, Inc yaitu (*spectra/por 1 dialysis sack, 1-40 ml*) 6000-8000 MWCO (*molecular weight cut of*). Sampel yang di gelas piala ditambahkan 5 ml pankreatin bile, selanjutnya dititrasi dengan KOH 0,5 N sampai pH 7.5. Kantong dialisis diisi dengan 20 ml  $NaHCO_3$  dengan konsentrasi yang diperoleh dari hasil titrasi dengan KOH sebelumnya (jumlah  $NaHCO_3$  sama dengan KOH yang digunakan untuk titrasi), kemudian kantong dialisis yang telah diisi larutan  $NaHCO_3$ . Sampel dalam vial yang telah diberi pepsin di shaker waterbath pada suhu  $37^\circ C$  diatur kecepatan shaker pada angka 5, kemudian kantong dialisis dimasukkan ke dalam vial kemudian vial ditutup dan diinkubasi selama 30 menit untuk dihidralkan proses pencernaan. Ditambahkan 5 ml pankreatin bile ke dalam setiap vial kemudian inkubasi dilanjutkan selama 2 jam. Untuk penentuan Ca terdialisis, diambil 25 ml larutan yang terdapat dalam vial, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama 30 menit. 2 ml supernatant diambil dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus, 2 ml dialisat juga diambil dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus yang lain, masing-masing ditambahkan 1 ml larutan protein presipitan, kemudian didiamkan semalam. Setelah didiamkan semalaman, larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 3400 rpm selama 10 menit.

### c. Penentuan bioavailabilitas mineral Ca

Gram sampel dimasukan ke dalam cawan pengabuan, kemudian diabukan selama 2 jam pada suhu  $600^\circ C$ . 20 ml larutan abu dimasukan ke dalam gelas piala 250 ml, ditambahkan 10 ml ammonium oksalat jenuh dan 2 tetes indikator metal merah. Larutan dibuat sedikit basa (pH 9) dengan penambahan  $NH_3$  encer (1:4) dan dibuat sedikit asam (pH 5) dengan penambahan  $CH_3COOH$  (1:4). Larutan dipanaskan, kemudian didiamkan semalam pada suhu kamar.

Larutan yang telah didiamkan semalam disaring dengan kertas saring Whatman no. 42 dan dibilas dengan akuades hingga filtrat bebas oksalat. Ujung kertas saring dilubangi dengan spatula, dibilas dan dipindahkan endapan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> encer (1:4) panas ke dalam gelas piala bekas tempat mengendapkan Ca, kemudian dibilas 1 kali dengan air panas, selagi panas dititrasi dengan KMnO<sub>4</sub> 0,01N hingga larutan berwarna merah jambu permanen yang pertama. Dimasukkan kertas saring pada larutan yang telah dititrasi, kemudian dititrasi kembali dengan KMnO<sub>4</sub> 0,01N hingga larutan berwarna merah jambu permanen yang kedua.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Tahap I (Tahap Penentuan Perlakuan Terbaik dalam Menentukan Perubahan Kadar Asam Fitat)

#### a. Tahap I.1

Dari analisis uji normalitas dan homogenitas, ternyata data kadar asam fitat (mg/g) diperoleh berdistribusi normal dan homogen yang ditunjukkan oleh nilai signifikan  $p > 0,05$ . Hasil uji Anova dua arah untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh variasi lama perendaman dan konsentrasi asam sitrat terhadap kadar asam fitat, serta uji lanjut LSD (*Least Significant Difference*) terdapat pada Tabel 1:

Tabel 1 Kadar Asam Fitat (mg/g) Jagung pada Variasi Lama Perendaman (jam) dan Konsentrasi Asam Sitrat (%)

