

KOBALAMIN, KOBALAMIN-ANALOG DAN KEBERADAANNYA DALAM TEMPE

Oleh :

Suparmo *)

Pendahuluan

Faktor anti anemia pernisius, yang berada dalam ekstrak hati, pertama kali dijati-dirikan dan dimurnikan oleh Smith (1948) dan dikristalkan oleh Rickes dkk (1948). Senyawa tersebut kemudian dikenal sebagai vitamin B-12. Di alam, beberapa senyawa serupa juga ditemukan. Semua senyawa yang mengandung korin dan inti kobalt ini kemudian disebut kobalamin.

Secara alami, kobalamin hanya disintesis oleh bakteri. Karena tanaman tidak bisa mensintesisnya, maka vitamin ini hanya terdapat dalam hasil hewani. Dalam saluran pencernaan hewan terdapat bakteri yang mampu mensintesis vitamin tersebut; beberapa jenis hewan (misalnya ruminan) bisa mengasimilasi vitamin B-12 yang dihasilkan.

Beberapa strain bakteri digunakan secara komersial untuk mensintesis vitamin B-12. Pada beberapa cara fermentasi lama digunakan proses dua tahap, yaitu proses anaerob yang disusul dengan fermentasi aerob. Pada proses anaerob, cincin korin (Gambar 1) terbentuk, disusul pengikatan atom kobalt, sedangkan selama fermentasi aerobik gugus dimetilbenzimidazol dihasilkan, melengkapi struktur keseluruhan. Pada

proses lainnya yang lebih baru, untuk mempercepat proses, dimetilbenzimidazol ditambahkan dari luar untuk memperpendek proses aerobik.

Secara alami banyak molekul yang terdiri dari cincin korin, tetapi tidak mempunyai dimetilbenzimidazol. Beberapa dari senyawa tersebut diduga merupakan prekursor kobalamin. Karena tidak mempunyai aktivitas sebagai vitamin B-12, senyawa tersebut dikenal sebagai B-12 analog atau pseudokobalamin.

