

Fortifikasi besi dan prebiotik pada kukis terhadap histologi usus tikus anemia

Iron and prebiotic fortification in cookies towards intestine histology anemia rats

Muhana Rafika¹, Lily Arsanti Lestari², Siti Helmyati²

¹Departemen Biostatistik, Epidemiologi, dan Kesehatan Populasi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Departemen Gizi Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Background: Anemia can also cause damage to small intestinal villous cells. Iron fortification can be an alternative prevention of anemia. Prebiotic additives can reduce the effects of fortification and improve intestinal villous. **Objective:** The study aims to determine the effect of breadfruit and soybean-based cookies with prebiotic and iron fortification on the small intestine's histology, especially the intestinal villous's height and width. **Methods:** Experimental study with posttest control group design with a total sample of 48 rats. Rats were divided into eight groups, given breadfruit and soybean-based cookies with the addition of FOS and NaFeEDTA (K1), FOS and FeSO₄ (K2), FOS (K3), FeSO₄ (K4), NaFeEDTA (K5), without fortification (K6). In addition, K- is a healthy mouse with standard feed, and K+ is an anemia mouse. Anemia induction is for two weeks, and intervention is for 28 days. Intestinal histology was observed using an optilab microscope and measured using ImageRaster 4.0.5. **Results:** There were no significant differences in duodenum villous height, jejunum villous height, and ileum villous width ($p > 0.05$). However, there were significant differences ($p < 0.05$) for duodenum villous width (K- and K3), jejunum villous width (K1 and K4) and ileum villous height (K1, K2 and K+). **Conclusions:** Giving breadfruit-based and soybeans with prebiotic and iron fortification can increase the height and width of small intestinal villi.

KEYWORDS: anemia; breadfruit; cookies; iron; prebiotic; soy; villous

ABSTRAK

Latar belakang: Kondisi anemia dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada vili-vili usus halus. Fortifikasi besi dapat menjadi alternatif pencegahan anemia. Penambahan prebiotik dapat mengurangi dampak yang timbul akibat fortifikasi dan memperbaiki vili usus. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kukis berbasis sukun dan kedelai dengan fortifikasi prebiotik dan zat besi terhadap histologi usus halus khususnya tinggi dan lebar vili usus. **Metode:** Penelitian eksperimental dengan *post-test control group design* pada total sampel 48 tikus. Tikus dibagi menjadi 8 kelompok, diberikan kukis berbasis sukun dan kedelai dengan penambahan fruktooligosakarisa (FOS) dan NaFeEDTA (K1), FOS dan FeSO₄ (K2), FOS (K3), FeSO₄ (K4), NaFeEDTA (K5), tanpa fortifikasi (K6). Selain itu K- yaitu tikus sehat dengan pakan standard dan K+ yaitu tikus anemia. Induksi anemia selama dua minggu dan intervensi selama 28 hari. Histologi usus diamati menggunakan mikroskop optilab dan diukur menggunakan *software ImageRaster 4.0.5*. **Hasil:** Tidak ada perbedaan yang bermakna untuk tinggi vili duodenum, tinggi vili jejunum, dan lebar vili ileum ($p > 0,05$). Namun, terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) untuk lebar vili duodenum (K- dan K3), lebar vili jejunum (K1 dan K4), dan tinggi vili ileum (K1, K2 dan K+). **Simpulan:** Pemberian kukis berbasis sukun dan kedelai dengan fortifikasi prebiotik dan zat besi dapat meningkatkan tinggi dan lebar vili usus halus.

KATA KUNCI: anemia; sukun; kukis; besi; prebiotik; kedelai; vili

Korespondensi: Siti Helmyati, Departemen Gizi Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada, Jl. Farmako Sekip Utara, Sleman, Yogyakarta, Indonesia, e-mail: helmyati@ugm.ac.id

Cara sitasi: Rafika M, Lestari LA, Helmyati S. Fortifikasi besi dan prebiotik pada kukis terhadap histologi usus tikus anemia. Jurnal Gizi Klinik Indonesia. 2023;19(4): 173-182. doi: 10.22146/ijcn.42606

PENDAHULUAN

Anemia merupakan masalah kesehatan masyarakat secara global yang ditemukan pada negara maju maupun negara berkembang [1]. Jenis anemia pada wanita umumnya anemia *mikrositik-hipokromik*, yaitu anemia karena defisiensi besi [2]. Remaja putri berisiko tinggi menderita anemia defisiensi besi. Tubuh remaja membutuhkan zat besi dalam jumlah banyak untuk masa pertumbuhannya [3]. Anemia defisiensi besi dapat menyebabkan lekas lelah dan konsentrasi belajar menurun sehingga prestasi belajar rendah serta dapat menurunkan produktivitas kerja di kalangan remaja [4]. Selain itu, pada kondisi anemia diketahui terdapat modifikasi fungsi dan morfologi vili saluran gastrointestinal sehingga proses absorpsi zat besi ikut terdampak [5,6]. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kekurangan zat besi dapat menyebabkan kerusakan pada sel epitel mukosa duodenum pada babi yang memperoleh pakan minim zat besi [7].

Prevalensi anemia defisiensi besi di Indonesia pada remaja putri 13-18 tahun dan wanita usia subur 15-49 tahun cukup tinggi masing-masing sebesar 22,7% [2]. Dampak yang terjadi sebagai akibat anemia defisiensi besi sangat merugikan untuk masa mendatang, maka usaha penanggulangan perlu dilakukan. Fortifikasi pangan dapat menjadi strategi perbaikan gizi seperti defisiensi zat gizi besi dalam waktu yang relatif cepat dan menjangkau populasi yang lebih luas. Fortifikasi pangan merupakan intervensi yang sangat hemat biaya tetapi manfaatnya besar [8].

