

@Hak cipta milik IPB University

LAMPIRAN

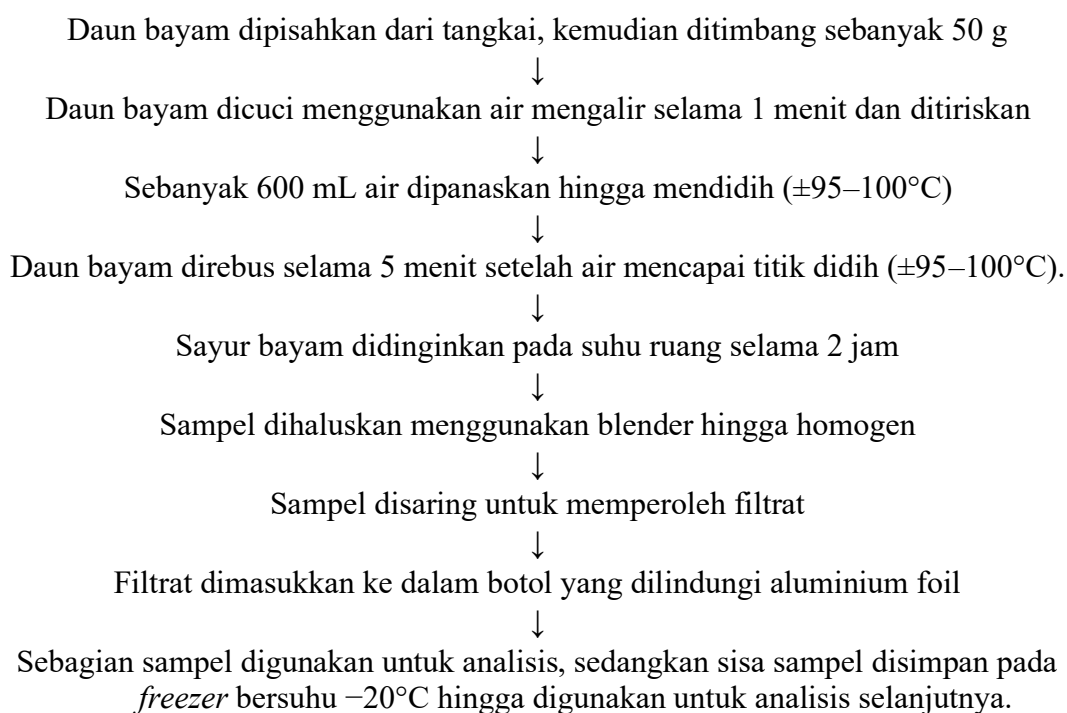
- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 1 Pembuatan Sayur Bayam Berkuah

Pengolahan sayur bayam berkuah dilakukan menggunakan tiga perlakuan, yaitu bayam rebus tanpa bumbu (P0), sayur bening bayam dengan penambahan tomat dan rimpang kunci (P1), serta sayur bobor bayam dengan penambahan santan, kencur, ketumbar, dan daun salam (P2). Seluruh perlakuan menggunakan bahan baku dan kondisi pemasakan yang sama, kecuali perbedaan formulasi sesuai perlakuan. Setelah proses pengolahan selesai, sampel didiamkan selama 3 jam, kemudian dihomogenkan dan dipreparasi untuk analisis laboratorium.

1. Sayur Bayam Rebus (P0)

Perlakuan P0 merupakan kontrol berupa bayam rebus tanpa penambahan bumbu. Pengolahan dilakukan dengan metode perebusan menggunakan kondisi pemasakan yang terstandar, kemudian sampel dipreparasi hingga diperoleh filtrat homogen sebagai bahan analisis laboratorium. Tahapan yang dilakukan untuk membuat sayur bayam rebus:



2. Sayur Bening Bayam (P1)

Perlakuan P1 merupakan sayur bening bayam dengan penambahan tomat dan rimpang kunci. Pengolahan dilakukan menggunakan metode perebusan dengan kondisi pemasakan yang terstandar. Setelah proses pengolahan selesai, sampel dipreparasi hingga diperoleh filtrat homogen sebagai bahan analisis laboratorium. Tahapan yang dilakukan untuk membuat sayur bening bayam:

Daun bayam dipisahkan dari tangkai, kemudian ditimbang sebanyak 50 g



Daun bayam dicuci menggunakan air mengalir selama 1 menit dan ditiriskan



Bawang merah 5 g, bawang putih 3 g, 25 g tomat, dan rimpang kunci 5 g disiapkan sesuai komposisi perlakuan



Sebanyak 600 mL air dipanaskan hingga mendidih ($\pm 95-100^{\circ}\text{C}$)



Bawang merah, bawang putih, dan rimpang kunci dimasukkan ke dalam air mendidih



Daun bayam dimasukkan, kemudian tomat ditambahkan sesuai perlakuan



Sayur bening bayam dimasak selama 5 menit



Sampel didinginkan pada suhu ruang selama 3 jam



Rimpang kunci dipisahkan dari sampel



Sampel dihaluskan menggunakan blender hingga homogen



Sampel disaring untuk memperoleh filtrat



Filtrat dimasukkan ke dalam botol yang dilindungi aluminium foil



Sebagian sampel digunakan untuk analisis, sedangkan sisa sampel disimpan pada *freezer* bersuhu -20°C hingga digunakan untuk analisis selanjutnya.

