

1. RANC
2. APLIKASI

KK
TKD 21/02
Aid
P

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI
FERRO SULFAT BERSAMA ASAM ASKORBAT DAN ASAM SITRAT
TERHADAP STATUS ZAT BESI PADA TIKUS *Rattus norvegicus*
DENGANKEADAAN DEFISIENSI ZAT BESI**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



ARYATI ABDUL

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI
FERRO SULFAT BERSAMA ASAM ASKORBAT DAN ASAM SITRAT
TERHADAP STATUS ZAT BESI PADA TIKUS *Rattus norvegicus*
DENGAN KEADAAN DEFISIENSI ZAT BESI**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh:

**ARYATI ABDUL
NIM 099913290/M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002
Tanggal 6 Mei 2002**



Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 22 APRIL 2002**

Oleh

Pembimbing



**dr. Retno Handajani MS., Ph.D
NIP 130 541 984**

Mengetahui

**Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**dr. Soetjipto, MS., Ph.D
NIP 130 687 606**

**Telah diuji pada
Tanggal 6 Mei 2002
PANITIA PENGUJI TESIS**

Ketua : Prof. Sri Utari Purnomo S., dr.

**Anggota : 1. dr. Retno Handayani MS., Ph.D
2. Dr.dr. Indri Safitri, MS.
3. Dr. dr. Harianto Notopuro, MS
4. dr. Muhammad Cholil Munif, AIF.,**



UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagai umat yang beragama sepatutnyalah penulis memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, karena hanya dengan rahmat dan hidayahNya jualah tesis ini dapat diselesaikan.

Dalam penyelesaian tesis ini, tidak lepas dari bantuan berbagai pihak yang telah memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu dengan setulus hati perkenankan penulis menyampaikan terima kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya teristimewa kepada yang terhormat dr. Retno Handajani. MS., Ph.D selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan sejak dari perencanaan penelitian sampai pada penulisan tesis ini.

Pada kesempatan ini pula perkenankanlah penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada yang terhormat,

Rektor Universitas Airlangga yang dijabat oleh Prof. Dr. H. Puruhito, dr. Sp.B telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Direktur Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Muhammad Amin, dr. yang telah menerima dan memberikan kesempatan kepada penulis menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dr. Soetjipto, MS. PhD yang telah banyak memberikan motivasi sehubungan dengan penyelesaian studi .

Ketua Peminatan Studi Ilmu Biokimia Prof. Sri Utari Purnomo S.,dr yang selalu memberikan bimbingan dan motivasi sejak penulis diterima sebagai mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga sampai tahap penyelesaian studi.

Seluruh staf pengajar Program Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah banyak memberikan bekal ilmu yang sangat berguna bagi perjalanan karir penulis selanjutnya sebagai seorang pendidik.

Mantan Rektor IKIP Gorontalo Prof. Dr. Hi Nani Tuloli dan Rektor IKIP Gorontalo Dr. Ir Nelson Pomalingo M.Pd yang telah memberikan izin kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Pascasarjana di Universitas Airlangga Surabaya.

Pemerintah Cq. Menteri Pendidikan Nasional yang telah memberikan bantuan finansial melalui Bea Siswa Pascasarjana sehingga dapat meringankan beban penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Seluruh staf dan karyawan Laboratorium Ilmu Biokimia FK Unair cq. Bpk. Suheri yang telah banyak memberikan bantuan sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini..

Kedua orang tua (Abd.K.Abdullah (alm.) dan A. Duhe) yang tercinta yang dengan susah payah mengasuh dan membesarkan serta memberikan landasan hidup yang kokoh bagi penulis.

Suami tercinta Hamdin Panto, Drs dan anak-anak tersayang Mahmud Buyung Syafryadi, Ahmad Rajiv Agung, Aida Rahmatiya yang dengan penuh ketabahan dan kesabaran, serta pengorbanannya selama penulis menyelesaikan studi.

Kakak dan adik-adik tercinta yang telah memberikan motivasi untuk keberhasilan penulis dalam studi

Teman-teman peminatan Ilmu Biokimia angkatan 1999/2000 (Triawanti, dr. Kadek Rahmawaty,drh.) yang telah banyak memberikan bantuan dan sumbangan pikiran serta semangat untuk belajar sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.

Ishak Isa, Drs.,Msi. sekeluarga dan Herlina Yusuf, Dra yang telah banyak memberikan bantuan moril maupun materil dan motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan studi.

Kepada seluruh keluarga dan handai tolan yang telah memberikan bantuan kepada penulis sejak awal hingga akhir studi di Pasccasarjana Universitas Airlangga .

Semua bantuan yang penulis peroleh tidak dapat dibalas dengan apapun jua, selain mengharapkan imbalan dari Yang Maha Kuasa, semoga apa yang telah diberikan merupakan ibadah.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan .Semoga tesis ini akan bermanfaat.

Amiin Yarabbal Alamiin.

Surabaya, Mei 2002

Penulis



RINGKASAN

Anemia akibat kekurangan zat besi masih merupakan masalah gizi pokok di Indonesia. Masyarakat terutama wanita hamil dan menyusui, wanita dewasa, anak dan bayi merupakan kelompok yang mempunyai risiko tinggi untuk terjadinya anemia kekurangan zat besi. Penyebab utama anemia kekurangan zat besi adalah ketidak seimbangan antara masukan zat besi melalui absorpsi oleh usus dengan jumlah zat besi yang dibutuhkan oleh tubuh untuk mengimbangi kehilangan zat besi fisiologi atau patologi dan kebutuhan akibat pembentukan jaringan baru. Asam askorbat dan asam sitrat merupakan senyawa organik yang dapat meningkatkan absorpsi zat besi ke dalam usus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat terhadap peningkatan status zat besi tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.

Penelitian ini menggunakan tikus sejumlah 60 ekor jenis kelamin betina strain wistar umur sekitar 4 minggu. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Post-test Only Control Group Design*. Sebelum diberi perlakuan tikus dibuat defisiensi zat besi dengan memberikan pakan rendah zat besi selama 8 minggu. Setelah defisiensi zat besi tikus dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan masing-masing P1 = ferro sulfat 3.6 mg; P2 = kombinasi ferro sulfat 3.6 mg dan asam askorbat 4.5 mg; P3 = kombinasi ferro sulfat 3.6 mg dan asam sitrat 5.4 mg dan P4 = kombinasi ferro sulfat 3.6 mg, asam askorbat 4.5 mg dan asam sitrat 5.4 mg. Dosis yang diberikan telah dikonversi dari dosis FeSO₄ 200 mg, asam askorbat 250 mg dan asam sitrat 300 mg yang digunakan pada manusia dengan faktor konversi manusia – tikus adalah 0.018. Parameter yang digunakan untuk mengukur status zat besi pada tikus adalah kadar Hb, kadar zat besi serum (SI), kadar TIBC dan persen saturasi transferrin. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji anava multivariat.

Hasil penelitian dan uji statistik menunjukkan bahwa setelah 4 minggu pemberian pakan rendah zat besi telah terjadi penurunan pada kadar zat besi serum sedangkan kadar Hb dan persen saturasi transferrin penurunannya masih dalam batas normal, kadar TIBC peningkatannya juga masih dalam batas normal. Setelah 8 minggu pemberian pakan rendah zat besi telah terjadi penurunan status zat besi dalam darah tikus yang ditandai dengan penurunan kadar zat besi serum, saturasi transferrin dan kadar Hb secara bermakna sedangkan kadar TIBC peningkatannya tidak berbeda bermakna. Setelah 2 minggu perlakuan diperoleh hasil bahwa pada seluruh kelompok perlakuan telah terjadi peningkatan status zat besi pada tikus yang ditandai dengan meningkatnya kadar Hb, kadar zat besi serum dan persen saturasi transferrin, serta menurunnya kadar TIBC secara bermakna bila dibandingkan dengan keadaan sebelum diberi perlakuan (keadaan defisiensi zat besi). Rata-rata untuk kadar Hb dari 11.3 gram% meningkat hingga 15.02 gram %, kadar zat besi serum dari 72.29 ug/dl meningkat hingga 223.28 ug/dl, kadar TIBC dari 543.15 ug/dl menurun hingga 479.627 ug/dl dan persentase saturasi transferrin dari 13,32 % meningkat hingga 46.61 %. Dari keempat kelompok perlakuan diperoleh bahwa kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat yang menunjukkan peningkatan status zat besi pada tikus paling tinggi jika dibandingkan dengan tiga kelompok perlakuan lainnya. Jadi dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat dapat meningkatkan status zat besi pada tikus lebih baik dari tiga kelompok perlakuan lainnya.

ABSTRACT

Iron-deficient anemia remains a remarkable nutritional problem in Indonesia. It is recognized that ascorbic acid is one of iron-absorption enhancer factor, and citric acid is an organic compound that acts synergistically with ascorbic acid in enhancing iron absorption.