Kukis adalah kue kering yang biasanya dibuat dengan menggunakan bahan baku seperti gula, mentega, dan tepung terigu [9]. Pengembangan kukis yang berasal dari bahan pangan lokal yaitu kedelai dan sukun dengan fortifikasi prebiotik dan zat besi dapat menjadi alternatif pangan untuk mengatasi anemia pada remaja. Bahan utama yang digunakan dalam pembuatan kukis adalah tepung kedelai yang bisa mencukupi kebutuhan zat besi walaupun sumber non-heme, mudah dikonsumsi, harganya murah, dan nilai gizi proteinnya lebih tinggi dibandingkan dengan kacang-kacangan yang lain [10]. Keunggulan lain dari kedelai berdasarkan hasil penelitian di Malawi yaitu pemberian fortifikasi mikromineral seperti zat besi pada susu yang berbahan dasar kedelai dapat menurunkan total populasi *E.coli* pada anak [11].

Hal ini menunjukkan bahwa kedelai mampu menurunkan efek samping peningkatan *E.coli* yang biasa terjadi pada pemberian fortifikasi. Selain kedelai, tepung sukun memiliki kandungan karbohidrat, vitamin, dan mineral yang cukup tinggi [12]. Studi lain menunjukkan bahwa oligosakarida pada sukun berpotensi sebagai prebiotik dengan mendukung pertumbuhan *Lactobacillus* dan *Bifidobacter ia* [13].

Penambahan prebiotik berupa fruktooligosakarida (FOS) diketahui mampu merangsang pertumbuhan mikrobiota di usus secara spesifik serta mampu berkompetisi dengan bakteri patogen sehingga menjadi salah satu prebiotik yang baik digunakan untuk menjaga keseimbangan mikrobiota dalam saluran pencernaan manusia [14]. Penambahan besi diperlukan untuk meningkatkan kandungan besi pada kukis. Fortifikasi besi yang umum digunakan untuk pangan tinggi fitat adalah NaFeEDTA dan FeSO₄. NaFeEDTA merupakan jenis fortifikasi besi yang lebih direkomendasikan [15]. Penelitian pada kelompok anak penderita anemia yang diberi biskuit singkong yang difortifikasi NaFeEDTA selama 3 bulan menunjukkan peningkatan kadar hemoglobin (Hb) lebih tinggi dibandingkan kelompok FeSO₄. Selain itu, NaFeEDTA memiliki tingkat absorpsi dua hingga empat kali lebih baik [16].

Fortifikasi makanan dengan penambahan zat besi dosis kecil merupakan cara paling aman dan paling menguntungkan, merata zat besi yang dapat diserap sebanyak 5-20% tergantung dari jenis dan status zat besi. Residu zat besi yang tidak tercerna akan digunakan oleh mikrobiota yang menguntungkan di usus [17]. Jika dibandingkan dengan NaFeEDTA, FeSO₄ memiliki harga yang lebih rendah dan tidak menimbulkan residu atau *chelation* dengan senyawa lain. Namun, fortifikasi FeSO₄ dapat menyebabkan peningkatan rasa asam dan terkadang *off-flavour* dalam penyimpanan jangka panjang sehingga jika ditambahkan dalam jumlah banyak akan menurunkan daya terima [18]. Di sisi lain, penambahan NaFeEDTA dapat menurunkan sifat antibakteri susu fermentasi dan meningkatkan populasi bakteri patogen [19].

Kerjasama prebiotik dan mikrobiota dalam usus memberikan efek positif terhadap permukaan saluran cerna dengan cara memperbaiki permukaan vili usus sehingga tinggi dan lebar vili akan semakin meningkat.

Permukaan vili usus diperbaiki melalui kolonisasi mikrobiota menguntungkan dan atau melakukan pelepasan senyawa bioaktif sehingga terjadi penguatan terhadap barrier usus yang langsung memodulasi fungsi sel epitel. sehingga penyerapan zat gizi akan lebih baik [20]. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian fortifikasi prebiotik dan zat besi pada kukis terhadap histologi usus dengan melakukan eksperimen pada tikus *Sprague Dawley* defisiensi besi.

BAHAN DAN METODE

Desain dan subjek

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental murni laboratorium dengan rancangan *post test control group design*. Penelitian ini dilakukan pada bulan September hingga bulan Desember 2019. Tempat pembuatan kukis dengan prebiotik dan fortifikasi zat besi, serta pemberian intervensi dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada (UGM). Pengujian kandungan gizi produk dilakukan di Fakultas Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian UGM. Uji histologi dengan metode Hematoksinilin Aeosin dilakukan di Laboratorium Mikroanatomi Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

Populasi penelitian adalah tikus putih *Sprague Dawley* betina yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Tikus betina dipilih karena lebih sensitif terhadap perubahan tertentu dibanding tikus jantan [21]. Penentuan sampel menggunakan metode *simple random sampling* dari populasi penelitian. Kriteria inklusi yaitu sebagai berikut: a) betina; b) galur *Sprague Dawley*; c) berumur tiga minggu; d) berat 80 gram \pm 10%; e) kondisi sehat (aktif dan tidak cacat, tidak mengalami kelainan anatomis). Kriteria eksklusinya yaitu: a) tikus sakit (penampakan rambut kusam, rambut rontok, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, atau genital, dan tidak bergerak aktif); dan b) tikus hamil. Sementara itu, kriteria *drop out* adalah tikus yang mati selama penelitian berlangsung.

Besar sampel dihitung dengan rumus menurut Dell, Holleran, dan Ramakrishnan (2002) dengan perkiraan *drop out* sebesar 15% sehingga jumlah sampel setiap

kelompok sebesar enam ekor tikus dan total sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 48 ekor tikus. Pengelompokan tikus dilakukan dengan metode *simple random sampling* yang dilakukan dengan cara memilih sampel secara acak berdasarkan kriteria inklusi dari populasi tikus putih *Sprague dawley* yang ada. Tikus yang memenuhi kriteria inklusi diambil secara acak sejumlah 48 ekor sebagai sampel. Tikus tersebut diadaptasi kemudian dibagi menjadi delapan kelompok secara acak dan setiap kelompok terdiri dari enam tikus.