3. Sayur Bobor Bayam (P2)

Perlakuan P2 merupakan sayur bobor bayam dengan penambahan santan, kencur, ketumbar, dan daun salam. Pengolahan dilakukan menggunakan metode perebusan dengan kondisi pemasakan yang terstandar. Setelah proses pengolahan selesai, sampel dipreparasi hingga diperoleh filtrat homogen sebagai bahan analisis laboratorium. Tahapan yang dilakukan untuk membuat sayur bobor bayam:

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Daun bayam dipisahkan dari tangkai, kemudian ditimbang sebanyak 50 g



Daun bayam dicuci menggunakan air mengalir selama 1 menit dan ditiriskan



Bawang merah, bawang putih, kencur, ketumbar, daun salam, dan santan disiapkan sesuai komposisi perlakuan



Sebanyak 535 mL air dan 65 mL santan dipanaskan hingga mendidih ($\pm 95-100^{\circ}\text{C}$) sambil diaduk



Bawang merah, bawang putih, kencur, ketumbar, dan daun salam dimasukkan ke dalam kuah santan



Daun bayam dimasukkan ke dalam panci



Sayur bobor bayam dimasak selama 5 menit



Sampel didinginkan pada suhu ruang selama 3 jam



Daun salam dipisahkan dari sampel



Sampel dihaluskan menggunakan blender hingga homogen



Sampel disaring untuk memperoleh filtrat



Filtrat dimasukkan ke dalam botol yang dilindungi aluminium foil



Sebagian sampel digunakan untuk analisis, sedangkan sisa sampel disimpan pada *freezer* bersuhu -20°C hingga digunakan untuk analisis selanjutnya.

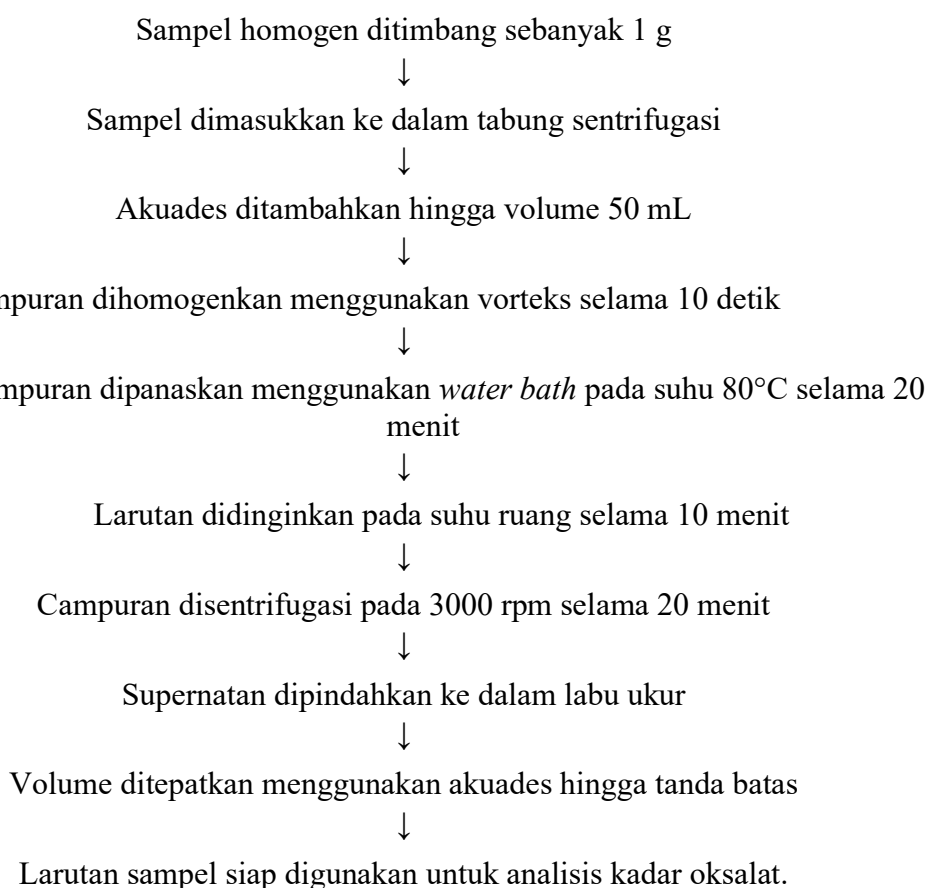
Lampiran 2 Prosedur Penentuan Kadar Oksalat Larut Air

1. Analisis Kadar Oksalat Larut Air (Savage *et al.* 2000)

Analisis kadar oksalat larut air dilakukan menggunakan metode spektrofotometri kinetik multimode mengacu pada Savage *et al.* (2000). Metode ini didasarkan pada pembentukan senyawa triiodida (I_3^-) melalui reaksi oksidasi katalitik, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 352 nm. Konsentrasi oksalat ditentukan berdasarkan kurva kalibrasi larutan standar oksalat.

a. Pembuatan Larutan Sampel

Larutan sampel disiapkan untuk mengekstraksi oksalat larut air dari sampel sayur bayam sebelum dilakukan analisis menggunakan metode spektrofotometri kinetik. Ekstraksi dilakukan dengan pemanasan dan sentrifugasi sehingga diperoleh supernatan yang siap digunakan sebagai larutan sampel. Tahapan yang dilakukan untuk pembuatan larutan sampel:



b. Pembuatan Buffer Asetat pH 5 (Vogel 1989)

Larutan buffer asetat pH 5 digunakan untuk mempertahankan kondisi pH optimum selama reaksi analisis oksalat berlangsung. Pembuatan buffer dilakukan mengacu pada Vogel (1989). Tahapan yang dilakukan untuk pembuatan buffer asetat pH 5:

Sebanyak 3,65 mL CH_3COOH 1 M dipipet ke dalam gelas ukur
 ↓
 Sebanyak 6,35 mL CH_3COONa 1 M ditambahkan
 ↓
 Campuran diencerkan menggunakan akuades hingga volume 100 mL
 ↓
 Larutan dihomogenkan
 ↓
 Nilai pH diukur menggunakan pH meter
 ↓
 pH disesuaikan hingga mencapai pH 5 menggunakan CH_3COOH 1 M atau CH_3COONa 1 M
 ↓
 Larutan buffer disimpan dalam botol tertutup dan diberi label.

c. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat menggunakan larutan standar oksalat untuk memperoleh persamaan regresi linear yang digunakan dalam penentuan kadar oksalat larut air pada sampel. Tahapan yang dilakukan untuk pembuatan kurva kalibrasi:

Larutan standar oksalat 100 $\mu\text{g/mL}$ dipipet ke dalam labu ukur 10 mL masing-masing sebanyak 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 mL
 ↓
 Larutan Fe(II) 7 $\mu\text{g/mL}$, KI 0,12 mol/L, dan KBrO_3 0,1 mol/L ditambahkan
 ↓
 Volume ditepatkan menggunakan akuabidest hingga 10 mL
 ↓
 Larutan dihomogenkan menggunakan vortex
 ↓
 Absorbansi diukur pada panjang gelombang 352 nm pada menit ke-0,5 dan menit ke-4
 ↓
 Nilai ΔA dihitung ($\Delta A = A_4 - A_{0,5}$)

Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot nilai ΔA sebagai sumbu y terhadap konsentrasi standar oksalat sebagai sumbu x sehingga diperoleh persamaan regresi linear:

$$y = mx + b$$

Keterangan:

y = nilai ΔA ($A_4 - A_{0,5}$)

m = slope kurva kalibrasi

x = konsentrasi oksalat larut air ($\mu\text{g/mL}$)

b = intersep kurva kalibrasi

d. Analisis dan Perhitungan Kadar Oksalat Larut Air Sampel

Analisis kadar oksalat larut air dilakukan menggunakan metode spektrofotometri kinetik dengan membandingkan nilai absorbansi sampel terhadap kurva kalibrasi larutan standar.

Larutan sampel dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL



Buffer asetat pH 5, Fe(II) 7 $\mu\text{g/mL}$, KI 0,12 mol/L, dan KBrO₃ 0,1 mol/L ditambahkan



Volume ditepatkan menggunakan akuabidest hingga 10 mL



Larutan dihomogenkan menggunakan vortex



Absorbansi diukur pada panjang gelombang 352 nm pada menit ke-0,5 dan menit ke-4



Nilai ΔA dihitung ($\Delta A = A_4 - A_{0,5}$)

Perhitungan kadar oksalat sampel dibuat dengan memplot nilai ΔA sebagai sumbu y terhadap konsentrasi standar oksalat sebagai sumbu x sehingga diperoleh persamaan regresi linear:

$$y = mx + b$$

Keterangan:

y = nilai sampel sayur bayam ΔA ($A_4 - A_{0,5}$)

m = kemiringan (*slope*) kurva kalibrasi

x = konsentrasi oksalat larut air ($\mu\text{g/mL}$)

b = intersep kurva kalibrasi

Lampiran 3 Prosedur analisis kandungan gizi, bioaksesibilitas mineral, dan daya cerna zat besi

1. Analisis Kadar Air Metode Oven Gravimetri (SNI 01-2891-1992)

Penentuan kadar air melalui metode ini didasarkan pada selisih bobot sampel sebelum dan sesudah proses pemanasan, di mana penurunan berat tersebut merepresentasikan jumlah air yang menguap.

Cawan aluminium dipanaskan dalam oven dengan suhu 105°C selama 60 menit



Cawan didinginkan di dalam desikator selama 30 menit

Berat cawan ditimbang (W₀) bobot kosongnya.



Sampel sebanyak 10 gram ke dalam cawan kemudian ditimbang (W₁)



Sampel diuapkan di atas kompor listrik hingga tidak muncul asap berubah bentuk menjadi pasta homogen



Cawan beserta sampel dipanaskan dalam oven dengan suhu 105°C selama 3-5 jam hingga didapatkan berat yang konstan.



Cawan didinginkan dalam desikator selama 30 menit



berat cawan ditimbang (W₂)

Kadar air dihitung dengan persamaan :

$$\% \text{ kadar air (bb)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

$$\% \text{ kadar air (bk)} = \frac{W_1 - W_2}{W_2 - W_0} \times 100$$

Keterangan :

W₀ = berat cawan kosong (g)

W₁ = berat cawan dan sampel sebelum pemanasan (g)

W₂ = berat cawan dan sampel setelah pemanasan (g)

2. Analisis Kadar Abu Metode Gravimetri (SNI 01-2891-1992)

Prinsip analisis kadar abu metode gravimetri didasarkan pada proses pengabuan sampel pada suhu tinggi sehingga seluruh komponen organik terurai menjadi air (H₂O) dan karbon dioksida (CO₂), sedangkan komponen anorganik tidak terurai dan tertinggal sebagai residu (abu). Residu tersebut kemudian

ditimbang hingga diperoleh bobot konstan untuk menentukan kadar abu dalam sampel. Langkah-langkah analisis kadar abu metode Gravimetri.