The aim of this study was to find out whether the administration of ferrous sulfate, ascorbic acid, and citric acid either alone or in combination, with converted dose may increase iron status in iron-deficient rats.

Sixty female Wistar strain rats of 4 weeks old were used. The Post-test Only Control Group Design was used to analyze the data in this study. Before treatment, those rats were rendered to be iron-deficient by giving low-iron diet for 8 weeks. After becoming iron-deficient, the animals were divided into 4 treatment groups, as follows : T1 = ferrous sulfate 3.6 mg/day; T2 = ferrous sulfate 3.6 mg/day and ascorbic acid 4.5 mg/day; T3 = ferrous sulfate 3.6 mg/day and citric acid 5.4 mg/day; T4 = ferrous sulfate 3.6 mg/day, ascorbic acid 4.5 mg/day and citric acid 5.4 mg/day. The dose was converted dose with correction factor of 0.018. Parameters used to measure iron status in rats were Hb level, serum iron (SI), total iron binding capacity (TIBC), and transferrin saturation percentage.

Results showed that after being treated for 2 weeks, all groups experienced increased iron status, indicated by the increase of Hb level, SI and transferrin saturation percentage, and decreased TIBC level significantly ($p < 0.05$) compared to that before treatment (during iron-deficient condition). Hb level increase from 11.3 gram % to 15.02 gram %, SI level increase from 72.29 ug/dl to 223.28 ug/dl, TIBC level decrease from 543.15 ug/dl to 479.627 ug/dl and transferrin saturation increase from 13.32% to 46.61 %. From all treatment group, P4, which treated with combined ferrous sulfate, ascorbic acid, and citric acid, showed the highest increase of iron status compared to other treatment groups.

Keywords: *iron-deficient anemia, combination of ferrous sulfate, ascorbic acid, and/or citric acid, Hb, SI, TIBC, and transferrin saturation percentage*

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	ix
Abstrak	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Metabolisme Zat Besi	7
2.1.1 Zat Besi Dalam Tubuh Manusia	7
2.1.2 Absorpsi Zat Besi Dalam Tubuh	8
2.1.2.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi absorpsi zat besi	10
2.1.2.2 Mekanisme absorpsi zat besi dalam tubuh	13
2.1.3 Pengangkutan Zat Besi Dalam Tubuh	17
2.1.4 Kinetika Zat Besi Dalam Tubuh	21
2.1.5 Penyimpanan Dan Pemanfaatan Zat Besi Dalam Tubuh.....	21
2.1.6 Biosintesis Dan Degradasi Hemoglobin	26
2.1.6.1 Biosintesis hemoglobin	26
2.1.6.2 Degradasi hemoglobin	30

2.1.7	Defisiensi Zat Besi	35
2.2	Asam Askorbat	37
2.2.1	Kebutuhan Asam Askorbat	37
2.2.2	Metabolisme Asam Askorbat	38
2.3	Asam Sitrat	43
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	46
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	46
3.2	Hipotesis	49
BAB 4	METODE PENELITIAN	50
4.1	Rancangan Penelitian	50
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	51
4.3	Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional	52
4.3.1	Variabel Penelitian	52
4.3.2.1	Variabel bebas	52
4.3.2.2	Variabel terikat	52
4.3.2.3	Variabel kendali	52
4.3.2	Definisi Operasional	52
4.3.2.1	Pemberian ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat	52
4.3.2.2	Keadaan defisiensi zat besi	53
4.3.2.3	Pakan hewan coba	53
4.3.2.4	Waktu pemberian pakan perlakuan	54
4.4	Bahan Penelitian	54
4.4.1	Pahan Pakan Penelitian	54
4.4.2	Bahan Yang Diperiksa	55
4.5	Instrumen Penelitian	55
4.5.1	Pemeriksaan Kadar Hemoglobin	55
4.5.2	Pemeriksaan Kadar Zar Besi Serum	55
4.5.3	Pemeriksaan Kadar <i>Total Iron Binding Capacity</i> (TIBC).....	56
4.5.4	Perhitungan Persentase Saturasi Transferrin	57
4.6	Waktu dan Tempat Penelitian	57
4.7	Prosedur Penelitian	57
4.8	Analisis Data	59
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	61
5.1	Data hasil pemberian pakan rendah zat besi	61
5.2	Data hasil pengukuran berat badan sebelum dan sesudah perlakuan	64

5.3	Data hasil pengukuran status zat besi setelah perlakuan selama 2 minggu	66
5.3.1	Kadar Hemoglobin	66
5.3.2	Kadar zat besi serum	67
5.3.3	Kadar <i>total iron binding capacity</i> (TIBC)	69
5.3.4	Saturasi transferrin dalam serum	70
BAB	6 PEMBAHASAN	72
BAB	7 KESIMPULAN DAN SARAN	80
7.1	Kesimpulan	80
7.2	Saran	80

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Proses transferrin dan reseptornya mengantarkan zat besi ke dalam sel.....	20
Gambar 2.2 : Ringkasan metabolisme zat besi pada orang dewasa	23
Gambar 2.3 : Struktur apoferritin	24
Gambar 2.4 : Struktur heme	26
Gambar 2.5 : Biosintesis porfobilinogen	27
Gambar 2.6 : Pembentukan uroporfirinogen	28
Gambar 2.7 : Tahapan dalam biosintesis porfirin dari porfobilinogen	29
Gambar 2.8 : Ringkasan degradasi hemoglobin	32
Gambar 2.9 : Konjugasi bilirubin	34
Gambar 2.10 : Biosintesis asam askorbat	39
Gambar 2.11 : Metabolisme asam askorbat	40
Gambar 2.12 : Pembentukan oksalat	43
Gambar 3.1 : Bagan kerangka konseptual penelitian	48
Gambar 4.1 : Bagan kerangka operasional penelitian	60
Gambar 5.1 : Rerata kadar hemoglobin menurut waktu pengamatan	62
Gambar 5.2 : Rerata kadar zat besi dalam serum menurut waktu pengamatan	63
Gambar 5.3 : Rerata kadar TIBC menurut waktu pengamatan	63
Gambar 5.4 : Rerata saturasi transferrin menurut waktu pengamatan.....	64
Gambar 5.5 : Rerata kadar hemoglobin setelah perlakuan selama 2 minggu	66
Gambar 5.6 : Rerata kadar zat besi dalam serum setelah perlakuan selama 2 minggu	68
Gambar 5.7 : Rerata kadar kapasitas total pengikatan zat besi (TIBC) setelah perlakuan selama 2 minggu	69
Gambar 5.8 : Rerata saturasi transferrin dalam serum setelah perlakuan selama 2 minggu	71

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 : Data status zat besi setelah pemberian pakan rendah zat besi menurut waktu pengamatan	61
Tabel 5.2 : Data hasil pengukuran berat badan dan pertambahan berat badan tikus (gram)	65
Tabel 5.3 : Data hasil pengukuran kadar Hemoglobin (gram %)	66
Tabel 5.4 : Data hasil pengukuran kadar zat besi dalam serum (ug/dl).....	67
Tabel 5.5 : Data hasil pengukuran kadar kapasitas total pengikatan zat besi dalam serum (TIBC) (ug/dl)	69
Tabel 5.6 : Data hasil pengukuran kadar saturasi transferrin (%)	70



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Perhitungan dosis untuk zat besi, asam askorbat dan asam sitrat.....	87
Lampiran 2 : Susunan pakan penelitian.....	89
Lampiran 3 : Prosedure pemeriksaan darah.....	92
Lampiran 4 : Prosedur pemeriksaan kadar Fe dan protein pada pakan.....	96
Lampiran 5 : Kadar normal status zat besi tikus.....	98
Lampiran 6 : Hasil pengukuran status zat besi dan berat badan awal hewan coba tikus.....	99
Lampiran 7 : Analisis statistik setelah pemberian pakan rendah zat besi.....	103
Lampiran 8 : Analisis statistik hasil pengukuran berat badan tikus.....	110
Lampiran 9 : Analisis statistik setelah perlakuan.....	116



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah.

Indonesia adalah negara yang kaya dengan sumber alam yang merupakan sumber utama zat gizi. Namun di lain pihak sebagian besar penduduk menderita anemia kurang gizi. Anemia kurang gizi yang sering dijumpai terutama adalah anemia kekurangan zat besi. Anemia akibat kekurangan zat besi masih merupakan salah satu masalah pokok kekurangan gizi di Indonesia. Masyarakat terutama wanita hamil dan menyusui, wanita dewasa, anak dan bayi merupakan kelompok yang mempunyai risiko tinggi untuk terjadinya anemia kekurangan zat besi (Sumarno, 1996; Sediaoetama, 1999). Di Indonesia dilaporkan bahwa prevalensi anemia kurang zat besi masih cukup tinggi, pada ibu hamil sekitar 50,9%, balita 55,5%, wanita dewasa 30 – 40%, dan anak usia 6 bulan – 12 tahun sekitar 24 – 35% (Wirakusumah, 1999).