Pengumpulan dan pengukuran data

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu intervensi berupa kukis dengan atau tanpa prebiotik FOS dan dengan atau tanpa fortifikasi zat besi sedangkan variabel terikat adalah histologi usus tikus anemia yaitu tinggi dan lebar vili usus. Kukis dengan bahan baku sukun dan kedelai dengan perbandingan 60:40 yang difortifikasi zat besi dan prebiotik dan diberikan pada tikus sebanyak 0,675 gram yang dilarutkan dalam akuades dan diberikan setiap hari selama 28 hari melalui sonde. Fortifikasi zat besi berupa FeSO_4 atau NaFeEDTA sebanyak 7,8 mg per takaran saji. Penambahan prebiotik berupa fruktooligosakarida (FOS) sebanyak 4 gram per takaran saji.

Kelompok perlakuan adalah kelompok yang diberi kukis dengan atau tanpa prebiotik FOS dan dengan atau tanpa fortifikasi zat besi. Selain itu, terdapat kelompok kontrol positif (tikus dengan induksi anemia yang diberi pakan standar) dan kelompok kontrol negatif (tikus tidak diinduksi anemia yang diberi pakan standar). Setiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Sebelum intervensi, dilakukan adaptasi selama 3 hari kemudian dilakukan proses induksi anemia dengan memberikan pakan rendah zat besi (Fe 17 ppm) dengan durasi 14 hari. Lalu dilanjutkan dengan pemberian intervensi selama 28 hari. Sesuai dengan penelitian sebelumnya [22] bahwa masa hidup sel darah merah tikus selama 20-30 hari [22]. Pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut: K1 = tikus anemia yang diberi kukis dengan FOS dan fortifikasi NaFeEDTA (FOS+NAFE); K2 = tikus anemia yang diberi kukis dengan FOS dan fortifikasi FeSO_4 (FOS+FESO); K3 = tikus anemia yang diberi kukis dengan FOS tanpa fortifikasi zat besi (FOS+NOFE); K4 = tikus anemia yang diberi kukis tanpa prebiotik FOS tetapi dengan

fortifikasi FeSO_4 (NOFOS+FE); K5 = tikus anemia yang diberi kukis tanpa prebiotik FOS tetapi dengan fortifikasi NaFeEDTA (NOFOS+NAFE); K6 = tikus anemia yang diberi kukis tanpa FOS dan fortifikasi zat besi (NOFOSFE); K+ = tikus anemia yang diberi pakan standar AIN93-M; dan K- = tikus sehat tanpa induksi anemia yang diberi pakan standar AIN93-M.

Pengambilan data dilakukan sebelum dan sesudah intervensi dengan membandingkan hasil pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, pengambilan data kandungan nilai gizi dilakukan setelah produksi kukis. Data yang dikumpulkan terdiri dari data berat tikus, asupan makanan, kandungan gizi produk, dan histologi usus. Data berat tikus diperoleh dengan menimbang tikus setiap tujuh hari sekali menggunakan neraca analitik Metler Toledo dengan ketelitian 0,01 gram. Data asupan makan tikus diperoleh dengan menghitung jumlah pakan yang diberikan (pakan AIN 93 sebanyak 10 gram/hari) dikurangi sisa pakan setiap hari selama intervensi. Data kandungan gizi produk diperoleh dari pengukuran kandungan protein, lemak, karbohidrat, energi, kadar air, besi (Fe), serat kasar, serat larut, dan fitat dalam 100 gram produk kukis. Kadar protein dianalisis dengan metode mikro Kjeldahl. Kadar lemak dianalisis dengan ekstraksi soxhlet. Kadar air dengan analisis proksimat. Kadar karbohidrat dihitung dengan *by difference* yaitu $100\% - (\text{protein, lemak, dan air})$. Total energi atau kalori dihitung dengan menjumlahkan kadar protein, lemak, dan karbohidrat. Kadar Fe diukur dengan metode *Wet Digestion* (pengabuan basah) dan ditera dengan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS). Data histologi usus diperoleh dari pewarnaan hematoksilin eosin yang dilakukan oleh analisis Laboratorium Mikroanatomi Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

Pemeriksaan histologi dilakukan dalam tiga tahap. Tahap pertama yaitu nekropsi yang dilakukan dengan memberikan anestesi dengan kloroform dilanjutkan dengan metode *cervical dislocation*. Setelah itu, *intestinum tenue* dipotong pada bagian duodenum dan jejunum. Pemotongan sampel *intestinum tenue* dilakukan secara memanjang dan dilanjutkan pencucian menggunakan larutan NaCl 0,9% dingin. Selanjutnya, sampel disimpan ke dalam larutan formalin 10% dalam buffer dengan durasi 24 jam [23].

Tahap kedua adalah pewarnaan hematoksilin eosin yang dilakukan dalam enam langkah. Pertama, trimming yaitu dengan memotong sampel setebal 0,5 x 0,5 x 0,5 cm lalu dipindahkan ke dalam *tissue cassette*. Selanjutnya, memotong bagian duodenum secara melintang dan bagian jejunum. Kedua, dehidrasi dan penjernihan dengan etil-alkohol dosis bertingkat dan ditambah *xytol*. Ketiga, pembedaan yang dilakukan dengan mengiris usus halus secara melintang lalu dibenamkan dalam parafin cair dan dibiarkan hingga mengeras. Keempat, pemotongan dengan mengambil 4-5 irisan dengan ketebalan 5-6 μm dalam slide gelas objek dengan jarak irisan 50 μm . Kelima, penempelan dan pewarnaan dengan cara menempelkan irisan ke gelas objek dan dilakukan pengeringan pada *hot plate*. Lalu dilakukan deparafinisasi dengan *xytol* kemudian direhidrasi dengan konsentrasi alkohol menurun dari 100% hingga 70%. Selanjutnya, dilakukan pencucian slide dan direndam dalam akuades. Keenam, pulasan hematoksilin eosin dengan memulas spesimen menggunakan hematoksilin kemudian dilakukan dehidrasi menggunakan sekumpulan larutan alkohol agar kadar air dalam jaringan menurun kemudian dilanjutkan pewarnaan menggunakan eosin pada alkohol. Setelah itu, dilakukan perendaman menggunakan *xytol* lalu ditutup menggunakan *cover slip* agar diperoleh preparat yang permanen [23].