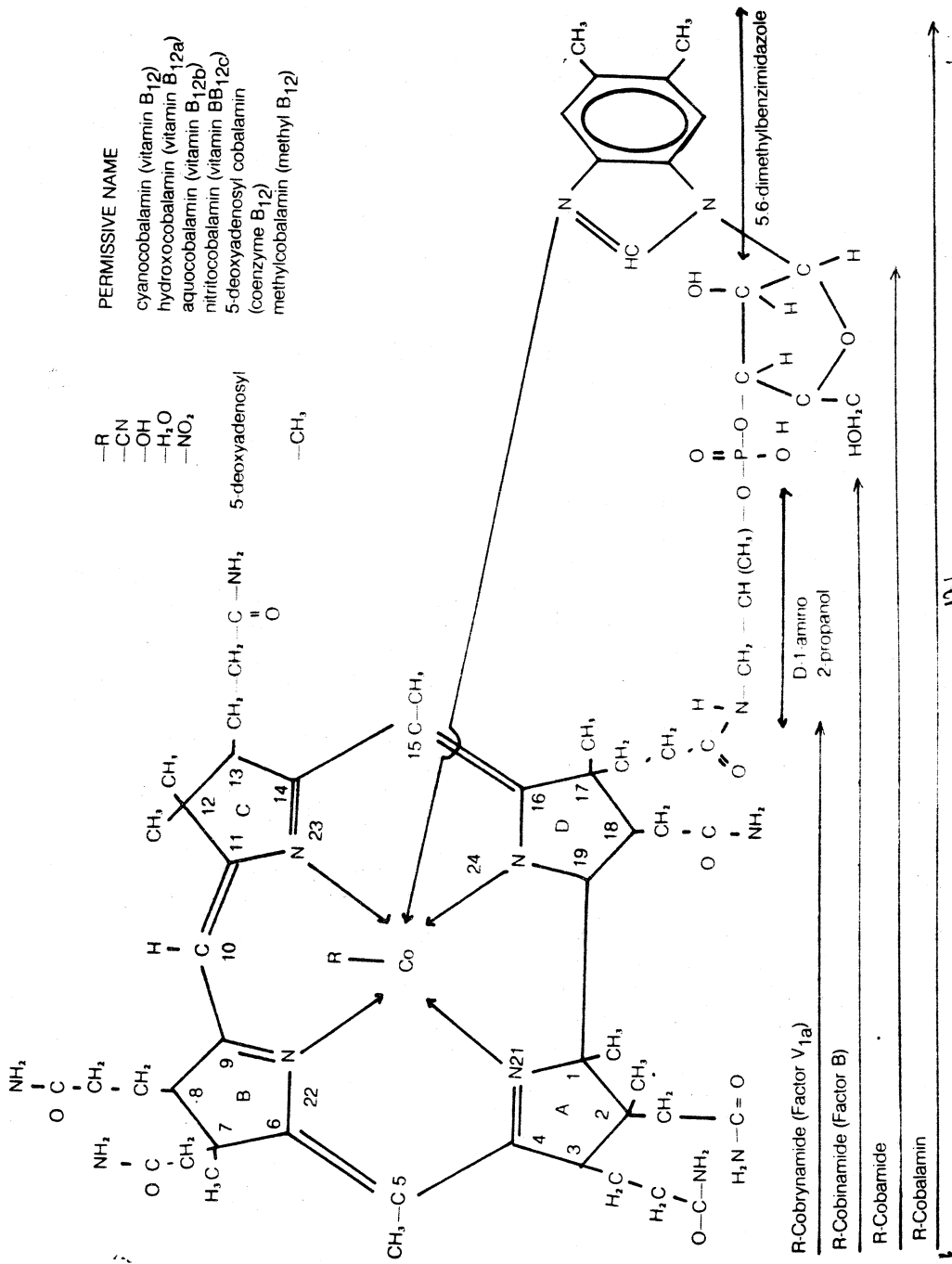
Beberapa makanan hasil fermentasi dilaporkan mengandung vitamin B-12, misalnya tempe (Liem dkk. 1977) dan Kimchi (Ro dkk. 1979). Laporan tersebut banyak diambil sebagai acuan, tanpa mendapatkan penelaahannya lebih dalam.

Kasus kekurangan vitamin B-12 karena diet sangatlah jarang. Beberapa kasus yang dialami oleh penderita yang bukan vegetarian terutama terjadi pada individu yang mempunyai populasi bakteri berlebihan dalam sistem pencernaannya. Diduga bakteri memproduksi kobalamin analog yang secara kompetitif menahan penyerapan vitamin B-12.

Aspek Kimia

Secara kimiawi, vitamin B-12 termasuk anggota dari sejumlah senyawa yang disebut kobalamin (Gambar 1).

*) Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian UGM.



Gambar 1. Structural formula of cobalamin analogs. (Source : From Ref. 84.)

Molekulnya tersusun oleh satu inti atom kobalt yang mempunyai ikatan koordinasi dengan korin, yaitu susunan kerangka empat cincin pirol yang hampir planar menyerupai cincin porfirin. Untuk membuatnya stabil, dalam usaha memisahkan dan mengkristalkan kobalamin, sisi aksial atom kobalt diisi dengan gugus sianida. Senyawa yang terbentuk ialah sianokobalamin atau vitamin B-12, yang tidak pernah dijumpai secara alami dalam makanan. Dalam bahan makanan, struktur yang utama ialah bentuk koenzimnya yaitu adenosil kobalamin, dalam keadaan ini sisi aksial atom kobalnya diisi oleh nukleosida adenin, bukannya gugus sianida. Dalam proses pemasakan, sebagian adenin tersebut terlepas dan digantikan oleh molekul hidrogen. Molekul ini dikenal sebagai hidroksokobalamin.

Semua kobalamin yang mempunyai aktifitas vitamin B-12 mempunyai gugus 5,6 dimetilbenzimidazol pada sisi aksial lain pada atom kobalnya. Gugus inilah yang kemudian membedakan antara kobalamin dan pseudokobalamin. Kegunaan pseudokobalamin dalam tubuh belum diketahui.

