

PENGARUH VARIASI pH DAN LAMA PEREBUSAN KACANG PANJANG (*Vigna Sesquipedalis* (L) fruhw) TERHADAP KADAR ASAM KOLAT DAN ASAM DEOKSIKOLAT PADA FESES HEWAN COBA (*Rattus norvegicus* L)

THE EFFECT OF pH VARIATION AND LENGTH BOILING TIME OF YARD-LONG BEAN (*Vigna Sesquipedalis* (L) fruhw) ON THE PERCENTAGE OF CHOLIC ACID AND DEOXYCHOLIC ACID IN FECAL

Rizkiyanto* dan Leny Yuanita

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural sciences
State University of Surabaya

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

Corresponding author, tel/fax: 085731110231, rizkiyantoik@yahoo.com

Abstrak. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh variasi pH dan lama perebusan kacang panjang terhadap kadar asam kolat dan asam deoksikolat pada feses *Rattus norvegicus* L. Rancangan penelitian menggunakan faktorial dua faktor yaitu pH (3 dan 7) dan Lama perebusan 0 (tanpa perebusan), 5, 20, dan 35 menit sebanyak 36 sampel. Analisis pengikatan asam kolat dan asam deoksikolat pada feses *Rattus norvegicus* L oleh serat pangan ditentukan melalui metode spektrofotometri UV-Vis, data dianalisis dengan Anova dua arah ($\alpha = 5\%$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada pengaruh pH dan lama perebusan terhadap pengikatan asam kolat dan asam deoksikolat oleh serat pangan pada feses *Rattus norvegicus* L ($p < 0,005$). Persentase pengikatan asam kolat dan asam deoksikolat tertinggi didapat pada perlakuan pH 3- Lama perebusan 35 menit secara berturut-turut sebesar 31,301 ppm dan 34,497 ppm, sedangkan; pengikatan asam kolat dan asam deoksikolat terendah terjadi pada perlakuan pH 7- tanpa perebusan secara berturut-turut sebesar 11,211 00m dan 13,463 ppm.

Kata kunci: asam kolat, asam deoksikolat, pH, lama perebusan, kacang panjang

Abstract. The research has purpose are to know the effect of pH variation and length of boiling time of yard-long bean (*Vigna Sesquipedalis* (L) fruhw) on the percentage of cholic acid and deoxycholic acid in *Rattus norvegicus* L fecal. Design of the research use two factors factorial, namely, pH (3 and 7) and length of boiling time 0 (without boiling), 5, 20, and 35 minutes. Binding analysis of cholic acid and deoxycholic acid in *Rattus norvegicus* L fecal by dietary fiber is determined through UV-Vis spectrophotometry, data analyzed by using two ways Anova ($\alpha = 5\%$). The results of this research was presented that there is effect of pH and length of boiling time on cholic acid and deoxycholic acid binding by dietary fiber in *Rattus norvegicus* L fecal ($p < 0.005$). The highest binding percentages of cholic acid and deoxycholic acid gained in the treatment of pH 3-length of boiling time 35 minutes are 31.301 ppm and 34.497 ppm respectively but the lowest binding of percentages of cholic acid and deoxycholic acid gained in the treatment of pH 7- length of boiling time 0 (without boiling) are 11.211 ppm dan 13.463 ppm respectively.

Keyword: cholic acid, deoxycholic acid, pH, boiling time, yard-long bean

PENDAHULUAN

Kolesterol adalah golongan lipida yang merupakan bagian dari membran luar sel dalam tubuh hewan mempunyai rumus molekul $C_{27}H_{45}OH$. Lima puluh persen dari jumlah kolesterol tubuh berasal dari sintesis pada hati (endigenik) dan sisanya berasal dari makanan sehari-hari (eksogenik) yang berupa karbohidrat (glukosa), lemak (asam lemak), dan protein (asam amino) [1]. Kolesterol yang tidak terekskresi dalam sistem metabolisme pada jumlah konsentrasi tinggi

dalam tubuh manusia dapat memberi dampak negatif bagi kesehatan, antara lain: kegemukan (obesitas), kanker usus besar (colon), penyakit divertikular, dan penyakit kardiovaskular [2]. Kolesterol yang tertinggal dalam tubuh tersusun atas asam empedu.