Anak yang menderita anemia kurang zat besi akan mengalami gangguan pertumbuhan fisik dan hambatan perkembangan kecerdasan serta penurunan aktivitas fisik. Pada ibu hamil akan mengakibatkan timbulnya gangguan kehamilan atau persalinan seperti keguguran, perdarahan, bahkan menyebabkan kematian bagi ibu dan anak. Disamping itu janin yang dikandung dapat mengalami kekurangan gizi, lahir dengan berat badan rendah (BBLR) atau lahir prematur. Sedangkan bagi pekerja wanita akan menyebabkan lesu, cepat lelah, tenaga berkurang sehingga menyebabkan produktivitas menurun (Sartono, 1996; Wirakusumah, 1999).



Pada anemia kekurangan zat besi terjadi ketidakseimbangan antara masukan zat besi melalui absorpsi oleh usus dengan jumlah zat besi yang dibutuhkan oleh tubuh untuk mengimbangi kehilangan zat besi fisiologi atau patologi dan kebutuhan akibat pembentukan jaringan baru (Layrisse, 1985 dalam Bakta, 1993).

Zat besi yang terdapat dalam bahan makanan dapat berasal dari hewan maupun tumbuhan, dimana selain mengandung zat besi, bahan makanan tersebut juga mengandung komponen-komponen penghambat maupun pemacu absorpsi zat besi. Bahan pangan terutama pangan nabati banyak mengandung komponen penghambat absorpsi zat besi ke dalam tubuh seperti senyawa polyfenol dan asam fitat. Senyawa-senyawa ini dapat mengikat zat besi, sehingga zat besi tidak dapat diabsorpsi. Sedangkan komponen seperti asam askorbat, protein dan asam sitrat dapat meningkatkan absorpsi zat besi ke dalam tubuh (Beck, 1993; Hallberg, *dkk.*, 1994).

Untuk mengatasi anemia defisiensi zat besi dapat diterapi dengan memberikan preparat zat besi. Selain itu untuk meningkatkan absorpsi zat besi dapat dilakukan dengan penambahan asam askorbat dan asam sitrat agar zat besi dapat diabsorpsi dengan lebih baik.

Asam askorbat (Vitamin C) merupakan salah satu faktor pemacu absorpsi zat besi yang paling kuat. Senyawa ini bekerja dengan meningkatkan kelarutan zat besi dengan mengkonversi zat besi bentuk ferri (Fe^{3+}) menjadi bentuk ferro (Fe^{2+}) dan dapat membentuk kompleks askorbat-besi yang larut, sehingga zat besi mudah diabsorpsi oleh usus. (Hallberg, *dkk.*, 1994; Crawford, 1995; Bender, *dkk.*, 1997).

Berbagai penelitian yang dilakukan telah membuktikan bahwa asam askorbat dapat meningkatkan absorpsi zat besi antara lain; Hunt, *dkk.*, (1994) melaporkan

hasil penelitian yang dilakukan pada manusia yang sehat dan mengonsumsi makanan dengan ketersediaan hayati yang rendah, dengan menambahkan 500 mg asam askorbat pada makanan, akan terjadi peningkatan absorpsi zat besi sebanyak 2,3 kali. Davidsons, *dkk.*, (1998) melaporkan dengan penambahan asam askorbat 50 mg pada minuman susu rasa coklat yang difortifikasi dengan ferro sulfat, absorpsi zat besi akan meningkat sebanyak 3 kali.

Selain asam askorbat, senyawa organik yang lain misalnya asam sitrat memiliki kemampuan untuk dapat membantu meningkatkan absorpsi zat besi dengan membentuk kompleks dengan zat besi. Asam sitrat dapat bekerja sinergis dengan asam askorbat dalam meningkatkan absorpsi zat besi ke dalam usus (Crawford, 1995)

Meningkatnya angka kejadian anemia defisiensi zat besi di Indonesia disebabkan oleh karena konsumsi makanan masyarakat sehari-hari terutama yang tinggal dipedesaan adalah makanan dengan ketersediaan hayati yang rendah (Bakta, 1993). Hal ini disebabkan karena diet yang dikonsumsi sebagian besar terdiri dari zat besi *nonheme* dengan ketersediaan hayati yang rendah, zat pemacu yang rendah serta bahan penghambat absorpsi zat besi terdapat dalam jumlah yang tinggi, sehingga kebutuhan zat besi tidak terpenuhi. Mengonsumsi bahan pangan yang banyak mengandung bahan penghambat absorpsi zat besi akan berakibat kurangnya absorpsi zat besi ke dalam tubuh. Asupan zat besi yang tidak mencukupi dan menurunnya absorpsi zat besi ke dalam tubuh menyebabkan status zat besi tubuh menurun. Status zat besi merupakan gambaran daripada kadar zat besi dalam tubuh.

Walaupun penelitian mengenai pengaruh asam askorbat maupun asam sitrat terhadap absorpsi zat besi sudah banyak dilakukan, namun mengingat bahwa

penelitian ini dilakukan pada kondisi yang berbeda dengan penelitian sebelumnya, maka penelitian mengenai kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat terhadap absorpsi zat besi dalam tubuh perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap status zat besi dalam tubuh. Untuk mengetahui peningkatan status zat besi dalam tubuh dilakukan pemeriksaan terhadap parameter yang digunakan yaitu peningkatan kadar hemoglobin, kadar zat besi serum, persentase saturasi transferrin, dan penurunan kadar *total iron binding capacity (TIBC)*.

Pada penelitian ini digunakan tikus sebagai hewan percobaan karena tikus termasuk golongan omnivora yang mempunyai sistem pencernaan menyerupai sistem pencernaan pada manusia dan menunjukkan kebutuhan gizi seperti pada manusia pula (Smith, 1959 dalam Pariassa, 1983).

1.2 Rumusan Masalah

Atas dasar uraian diatas, maka permasalahan yang timbul adalah :

1. Apakah pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.
2. Apakah pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.
3. Apakah pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi lebih baik dari kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat.

1.3 Tujuan Penelitian.

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui apakah disamping pemberian ferro sulfat, pemberian asam askorbat dan asam sitrat baik sendiri maupun dalam bentuk kombinasi meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mempelajari apakah pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.
2. Mempelajari apakah pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.
3. Mempelajari apakah pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi lebih baik dari kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan ferro sulfat bersama asam sitrat.

1.4. Manfaat Penelitian.

1. Manfaat yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah untuk menambah khasanah keilmuan dibidang ilmu biokimia khususnya dalam mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat terhadap status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.
2. Dari hasil yang didapatkan, jika diperoleh hasil kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat dapat meningkatkan status zat besi, maka hal ini dapat dipertimbangkan sebagai upaya dalam penanganan masalah kekurangan

zat besi, baik dalam hal pembuatan obat-obatan maupun penyuluhan di masyarakat. Hal ini terutama ditujukan pada penanggulangan anemia pada masa kehamilan maupun masa pertumbuhan anak yang banyak terjadi di masyarakat.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Metabolisme zat besi

2.1.1 Zat besi dalam tubuh manusia

Zat besi merupakan salah satu mineral runtuhan yang esensial yang ada dalam tubuh makhluk hidup. Sebagai mineral runtuhan, zat besi paling banyak terdapat dalam tubuh. Di dalam tubuh manusia dewasa mengandung zat besi sekitar 2.5 dan 4 gram dimana 2,0 - 2,5 gram dalam sirkulasi yakni dalam sel-sel darah merah sebagai komponen hemoglobin. Sekitar 300 mg zat besi dihubungkan dengan enzim seperti sitokrom yang mengandung *heme* dan kompleks protein besi-sulfur pada transport elektron dan proses fosforilasi oksidatif pada seluruh sel dan enzim-enzim untuk metabolisme obat (sitokrom P450 dan b₅) khususnya dalam hepar. Zat besi juga diperlukan untuk enzim yang terdistribusi secara luas, seperti ribonukleotida reduktase; enzim yang terlibat dalam sintesis dan degradasi senyawa amin biogenik; mieloperoksidase pada leukosit yang terlibat pada pemusnahan bakteri, dan enzim hepar seperti katalase dan triptofan oksigenase (Linder, 1991). Zat besi di dalam tubuh memiliki beberapa fungsi yaitu sebagai pembawa oksigen ke jaringan, sebagai medium transport untuk elektron dalam sel, dan sebagai bagian yang terintegrasi pada reaksi enzim yang penting dalam berbagai jaringan (Hallberg, *dkk.*, 1994).

Di dalam tubuh manusia zat besi terdapat dalam 6 kompartemen yaitu (Fairbanks & Beutler, 1995): kompartemen hemoglobin, kompartemen simpanan,

kompartemen mioglobin, *labile iron pool*, kompartemen jaringan dan kompartemen transport.