Lama perendaman (jam)	Konsentrasi asam sitrat (%)				NILAI
	0	3	6	9	
0	40.405 <sup>a</sup>	34.948 <sup>b</sup>	31.988 <sup>c</sup>	30.101 <sup>d</sup>	F = 8.732 p = 0.000
4	39.576 <sup>e</sup>	34.259 <sup>f</sup>	31.121 <sup>g</sup>	31.672 <sup>h</sup>	
8	39.033 <sup>i</sup>	33.156 <sup>j</sup>	30.635 <sup>k</sup>	28.409 <sup>l</sup>	
12	27.992 <sup>m</sup>	32.815 <sup>n</sup>	30.139 <sup>o</sup>	27.292 <sup>p</sup>	
	F = 18.762 p = 0.000				F = 2.964 p = 0.011

Pada Tabel 1 didapatkan nilai  $p = 0.000$  ( $p \leq 0.05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh lama perendaman dan konsentrasi asam sitrat terhadap kadar fitat pada jagung. Dari uji lanjutan

LSD dapat dikemukakan bahwa antar perlakuan ada perbedaan signifikan yang ditunjukkan dengan huruf yang berbeda. Pada jagung perlakuan 0% 0 jam didapatkan kadar fitat sebesar 40.405 mg/g, selanjutnya dengan bertambahnya waktu perendaman dan bertambahnya konsentrasi asam sitrat maka kadar fitat juga semakin rendah dan didapatkan kadar asam fitat terendah pada perlakuan 9% 12 jam yaitu 27.292 mg/g. Pada perlakuan 9% 12 jam, kadar asam fitat dapat berkurang 13.113 mg/g atau 32.45% dari perlakuan 0% 0 jam.

Asam fitat bersifat larut dalam air serta beberapa jenis pelarut lain seperti larutan asam. Sifat inilah yang digunakan sebagai dasar untuk mengurangi dan menghilangkan asam fitat dalam pangan (Sangadji, 2004). Penambahan asam sitrat ke dalam air rendaman dimungkinkan menyediakan donor proton dan membuat fitat terprotonasi sebagian sehingga mencegah pembentukan kompleks fitat-mineral tak larut (Atapattu, 2005). Selain itu, asam sitrat memiliki gugus karboksil (COO<sup>-</sup>) dan gugus hidroksil (OH<sup>-</sup>) sehingga mampu mengkelat logam pada senyawa fitat (Ismangil, 2005). Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian Ekholm (2000), yang menunjukkan bahwa asam sitrat merupakan agen pengkelat logam Ca, Zn, Mg, dan Mn yang paling efisien. Semakin besar konsentrasi asam sitrat, maka semakin meningkat pula intensitas penyerapan proton terhadap ikatan mineral, sehingga jumlah proton yang mungkin dilepaskan juga semakin meningkat (Ismangil, 2005). Hal ini menyebabkan degradasi fitat menjadi lebih besar dan logam yang dapat diikat ion sitrat semakin banyak, akibatnya kadar fitat pada jagung semakin rendah. Berdasarkan hasil penelitian tahap I.1 dapat disimpulkan bahwa perlakuan 9% 12 jam yaitu perlakuan yang dapat mendegradasi fitat terbesar untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

#### b. Tahap I.2

Enzim fitase yang digunakan berupa ekstrak kasar enzim fitase hasil isolat *Bacillus subtilis* HG dengan aktivitas 0.277448 U/mL (Yuanita, 2007) diperoleh



Dari tahap ini diambil perlakuan perendaman jagung dalam asam sitrat 9 % selama 12 jam dan penambahan enzim fitase 250 µl untuk digunakan pada tahap II yaitu penentuan bioavailabilitas mineral Ca secara *in-vitro*.