Asam empedu tersusun atas asam empedu primer yang terdiri dari asam kolat dan kenedeoksikolat dan asam empedu sekunder yang terdiri dari asam deoksikolat dan litokolat. [3] Jumlah gugus hidroksil pada masing-masing asam

empedu menunjukkan sifat hidrofobik dan kepolaran asam empedu. Pengikatan asam empedu oleh serat pangan dipengaruhi sifat kehidrofobikan asam empedu, hal ini dikarenakan pengikatan asam empedu oleh serat pangan melalui interaksi hidrofobik. Asam kolat memiliki 3 gugus hidroksil merupakan asam empedu yang kurang hidrofobik dan kurang terikat oleh serat pangan yang tak larut sedangkan asam deoksikolat memiliki 2 gugus hidroksil. Asam deoksikolat adalah salah satu asam empedu yang bersifat hidrofobik, dan asam litokolat memiliki 1 gugus hidroksil. Sifat hidrofobik dari asam deoksikolat dapat mempercepat pengikatan asam empedu oleh serat pangan, karena pengikatan asam empedu oleh serat pangan terjadi melalui interaksi hidrofobik dan dikeluarkan bersama feses.

Jumlah kolesterol yang berlebih dalam tubuh manusia dapat dikurangi atau dicegah dengan cara mengkonsumsi makanan yang mengandung serat pangan. Serat pangan merupakan senyawa inert secara gizi karena tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan manusia. Serat pangan memiliki komponen utama yaitu selulosa, lignin, hemiselulosa, gum, dan senyawa pektin. Lignin dan selulosa yang terkandung dalam makanan sebagian besar bersumber dari serat pangan nabati. Serat pangan tersebut berasal dari dinding sel berbagai jenis sayuran, sereal, umbi-umbian, dan kacang-kacangan. Komposisi serat cukup tinggi terdapat dalam kacang panjang, karena mengandung kadar serat pangan total sebesar 49,47% bobot kering [4].

Pada penelitian Supiati [5], perlakuan pH dan lama perebusan terhadap kacang panjang berpengaruh terhadap pengikatan asam deoksikolat oleh serat pangan kacang panjang dan pengikatan asam deoksikolat oleh serat pangan hemiselulosa dan pektin terjadi pengikatan tertinggi pada perlakuan pH 3 dengan lama perebusan 35 menit secara *In Vitro*. Dari uraian di atas peneliti ingin mengetahui pengikatan yang terjadi antara serat pangan kacang panjang (*Vigna Sesquipedalis* (L) fruhw) yang merupakan sumber serat pangan dengan asam kolat dan asam deoksikolat pada berbagai variasi pH dan lama perebusan secara *In Vivo*.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah peralatan gelas, pH meter, corong *buchner*, oven, termometer, lumpang alu, *blender*, gilingan, pipet mikro, cawan kurs, loyang, dan spektroskop UV-VIS.

Bahan yang digunakan adalah kacang panjang (*Vigna Sesquipedalis* (L) fruhw), feses hewan coba (*Rattus novergicus* L), aquades, larutan buffer sitrat, CHCl_3 , CH_3OH , H_2SO_4 70%, dan furfural.