Pada manusia zat besi hemoglobin adalah kompartemen yang paling besar, secara normal mengandung 2 gram zat besi. Zat besi dalam kompartemen simpanan berada dalam 2 bentuk yang berbeda yaitu ferritin dan hemosiderin. Secara normal pada laki-laki dewasa kompartemen simpanan adalah sekitar 800 – 1000 mg. Kompartemen mioglobin secara struktural menyerupai hemoglobin tapi monomerik. Pada sel-sel otot kerangka dan otot jantung zat besi mioglobin berada dalam jumlah yang kecil, sekitar 0,34 % dari zat besi dalam tubuh.

Labile iron pool merupakan kompartemen zat besi yang meninggalkan plasma dan masuk ke dalam bagian interstitial dan cairan intraselluler. Secara normal zat besi yang terdapat pada kompartemen ini sekitar 80-90 mg. Zat besi dalam jaringan seperti parenkim termasuk sitokrom dan berbagai enzim sekitar 6-8 mg. Sedangkan pada kompartemen transport mengandung 3 mg zat besi. Secara kinetik bagian ini adalah paling aktif sebab zat besinya secara normal *turn over* paling sedikit 10 kali setiap 24 jam (Fairbanks & Beutler, 1995).

2.1.2 Absorpsi zat besi dalam tubuh.

Zat besi dalam bahan makanan terdapat dalam 2 bentuk yaitu bentuk *nonhem* dan bentuk *heme*, keduanya diabsorpsi dengan mekanisme yang berbeda (Kuswarini, 1998 dari Thomas, JH dan Gillham, B.1989).

- Bentuk *nonhem* merupakan bentuk yang paling banyak terdapat dalam bahan makanan. Zat besi dalam bentuk *nonheme* merupakan bahan kompleks berupa

ferri-organik. Sayur-sayuran hanya mengandung zat besi *nonheme*, sedangkan pada daging, ayam dan ikan kandungan zat besi *nonheme* 60% (Herbert, 1987).

- Bentuk *heme* terdapat dalam jumlah kecil (lebih kurang 40%) berasal dari makanan hewani, terutama yang mengandung hemoglobin (Herbert, 1987).

Ketersediaan zat besi dalam makanan berbeda-beda. Zat besi pada makanan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan seperti kacang-kacangan, jagung, beras dan roti dengan ketersediaan yang sangat rendah sekitar 1 – 10 %, sedangkan pada daging lebih tinggi daripada yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Ketersediaan zat besi *nonheme* pada daging, ikan, dan hepar sekitar 20%, sedangkan zat besi *heme* dengan ketersediaan sekitar 30%. Hampir semua zat besi pada tumbuh-tumbuhan adalah zat besi *nonheme*. Bentuk ketersediaan menggambarkan persentase zat besi dalam makanan yang dapat diabsorpsi dan digunakan untuk proses-proses fisiologi seperti pembentukan sel-sel darah merah (Brody, 1994).

Bentuk zat besi yang terdapat di dalam makanan mempengaruhi penyerapan zat besi oleh tubuh. Zat besi *nonheme* merupakan bentuk utama zat besi yang berasal dari makanan; absorpsinya sangat dipengaruhi oleh status zat besi individu, yaitu pada individu yang defisiensi zat besi maka akan lebih banyak zat besi diserap, sedangkan pada individu dengan keadaan zat besi yang cukup akan lebih sedikit zat besi yang diserap (Hallberg, *dkk.*, 1994). Selain itu absorpsi zat besi *nonheme* sangat dipengaruhi oleh komposisi makanan atau senyawa yang terdapat dalam makanan, baik yang dapat menghambat maupun yang memacu absorpsi (Hanafi, 1996; Wirakusumah, 1999).

Absorpsi zat besi *heme* dalam makanan yang mengandung daging dan ikan lebih efektif dibandingkan dengan zat besi *nonheme*. Rata-rata absorpsi zat besi *heme* adalah sekitar 25%. Seperti pada zat besi *nonheme*, absorpsi zat besi *heme* juga dipengaruhi oleh keadaan defisiensi zat besi, tapi proporsi perubahannya lebih kecil. Zat besi *heme* secara relatif lebih baik diabsorpsi pada semua keadaan. Absorpsi zat besi *heme* relatif tidak tergantung pada komposisi makanan dan sedikit dipengaruhi oleh faktor pemacu dan penghambat yang mempengaruhi absorpsi zat besi *nonheme* (Lynch, 1997). Zat besi *heme* lebih baik diabsorpsi daripada zat besi *nonheme* khususnya pada individu defisiensi zat besi (Hallberg, *dkk.*, 1994; Fairbanks & Beutler, 1995)

2.1.2 1 Faktor-faktor yang mempengaruhi absorpsi besi dalam tubuh.

Kebutuhan akan zat besi dipenuhi dari kandungan zat besi dalam makanan. Jumlah zat besi yang terdapat dalam tubuh pada keadaan fisiologik dikendalikan dalam batas-batas tertentu melalui pengendalian absorpsi. Absorpsi zat besi dipengaruhi oleh: keadaan mukosa usus; dimana mukosa usus mengatur absorpsi dalam taraf tertentu dan menjaga zat besi dalam tubuh konstan, jumlah dan susunan zat besi yang terdapat dalam makanan, status zat besi dalam tubuh dan adanya komponen penghambat dan pemacu absorpsi zat besi yang ada di dalam makanan (Lynch, 1997; Kuswarini, 1998).

Dalam diet terdapat senyawa-senyawa tertentu yang berpengaruh terhadap absorpsi zat besi terutama zat besi *nonheme* yaitu: senyawa yang dapat menghambat dan senyawa yang dapat meningkatkan absorpsi zat besi. Senyawa yang dapat

meningkatkan absorpsi zat besi adalah asam askorbat, daging hewan dan asam organik.

Asam askorbat dapat meningkatkan absorpsi zat besi *nonheme* dengan jalan membentuk ikatan (*chelate*) dan mempertahankan zat besi dalam bentuk Fe^{2+} setelah dilepas dari ikatan kompleksnya (Hanafi,1996). Asam askorbat bekerja mempertahankan zat besi dalam bentuk terlarut (Fe^{2+}) karena terjadi peningkatan pH lumen dari lambung masuk ke duodenum. Zat besi dalam bentuk Fe^{2+} memiliki kelarutan yang tinggi dibandingkan dengan bentuk Fe^{3+} . Zat besi dalam bentuk ferri (Fe^{3+}) larut hanya pada pH asam (\pm pH 4). Dalam larutan encer ion-ion logam terikat satu sama lain melalui jembatan air. Jika pH meningkat ion-ion hidroksid terbentuk dan polimer metallik atau presipitasi hidroksid metallik akan terbentuk. Di atas pH 4 hampir semua zat besi terpresipitasi dari larutan ferri khlorida. Jika asam askorbat ditambahkan pada ferri klorida yang larut dalam larutan asam akan terbentuk kompleks besi-asam askorbat yang tetap larut dalam rentang pH yang lebih lebar (Lynch, 1997).

Daging hewan dapat meningkatkan status zat besi karena adanya kandungan zat besi *heme* yang tinggi dan komponen yang dapat meningkatkan absorpsi zat besi *nonheme*. Pengaruh daging hewan lebih kompleks terhadap absorpsi zat besi. Ada beberapa mekanisme dapat terlibat, dari hasil penelitian yang diperoleh antara lain diusulkan bahwa di dalam daging ada komponen yang bekerja primer dengan menurunkan pengaruh penghambatan polifenol. Ditemukan juga adanya peningkatan zat besi ferro yang stabil selama pencernaan daging secara *in vitro*. Hal ini mempertegas bahwa daging mempunyai pengaruh mereduksi zat besi bentuk ferri menjadi bentuk

ferro. Selain itu juga diusulkan bahwa daging mungkin bekerja dengan menstimulasi produksi asam lambung (Lynch, 1997). Jadi disimpulkan bahwa daging memacu absorpsi zat besi nutrisi dalam dua cara yaitu; menstimulasi absorpsi dari zat besi nonheme dan menyediakan zat besi heme yang baik untuk diabsorpsi (Hallberg, *dkk.*, 1994).

Asam organik yang dapat meningkatkan absorpsi zat besi seperti asam sitrat, asam malat dan asam tartrat. Penambahan asam organik pada makanan dapat meningkatkan absorpsi zat besi. Asam sitrat dapat meningkatkan absorpsi zat besi dengan membentuk kompleks dengan zat besi (Lynch, 1997).

Sedangkan senyawa-senyawa yang dapat menghambat absorpsi zat besi misalnya: fitat, polifenol, kalsium dan serat.

Fitat adalah garam inositol heksapospat, merupakan bentuk persediaan pospat dan mineral yang banyak terdapat pada jagung, padi-padian, kacang-kacangan, buah-buahan dan sayur-sayuran (Hallberg, *dkk.*, 1994). Fitat penghambat absorpsi yang sangat kuat, namun mekanisme penghambatan tidak khusus. Fitat monoferrit yang terdapat hanya sedikit pada kulit padi tidak menghambat, tapi pembentukan kompleks fitat diferrit dan tetraferri dalam saluran gastrointestinal mengakibatkan zat besi tidak dapat diabsorpsi (Lynch, 1997).