Cawan porselen berlabel di dalam tanur pada suhu 550 °C selama 1 jam



Cawan didinginkan di dalam desikator selama 60 menit



Cawan ditimbang untuk mengetahui berat cawan kosongnya (W1)



5 g sampel dimasukkan ke dalam cawan kemudian ditimbang (Ws)



Sampel dalam cawan diuapkan di atas kompor listrik hingga tidak muncul asap berubah bentuk menjadi pasta homogen



Cawan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam tanur dan dipanaskan pada suhu tinggi 550°C selama 5–8 jam atau hingga diperoleh residu berupa abu berwarna putih



Setelah proses insinerasi selesai, suhu tanur diturunkan terlebih dahulu dengan cara membuka pintunya secara perlahan hingga mencapai suhu aman sekitar 200°C



Cawan porselen berisi abu kemudian dipindahkan dan didinginkan kembali di dalam desikator selama 60 menit untuk menstabilkan massanya



berat cawan ditimbang (W2)

Perhitungan kadar abu sampel:

$$\% \text{ Kadar abu (bb)} = \frac{W2-W1}{Ws} \times 100$$

$$\% \text{ Kadar abu (bk)} = \frac{\text{kadar abu (bb)}}{100-\text{kadar air (bb)}} \times 100$$

Keterangan :

Ws = berat sampel awal sebelum pengabuan (g)

W1 = berat cawan kosong (g)

W2 = berat sampel dan cawan setelah pengabuan (g)

3. Analisis Kadar Protein Metode *Kjeldahl* (AOAC 955.04)

Metode *Kjeldahl* didasarkan pada pelepasan nitrogen melalui destruksi sampel secara asam, diikuti dengan pengukuran nitrogen dikalikan dengan faktor konversi untuk mengetahui jumlah protein. Destruksi dilakukan dengan *digestor*.

Sampel ditimbang sebanyak 0,25 g dimasukkan ke dalam labu kjeldahl
100 mL



1 g katalis (selenium mix) dan 25 mL asam sulfat 98% ditambahkan ke dalam
labu destruksi



larutan didestruksi dalam penangas selama 1 jam hingga jernih



larutan hasil destruksi didinginkan pada suhu ruang



20 mL air destilasi dan NaOH 40% ditambahkan ke dalam larutan, kemudian
larutan didestilasi



hasil destilasi (destilat) ditampung dalam 25 mL asam borat 4% dan 2 tetes
indikator BCG-MM hingga berwarna kehijauan



destilat dititrasi dengan HCl 0,1 N hingga berubah warna menjadi merah muda

Tahapan *recovery* dilakukan untuk memeriksa akurasi prosedur dan alat. (NH₄)₂SO₄ sebanyak 0,15 g ditambah 75 mL air dan dilakukan prosedur sama seperti sampel. Hasil *recovery* seharusnya 90-107%.

$$\%Recovery = \frac{N \text{ HCl terukur}}{N \text{ HCl sebenarnya}} \times 100$$

Hasil standarisasi HCl menghasilkan nilai *recovery* sebesar 109%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi titran mendekati nilai teoritis, meskipun sedikit lebih tinggi dibandingkan kisaran *recovery* yang direkomendasikan AOAC International (2012) untuk validasi metode kuantitatif. Kadar protein dalam sampel akan dihitung dari kadar nitrogen yang diperoleh dari hasil analisis. Kadar nitrogen dalam sampel dihitung menggunakan persamaan:

$$\%N = \frac{(V_s - V_b) \times N \text{ HCl} \times fp \times 14,01}{\text{berat sampel (mg)}} \times 100$$

$$\text{Kadar protein} = \text{kadar nitrogen (\%)} \times F$$

Keterangan:

V_s : Volume (mL) HCl yang digunakan untuk menitrasi

V_b : Volume blanko

fp : Faktor pengencer

F : Faktor konversi (6,25)

4. Analisis Kadar Lemak Metode Soxhlet (AOAC 920.85)

Analisis kadar lemak dilakukan dengan metode Soxhlet berdasarkan prinsip ekstraksi lemak menggunakan pelarut heksana. Lemak yang terekstraksi dipisahkan melalui penguapan pelarut, kemudian residu lemak ditimbang secara gravimetri untuk menentukan kadar lemak dalam sampel.

Cawan lemak dipanaskan dalam oven dengan suhu 105°C selama 1 jam
↓
cawan lemak didinginkan dalam desikator selama 30 menit
↓
berat cawan lemak ditimbang (W0)
↓
timbang 1 g sampel pada kertas timbang, dan dilipat
↓
kertas timbang dimasukkan ke dalam selongsong, ditambahkan kapas hingga menutupi sampel, dan dipasang cincin besi diatas selongsong
↓
cawan lemak diisi dengan pelarut heksana sebanyak 40 mL
↓
selongsong dimasukkan ke dalam alat Soxtech selama 70 menit dan dibiarkan melalui proses *boiling*, *rinsing*, dan *recovery*
↓
keran air dibuka dan ditunggu hingga suhu mencapai 130 °C. Sampel memasuki proses *boiling* (posisi sampel terendam dalam heksana) selama 20 menit, kemudian dilanjutkan dengan *rinsing* yaitu sampel dinaikan hingga tidak terendam heksana selama 40 menit
↓
ekstrak lemak dalam cawan lemak dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C selama 1 jam
↓
cawan lemak didinginkan dalam desikator selama 30 menit
↓
cawan lemak ditimbang dan dicatat hasilnya (W1)
Kadar lemak dalam sampel dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{Kadar lemak (bb)} = \frac{W_1 - W_0}{W_1} \times 100$$

$$\% \text{Kadar lemak (bk)} = \frac{\text{kadar lemak (bb)}}{100 - \text{kadar air (bb)}} \times 100$$

Keterangan:

W0 = berat labu kosong (g)

W1 = berat labu lemak setelah analisis (g)

5. Analisis Kadar Karbohidrat (*By Difference*)

Kandungan karbohidrat dilakukan menggunakan metode menghitung selisih antara angka 100% total komponen gizi dengan persentase kadar air, abu, protein, serta lemak sampel. Estimasi nilai tersebut secara kuantitatif dapat diperoleh melalui persamaan matematis berikut:

$$\text{Kadar karbohidrat (\%)} = 100\% - (\% \text{Air} + \% \text{Abu} + \% \text{Lemak} + \% \text{Protein})$$

6. Analisis Kadar Vitamin C Metode Sudjarwo (2017)

Prinsip analisis kadar vitamin C metode Sudjarwo (2017) didasarkan pada reaksi asam askorbat dengan ammonium molibdat dalam suasana asam sehingga membentuk kompleks berwarna. Intensitas absorbansi kompleks yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum berbanding lurus dengan konsentrasi vitamin C dalam sampel. Berikut merupakan langkah analisis kadar vitamin C.