Metode Pembuatan Pakan dan Supernatan

Sebanyak 350 gram Kacang panjang (*Vigna Sesquipedalis* (L) fruhw) dicuci, dipotong dan direbus. Untuk menghasilkan pH 7 digunakan air suling, sedangkan pH 3 menggunakan buffer sitrat masing-masing sebanyak 150 ml. Lama perebusan 0 (tanpa perebusan), 5, 20 dan 35 menit. Kemudian dihancurkan dan disaring. Air rebusan disimpan dalam lemari pendingin dan dilelehkan sebelum diberikan ke hewan coba setiap 2 kali sehari @ 20 ml secara bertahap selama 48 hari, sedangkan bagian padatnya digunakan untuk membuat pakan berbentuk pellet. Pellet dan air rebusan kacang panjang diberikan pada hewan coba yaitu *Rattus novergicus* L untuk dilihat kadar asam kolat dan asam deoksikolat melalui feses yang dikeluarkan. Hewan coba usia 2-3 bulan, diberi perlakuan pakan standar (pakan atau pellet buatan pabrik) selama 14 hari. Kemudian dibagi menjadi 9 kelompok hewan coba masing-masing kelompok mempunyai berat badan yang setara dengan berat ± 300 gram, yaitu 8 kelompok untuk pakan perlakuan dan 1 kelompok pakan standar (tidak menggunakan serat pangan). Setelah perlakuan selama 48 hari akan diambil feses pada hewan coba sebanyak (± 5 gram) dan dikeringkan pada suhu 70°C sehingga menghasilkan berat yang konstan, feses dihancurkan sampai menjadi serbuk. Kemudian diambil 10 mg dan ditambah larutan campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan (5 : 4). Larutan di panaskan pada suhu 60°C selama 2 jam dan diambil filtratnya. Langkah tersebut diulangi pada residu feses hingga 2 kali untuk mendapat supernatan lebih banyak.

Analisis Supernatant dengan Spektrofotometri Uv-Vis

Mengambil 4 ml filtrat atau supernatan ditambah 30 tetes ml H_2SO_4 70%, didiamkan selama 2 menit, ditambah 1 tetes furfural yang menghasilkan larutan berwarna pink. Setelah 5 menit penambahan furfural di baca pada panjang gelombang optimum 528 nm dari asam kolat dan asam deoksikolat. Data hasil pengujian dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dianalisis menggunakan metode Anava dua arah dengan uji lanjut LSD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai persentase kadar pengikatan asam kolat pada feses hewan coba oleh serat pangan dengan berbagai variasi pH dan lama perebusan

Data persentase kadar pengikatan asam kolat yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen yang ditunjukkan oleh nilai signifikan $\alpha > 0,05$, kemudian dilanjutkan uji Anava dua arah untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh variasi pH dan lama perebusan serat pangan terhadap kadar asam kolat pada feses hewan coba dan dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Rerata Persentase Kadar Pengikatan Asam kolat yang terekskresi pada feses hewan coba oleh serat pangan (Pengaruh pH dan Lama Perebusan)

pH	Lama Perebusan (menit)				F,p
	0	5	20	35	
3	25.305 ^c	28.421 ^{cd}	29.428 ^{cd}	31.301 ^d	76,291
7	11.211 ^a	13.227 ^{ab}	15.253 ^{ab}	17.431 ^b	p = 0,000
					F = 6,182
					p = 0,003
					F = 848,085
					p = 0,000

Menurut data dari hasil uji Anava 2 arah yang disajikan pada Tabel 1 dan lampiran data SPSS diperoleh angka signifikan (p) sebesar 0,003 kurang dari 0,05 yang menunjukkan bahwa hipotesis penelitian yang berbunyi "pH dan lama perebusan serat pangan berpengaruh terhadap kadar asam kolat pada feses hewan coba" dapat diterima, serta hasil yang ditunjukkan pada uji lanjutan LSD menyatakan bahwa ada beberapa perlakuan mengalami perbedaan yang nyata pada taraf signifikansi 0,05. Hal ini memperkuat kesimpulan bahwa pH dan lama perebusan serat pangan berpengaruh terhadap kadar asam kolat yang diperoleh pada feses hewan coba.