Polifenol terdapat pada hampir semua tumbuhan seperti pada teh, kopi, coklat, sayuran dan tanaman rempah-rempah. Polifenol bekerja dengan pembentukan kompleks antara gugus hidroksil dan molekul zat besi yang menyebabkan zat besi tidak dapat diabsorpsi. Senyawa polifenol ini berperan sebagai bagian dari sistem

pertahanan tumbuhan terhadap insekta, hewan dan manusia (Hallberg, *dkk.*, 1994; Lynch, 1997)

Penambahan kalsium dalam bentuk susu dan garam inorganik pada makanan menurunkan persentase absorpsi zat besi. Penghambatan kalsium terhadap zat besi *heme* dan *nonheme* sama kuatnya. Mekanisme kerja penghambatan kalsium belum diketahui, namun fakta yang kuat menyatakan bahwa penghambatan tidak terletak pada lumen gastrointestinal tapi pada sel-sel mukosa itu sendiri dan biasanya pada tahap akhir transfer zat besi *heme* dan *nonheme* (Hallberg, *dkk.*, 1994).

Secara *in vitro* komponen serat dapat mengikat zat besi. Serat dalam makanan dapat mengabsorpsi zat besi dan menahannya dalam lumen karena serat tersebut tidak dapat dicerna dan diserap (Hanafi, 1996).

Besar kecilnya absorpsi zat besi oleh usus ditentukan oleh faktor intraluminal dan faktor regulasi eksternal. Faktor intraluminal ditentukan oleh jumlah zat besi dalam makanan, kualitas zat besi (*heme* atau *nonheme*), perbandingan jumlah pemacu dan penghambat dalam makanan. Faktor regulasi eksternal ditentukan oleh cadangan zat besi tubuh dan kecepatan eritropoesis (Bakta, 1993).

2.1.2.2 Mekanisme absorpsi zat besi.

Absorpsi zat besi dalam makanan baik *heme* maupun *nonheme* menggunakan dua reseptor tersendiri pada sel mukosa. Zat besi *heme* diabsorpsi sebagai kompleks porfirin utuh. Setelah ambilan zat besi *heme* ke dalam sel-sel mukosa, cincin porfirinnya dipisah oleh enzim *haemoxygenase* di dalam sel dan zat besi dilepaskan. Selanjutnya zat besi *heme* dan *nonheme* melalui jalur yang sama dan meninggalkan

sel mukosa dalam bentuk kimia yang sama dengan menggunakan sistem transfer yang sama menuju kelapisan serosa sel-sel mukosa (Hallberg, *dkk.*, 1994).

Proses absorpsi dalam usus dapat dibagi dalam 3 fase yaitu fase luminal, fase mukosa dan fase sistemik (korporeal) (Cook & Skikne, 1987 dalam Bakta, 1993).

Pada fase luminal mula-mula terjadi pelepasan ikatan zat besi dari ikatan kompleksnya dari bahan makanan. Zat besi yang sudah terlepas dari ikatan kompleksnya akan terionisasi. Adanya getah lambung dan komponen lain seperti asam askorbat dan beberapa asam amino, maka zat besi berada dalam bentuk terlarut (Fe^{2+}). Absorpsi zat besi yang paling efisien terjadi pada duodenum. Hal ini dihubungkan dengan jumlah reseptor pada permukaan usus dan pH usus (Fairbanks & Beutler, 1995). Pada fase mukosa ada dua konsep yang dikemukakan mengenai penyerapan zat besi yaitu yang disebut konsep lama dan konsep baru (Hanafi, 1996).

Pada konsep lama mula-mula zat besi diabsorpsi oleh mukosa *brush border* dan ini spesifik dengan adanya reseptor zat besi pada *brush border*. Status zat besi tubuh akan mempengaruhi jumlah reseptor. Apabila dalam keadaan anemia maka jumlah reseptor akan meningkat daripada normal sehingga absorpsi zat besi meningkat. Selanjutnya zat besi melewati membran mukosa pertama (dekat lumen). Transfer ini memerlukan energi. Zat besi dalam bentuk ion ferro (Fe^{2+}) lebih banyak melewati membran pertama ini daripada bentuk ion ferri (Fe^{3+}) yang penyerapannya berlangsung cepat (fase pertama). Kemudian zat besi bentuk ferro (Fe^{2+}) dalam sel usus akan bergerak menuju ke membran mukosa kedua (lapisan serosa). Mula-mula zat besi berada didaerah retikulum endoplasma kasar dan di dalam plasma sel, kemudian zat besi berkumpul di dalam mitokondria dan lisosom.

Pada keadaan normal Fe^{2+} dalam usus berada dalam keseimbangan dengan feritin. Dalam keadaan anemia Fe^{2+} sebagian besar menuju ke membran kedua (lapisan serosa) untuk selanjutnya masuk ke pembuluh darah. Pada keadaan kelebihan Fe^{2+} akan membentuk ferritin dan tinggal dalam usus yang akhirnya terbuang ke lumen pada pergantian sel usus. Bergeraknya Fe^{2+} menuju ke lapisan serosa diperkirakan memerlukan suatu *carrier*.

Menurut konsep baru, Fe^{2+} masuk menembus membran mikrovili mukosa usus dengan adanya peranan *integrin*. Integrin yang dimaksud pada konsep baru adalah reseptor yang ada pada *brush border* menurut konsep lama. Kemudian Fe^{2+} diikat oleh *mobilferrin*, suatu protein pengikat zat besi yang membantu mengadakan keseimbangan dengan cadangan zat besi tubuh (ferritin). *Integrin* dan *mobilferrin* membentuk kompleks dengan flavin monooxygenase yang melibatkan NADPH untuk menjaga zat besi tetap dalam keadaan ion Fe^{2+} . Dalam sel usus juga terdapat protein lain yaitu *paraferritin* yang terlibat mulai dari masuknya zat besi ke dalam sel usus melalui membran mikrovili menyerahkan zat besi pada ferritin dalam keadaan Fe^{2+} dan terlibat dalam pengangkutan Fe^{2+} menuju membran kedua sel mukosa. Paraferritin adalah protein yang mempunyai aktifitas ferri-reduktase yang melibatkan NADPH dan membentuk kompleks dengan integrin dan mobilferrin. Apabila cadangan zat besi tinggi, akan banyak zat besi masuk ke sel mukosa dari darah melalui reseptor transferrin untuk mencegah pengambilan zat besi dari lumen dan pada keadaan zat besi diperlukan transfer zat besi dari sel mukosa usus ke darah meningkat. Selanjutnya Fe^{2+} melewati membran kedua (lapisan serosa) masuk ke dalam darah (fase kedua). Proses ini tidak memerlukan energi, dan fase kedua ini

dipengaruhi oleh status zat besi tubuh, keadaan eritropoetik, hipoksia dan anemia (Hanafi, 1996).

Zat besi masuk ke dalam tubuh melalui usus dengan melewati kedua lapisan membran sel mukosa usus. Selanjutnya bagaimana cara zat besi menembus membran sel mukosa usus, Andrew, *dkk.*, (1999) telah melaporkan bahwa terdapat suatu *iron transporter* yang diidentifikasi sebagai *Nramp2* (*Natural resistance-associated macrophage protein 2*) yang merupakan *iron transporter transmembran* yang utama. *Nramp2* selanjutnya disebut sebagai *divalent metal ion transporter 1* (DMT1). DMT1 diidentifikasi pertama berdasarkan homologinya pada *Nramp1*. Struktur DMT1 sangat mirip dengan *Nramp1*. DMT1 menunjukkan selektifitas substrat yang sangat luas dengan penurunan kapasitas transport dalam urutan Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} . Dari beberapa penelitian yang dilakukan pada oosit mamalia menunjukkan bahwa transport ion logam divalent yang elektrogenik dan merupakan proton berpasangan diperantarai oleh DMT1, dimana transport berlangsung pada kecepatan yang tinggi pada potensial hiperpolarisasi dan/atau pH ekstraselluler rendah. Ada beberapa alasan perlunya ko-transport obligat dari ion logam divalent dan proton. Pertama, pergerakan ion H^+ menurunkan gradient elektrokimia yang akan meningkatkan masukan ion-ion logam divalent. Kedua, rendahnya pH pada permukaan membran intraseluler akan membantu mempertahankan besi dalam keadaan terlarut (Fe^{2+}) dan Fe^{+2} ini akan membantu distribusi dalam intra-seluler Andrews *dkk.*, 1999).

Pada fase sistemik (korporeal) zat besi yang masuk ke plasma diikat oleh apo-transferrin menjadi transferrin dan diedarkan ke seluruh tubuh, terutama ke sel erit-

roblast dalam sumsum tulang. Semua sel mempunyai reseptor pada permukaannya. Transferrin ditangkap oleh reseptor ini, dan kemudian melalui pinositosis (endositosis) masuk dalam vesikel (endosom) dalam sel. Akibat penurunan pH, zat besi, apotransferrin dan reseptor akan terlepas dari ikatannya. Zat besi akan dipakai oleh sel sedangkan reseptor dan apotransferin dikeluarkan dan dipakai kembali (Fairbanks & Beutler, 1995).