### Tahap II (Tahap Penentuan Bioavailabilitas Mineral Ca secara *in-vitro*)

Perlakuan terhadap sampel pada tahap II sesuai hasil penelitian pada tahap sebelumnya yaitu perendaman jagung dalam asam sitrat 9 % selama 12 jam, perendaman jagung dalam asam sitrat 9 % selama 12 jam dan ditambah enzim fitase 250 µl/50 ml serta tanpa perendaman (0 % 0 jam) sebagai kontrol. Penentuan bioavailabilitas mineral Ca dilakukan secara *in-vitro*, dengan mensimulasikan kondisi *gastrointestinal* pada proses pencernaan, yaitu pH serta enzim yang bekerja pada fase *gastric* dalam lambung, dan fase *intestinal* dalam usus halus. Hal ini bertujuan untuk mengkondisikan keadaan pencernaan yang sebenarnya terjadi didalam tubuh.

Prinsip pengukuran bioavailabilitas mineral Ca secara *in-vitro* merupakan teknik dialisis dengan menggunakan kantong dialisis yang disimulasikan sebagai usus halus. Dialisis digunakan untuk memisahkan molekul-molekul kecil dari molekul-molekul besar. Metode pemisahan ini didasarkan atas sifat membran semipermeabel yang meloloskan molekul-molekul kecil akan tetapi menahan yang besar (Puspita, 2003). Pada penelitian ini digunakan kantong dialisis (*spectrapor 1 dialysis sack, 1-40 ml*) 6000-8000 MWCO (*moleculer weight cut off*) yang hanya dapat mendifusikan molekul dengan berat sekitar 6000-8000 Da melintasi membran sehingga kantong dialisis ini bersifat permeabel untuk mineral dengan berat molekul sekitar 6000-8000 Da.

Data bioavailabilitas Ca yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen yang ditunjukkan oleh nilai signifikan ( $p > 0.05$ ), maka dilanjutkan uji Anova satu arah untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh variasi lama perendaman dan konsentrasi asam sitrat dengan penambahan enzim fitase terhadap bioavailabilitas Ca. Hasil uji Anova satu arah terhadap bioavailabilitas mineral Ca pada jagung dapat

dilihat pada Tabel 3 :

Tabel 3 Bioavailabilitas Ca pada Jagung

Perlakuan	Bioavailabilitas	F, p
0% 0jam	39.818 <sup>a</sup>	F = 26.067 p = 0.001
9% 12jam	51.595 <sup>b</sup>	
9% 12jam + enzim fitase 250µl/50ml	56.880 <sup>c</sup>	

Berdasarkan tabel diatas, didapatkan bahwa nilai  $p = 0.001$ ; karena harga  $p$  kurang dari 0.05 maka dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh variasi lama perendaman dan konsentrasi asam sitrat dengan penambahan enzim fitase terhadap bioavailabilitas mineral Ca pada jagung. Hal ini diperkuat dengan hasil uji LSD yang menyatakan bahwa ada perlakuan perbedaan antar perlakuan secara signifikan yang ditunjukkan dengan huruf yang berbeda.

Tabel 3 menunjukkan bahwa bioavailabilitas mineral Ca terkecil terjadi pada perlakuan tanpa perendaman (0 % 0 jam) yaitu 39.818 % sedangkan bioavailabilitas mineral Ca terbesar terjadi pada perlakuan perendaman jagung dalam asam sitrat 9 % selama 12 jam dan ditambah enzim fitase 250 µl/ 50 ml yaitu 56.880 %.

Pada metode *in-vitro* ini sampel mengalami dua fase yang menyerupai keadaan didalam tubuh manusia, yaitu fase di dalam lambung dan fase di dalam usus. Pada fase keadaan di dalam lambung, sampel diatur pH-nya menjadi 2 dengan penambahan HCl 6N. Pada fase berikutnya adalah kondisi yang menyerupai pencernaan dalam usus, yaitu dengan penggunaan suspensi pepsin, kantong dialisis yang telah diisi larutan buffer  $\text{NaHCO}_3$  (mengkondisikan cairan dalam tubuh) dan penambahan pankreatin *bile*. Enzim pepsin dan pankreatin tersebut berperan dalam pemecahan protein sehingga kalsium dapat lepas dari bentuk ikatan kalsium-protein yang terdapat dalam jagung dan berdifusi ke dalam kantong dialisis. Kantong dialisis harus terendam penuh selama proses shaking supaya kalsium dalam jagung dapat berdifusi secara optimal ke dalam kantong dialisis.