Analog

Di antara semua vitamin, molekul vitamin B-12 adalah yang terbesar dan terkompleks yang memungkinkannya mempunyai banyak analog. Beberapa analog terbentuk sebagai prekursor vitamin B-12, yaitu bentuk aktif dalam organisme lain atau sebagai derivatif setelah terjadi perubahan dari strukturnya. Perbedaannya dengan vitamin B-12 bisa terletak pada : ligan yang terikat pada sisi aksial atom kobalt, amida basa 5,6-dimetilbenzimidazol diganti oleh basa

lainnya. Analog macam yang terakhir terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. **Basa nukleotida beberapa kobalamin analog**

Nama	Basa Nukleotida
Vitamin B-12 (sianokobalamin)	5,6-dimetilbenzimidazol
Analog :	
Faktor A	2-metiladenin
Faktor B	tanpa basa
Faktor C	Guanin
Faktor III	5-hidroksibenzimidazol
Pseudovitamin B-12	Adenin

Sebanyak 20 macam analog yang terbentuk secara alami melalui sintesis oleh bakteri. Senyawa-senyawa alami ini biologis aktif pada masing-masing bakteri pembentuknya, namun belum tentu aktif sebagai vitamin B-12 dalam tubuh manusia. Beberapa di antara analog tersebut justru secara kompetitif mengganggu aktivitas kobalamin yang aktif. Hal ini yang menyusahkan dalam usaha penentuan aktivitas vitamin B-12 dalam suatu bahan. Kemungkinan analisis yang terbaik ialah bila manusia atau bahan yang didapatkan dari manusia bisa digunakan dalam analisis vitamin ini.

Absorpsi

Untuk memudahkan pembahasan tentang analisis, perlu diutarakan sistem absorpsi pencernaan terhadap kobalamin.

Absorpsi kobalamin bisa berjalan melalui dua cara : *Absorpsi aktif* dengan

perantaraan faktor intrinsik, yang berupa glikoprotein yang dihasilkan mukosa sel. Mekanisme ini sangat penting bagi penyerapan kobalamin pada dosis fisiologis (sampai 5 μ g). *Absorpsi pasif*, yang terjadi bila konsentrasi kobalamin sangat tinggi, yang melebihi konsentrasi dalam bahan makanan umumnya.

Urutan prosesnya meliputi (a) pembebasan kobalamin dari bahan lain, (b) pengikatan kobalamin ke faktor intrinsik, (c) transit ke ileum, (d) pengikatan senyawa kompleks kobalamin-faktor intrinsik pada reseptor di permukaan ileum, (e) transfer melalui dinding sel ileum ke pembuluh darah dan (f) pembebasan kobalamin dari faktor intrinsik.

Absorpsi pasif berlangsung bila konsentrasi vitamin sangat tinggi. Mekanismenya kemungkinan melalui difusi. Tempat terjadinya absorpsi tidak spesifik. Kedua cara absorpsi mempunyai kemampuan yang sangat rendah. Persentasi absorpsi menurun dengan peningkatan dosis vitamin yang dimakan. Tabel 2 menunjukkan jumlah sianokobalamin yang bisa diabsorpsi oleh orang normal dan penderita anemia pernisius yang pada umumnya disebabkan tidak mempunyai faktor intrinsik yang membantu penyerapan vitamin B-12. Terlihat bahwa absorpsi aktif yang menggunakan faktor intrinsik mampu memasukkan vitamin yang jauh lebih banyak dibandingkan bila tanpa faktor intrinsik.

Pada konsentrasi rendah, penyerapan dimulai 3-6 jam setelah makan yang mencapai puncak setelah 8-12 jam. Pada dosis tinggi, penyerapan sudah terlihat setelah 1-2 jam setelah pemberian makan dengan puncak pada jam 4 - 6. Kenyataan ini memberikan indikasi bahwa penyerapan vitamin B-12 secara

pasif tidak hanya terjadi pada dinding ileum saja.

Belum diperoleh data yang menunjukkan bahwa penyerapan analog juga mengikuti pola seperti dalam Tabel 2.