A. Pembuatan Pereaksi

a). Ammonium Molibdat 5% (150 mL)

Ammonium molibdat ditimbang sebanyak 7,5 g



Dimasukkan ke dalam labu ukur 150 mL



Akuades ditambahkan hingga tanda tera



Larutan dihomogenkan

b). Asam Sulfat 5% (150 mL)

Asam sulfat pekat dipipet sebanyak 7,89 mL



Dimasukkan ke dalam labu ukur 150 mL



Akuades ditambahkan hingga tanda tera



Larutan dihomogenkan

c). Asam Oksalat 0.4% (150 mL)

Asam oksalat ditimbang sebanyak 0,6 g



Dimasukkan ke dalam labu ukur 150 mL



Akuades ditambahkan hingga tanda tera



Larutan dihomogenkan

B. Pembuatan Larutan Baku Vitamin C 1000 ppm

Larutan baku vitamin C dibuat dari asam askorbat standar dengan konsentrasi tertentu sebagai larutan induk yang digunakan untuk penyusunan kurva kalibrasi.

Asam askorbat baku ditimbang sebanyak 25 mg



Dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL



Asam oksalat 0,4% ditambahkan hingga tanda tera



Larutan dihomogenkan

C. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum ditentukan untuk memperoleh panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi dari kompleks vitamin C ammonium molibdat sehingga pengukuran dilakukan pada kondisi yang paling sensitif.

Larutan baku vitamin C 1000 ppm dipipet sebanyak 0,8 mL ke dalam labu ukur 10 mL



Larutan asam sulfat 5% sebanyak 4 mL ditambahkan



Larutan ammonium molibdat 5% ditambahkan hingga tanda tera



Larutan dihomogenkan



Larutan diinkubasi selama 30 menit



Absorbansi diukur menggunakan BioTek Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Denmark) pada rentang 530–590 nm



Panjang gelombang maksimum ditentukan

D. Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar dibuat dari deret larutan baku vitamin C dengan konsentrasi bertingkat. Hubungan antara konsentrasi dan absorbansi digunakan untuk memperoleh persamaan regresi linear sebagai dasar penentuan kadar vitamin C sampel.

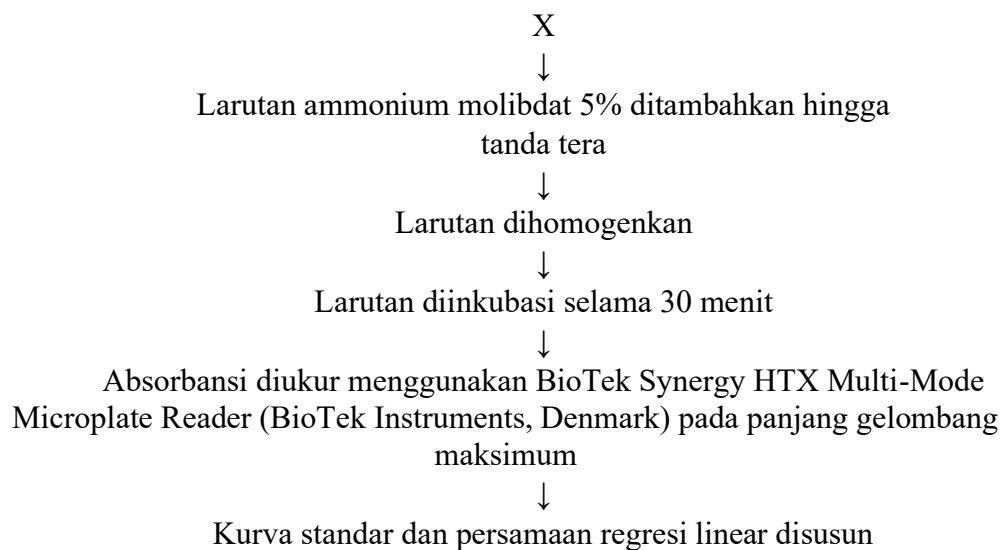
Larutan baku vitamin C 1000 ppm dipipet sebanyak 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; dan 0,8 mL ke dalam labu ukur 10 mL