Pengaturan transfer zat besi terjadi antara sel-sel mukosa dan dinding kapiler. Dalam keadaan normal proses tertentu menentukan jumlah zat besi yang akan ditransfer. Bila dalam keadaan defisiensi zat besi, jumlah yang ditransfer meningkat dan bila tubuh kelebihan zat besi jumlah yang ditransfer secara substansial berkurang. Untuk mengatur transfer zat besi melalui permukaan mukosa- kapiler sel-sel mukosa mensintesis apoferritin. Pada keadaan tubuh membutuhkan sedikit zat besi, dalam mukosa usus disintesis sejumlah besar apoferritin untuk mengikat zat besi agar tidak masuk dalam kapiler. Bila sel mengalami *turn-over* maka zat besi dilepaskan ke lumen usus tanpa diabsorpsi lagi. Pada keadaan defisiensi zat besi, tidak ada apoferritin yang disintesis sehingga zat besi langsung diikat oleh transferrin dan ditransfer ke kapiler darah (Wells & William, 1992).

2.1.3. Pengangkutan zat besi dalam tubuh.

Zat besi masuk ke dalam darah terikat oleh protein spesifik untuk diangkut ke seluruh tubuh. Protein yang telah mengikat zat besi ini disebut transferrin. Pelepasan zat besi dari mukosa kedalam pembuluh darah terjadi karena rendahnya kejenuhan transferrin. Dalam plasma terdapat seruloplasmin yaitu suatu ferroksidase yang mengkatalisis perubahan zat besi bentuk ferro (Fe^{2+}) menjadi bentuk ferri (Fe^{3+}) dan

mempercepat pengikatan zat besi oleh apotransferrin, sebab transferrin tidak mengikat zat besi bentuk ferro (Fe^{2+}). Zat besi bentuk ferri (Fe^{3+}) akan ikat oleh apotransferrin menjadi transferrin dan selanjutnya dibawa keseluruh jaringan tubuh (Fairbanks & Beutler, 1995; Hanafi 1996)

Apotransferrin adalah suatu protein dalam serum, yaitu suatu β_1 – glikoprotein yang disintesis dalam hepar, yang mengandung rantai polipeptida tunggal 78.000 Da dengan dua tempat pengikatan zat besi (Wells & William, 1992). Apotransferrin mempunyai kapasitas untuk mengikat 2 atom besi yang terikat dalam bentuk teroksidasi. Transferrin merupakan protein pengangkut zat besi dalam darah menuju jaringan. Zat besi yang terikat pada protein ini hanya 0,1 % dari zat besi dalam tubuh. Protein ini tidak disimpan tapi singgah dari satu organ ke organ yang lain (Brody, 1994). Transferrin dengan kejenuhan fisiologi akan mudah melepaskan zat besi pada sel eritroblas (Fairbanks & Beutler, 1995).

Transferrin akan mengikat reseptor permukaan sel spesifik yang mengantari internalisasi dari protein. Reseptor transferrin adalah suatu protein transmembran yang memiliki 2 sub unit masing-masing 90.000 Da yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. Setiap sub unit mengikat satu molekul transferrin. Internalisasi kompleks transferrin-reseptor tergantung pada fosforilasi reseptor oleh kompleks Ca^{2+} -calmodulin - protein kinase C. Pelepasan zat besi terjadi dalam lingkungan asam dari lisosom setelah itu kompleks apotransferrin – reseptor kembali ke permukaan sel, dan apotransferrin dilepas untuk digunakan lagi dalam plasma. Transferrin merupakan protein pengangkut zat besi dalam darah menuju jaringan (Wells & William, 1992).

Peranan dari transferrin dalam mengantarkan zat besi ke permukaan sel adalah: (Brody, 1994).

Tahap 1. Sebagai holotransferrin yang mengikat ke reseptor transferrin pada permukaan sel .

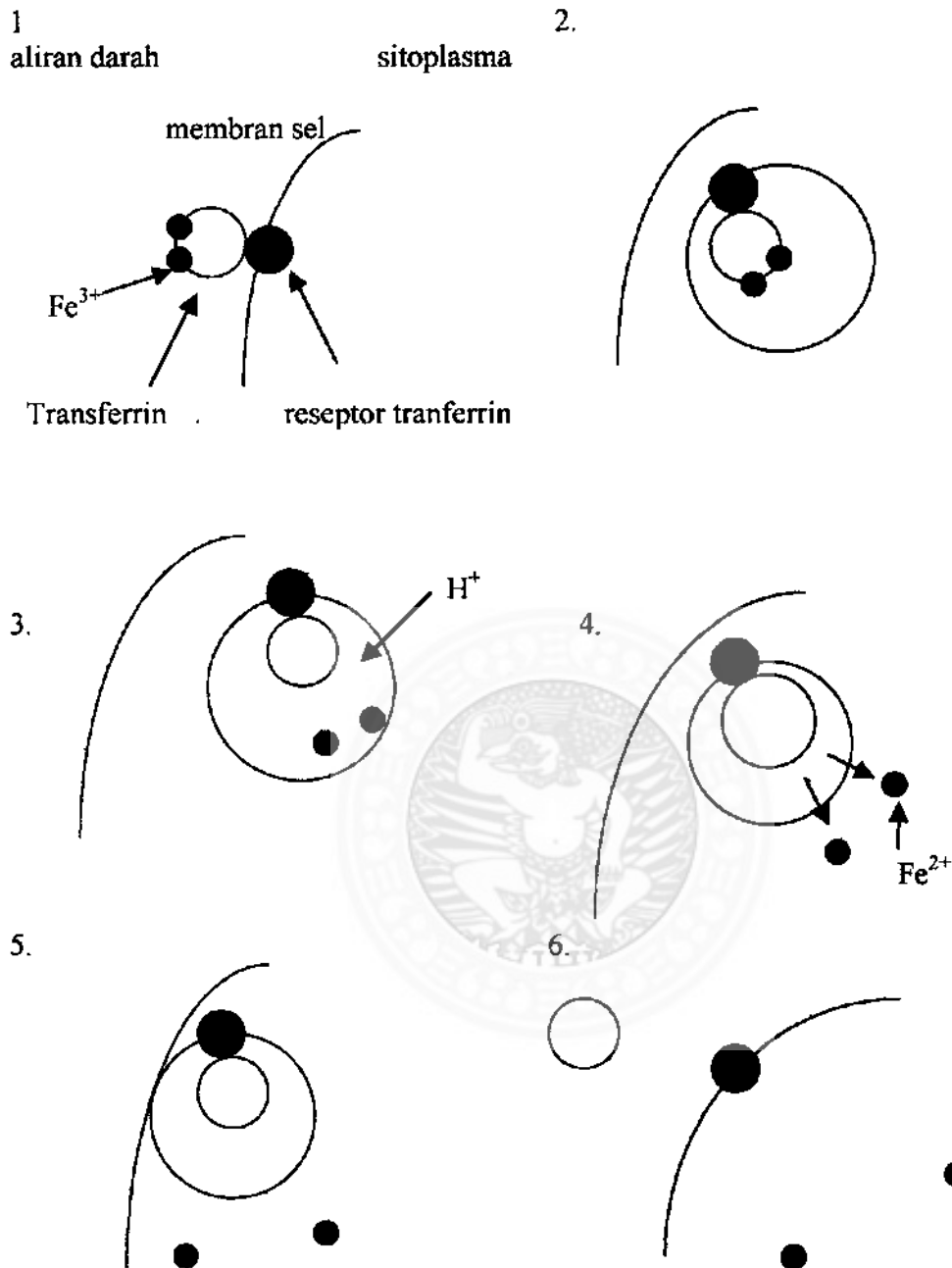
Tahap 2. Terjadinya invaginasi pada daerah membran plasma yang mengandung sejumlah holotransferrin yang terikat untuk membentuk vesikel yang menggembung ke dalam sel.

Tahap 3. Vesikel kemudian berfusi dengan vesikel yang mengandung suatu pompa asam. Pompa asam digunakan untuk menurunkan pH dalam vesikel. Lingkungan asam mendukung pelepasan ion ferri dari transferrin. Transferrin yang tidak mengandung zat besi tetap terikat pada reseptornya dan zat besi (Fe^{3+}) tetap terikat pada vesikel.

Tahap 4. Zat besi direduksi menjadi bentuk ferro, kemungkinan oleh enzim terikat-membran. Dan bentuk ferro (Fe^{2+}) ini siap melintasi membran masuk ke sitoplasma.

Tahap 5. Vesikel yang mengandung kompleks apotransferrin-reseptor transferrin dalam membrannya berfusi dengan membran plasma.