Analisis

Dalam analisis vitamin B-12, persoalan yang timbul ialah apakah jumlah yang tertera tersebut merupakan jumlah molekul secara kimiawi ataukah jumlah molekul yang mempunyai aktivitas vitamin B-12 secara biologis dalam tubuh manusia. Persoalan kekhasan rumit ini dipersulit dengan kenyataan bahwa jumlah molekul vitamin B-12 dalam sampel pada umumnya sangat rendah, dalam kisaran pikogram-nanogram per gram sampel, serta kurangnya stabilitas vitamin B-12.

Analisis untuk penentuan kadar vitamin B-12 bisa dikerjakan secara kimiawi, mikrobiologis, biologis dan radioassay. Namun rendahnya kuantitas aktivitas vitamin B-12 dalam larutan fisiologis maupun dalam bahan makanan penggunaan cara radioassay dan mikrobiologis menjadi lebih populer.

Metoda radioassay, yang umumnya disebut *pengenceran radio isotop*, banyak digunakan di rumah sakit karena mempunyai keuntungan tidak membuat "false low" yang disebabkan oleh antibiotik atau bahan penghambat mikrobia lain yang mungkin berada dalam darah (biasanya pasien). Metoda ini menggunakan protein pengikat dari saliva, faktor intrinsik dari babi dan sianokobalamin yang berlabel. Prinsip metoda ini ialah pengikatan sejumlah tertentu faktor intrinsik (yang diketahui) dalam suatu bahan,

Tabel 2. **Absorpsi terhadap kobalamin dosis tunggal oleh orang normal* dan penderita anemia pernisius****

Dosis oral (μ g)	Normal		Anemia Pernisius	
	Diabsorpsi			
	μ g	%	μ g	%
0.10	0.08	80		
0.25	0.19	76		
0.50	0.35	70		
1.00	0.56	56	0.057	5.7
2.00	0.92	46		
3.00	—	—	0.108	3.6
5.00	1.40	28		
10.00	1.60	16	0.260	2.6
20.00	1.20	6		
50.00	1.50	3		
100.00	—	—	1.10	1.1
200.00	—	—	2.00	1.0
400.00	—	—	4.00	1.0
800.00	—	—	8.80	1.1
5000.00	—	—	50.00	1.0

* Dari Chanarin (1968).

** dari Herbert (1959)

pengikatan sebagian faktor intrinsik oleh sianokobalamin dalam sampel, penentuan sisa faktor intrinsik dengan pengikatan sianokobalamin yang berlabel yang dilanjutkan dengan pengukuran radioaktivitasnya.

Kesulitan metoda ini ialah susahnya didapatkan faktor intrinsik yang betul-betul murni yang bisa secara khas hanya mengikat kobalamin saja tanpa analog. Metoda ini digunakan untuk pengukuran yang sifatnya hanya memberikan gambaran umum vitamin B-12 total. Untuk penentuan kobalamin yang betul-betul mempunyai aktivitas biologis atau disebut "kobalamin sejati" diperlukan intrinsik faktor yang lebih murni. Di rumah sakit tersedia perlengkapan untuk analisis

vitamin B-12 dalam bentuk paket ("kit") yang bisa digunakan secara mudah dan cepat. Kelemahan alat ini ialah tidak spesifik dan kepekaannya yang hanya berada pada kisaran mikrogram per gram sampel.

Analisis dengan cara mikrobiologis memberikan kepekaan pada kisaran nanogram per gram sampel dan tidak menghendaki perlakuan pemurnian sampel. Metoda ini sangat banyak digunakan dalam penelitian, terutama yang menggunakan sampel yang sangat besar. Kelemahan yang didapati pada umumnya sama yaitu pada kekhasannya terhadap analog serta kepekaan mikroorganisme terhadap bahan

penghambat maupun pemacu pertumbuhan.