Tahap ketiga adalah pengamatan hasil vili *intestinum tenue*. Tahap ini dilakukan dengan memeriksa preparat dibawah mikroskop yang memiliki kamera yang terhubung dengan komputer. Lalu, dilanjutkan pengamatan gambaran histologi *intestinum tenue* pada duodenum, jejunum, dan ileum meliputi tinggi dan lebar menggunakan mikroskop optilab [23].

Analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer STATA versi 13, kemudian dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui sebaran data. Analisis univariat meliputi analisis data dengan menghitung nilai rerata berat badan tikus dan asupan tikus. Analisis bivariat untuk mengetahui perbedaan histologi usus pada kelompok kontrol diuji dengan *paired t-test* sedangkan pada kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol diuji dengan parametrik *independent*

t-test. Setelah itu, dilanjutkan dengan analisis multivariat dengan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan antarkelompok. Jika mendapatkan hasil yang secara signifikan berbeda, maka dilanjutkan uji *post hoc* menggunakan uji Bonferroni. Sementara data yang tidak memenuhi syarat ANOVA menggunakan uji *Kruskall-Wallis*. Penelitian ini sudah disetujui dan mendapat perizinan oleh Medical Health Research Ethics Committee (MHREC) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan nomor surat KE/FK/0671/EC/2018.

HASIL

Karakteristik kukis berbasis sukun dan kedelai

Penelitian ini menggunakan sukun varietas Bangkok dan kedelai varietas Anjasmoro dari Grobogan. Hasil analisis kandungan gizi per 100 g kukis berbasis sukun dan kedelai disajikan pada **Tabel 1**. Analisis kandungan gizi tersebut dilakukan untuk mengetahui takaran saji produk sehingga dapat menentukan dosis FOS dan fortifikan besi. Takaran saji kukis berbasis sukun dan kedelai sebanyak 85 gram. Setiap takaran saji mengandung 4 g FOS dan 7,8 mg fortifikan besi. Hasil uji statistik menggunakan ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik ($p > 0,001$) antarkelompok perlakuan pada data nilai gizi kukis.

Karakteristik sampel penelitian

Penelitian ini menggunakan 48 ekor tikus *Sprague Dawley* betina berumur 3-4 minggu. Kondisi awal tikus tampak sehat berdasarkan kriteria rambut tidak kusam atau rontok, aktif bergerak, tidak cacat, dan tidak memiliki kelainan anatomis. Tikus tersebut diadaptasi selama 3 hari dan dikelompokkan secara acak menjadi delapan kelompok yaitu K-, K+, K1, K2, K3, K4, K5, dan K6. Sebanyak 7 kelompok merupakan tikus dengan induksi anemia dan satu kelompok (K-) merupakan tikus sehat atau tidak diinduksi anemia (**Tabel 2**).

Rerata berat badan tikus sebelum induksi anemia sebesar $99,98 \pm 11,21$ g sedangkan rerata asupan tikus sebesar $6,94 \pm 1,23$ g. Berdasarkan hasil uji statistik dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna antarkelompok yaitu K1, K2, dan K6 berbeda dengan K-. Masa adaptasi selama tiga hari dan umur tikus yang masih kecil menyebabkan perubahan pakan sebelum dan selama adaptasi yang mempengaruhi asupan pakan. Namun, rerata berat badan tikus sebelum induksi anemia menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antarkelompok ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa berat badan tikus adalah sama.

Berdasarkan hasil pemeriksaan Hb pada 42 ekor tikus yang diinduksi anemia, diperoleh hasil rerata Hb sebesar $8,86 \pm 1,46$ g/dl yang menandakan tikus telah

Tabel 1. Nilai gizi kukis berbasis sukun dan kedelai

Nilai gizi	Produk						P
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	
Energi (kkal)	485,17	483,18	491,03	492,83	497,13	499,88	1,000
Karbohidrat (g)	58,96	60,62	62,07	60,46	61,60	61,57	1,000
Protein (g)	10,33	10,45	11,29	11,61	11,65	11,88	1,000
Lemak (g)	15,78	15,20	15,72	16,21	16,5	16,81	1,000
Air (g)	10,12	9,40	8,35	8,47	7,65	7,21	1,000
Abu (g)	3,48	3,46	3,58	3,45	3,55	3,74	0,999
Serat kasar (mg)	2,86	2,67	2,40	2,66	2,63	2,04	1,000

Tabel 2. Karakteristik sampel penelitian sebelum intervensi

Karakteristik	Kelompok								P
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K+	K-	
Berat badan awal (g)	$90,67 \pm 8,12$	$95,33 \pm 4,55$	$101,1 \pm 13,77$	$104,33 \pm 12,86$	$101,1 \pm 9,76$	$103,83 \pm 13,47$	$102,16 \pm 13,99$	$101,16 \pm 13,18$	0,478
Asupan (g)	$7,83 \pm 1,17$	$7,33 \pm 1,21$	$7,00 \pm 1,09$	$7,00 \pm 1,09$	$8,16 \pm 0,75$	$7,5 \pm 0,84$	$5,83 \pm 1,94$	$4,83 \pm 1,72$	0,011
Kadar Hb awal (g/dl)	$9,08 \pm 0,76$	$9,67 \pm 1,17$	$9,80 \pm 1,62$	$8,40 \pm 1,83$	$7,6 \pm 1,65$	$8,6 \pm 1,10$	$8,85 \pm 1,17$	$13,35 \pm 1,36$	<0,001

mengalami anemia sedangkan pada tikus yang tidak diinduksi anemia diperoleh hasil rerata Hb $13,6 \pm 1,04$ g/dl yang artinya tikus sehat dan tidak anemia. Hasil uji statistik menggunakan ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antarkelompok perlakuan untuk data kadar Hb tikus yaitu pada kelompok K- terhadap kelompok lainnya.