Larutan asam sulfat 5% sebanyak 4 mL ditambahkan

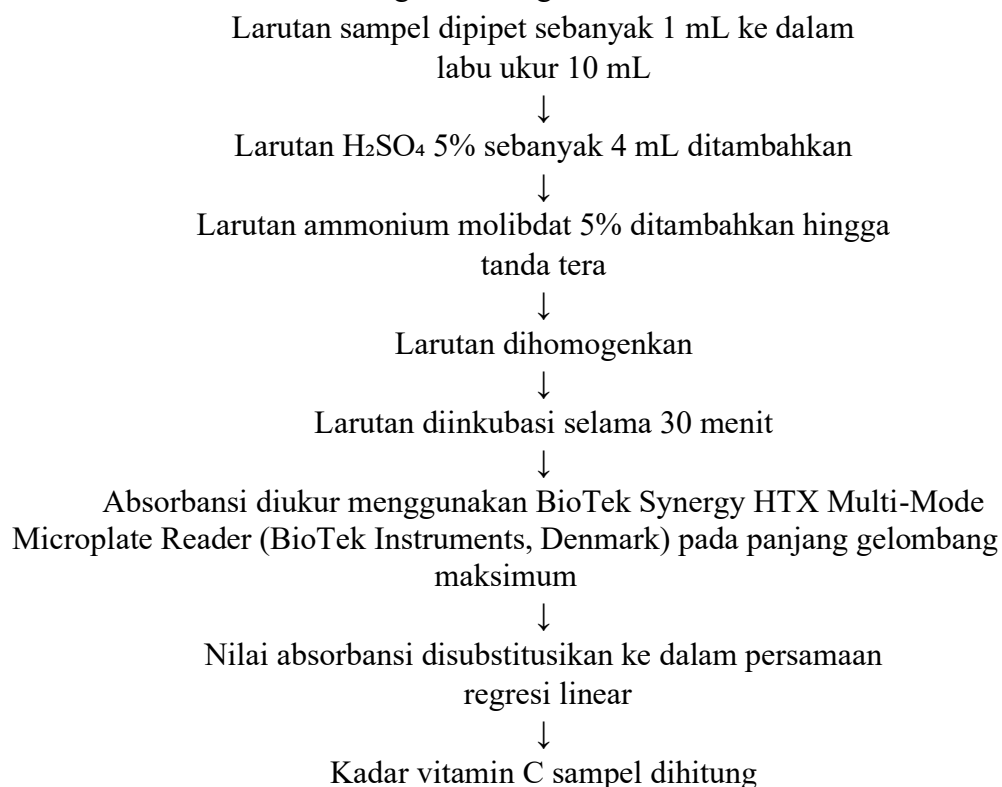


X



E. Pengukuran Kadar Vitamin C

Vitamin C dalam sampel bereaksi dengan ammonium molibdat dalam suasana asam membentuk kompleks berwarna. Intensitas warna yang terbentuk diukur secara spektrofotometri UV-Vis dan berbanding lurus dengan konsentrasi vitamin C dalam sampel. Berdasarkan prinsip bahwa kadar vitamin C berbanding lurus dengan absorbansi.



Rumus regresi linear:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

- y = Nilai absorbansi sampel yang terbaca alat
- x = Konsentrasi/Kadar vitamin C yang dicari
- a = Gradien atau kemiringan garis
- b = Konstanta atau intersep

7. Analisis Kadar Zat Besi (Fe) (ASEANFOODS 2011)

Analisis kadar zat besi (Fe) dilakukan menggunakan metode *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS) mengacu pada ASEANFOODS (2011). Metode ini didasarkan pada proses destruksi basah untuk menguraikan matriks organik sehingga unsur Fe berada dalam bentuk ion bebas. Konsentrasi Fe selanjutnya ditentukan berdasarkan absorbansi atom Fe yang menyerap radiasi pada panjang gelombang spesifik 248,3 nm menggunakan Atomic Absorption Spectrophotometer (Shimadzu AA-6300, Jepang). Besarnya absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi Fe dalam sampel dan dihitung berdasarkan kurva kalibrasi larutan standar.

a) Persiapan alat

Seluruh peralatan gelas dibersihkan menggunakan larutan asam nitrat untuk menghilangkan kemungkinan kontaminasi logam, sedangkan sampel dihomogenkan agar distribusi mineral merata sebelum dianalisis.

Peralatan gelas direndam dalam HNO₃ 20%



Peralatan dibilas menggunakan air bebas ion sebanyak 4 kali



Peralatan didiamkan selama 24 jam



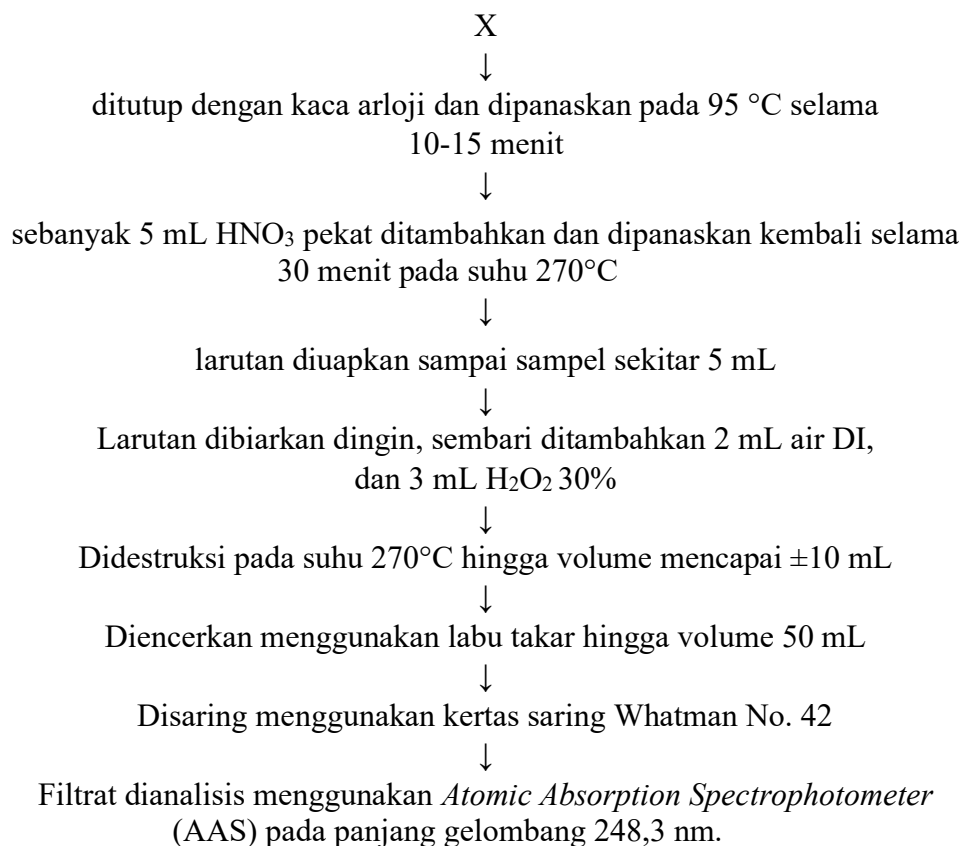
Peralatan siap digunakan untuk analisis

b) Pengabuan Basah Menggunakan HNO₃ dan H₂O₂

Matriks organik sampel diuraikan menggunakan campuran asam kuat dan hidrogen peroksida sehingga unsur Fe terbebas dalam bentuk larutan yang siap dianalisis menggunakan AAS.