Pada pH netral, asam fitat sangat aktif membentuk ikatan dengan kation seperti Ca, Zn, Fe, dan Mg untuk membentuk kompleks fitat-mineral. Bentuk kompleks ini resisten pada

proses absorpsi dalam saluran pencernaan dan berpengaruh terhadap bioavailabilitas mineral. Adanya kompleks fitat-mineral dapat menurunkan bioavailabilitas mineral Ca karena kompleks fitat yang terbentuk bersifat tidak larut. Dalam konsentrasi tinggi dapat menurunkan bioavailabilitas mineral dan protein (Sangadji, 2004). Setelah jagung direndam dengan asam sitrat, maka terjadi degradasi fitat yang memutus kompleks fitat-mineral, akibatnya bioavailabilitas mineral Ca dapat meningkat.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

- a. Ada pengaruh variasi lama perendaman dan konsentrasi asam sitrat terhadap kadar asam fitat pada jagung (*Zea mays L*). Perlakuan terbaik adalah perendaman jagung 9% 12 jam dihasilkan kadar asam fitat jagung terendah 27.292 mg/g dengan penurunan kadar asam fitat sebesar 32.45%.
- b. Ada pengaruh variasi konsentrasi enzim fitase dari *Bacillus subtilis* HG terhadap kadar asam fitat pada jagung (*Zea mays L*). Perlakuan terbaik adalah perlakuan jagung 9% 12 jam dengan penambahan enzim fitase 250 µl/50 ml dihasilkan kadar fitat jagung terendah 20.165 mg/g dengan penurunan kadar asam fitat sebesar 50.09%.
- c. Ada pengaruh kadar asam fitat terhadap bioavailabilitas mineral Ca. Bioavailabilitas Ca tertinggi sebesar 56.880% diperoleh pada perlakuan perendaman jagung dengan asam sitrat 9% selama 12 jam dengan penambahan enzim fitase 250 µl/50 ml.

### Saran

Perlu dilakukan penelitian mengenai bioavailabilitas mineral secara *in-vivo* dengan menggunakan hewan coba. Perlu adanya penelitian lain penentuan bioavailabilitas mineral Ca dengan metode yang lebih canggih misalnya dengan metode SSA atau spektrofotometri UV-Vis. Perlu adanya penelitian lain mengenai pengaruh degradasi fitat terhadap mineral bivalen lainnya seperti Mg, Mn, dan lain-lain. Adanya Fe dalam asam sitrat perlu diperhitungkan.