Asupan pakan tikus

Pakan AIN 93 diberikan setiap hari dengan dosis 10 gram pada minggu pertama hingga minggu keempat dan 12 gram diberikan pada minggu kelima hingga minggu kedelapan penelitian. Penimbangan sisa pakan juga dilakukan setiap hari. Jumlah pakan yang masuk dihitung dengan mengurangi dosis pakan dan sisa pakan. **Gambar 1** menampilkan rerata asupan pakan seluruh kelompok tikus pada masa adaptasi yang mengalami peningkatan. Rerata asupan pakan seluruh kelompok perlakuan pada masa adaptasi adalah 7,06 g/ekor. Secara keseluruhan rerata asupan pakan setiap kelompok fluktuatif dengan jumlah yang bervariasi. Namun, berdasarkan uji statistik tidak terdapat perbedaan bermakna pada perubahan asupan tikus dari hari ke-1 hingga hari ke-45 penelitian ($p>0,05$).

Berat badan tikus selama penelitian

Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap seminggu sekali untuk mengetahui perubahan berat badan selama penelitian. Pada awal penelitian, tikus memiliki rerata berat badan sebesar $96,88 \pm 11,35$ g. Setelah

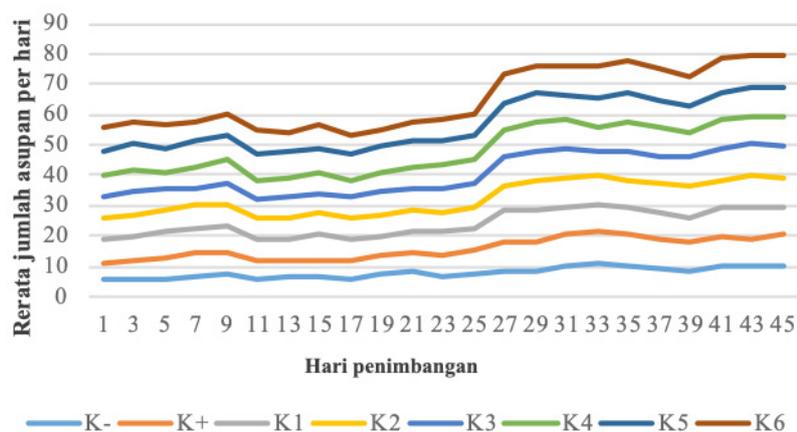
adaptasi, rerata berat badan tikus sebesar $99,98 \pm 11,62$ g. Saat induksi anemia, rerata berat badan tikus menjadi $109,9 \pm 11,63$ g dan setelah intervensi rerata berat badan menjadi $149,23 \pm 17,66$ g. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan pada awal penelitian ($p=0,4731$), setelah adaptasi, induksi anemia ($p=0,4782$), dan setelah intervensi ($p=0,1534$). Berat badan tikus mengalami peningkatan selama penelitian dengan jumlah berbeda antarkelompok perlakuan. Namun, berdasarkan uji statistik tidak terdapat perbedaan bermakna pada perubahan berat badan tikus selama penelitian ($p>0,05$).

Panjang dan lebar vili usus halus

Hasil uji statistik ANOVA pada **Tabel 3** menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna untuk tinggi vili duodenum, tinggi vili jejunum, dan lebar vili ileum ($p>0,05$). Akan tetapi, terdapat perbedaan yang bermakna untuk lebar vili pada duodenum dan jejunum serta tinggi vili ileum ($p<0,05$). Perbedaan lebar vili duodenum terdapat pada kelompok K3 yang diberikan FOS terhadap kelompok K- (tikus sehat). Perbedaan lebar vili jejunum terdapat pada K4 dan K1 sedangkan perbedaan tinggi vili ileum terdapat pada K1, K2, dan K+.

BAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian kukis fortifikasi prebiotik dan zat besi dalam perbaikan usus halus berupa peningkatan



Gambar 1. Rerata asupan tikus selama penelitian

Tabel 3. Hasil pengukuran panjang dan lebar vili usus halus

Variabel	Kelompok								P
	K-	K+	K1	K2	K3	K4	K5	K6	
Duodenum									
Tinggi (µm)	357,4±59,1	387±62,4	358,7±64,4	437,2±27,5	375,3±117,9	414,5±155,4	333,6±56,0	332,8±110,5	0,410
Lebar (µm)	120,8±53,5	76,6±23,6	87,9±12,2	98,5±14,9	65,9±13,2	81,7±17,4	73,8 ± 9,4	81,7±17,4	0,015*
Ileum									
Tinggi (µm)	195,5±50,2	140,9±35,2	216,2±29,2	215,6±40,8	169,7±50,2	167,4±27,8	146,1±31,1	190,2±43,4	0,004*
Lebar (µm)	66,0±17,4	49,9±24,1	65,8±19,4	48,5±3,2	52,7±13,9	53,7±11,1	50,5±16,8	70,3±23,6	0,174
Jejunum									
Tinggi (µm)	208,9±70,7	217±109,8	216,9±114,6	278,3±94,9	307,7±59,2	391,2±110,6	302,7±109,3	253,8±58,3	0,239
Lebar (µm)	81,1±17,9	72,7±23,4	91,3±13,6	86,6±17,2	71,4±26,3	52,8±15,1	61,8±12,6	62,6±10,2	0,007*

*signifikan pada p<0,05;