10 g sampel dituang ke gelas piala, sembari ditambahkan dengan 10 mL HNO₃ 50%





Nilai absorbansi larutan yang diperoleh dapat digunakan untuk menghitung kadar zat besi dalam sampel, kadar zat besi sampel diperoleh melalui persamaan berikut:

$$\text{Mineral (mg/kg)} = \frac{(a-b) \times V}{m}$$

Keterangan:

- a : Konsentrasi pada larutan sampel (mg/L)
b : Rata-rata konsentrasi pada blanko (mg/L)
V : Volume larutan sampel (mL)
m : Massa sampel (g)

8. Pembuatan Larutan Bioaksesibilitas Metode INFONGEST 2.0

A. Persiapan Larutan SSF, SGF, dan SIF

Larutan simulasi pencernaan disiapkan sesuai protokol INFOGEST 2.0 sebagai media yang menyerupai cairan fisiologis pada saluran pencernaan manusia. Pembuatan larutan diawali dengan menyiapkan Simulated Salivary Fluid (SSF), kemudian dilanjutkan dengan Simulated Gastric Fluid (SGF) dan Simulated Intestinal Fluid (SIF). Masing-masing larutan disusun dari campuran elektrolit, penyesuaian pH, dan penambahan ion kalsium sesuai komposisi yang direkomendasikan.

a) Pembuatan Larutan *Simulated Salivary Fluid* (SSF)

Larutan SSF sebanyak 500 mL dibuat dengan melarutkan KCl, KH_2PO_4 , $(\text{NaH}_4)_2\text{CO}_3$, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, HCl, dan $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ sesuai komposisi dalam protokol INFOGEST 2.0



Seluruh bahan dilarutkan menggunakan akuades hingga volume 500 mL



Larutan dihomogenkan hingga seluruh garam terlarut sempurna



Larutan yang telah dibuat selanjutnya digunakan sebagai larutan simulasi fase oral (*Simulated Salivary Fluid*, SSF) pada proses pencernaan *in vitro*.

b) Pembuatan Larutan *Simulated Gastric Fluid* (SGF)

Larutan *Simulated Gastric Fluid* (SGF) sebanyak 500 mL dibuat dengan melarutkan KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, HCl, dan $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ sesuai komposisi yang direkomendasikan dalam protokol INFOGEST 2.0



Seluruh bahan dilarutkan menggunakan akuades hingga volume 500 mL



Larutan dihomogenkan hingga seluruh garam terlarut sempurna.



Larutan yang telah dibuat selanjutnya digunakan sebagai larutan simulasi fase lambung (*Simulated Gastric Fluid*, SGF) pada proses pencernaan *in vitro*.



Sebelum digunakan, ke dalam larutan SGF ditambahkan pepsin sehingga aktivitas akhir mencapai 2.000 U/mL, kemudian pH disesuaikan menjadi $3,0 \pm 0,1$ menggunakan HCl dan NaOH.

c) Pembuatan *Simulated Intestinal Fluid* (SIF)

Larutan *Simulated Intestinal Fluid* (SIF) sebanyak 500 mL dibuat dengan melarutkan KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, dan $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ sesuai komposisi yang direkomendasikan dalam protokol INFOGEST 2.0.



Seluruh bahan dilarutkan menggunakan akuades hingga volume 500 mL



Larutan dihomogenkan hingga seluruh garam terlarut sempurna.



X

X



Larutan yang telah dibuat selanjutnya digunakan sebagai larutan simulasi fase usus (*Simulated Intestinal Fluid*, SIF) pada proses pencernaan *in vitro*



Sebelum digunakan, ke dalam larutan SIF ditambahkan pancreatin dengan aktivitas akhir 100 U/mL dan garam empedu (*bile salts*) hingga konsentrasi akhir 10 mM, kemudian pH disesuaikan menjadi $7,0 \pm 0,1$ menggunakan HCl dan NaOH