Mikrobia yang digunakan berdasar dengan urutan kepekaannya ialah *Lactobacillus leichmanii*, mutan *E. coli*, *Euglena gracilis* dan *Ochromonas malhamensis*, *L. leichmanii* ATCC 7830 ialah bakteri yang disetujui oleh U.S. Pharmacopeia untuk digunakan dalam analisis vitamin B-12. Organisme ini memberikan respons positif terhadap beberapa analog maupun DNA, tetapi untuk keperluan analisis darah dianggap tidak membahayakan. Organisme yang paling khas untuk analisis aktivitas vitamin B-12 ialah protozoa *O. malhamensis*. Dalam usaha perbandingan antara mikroorganisme terlihat bahwa *O. malhamensis* tidak memberikan reaksi terhadap faktor-faktor A,B,C, III dan pseudokobalamin, sedangkan keuga mikrobia lainnya (*E. coli*, *L. leichmanii* dan *E. gracilis*) memberikan test positif terhadap faktor-faktor yang tertera dalam Table 1. Cara analisis menggunakan *L. leichmanii* dan *O. malhamensis* disajikan dalam lampiran.

Keberadaan Vitamin B-12 dalam Tempe

Liem dkk (1977) melaporkan bahwa vitamin B-12 ditemukan dalam tempe yang dibeli di Ontario Kanada. Pada studi lebih lanjut menunjukkan bahwa tempe yang didapatkan dari Indonesia dan beberapa daerah di A.S. ternyata juga mengandung vitamin tersebut, tetapi tempe yang diproduksi menggunakan biakan murni *Rhizopus oligosporus* tidak menunjukkan aktivitas tersebut. Djurtoft (1983) yang membuat tempe dari kacang tolo di Nigeria menggunakan usar dari Indonesia juga menemukan vitamin tersebut dalam tempennya. Suatu bakteri,

yang belakangan diketahui *Klebsiella pneumoniae*, adalah yang bertanggung jawab terhadap kejadian ini. Tempe, bahan nabati yang cukup baik sebagai sumber protein menjadi lebih penting artinya, terutama bagi vegetarian, dengan kandungan vitamin B-12-nya.

Dibalik publikasi yang besar tersebut terkandung suatu pertanyaan yang harus dijawab terutama oleh nutrisionis yang mengetahui ikhwal vitamin B-12. Melihat bahwa laporan tersebut merupakan data hasil analisis mikrobiologis menggunakan *L. leichmanii*, pertanyaan yang timbul ialah berapa bagian di antaranya yang berupa vitamin B-12 sejati.

Dalam usaha menghasilkan vitamin B-12 yang lebih banyak dalam tempe dengan menggunakan mikrobia yang lebih potensial, secara tidak sengaja diketahui bahwa sebagian besar kobalamin yang dihasilkan ternyata bukan vitamin B-12 sejati (Tabel 3). Waktu fermentasi yang singkat tidak cukup bagi mikrobia yang bersangkutan untuk membentuk molekul yang besar tersebut, atau memang bisa menggunakan analog untuk keperluan biologisnya yang bukannya vitamin B-12 sejati. Perlu dipertanyakan apakah banyaknya analog ini sudah sampai pada tingkat yang mengganggu penyerapan vitamin B-12 sejati.

Penutup

Vitamin B-12 mempunyai molekul yang besar, memungkinkannya mempunyai banyak analog. Analog-analog tersebut tidak mempunyai aktivitas vitamin B-12, dan ada beberapa di antaranya bisa mengganggu absorpsi vitamin B-12. Dalam tempe dilaporkan

Tabel 3. **Aktivitas vitamin B-12 dalam tempe yang ditera menggunakan *L. leichmanii* dan *O. malhamensis****

Bakteria	Waktu Ferm. (hari)	<i>L. leichmanii</i> (ng/g d.b.)	<i>O. malhamensis</i> (ng/g d.b.)
<i>K. pneumoniae</i>	1	25,4 ± 2,05	0
	2	50,2 ± 2,54	0
	3	63,6 ± 2,86	0
<i>B. megaterium</i>	1	39,5 ± 2,32	2,38 ± 0,32
	2	57,6 ± 3,70	3,89 ± 0,19
	3	88,1 ± 5,01	5,15 ± 0,10
<i>S. olivaceus</i>	1	42,6 ± 2,87	0
	2	101,5 ± 3,04	0,57 ± 0,16
	3	176,4 ± 5,60	1,04 ± 0,18

*)Rata-rata ± std.dev.

terdapat vitamin B-12, yang ternyata sebagian besar adalah analog. Belum diketahui apakah analog tersebut bisa mengganggu penyerapan vitamin B-12.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme penyerapan vitamin B-12, terutama dalam interaksi antara analog dengan vitamin B-12 sejati. Untuk melengkapi data, perlu dilakukan studi epidemiologi terhadap gejala klinis awal defisiensi vitamin B-12 pada populasi yang sangat kerap memakan.