Persentase kadar pengikatan tertinggi asam kolat oleh serat pangan diperoleh pada pH 3 dengan lama perebusan 35 menit sebesar 31,301%. Persentase kadar asam kolat terendah diperoleh pada pH 7 dengan lama perebusan 0 menit (tanpa perebusan) sebesar 11,077%. Terjadinya pengikatan secara optimal asam kolat pada pH 3 dikarenakan, pada kondisi pH asam yaitu $\text{pH} \leq 3-4$ terjadi degradasi pektin dan terhidrolisisnya ikatan glikosidik pada senyawa pektat [6] dan hemiselulosa relatif mudah terhidrolisis oleh asam

membentuk komponen monomernya [7]. Menurut Eastwood & Hamilton, [8] pH asam dapat meningkatkan pengikatan asam kolat, dikarenakan adanya metoksilasi serat pangan. Pektin (yang biasanya terasa lekat pada tangan), akan mengalami fermentasi di usus besar menghasilkan produk akhir yang biasanya memiliki efek yang baik bagi kesehatan. Produk yang dihasilkan adalah asam lemak rantai pendek, yaitu asam asetat, asam propionat, dan asam butirat. Sehingga pektin dan hemiselulosa akan terikat secara optimal dengan asam kolat, karena asam kolat memiliki sifat hidrofilik.

Lama perebusan serat pangan diperoleh waktu optimal selama 35 menit. Hal tersebut disebabkan karena pektin dan hemiselulosa memiliki sifat serat pangan yang larut, sehingga semakin lama waktu perebusan serat pangan maka pektin dan hemiselulosa yang terlarut juga semakin tinggi, mengakibatkan asam kolat yang terikat juga semakin besar. Proses pemasakan bahan berserat pangan seperti perebusan akan menyebabkan denaturasi protein dan pati. Denaturasi pati menghasilkan *Resistant Starch* (RS) yang mempunyai kemampuan mengikat asam empedu [9]. Semakin banyak RS yang dihasilkan semakin tinggi asam empedu yang terikat. Perebusan yang semakin lama dapat meningkatkan pengikatan dengan asam empedu. Proses perebusan terjadi kerapuhan dinding sel akibat degradasi komponennya, hal ini mengakibatkan meningkatnya luas permukaan adsorpsi [7].

Asam kolat yang terikat oleh serat pangan dalam tubuh tidak dapat teradsorpsi kembali pada hati melalui siklus enterohepatik melainkan dibuang melalui feses, sehingga jumlah asam empedu berkurang dalam tubuh dan menyebabkan hati harus menggunakan kolesterol sebagai bahan untuk membentuk asam empedu kembali [10]. Dengan demikian, asam kolat yang terikat oleh serat pangan kacang panjang dalam tubuh dapat mengurangi resiko untuk terkena penyakit yang diakibatkan oleh terlalu banyaknya kandungan kolesterol yang ada di dalam tubuh, antara lain : kegemukan (obesitas) yang bisa berakhir pada panyakit diabetes melitus, hipertensi, sampai penyempitan dan pengerasan pembuluh darah yang memicu stroke [11].

Nilai persentase kadar asam deoksikolat oleh serat pangan dengan berbagai variasi pH dan lama perebusan

Data persentase kadar asam deoksikolat yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen yang

ditunjukkan oleh nilai signifikan $\alpha > 0.05$, maka akan dilanjutkan uji Anava dua arah untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh variasi pH dan lama perebusan serat pangan terhadap kadar asam deoksikolat pada feses hewan coba dan dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Menurut hasil uji Anava 2 arah yang disajikan pada Tabel 2 diperoleh angka signifikan (p) sebesar 0,007 kurang dari 0,05 yang menunjukkan bahwa hipotesis penelitian yang berbunyi “pH dan lama perebusan kacang panjang berpengaruh terhadap kadar asam deoksikolat pada feses hewan coba” dapat diterima, serta hasil yang ditunjukkan pada uji lanjutan LSD menyatakan bahwa ada beberapa perlakuan mengalami perbedaan yang nyata pada taraf signifikansi 0,05.