Tahap 6. Dalam lingkungan netral pada aliran darah apotransferrin memisah dari reseptor dan masuk ke sirkulasi.



Gambar.2.1 Peranan transferrin dan reseptornya membawa zat besi kedalam sel.
 Sumber : Brody, 1994)

2.1.4 Kinetika zat besi dalam tubuh.

Sel darah merah mengalami proses katabolisme secara berkesinambungan pada sistem retikuloendotelial untuk melepaskan 20-25 mg zat besi setiap hari. Zat besi yang terlepas akan mengikat protein transferrin atau disimpan sebagai ferritin.

Apabila katabolisme sel darah merah berlebihan maka akan banyak zat besi yang dilepaskan sehingga absorpsi zat besi di usus menurun yaitu sekitar 1 mg ini merupakan 10 % dari total diet setiap hari (Kuswarini, 1998).

Zat besi diangkut ke sumsum tulang dalam bentuk transferrin untuk pembentukan sel-sel darah merah (eritrosit). Zat besi yang diperlukan dalam pembentukan hemoglobin dibawa oleh transferrin dan masuk ke dalam sel retikulosit melalui 3 tahapan proses yaitu : transferrin terikat pada reseptor transferrin yang ada pada permukaan luar sel retikulosit; kompleks reseptor-transferrin masuk ke dalam sel dengan cara endositosis. Pada vesikel endositik yang mempunyai pH rendah (pH:5), 2 molekul zat besi (Fe^{3+}) dilepas dari apotransferrin dan masuk ke dalam sitosol untuk digunakan dalam proses pembentukan hemoglobin selanjutnya. Setelah pelepasan zat besi selanjutnya kompleks reseptor-apotransferrin dilepas dari sel retikulosit (Thomas & Gillham, 1989 dalam Kuswarini, 1998) . Untuk selanjutnya sel retikulosit mengalami pematangan menjadi sel darah merah dewasa.

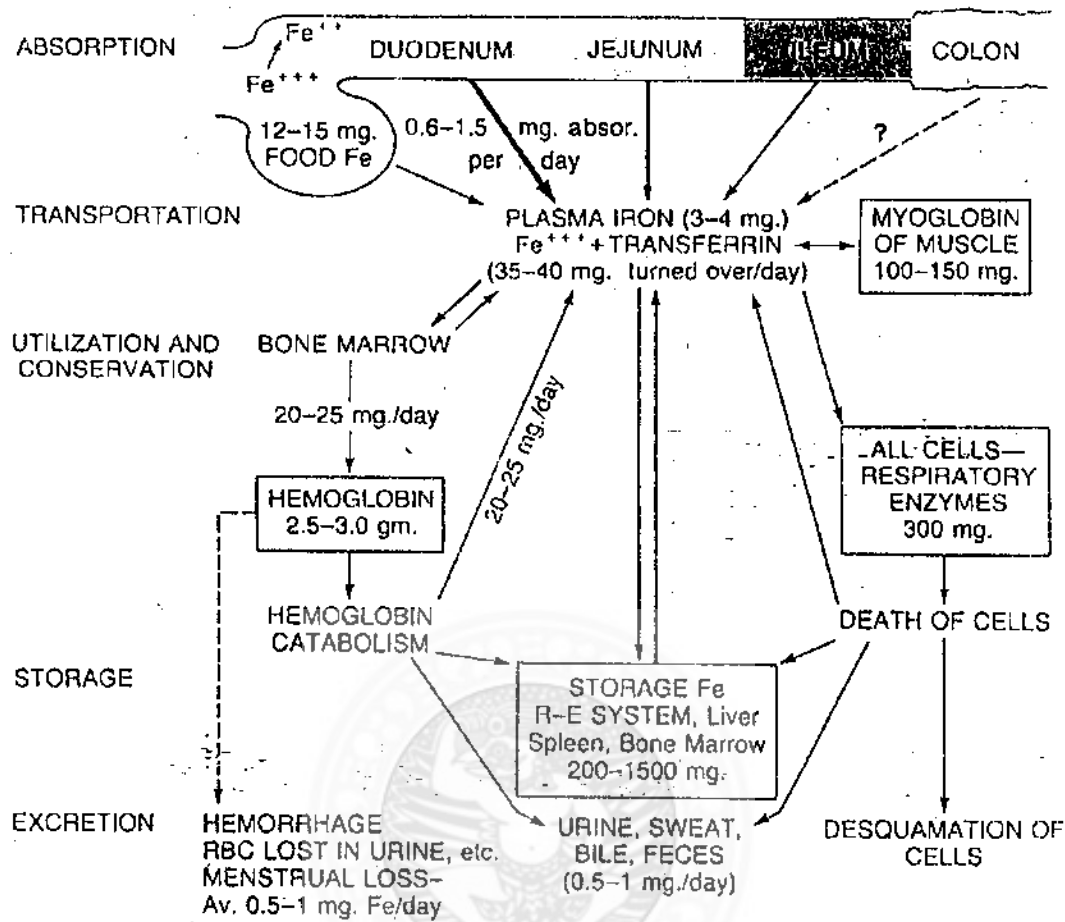
2.1.5. Penyimpanan dan pemanfaatan zat besi dalam tubuh.

Zat besi bergabung pada ferritin dan dapat disimpan dalam mukosa usus, tapi simpanan zat besi pada tubuh mamalia terutama terdapat di hepar dan limpa (Kuswarini, 1998). Di dalam tubuh zat besi tersimpan dalam 2 bentuk yaitu feritin dan hemosiderin. Ferritin adalah kompleks dari ferri hidroksi dan apoferritin yang

larut air. Apoferritin adalah protein utama yang terlibat pada penyimpanan zat besi. Dalam keadaan normal tubuh menyimpan zat besi dalam bentuk ferritin untuk dapat segera digunakan ketika diperlukan. Normalnya, dalam plasma manusia hanya terdapat sedikit ferritin. Pada keadaan dimana zat besi berlebihan, simpanan zat besi dalam tubuh meningkat dan ferritin terdapat dalam jumlah yang banyak di dalam jaringan. Ferritin mengandung kurang lebih 23 % zat besi dan apoferritin (protein tanpa zat besi) (Rand,*dkk.*, 1996).

Apoferritin membentuk suatu kerangka ion ferri, ion hidroksi dan oksigen yang tersusun dari 24 subunit yang serupa membentuk bola dengan zat besi ditengah bulatan protein tersebut. Ion Fe^{2+} dan molekul kecil masuk atau meninggalkan bagian dalam molekul ferritin dengan melalui enam lubang. Saluran permukaan dari apoferritin dapat mengakumulasi dan melepaskan besi. Monomer dari subunit apoferritin digambarkan sebagai rantai bentuk H (heavy) dan rantai bentuk L (light). 24 subunit ini terdiri dari bentuk H (heavy) atau bentuk L (light) saja atau campuran bentuk H dan bentuk L yang masing-masing mengandung 182 asam amino dan 174 asam amino. Rantai bentuk H dari apoferritin ini mengoksidasi ion ferro menjadi ion ferri (Wells & William, 1992; Fairbanks & Beutler, 1995).

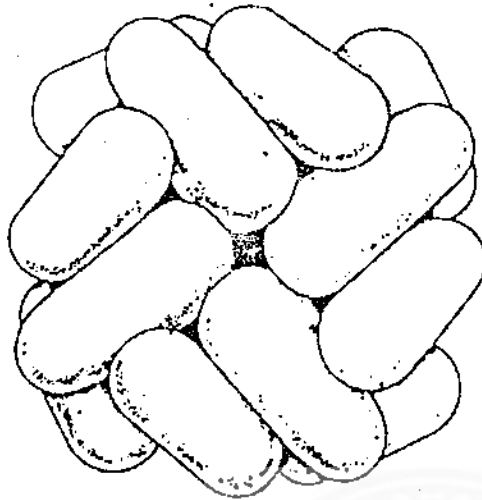
Masukan dan pelepasan zat besi dari ferritin berlangsung cepat. Molekul ferritin nampak berfungsi sebagai suatu enzim ferroksidase yang mengikat dan mengoksidasi ion ferro dan melepaskan $FeOOH$ yang terbentuk pada pertumbuhan inti kristal. Sebaliknya pelepasan zat besi diperantarai oleh substansi pereduksi kecil khususnya dari flavin mononukleotida tereduksi dan asam askorbat (Fairbanks & Beutler, 1995).



Gambar 2.2 Ringkasan metabolisme zat besi pada orang dewasa
Sumber. Mahan. 1996

Di dalam sel, monomer apoferritin disintesis oleh ribosom dalam merespon keberadaan zat besi. Pengaturan sintesis apoferritin tergantung pada *iron-responsive elements* (IRE) dalam mRNA ferritin. Ferritin ditemukan dalam seluruh sel tubuh dan juga dalam cairan jaringan. Hepatosit dan mungkin sel-sel lain mempunyai reseptor ferritin pada membran selnya yang terlibat dalam pengikatan dan internalisasi ferritin dari plasma dan cairan interstitial. Di dalam plasma darah, ferritin berada dalam kadar yang rendah, namun kadar ferritin plasma berhubungan dengan simpanan zat

besi total tubuh, sehingga pengukuran ini penting dalam diagnosis gangguan metabolisme besi (Fairbanks & Beutler, 1995).