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

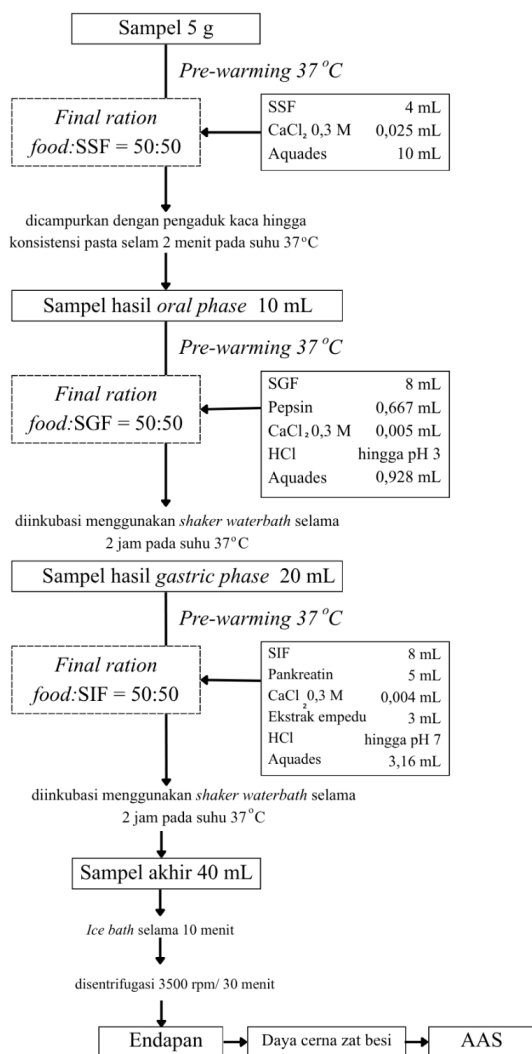


Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

9. Simulasi pencernaan *in vitro* metode Harmonisasi INFOGEST 2.0

Mengacu pada protokol harmonisasi INFOGEST 2.0 (Minekus *et al.* 2014; Brodkorb *et al.* 2019), proses simulasi pencernaan dilakukan secara bertahap melalui tiga fase utama, yang meliputi fase oral, fase lambung (gastrik), dan fase usus (intestinal). Berikut tahapan simulasi *in vitro*:



Keterangan:

SSF = Simulated Salivary Fluid

SGF = Simulated Gastric Fluid

SIF = Simulated Intestinal Fluid

Media simulasi pencernaan yang dibutuhkan dalam metode ini berupa Simulasi Cairan Saliva (SSF), Simulasi Cairan Lambung (SGF), dan Simulasi Cairan Intestinal (SIF) dibuat dari larutan elektrolit (konsentrasi 1,25 x), enzim, CaCl_2 , dan air sebagai pelarutnya. Sebanyak 5 g sampel ditambahkan dengan 4 mL larutan elektrolit SSF kemudian ditambahkan larutan α -amilase (1500 U/mL) yang dilarutkan dalam larutan elektrolit SSF. Sebanyak 0,025 mL CaCl_2 dan 10 mL H_2O ditambahkan dan larutan dihomogenkan. Semua pereaksi dihangatkan hingga suhu

37 °C sebelum dicampurkan. Proses inkubasi selama 2 menit dan menghasilkan oral bolus.

Jumlah asam yang diperlukan sebaiknya diuji coba sebelum melakukan stimulasi pencernaan. Sebanyak 10 mL sampel oral bolus dicampur dengan 8 mL larutan elektrolit SGF 0,67 mL larutan pepsin 0,667 mL yang dibuat dengan air dan pepsin (pepsin porcine berasal dari mukosa lambung 3200-4500 U/mg protein, Sigma), 0,005 mL CaCl₂ 0,3 M, 0,42 mL HCl 1 M untuk mencapai pH 3, dan air sebanyak 0,928 mL. Larutan diinkubasi selama 2 jam pada *water bath* suhu 37 °C.

Sebanyak 20 mL kimus yang berasal dari fase lambung dicampur dengan 8 mL larutan elektrolit SIF, 5 mL larutan pankreatin 800 U/mL yang dibuat dengan larutan elektrolit SIF, 3 mL ekstrak empedu (*bile*), 40 µL CaCl₂ 0.3 M, 0,95 mL NaOH 1 M untuk mencapai pH 7,0, dan 3,01 mL air. Kemudian pH diverifikasi dan melakukan penentuan jumlah NaOH-HCl yang dibutuhkan dilakukan pada uji coba sebelum simulasi *in vitro*.

10. Pengukuran Bioaksesibilitas Zat Besi (Fe)

Berdasarkan prosedur Gwala *et al.* (2019) dan Manditsera *et al.* (2019), penentuan bioaksesibilitas Fe *in vitro* dilakukan pada sampel yang telah melalui fase intestinal (Minekus *et al.* 2014) dan telah diinaktivasi enzimnya menggunakan air es. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi untuk mengisolasi fraksi supernatan jernih. Kadar total zat besi dan seng di dalam supernatan tersebut selanjutnya dianalisis dengan metode AAS berbasis preparasi destruksi basah.

Bioaksesibilitas Fe dihitung antara lain:

$$\text{Bioaksesibilitas Zat Besi} = 100 \times \frac{(a-b)}{c}$$

Keterangan:

- a : Konsentrasi mineral dalam supernatan sampel pencernaan
- b : Konsentrasi mineral blanko
- c : Konsentrasi mineral dalam sampel sebelum simulasi pencernaan

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Magetan, 15 Desember 2003. Penulis merupakan anak kedua dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Arif Fuadhi dan Ibu Sri Utami. Penulis menempuh pendidikan sekolah menengah atas di MA Mu'allimaat Muhammadiyah Yogyakarta dan lulus pada tahun 2022. Pada tahun 2022, penulis diterima sebagai mahasiswa sarjana (S-1) di Program Studi Sarjana Ilmu Gizi di IPB University melalui jalur Ketua Osis.

Selama mengikuti program sarjana (S-1), penulis diberikan kesempatan menjadi Staf Divisi Media Informasi dan Desain IPB Mengajar pada tahun 2022-2023, Co-Fasilitator MPKMB IPB 2022-2023, peserta kegiatan Wirausaha Merdeka Kampus (WMK) pada tahun 2024 dan berhasil menjadi salah satu tim yang didanai. Staf Divisi *Nutrition Professionalism* 2023-2024, Ketua Himpunan Mahasiswa Ilmu Gizi pada tahun 2024-2025.

Penulis pernah melaksanakan Praktik Kerja Lapangan Gizi Masyarakat di Kecamatan Babakan Pasar, Kota Bogor pada tahun 2025. Selain itu, penulis juga melaksanakan PKL Manajemen Makanan dan Asuhan Gizi Klinik di RSUD Tangerang Selatan pada tahun 2026.