Tabel 2 Rerata Persentase Kadar Pengikatan Asam Deoksikolat tang terekskresi pada hewan coba oleh Serat Pangan (Pengaruh pH dan Lama Perebusan)

pH	Lama Perebusan (menit)				F,p
	0	5	20	35	
3	23.863 ^c	26.137 ^{cd}	28.259 ^{cd}	34.497 ^d	F = 75.198 p = 0,000
7	13.463 ^a	15.196 ^{ab}	17.567 ^{ab}	19.497 ^b	F = 5,046 p = 0,007
	F = 865.282 p = 0,000				

Tabel 2 menunjukkan bahwa pengikatan tertinggi didapat pada perlakuan pH 3 dengan lama perebusan 35 menit dengan persentase sebesar 34.189% dan pengikatan terendah terjadi pada perlakuan pH 7 dengan lama perebusan 0 menit 13.463%. Pada pengaruh pH didapatkan rerata kadar tertinggi yaitu pH 3.. Asam empedu semakin terikat dengan serat pangan pada pH rendah, dikarenakan komponen-komponen serat pangan seperti lignin akan mengalami degradasi melalui hidrolisis disebabkan antara sub unit lignin berikatan dengan stabilitas yang tinggi, yaitu ikatan -C-O-C dan -C-C [7]. Lignin merupakan senyawa yang efisien dalam mengikat asam deoksikolat pada pH asam, dengan gugus metoksil dan β -karboksil. Pada selulosa dalam keadaan asam dengan konsentrasi tinggi atau asam kuat akan terjadi degradasi melalui hidrolisis ikatan glikosidik atau disebut dengan degradasi (β -1,4) [7]. Tingginya pengikatan asam deoksikolat oleh serat pangan tak larut (lignin dan selulosa) terjadi pada pH 3 karena lignin dan selulosa memiliki sifat yang hidrofobik, sehingga pada pH asam terjadi hidrolisis yang

mengakibatkan sub unit lignin memiliki ikatan yang stabil dan ikatan rantai selulosa terhidrolisis melalui ikatan glikosidik. Sifat tersebut mendukung dalam pengikatan dengan serat pangan kacang panjang. Asam deoksikolat di dalam tubuh khususnya dalam usus besar, nantinya akan langsung dikeluarkan bersama dengan feses.

Pengaruh lama perebusan didapatkan rerata pengikatan tertinggi yaitu lama perebusan 35 menit. Perebusan yang semakin lama dapat meningkatkan pengikatan dengan asam empedu dikarenakan pada proses perebusan terjadi kerapuhan dinding sel akibat degradasi komponennya, hal ini mengakibatkan meningkatnya luas permukaan adsorpsi [7]. Gorecka [3], mengungkapkan bahwa lama pemasakan pada sayuran dapat meningkatkan pengikatan serat pangan dengan asam empedu. Pengikatan asam empedu oleh serat pangan dipengaruhi sifat kehidrofobikan asam empedu, hal ini dikarenakan pengikatan asam empedu oleh serat pangan melalui interaksi hidrofobik. [12] menerangkan, proses perebusan dapat menghasilkan produk milliard yang dianggap lignin. [7], produk milliard memiliki karakter fenol yang sama dengan lignin. Semakin lama perebusan maka semakin besar produk milliard yang dihasilkan, sehingga semakin banyak klason lignin yang terbentuk dan semakin banyak yang dapat mengikat asam deoksikolat.

Asam deoksikolat merupakan asam empedu sekunder yang dihasilkan dari sintesis asam kolat yang terjadi di dalam hati pada siklus enterohepatik. Asam deoksikolat salah satu asam empedu yang memiliki 2 gugus hidroksil dan bersifat hidrofobik. Sifat hidrofobik asam deoksikolat dalam tubuh dapat membantu proses interaksi pengikatan oleh serat pangan dengan baik. Asam deoksikolat yang telah terikat oleh serat pangan di dalam tubuh khususnya di usus besar, akan langsung dikeluarkan bersamaan dengan feses, karena asam deoksikolat terdapat dalam jumlah yang cukup banyak pada usus besar. Asam deoksikolat yang telah dikeluarkan dalam tubuh mempunyai manfaat, antara lain : mencegah kegemukan (obesitas), mencegah kanker usus besar (colon), mencegah penyakit divertikular, dan mencegah penyakit kardiovaskular.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan : 1) Ada pengaruh pH dan lama perebusan kacang panjang (*Vigna Sesquipedalis*