Perlu diusulkan analisis ulang terhadap kandungan vitamin B-12 pada daftar makanan, menggunakan metoda khas terhadap vitamin B-12. Perlu pula diusulkan agar analisis vitamin B-12 menggunakan bakteri *L. leichmanii* tidak digunakan untuk menganalisis makanan hasil fermentasi.

Pustaka

- Analytical Methods Committee. 1956. The estimation of vitamin B-12. Analyst. 81:132.
- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. 13th ed., Assn. Offic. Anal. Chem., Washington, D.C.
- Beuchat, L.R. 1984. Fermented soybean foods. Food Tech. 36:64.
- Chanarin, I., 1968. The megaloblastic anemias, Blackwell, Oxford.
- Chung, H.J., and Fields, M.L. 1986. Production of riboflavin and vitamin B-12 by *Bacillus megaterium* ATCC 13639 and *Acetobacter aerogenes* in corn meal. J. Food Sci. 51:1514.
- Djurtoft, R., and Nielsen, J.P. 1983. Increase in some B vitamins, including B-12, during fermentation of tempeh, produced from cowpeas or soybeans.

- Ellenbogen, L. 1984. Vitamin B-12. In Handbook of Vitamins. Machlin, L.J. ed. Marcel Dekker.
- FAO/WHO, 1970. Requirements of ascorbic acid, vitamin D, Vitamin B-12 folate, and iron. Report of a Joint FAO/WHO expert group. WHO Tech. Rep. Series. No. 452. Geneva.
- Ford, J.E. 1953. The microbiological assay of vitamin B-12. The specificity of the requirement of *O. malhamensis* for cyanocobalamin, Br. J. Nutr. 7:299
- Herbert, V., J. Clin. Invest., 38:102 (1959).
- Hesseltine, C.W. 1965. A millenium of fungi, Food, and fermentation. Mycologia 57(2) : 149.
- Hesseltine, C.W., and Wang, H.L. 1967. Traditional fermented foods. Biotech. and Bioeng. 9:275.
- Hozova, B. and Sorman, L. 1979. Microbiological determination of vitamin B-12 in heat-treated foods. Food Sci. Tech. Abstr. 11, S1799.
- Liem, I.T.H., Steinkraus, K.H., and T.C. Cronk. 1977. Production of vitamin B-12 in tempeh, a fermented soybean food. Appl. & Environ. Microbiol. 34 : 773.
- Meers, J.L. 1973. Growth of bacteria in mixed cultures. CRC Critical Review in Microbiology. 2:139.
- Murata, K., Ikehata, H. and Miyamoto, T. 1967. Studies on the nutritional value of tempeh. J. Food. Sci. 32:580.
- Raven, J.L., Robson, M.B., Morgan, J.O., and Hoffbrand, A.V. 1972. Comparison of three methods for measuring vitamin B12 in serum : radioisotopic. Brit. J. Haematol. 22(1):21-31.
- Steinkraus, K.H. Hwa, Y.B., and van Buren, J.P. 1960. Studies on tempeh - An Indonesian fermented soybean food. Food Research. 25(6):777.
- Steinkraus, K.H. 1985. Manufacture of tempeh - Tradition and modern. Presented at the Symposium on non-salt fermented soybean foods, Tsukuba, Japan.
- Suparmo and Markakis, P. 1987. Tempeh prepared from germinated soybeans. J. Food Sci. 52:1736.
- Truesdell, D.D., Green, N.R., and Acosta, P.B. 1987. Vitamin B-12 activity in miso and tempeh. J. Food Sci. 52:493.