K- = tikus sehat tanpa induksi anemia yang diberi pakan standar AIN93-M; K+ = tikus anemia yang diberi pakan standar AIN93-M; K1 = tikus anemia yang diberi kukis dengan FOS dan fortifikasi NaFeEDTA (FOS+NAFE); K2 = tikus anemia yang diberi kukis dengan FOS dan fortifikasi FeSO₄ (FOS+FESO); K3 = tikus anemia yang diberi kukis dengan FOS tanpa fortifikasi zat besi (FOS+NOFE); K4 = tikus anemia yang diberi kukis tanpa prebiotik FOS tetapi dengan fortifikasi FeSO₄ (NOFOS+FE); K5 = tikus anemia yang diberi kukis tanpa prebiotik FOS tetapi dengan fortifikasi NaFeEDTA (NOFOS+NAFE); K6 = tikus anemia yang diberi kukis tanpa FOS dan fortifikasi zat besi (NOFOSFE).

panjang dan lebar vili pada usus halus. Pemberian prebiotik dapat meningkatkan kinerja usus dan pencernaan zat gizi melalui peningkatan mikroflora usus yang menguntungkan, menghasilkan asam rantai pendek dalam duodenum, jejunum, dan meningkatkan jumlah vili-vili usus halus [24]. Berdasarkan hasil penelitian terdapat perbedaan bermakna antara lebar vili jejunum kelompok tikus anemia yang diberikan kukis FOS dan NaFeEDTA (K1) dengan kelompok tikus yang diberikan kukis dan FeSO₄. Vili jejunum lebih lebar pada K1 (91,3±13,6) dibandingkan K4 (52,8±15,1). Hal serupa juga terjadi pada tinggi ileum antarkelompok perlakuan yaitu vili ileum pada tikus anemia yang diberikan kukis FOS dan NaFeEDTA (K1) serta tikus anemia yang diberikan kukis FOS dan FeSO₄ (K2) memiliki vili lebih tinggi dibandingkan tikus anemia yang tidak mendapat intervensi (K+).

Fruktooligosakarida (FOS) sebagai prebiotik merupakan bahan pakan yang memberikan keuntungan dan tidak dapat tercerna hewan inang, serta secara selektif menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas bakteri nonpatogen saluran pencernaan [25]. Peningkatan tinggi dan lebar vili usus halus dipengaruhi oleh peningkatan asam lemak rantai pendek dari hasil fermentasi bakteri nonpatogen tersebut. Asam lemak rantai pendek berperan dalam stimulasi perbanyakan sel epitel usus karena asam lemak ini merupakan komponen fosfolipid membran sel [26]. Semakin tinggi vili usus halus, maka permukaan

absorpsi akan semakin luas sehingga pencernaan terhadap zat-zat makanan akan lebih baik [27].

Hal ini juga didukung oleh penelitian [28,29] yang menyatakan mekanisme kerja prebiotik terhadap kondisi saluran pencernaan pada ayam pedaging yaitu prebiotik difermentasi oleh mikrobiota yang menguntungkan dalam usus halus sehingga menghasilkan *short chain fatty acids* (SCFA) dan asam laktat yang mampu menurunkan pH usus menjadi asam. Kondisi asam meningkatkan bakteri nonpatogen sehingga terjadi proses eliminasi bakteri patogen yang menempel pada vili-vili usus. Proses eliminasi bakteri patogen akan memperluas permukaan vili-vili usus sehingga penyerapan makanan menjadi lebih efisien dan berdampak pada performa yang berkaitan dengan usus ayam pedaging tersebut. Prebiotik dapat merangsang pertumbuhan bakteri asam laktat dalam usus sehingga penyerapan makanan menjadi lebih efisien dan berdampak pada penambahan berat badan. Hal tersebut juga dijelaskan dalam penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa bahwa penggunaan prebiotik umbi bunga dahlia ternyata dapat mempengaruhi penambahan bobot badan (PBB) pada karkas ayam pedaging [28]

Lebih lanjut, penelitian lain menjelaskan bahwa prebiotik pada umbi garut yang berupa inulin dan oligosakarida difermentasi oleh bakteri asam laktat melalui proses glikolisis. Asam laktat yang dihasilkan akan menurunkan pH. Hal ini juga menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan umbi garut, maka

daya hambat bakteri patogen akan semakin meningkat. Daya hambat bakteri patogen dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, penurunan pH, ketersediaan oksigen, adanya bakteriosin, dan interaksi dari beberapa faktor tersebut. pH merupakan salah satu faktor yang dominan. Bakteri patogen biasanya tidak tahan terhadap kondisi asam, seperti pada studi yang menyebutkan bahwa bakteri *E. coli* tidak dapat bertahan hidup pada kondisi di bawah pH 4. Prebiotik digunakan untuk meningkatkan aktivitas dan pertumbuhan bakteri asam laktat sehingga mempercepat penurunan pH. pH merupakan salah satu indikator daya hambat, selain bakteriosin. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa semakin rendah pH maka daya hambat akan semakin meningkat.

Pada penelitian sebelumnya [30] juga menjelaskan terkait kadar serat pada umbi garut, semakin besar penambahan umbi garut dalam bentuk tepung maupun pati, maka kadar serat semakin tinggi yang berarti pula kadar prebiotik semakin tinggi. Inulin yang berperan sebagai prebiotik ini oleh bakteri asam laktat dalam yoghurt akan difermentasi yang menghasilkan asam laktat dan asam-asam lemak rantai pendek. Dalam penelitian ini, bahan pangan yang digunakan berupa tepung sukun juga memiliki kandungan serat yang cukup tinggi yaitu sebesar 2,49% [31].

Struktur mukosa saluran pencernaan dapat memberi berbagai informasi mengenai kesehatan saluran pencernaan. Stresor yang ada pada saluran pencernaan, relatif cepat dapat merubah mukosa intestinal. Perubahan morfologi mukosa intestinal seperti vili yang lebih pendek dan kripta yang kurang dalam terkait dengan keberadaan toksin atau pergantian jaringan yang lebih tinggi. Kripta dapat dianggap sebagai pabrik vili, kripta yang lebar menunjukkan pergantian jaringan yang cepat. Vili yang lebih pendek dan kripta yang kurang dalam akan meningkat pada keadaan adanya bakteri patogen yang mengakibatkan absorbs sel sedikit dan banyak mensekresikan sel [32].