## DAFTAR RUJUKAN

- Atapattu, N.S.B.M. and C.J. Nelligaswatta. 2005. *Effects of Citric Acid on the Performance and the Utilization of Phosphorous and Crude Protein in Broiler Chickens Fed on Rice By-Products Based Diets. International Journal of Poultry Science 4 (12): 990-993.*
- Boling, S. D., D. M. Webel, I. Mavromichalis, C. M. Parsons and D. H. Baker. 2000. *The Effects of Citric Acid on Phytate-Phosphorus Utilization in Young Chicks and Pigs. J Amin Sci. 78: 682-689.*
- Boyce, A., Casey, A., Walsh, G. 2004. *A Phytase Enzyme Based Biochemistry Practical Particularly Suited to Student Undertaking Courses in Biotechnology and Environmental Science. Biochemistry and Molecular Biology Education. 32: 336-340.*
- Ekholm, Päivi, Liisa Virkki, Maija Ylinen, Liisa Johansson, and Pertti Varo. 2000. *Effects of Natural Chelating Agents on the Solubility of Some Physiologically Important Mineral Element in Oat Bran and Oat Flakes. Cereal Chem, 77(5): 562-566.*
- Greiner, Ralf and Ursula Kunietzny. 2006. *Phytase for Food Application. Journal of Food Technol and Biotechnol, 44(2): 125-140.*
- Hadisusilo, Susilowati, Siswati Setiasih dan Ismunaryo M. 1996. *Pengaruh Waktu Perendaman Kedelai (Glycine max. (L) Merrill) Pada Kandungan Asam Fitat Dalam Sampel Dari Setiap Tahap Proses Pembuatan Tahu. AKTA KIMIA Vol. 6, No. 1-2.*
- Ismangil dan Eko Hanudin. 2005. *Degradasi Mineral Batuan oleh Asam-Asam Organik. Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan Vol 5 (1): 1-17.*
- Liang, Jianfen, Ben-Zhong Han, M. J. Robert Nout, Robert J. Hamer. 2008. *Effect of Soaking, Germination and Fermentation on Phytic Acid, Total and in vitro Soluble Zinc in Brown Rice. Food Chemistry 110: 821-828.*
- Lieber, F and H.A. Sukria. 2004. *Citric Acid and Microbial Phytase Inclusion in The Diet to Improve Utilization Phytate Phosphorous and Growth of Broiler. Media Peternakan Vol. 27 NO. 1: 21-24.*

- Sandberg, Ann-Sophie. 2002. *Bioavailability of Mineral in Legumes. British Journal of Nutrition, Suppl 3, DOI: 10.1079/BJN/2002718: S281-S28*
- Yuanita, Leny. 2007. *Penentuan Spesies Mikroorganisme Tanah Penghasil Fitase. Jurnal Penelitian Matematika dan Sains. Vol 14, No. 2, ISSN 0852-0518.*
- Almatsier, S. 2001. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi.* Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Muchtadi, D., N. S. Palupi, dan M. Astawan. 1992. *Metode Kimia Biokimia dan Biologi dalam Evaluasi Nilai Gizi Pangan Olahan.* Bogor. IPB-PAU Pangan dan Gizi.
- Puspita, Indun Dewi. 2003. *Bioavailabilitas Kalsium Secara in-vitro pada Susu Bubuk yang Diberi Klaim High Calcium dengan Penambahan Serat dan Tanpa Penambahan Serat yang Beredar di Pasaran.* Bogor: IPB Press.
- Sudarmadji, Slamet, Bambang Haryono, Suhardi. 1998. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian.* Yogyakarta: Liberty.
- Al Amin, M. Farid. 2009. *Penentuan pH dan Suhu Optimum, Stabilitas pH dan Stabilitas Termal Enzim Fitase dari Isolat Bakteri Bacillus Subtilis Holiwood Gresik.* Skripsi tidak dipublikasikan. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
- Hernaman, Iman, Toto Toharmat, Wasmen Manalu, Putut Irwan Pudjiono. 2005. *Efektifitas Asam Asetat Dalam Ekstraksi Asam Fitat Pollard.* Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. (Diakses 25 September 2019)
- Rice, J. P., R. S. Pleasant, and J. S. Radcliffe. 2002. *The Effect of Citric Acid, Phytase, and Their Interaction on Gastric pH, and Ca, P, and Dry Matter Digestibilities.* Swine Reseach Report Department of Animal Sciences. (Diakses 17 Juni 2020)
- Sangadji, Insun. 2004. *Enzim Fitase dan Peranannya dalam Memecah Ikatan Asam Fitat pada Pakan.* Makalah Pengantar Falsafah Sains, Program Pasca Sarjana ITB. (Diakses 25 September 2019)
- Suarni dan S. Widowati. 2001. *Struktur, Komposisi, dan Nutrisi Jagung.* Balai Penelitian Tanaman Serealia, Maros. (Diakses 3 Januari 2020)
- Widowati, Sri, D. Andriani, E.I Riyanti, P. Raharto, dan L. Sukarno. 2001. *Karakterisasi Fitase dari Bacillus Coagulans.* Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor. (Diakses 25 September 2019)