(L) fruhw) terhadap kadar asam kolat dan asam deoksikolat feses hewan coba (*Rattus norvegicus* L). 2) Persentase pengikatan asam kolat dan asam deoksikolat tertinggi didapat pada perlakuan pH 3-lama perebusan 35 menit secara berturut-turut sebesar 31,301 ppm dan 34,497 ppm. Sedangkan pengikatan asam kolat dan asam deoksikolat terendah terjadi pada perlakuan pH 7- tanpa perebusan secara berturut-turut sebesar 11,211 ppm dan 13,463 ppm.

SARAN

Penelitian lanjutan supaya menambahkan variasi suhu pada penelitian yang sama. Suhu juga dapat dimungkinkan mengubah sifat fisiko kimia serat pangan, sehingga berakibat pada pengikatan dengan asam kolat dan asam deoksikolat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Guyton, A. C., 1987. Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit. Edisi III. Alih bahasa: P. Adrianto, EGC., Jakarta. p. 623-630.
2. Rahayu, Tuti. 2005. *Kadar kolesterol darah tikus putih (Rattus norvegicus L) setelah pemberian cairan kombucha per-oral. Jurnal Penelitian Sains & Teknologi, Vol. 6, No. 2, 85-100.*
3. Gorecka, D., Korczak J., Balcerowski E., and decyl K. 2002. *Sorption of Bile Acids and Cholesterol by Dietary Fiber of Carrots, Cabbages and Apples. Electronic journal of polish agricultural universities. 5;2.*
4. Muchtadi, Deddy. 2001. "Sayuran Sebagai Sumber Serat Pangan Untuk Mencegah Timbulnya Penyakit Degeneratif". Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, IPB: Bandung. *Journal Teknologi dan Industri Pangan, Volume XII, Hal 61-71.*
5. Supiati. 2011. *Pengaruh pH dan Lama Perebusan Terhadap Pengikatan Asam Deoksikolat Oleh Hemiselulosa dan Pektin Kacang Panjang (Vigna Sesquipedalis (L) fruhw).* Surabaya: Kimia FMIPA unesa.
6. Voragen AGJ, Pilnik W. 1995. Pectins. In: *Food Polysaccharides and Their Applications.* Edited by Stephen AM: 287-339.
7. Yuanita, Leny. 2003. *Pengaruh Derajat Keasaman dan Lama Perebusan terhadap Ketersediaan Hayati Fe: Pengikatan Fe oleh Makromolekul Serat Pangan Kacang Panjang (Vigna Sesquipedalis (L) Fruhw).* Disertasi tidak dipublikasikan. Surabaya: Pascasarjana Universitas Airlangga.
8. Eastwood, M. A. 1973. "Vegetable Fibre: its Physical Properties". *Gastrointestinal Unit, Western General Hospital, Edinburgh BH4 2XU. Proc. Nutr. Soc. Volume 32. Hal 137-143*
9. Vanhoof, K and Scrijver, R. De. 1998. "The Influence of enzyme-Resistant Starch on Cholesterol metabolism in Rats". *British journal of nutrition. Vol. 80:193-198.*
10. Nainggolan, Olwin dan Adimunca, Cornelis. 2005. *Diet Sehat dengan Serat. Cermin Dunia Kedokteran. 147:43-46*
11. Guyton, A. C., 1987. Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit. Edisi III. Alih bahasa: P. Adrianto, EGC., Jakarta. p. 623-630.
12. Peter J. Van Soest. 1994. "Nutritional Ecology of The Ruminant (Second edition)". New York: Cornell University Press.