Studi lain menyatakan bahwa peningkatan lebar vili pada usus halus disebabkan oleh bakteri asam laktat yang meningkatkan produksi asam lemak berantai pendek dan menurunkan produksi ammonium [33]. Asam lemak rantai pendek berperan dalam menstimulasi perbanyakan sel epitel usus. Menurunnya produksi ammonium berarti

tetap menjaga kondisi pH usus dalam yaitu dalam keadaan asam. Peningkatan lebar vili diasosiasikan dengan lebih luasnya permukaan vili untuk absorpsi bahan makanan masuk ke dalam aliran darah [34].

Hasil penelitian ini juga menemukan perbedaan bermakna antara vili duodenum pada kelompok tikus anemia yang diberikan kukis dengan FOS tanpa fortifikasi zat besi (K3) dengan tikus sehat tanpa induksi anemia (K-). Vili duodenum pada K- ($120,8 \pm 53,5$) lebih lebar dibandingkan K3 ($65,9 \pm 13,2$). Hal tersebut mungkin terjadi karena kadar FOS pada produk makanan sangat bergantung pada pH, waktu, dan suhu pemanasan saat produksi makanan. Retensi FOS terjadi pada produk yang dipanaskan dengan suhu tinggi dan waktu yang singkat berkisar antara 75-90% [35]. Pada penelitian ini tidak dilakukan analisis FOS sehingga tidak diketahui ada atau tidaknya kerusakan FOS selama pemanggangan. Apabila terdapat kerusakan FOS dalam kukis tersebut, maka dapat menyebabkan kadar FOS tidak mencukupi untuk memberikan efek terhadap perbaikan vili usus halus.

Pemberian prebiotik dapat meningkatkan kinerja usus sehingga penyerapan zat gizi lebih optimal. Semakin banyak penyerapan zat gizi, maka akan mempengaruhi tinggi dan lebar vili usus [36]. Pemberian prebiotik mempengaruhi histologis pada usus halus disebabkan oleh peningkatan populasi bakteri menguntungkan yang memasok *nutrient* dan merangsang vaskularisasi dan perkembangan vili usus (Bedford *et al.*, 2000). Prebiotik akan meningkatkan ketebalan usus yang dapat membantu proses penyerapan, meningkatkan zat gizi yang diserap, dan mengurangi kebutuhan metabolik dari sistem pencernaan [37].

SIMPULAN DAN SARAN

Tikus yang diberikan kukis berbasis sukun dan kedelai yang difortifikasi FOS dan NaFeEDTA memiliki vili jejunum lebih lebar dibandingkan tikus yang diberikan kukis dan fortifikasi FeSO_4 . Selain itu, vili ileum tikus yang diberikan FOS dan NaFeEDTA serta FOS dan FeSO_4 lebih tinggi dibandingkan kontrol. Sementara itu, vili duodenum pada kelompok kontrol lebih lebar dibandingkan kelompok tikus yang diberikan FOS. Peningkatan lebar dan tinggi

vili pada kelompok yang diberi FOS dipengaruhi oleh keberadaan prebiotik yang meningkatkan populasi bakteri baik yang menyediakan zat gizi dan menstimulasi vaskularisasi serta perkembangan vili usus. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat melibatkan analisis FOS untuk mengetahui kerusakan FOS dalam produk yang dapat menyebabkan kadar FOS tidak mencukupi untuk memberikan efek perbaikan vili usus halus.

Pernyataan konflik kepentingan

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini.

RUJUKAN

1. World Health Organization (WHO). The global prevalence of anaemia in 2011. [series online] 2015 [cited 2018 Sept 24]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564960>
2. Kemenkes RI. Riset kesehatan dasar 2013. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2013.
3. Citrakusumasari. Anemia gizi, masalah dan pencegahannya. Yogyakarta: Kalika; 2012.
4. Permaesih D, Herman S. Faktor-faktor yang mempengaruhi anemia pada remaja. Buletin Penelitian Kesehatan. 2005;33(4):162–71.
5. Guha DK, Walia BNS, Tandon BN, Deo MG, Ghai OP. Small bowel changes in iron-deficiency anaemia of childhood. Arch Dis Childh. 1968;43(228):239–44. doi: 10.1136/adc.43.228.239
6. Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014; 307(4):G397–409. doi: 10.1152/ajpgi.00348.2013
7. Li Y. Dietary iron deficiency and oversupplementation increase intestinal permeability, ion transport, and inflammation in pigs. J Nutr. 2016;146(8):1499–505. doi: 10.3945/jn.116.231621
8. Soekirman, Martianto D, Airesa K. Fortifikasi pangan strategi global penanggulangan kurang zat gizi mikro. Jakarta: Yayasan Kegizian untuk Pengembangan Fortifikasi Pangan Indonesia; 2015.
9. Muryanti S. Kue kering. Yogyakarta: Venus; 2009.
10. Ferawati, Muchtadi D. Formulasi dan pembuatan banana bars berbahan dasar tepung kedelai, terigu, singkong dan pisang sebagai alternatif pangan darurat. J Teknol Pangan. 2009;2(1):67–78.
11. Cheung YB, Xu Y, Mangani C, Fan Y, Dewey KG, Salminen SJ, et al. Gut microbiota in Malawian infants in a nutritional supplementation trial. Trop Med Int Heal. 2016;21(2):283–90. doi: 10.1111/tmi.12650
12. Waryat M, Handayani Y. Diversifikasi pangan dari tepung sukun untuk mengurangi konsumsi tepung terigu di Kepulauan Seribu, Provinsi DKI Jakarta. Buletin Pertanian Perkotaan. 2014;4(1):13–9.
13. Nuraida L, Palupi NS, Putri DE, Widayanti NWY. Potensi talas (*Colocasia esculenta (L) schott*) dan sukun (*Artocarpus altilis (park) fosberg*) untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat probiotik. In: Prosiding Mikrobiologi dan Bioteknologi. Yogya; 2006.
14. Warchol M, Perrin S, Grill J, Schneider F. Characterization of a purified β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. Lett Appl Microbiol. 2002;35:462–7.
15. Hurrell RF. Fortification: overcoming technical and practical barriers. J Nutr. 2002;132(4 Suppl):806S–12S. doi: 10.1093/jn/132.4.806S
16. Kandarina I, Helmyati S, Lily Arsanti L. Efektifitas pemberian biskuit tepung singkong yang difortifikasi zat besi pada anak usia sekolah dasar di Kabupaten Bantul: upaya mengatasi defisiensi gizi mikro berbasis pangan lokal. [Laporan Laporan Akhir Hibah Penelitian Strategis Nasional]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada; 2010.
17. Buhnik-Rosenblau K, Moshe-Belizowski S, Danin-Poleg Y, Meyron-Holtz EG. Genetic modification of iron metabolism in mice affects the gut microbiota. Biometals. 2012;25(5):883–92. doi: 10.1007/s10534-012-9555-5
18. Allen L, Benoist B De, Dary O, Hurrell R. Guidelines on food fortification with micronutrients. [series online] 2006 [cited 2018 Sept 24]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9241594012>
19. Nurdityawati E, Helmyati S. Pengaruh fortifikasi besi terhadap sifat antibakteri susu fermentasi sinbiotik [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada; 2013.
20. Nurhamidah E. Pengaruh pemberian ekstrak ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas poiret*) terhadap kadar glukosa darah, kadar immunoglobulin A (IgA), dan villi usus pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) diabetes melitus. Scientia Jurnal Farmasi dan Kesehatan. 2014;4(1):22–8.
21. Islamiah AR. Uji toksisitas akut gelatin babi pada tikus betina galur Sprague dawley [Skripsi]. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah; 2016.
22. Van Putten LM. The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP32 in vivo. Blood. 1958;13(8):789–794.
23. Sunarno, Goeltoem RJ, Mardiaty SM. Aplikasi pakan kaya nutrisi dengan suplementasi daging ikan gabus (*Channa striata*) dan perannya dalam perbaikan struktur duodenum: kajian in vivo pada tikus wistar yang diberi perlakuan stres. Bioma Jurnal Ilmiah Biologi. 2016;5(1):43–60. doi: 10.26877/bioma.v5i1.1493

24. Gomez-Alcon RA, Dudas C, Huber JT. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J Dairy Sci.* 1990;73(3):703-10. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78723-1
25. Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr.* 2007;137(11 Suppl):2493S-2502S. doi: 10.1093/jn/137.11.2493S
26. Gunal M, Yayli G, Kaya O, Karahan N, Sulak O. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *International Journal of Poultry Science.* 2006;5(2):149-55. doi: 10.3923/ijps.2006.149.155
27. Dellman HD, Brown E. *Histologi veteriner ed. III.* Jakarta: UI Press; 1992.
28. Fanani AF, Shutama N, Sukanto B. Retensi nitrogen dan konversi pakan ayam lokal persilangan yang diberi ekstrak umbi dahlia (*dahlia variabilis*) sebagai sumber inulin. *Jurnal Sains Peternakan.* 2014;12(2):35-7. doi: 10.20961/sainspet.v12i2.4762
29. Widodo TS, Sulistiyanto B, Utama CS. Jumlah bakteri asam laktat (BAL) dalam digesta usus halus dan sekum ayam broiler yang diberi pakan ceceran pabrik pakan yang difermentasi. *Jurnal Agripet.* 2015;15(2):98-103. doi: 10.17969/agripet.v15i2.2376
30. Rosa NR. Pengaruh penambahan umbi garut (*Maranta arundinaceae* L) dalam bentuk tepung dan pati sebagai prebiotik pada yoghurt sebagai produk sinbiotik terhadap daya hambat bakteri *Escherichia Coli* [Disertasi]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2010.
31. Astuti TYI, Ekawati LM, Purwijantiningsih, Pranata S. Substitusi tepung sukun dalam pembuatan non flaky crackers bayam hijau (*Amaranthus tricolor*). *Jurnal Agros.* 2013;1-13.
32. Giannenas I, Papaneophytou CP, Tsalie E, Pappas I, Triantafillou E, Kontopidis GA, et al. Dietary supplementation of benzoic acid and essential oil compounds affects buffering capacity of the feeds, performance of turkey poults and their antioxidant status, pH in the digestive tract, intestinal microbiota and morphology. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2014;27(2):225-36. doi: 10.5713/ajas.2013.13376
33. Samanta S, Haldar S, Ghosh TK. Comparative efficacy of an organic Acid blend and bacitracin methylene disalicylate as growth promoters in broiler chickens: effects on performance, gut histology, and small intestinal milieu. *Vet Med Int.* 2010;2010:645150. doi: 10.4061/2010/645150
34. Miles RD, Butcher GD, Henry PR, Littell RC. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poult Sci.* 2006;85(3):476-85. doi: 10.1093/ps/85.3.476
35. Zhang J, Liu C, Xie Y, Li N, Ning Z, Zhong Y, et al. Enhancing fructooligosaccharides production by genetic improvement of the industrial fungus *Aspergillus niger* ATCC 20611. *J Biotechnol.* 2017;249:25-33. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.03.021
36. Solis de los Santos F, Farnell MB, Tellez G, Balog JM, Anthony NB, Donoghue AM, et al. Effect of prebiotik on gut development and ascites incidence of broilers reared in a hypoxic environment. *Poultry Sci.* 2005;84(7):1092-100. doi: 10.1093/ps/84.7.1092
37. Mamiek B. *Fermacto versus enzymes.* USA: Fermacto. Pet. Ag. Inc. ed., Elgin, IL; 1993.