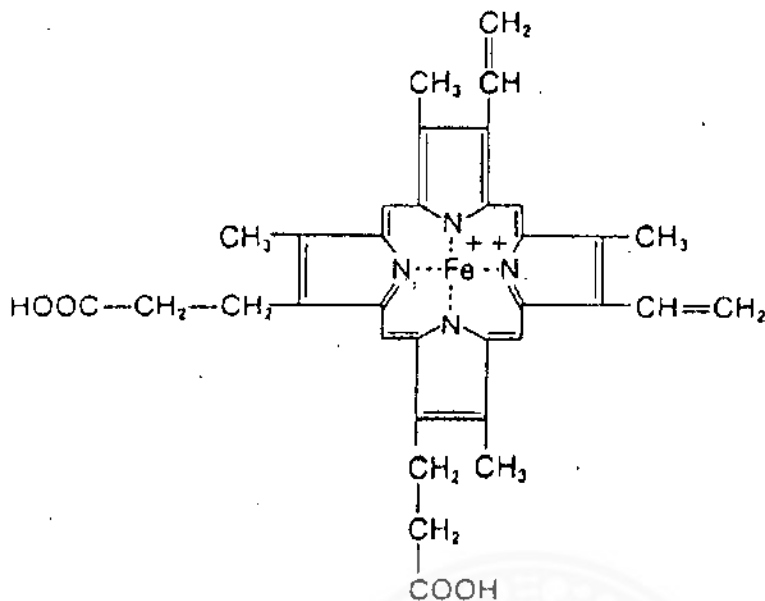
Gambar 2.3 Struktur apoferritin.
Sumber: Fairbanks & Beutler, 1995.

Hemosiderin, merupakan senyawa simpanan besi yang lain ditemukan terutama di dalam sel sistem makrofag-monosit dalam sumsum tulang, sel-sel Kupffer di hepar dan limpa. Hemosiderin tidak larut dalam air dan dapat dilihat dengan mikroskop. Hemosiderin terdiri dari 25-30% besi. Pada keadaan patologis hemo-siderin dapat terakumulasi dalam jumlah yang besar pada hampir setiap jaringan tubuh. Hemosiderin menyediakan zat besi untuk sintesis hemoglobin, tetapi pelepasan zat besi yang dikandungnya lebih lambat dibandingkan dengan pelepasan zat besi dari transferrin (Martyn, 1990). Hemosiderin mengandung sebagian kerangka protein apoferritin, yang terdiri dari agregasi inti $(\text{FeOOH})_x$ kristal (Fairbanks & Beutler, 1995; Mahan, 1996).

Banyaknya simpanan zat besi bervariasi, pada laki-laki dewasa normal sekitar 800-100 mg. Penurunan persediaan zat besi terjadi ketika kehilangan zat besi melebihi absorpsinya atau kebutuhan zat besi melebihi absorpsinya. Mobilisasi simpanan zat besi melibatkan pelepasan zat besi dari ferritin sitoplasma. (Fairbanks & Beutler, 1995).

Zat besi sangat penting dalam tubuh karena keberadaannya dalam banyak hemoprotein seperti hemoglobin, myoglobin dan sitokrom. Zat besi dikonsumsi dari makanan dan diserap sebagai Fe^{2+} diangkut ke sel mukosa usus. Dalam keadaan normal, tubuh menjaga kandungan zat besi dengan ketat sehingga seorang laki-laki yang sehat hanya kehilangan sekitar 1 mg zat besi per hari, dan digantikan dengan penyerapan (Rand,dkk.,1996).

Di dalam tubuh sebagian besar zat besi berperan sebagai komponen hemoglobin, mioglobin dan sebagian kecil berada pada sitokrom. Jumlah besi pada hemoglobin mencapai 70,5 % dari keseluruhan jumlah zat besi dalam tubuh, yang jumlahnya sekitar 2,72 gram. Gugus *heme* yang ada dalam hemoglobin, mioglobin maupun dalam banyak protein lain terdiri dari struktur cincin organik yang kompleks yang disebut protoporphirin IX. Protoporphirin ini mengikat zat besi dalam bentuk ferro. *Heme* merupakan senyawa yang paling stabil (Wells & William, 1992).



Gambar.2.4 Struktur *heme*
Sumber: Wells & William, 1992.

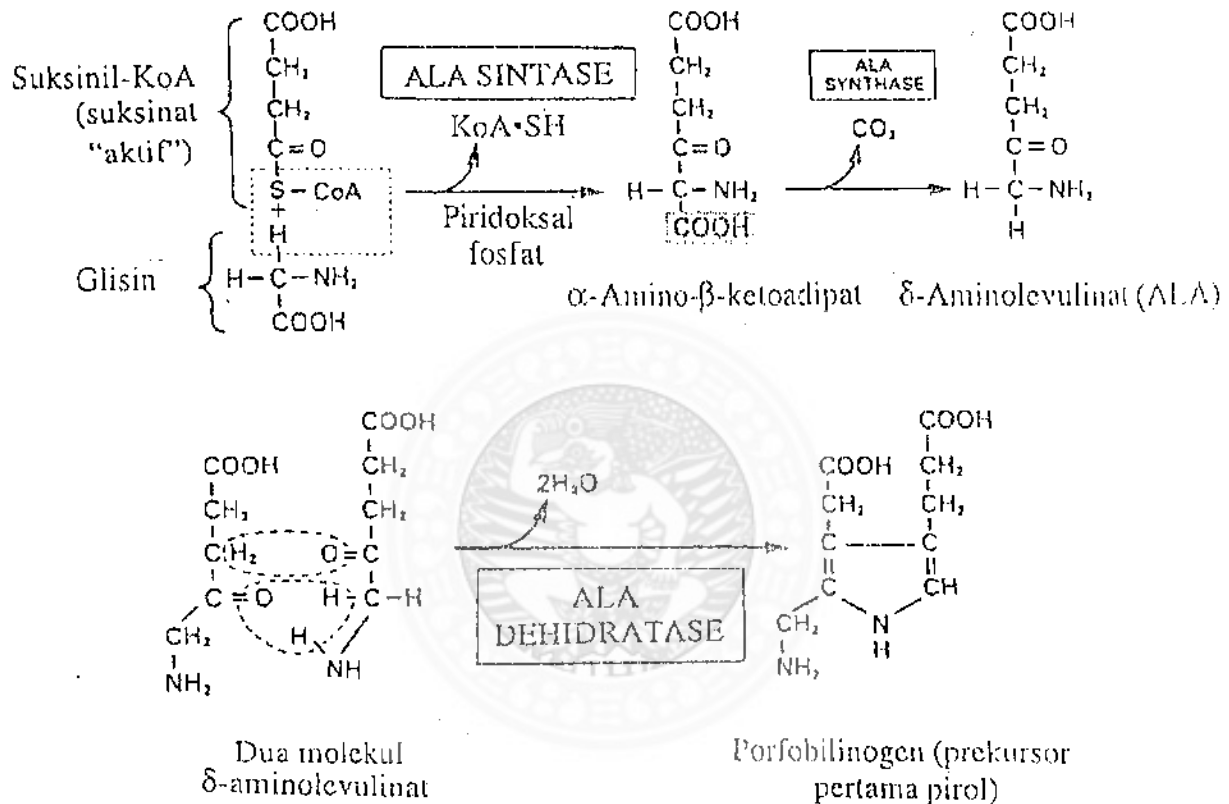
2.1.6. Biosintesis dan degradasi hemoglobin.

2.1.6.1 Biosintesis hemoglobin.

Hemoglobin merupakan senyawa porfirin besi (*heme*) yang melekat pada protein globin, dan senyawa tetrapirrol siklik sebagai gugus prostetik *heme*. Sedangkan senyawa tetrapirrol terdiri atas empat buah molekul pirol yang dihubungkan dalam sebuah cincin planar (sebidang) oleh empat buah jembatan α -metilen. Sifat khas porfirin adalah pembentukan berbagai kompleks dengan ion-ion logam yang terikat pada atom nitrogen cincin pirol (Murray, 1996).

Heme disintesis dari suksinil-KoA yang berasal dari siklus asam sitrat dalam mitokondria dan asam amino glisin. Hasil reaksi kondensasi adalah asam α -amino- β -ketoadipat yang dengan cepat mengadakan dekarboksilasi untuk membentuk δ -

amino-levulinat (ALA) dalam mitokondria dengan bantuan enzim ALA sintase. Selanjutnya ALA bergerak masuk kedalam sitosol dan dua buah molekul ALA mengalami kondensasi oleh enzim ALA dehidratase untuk membentuk dua molekul air dan satu molekul porfobilinogen (PBG) (Murray, 1996).

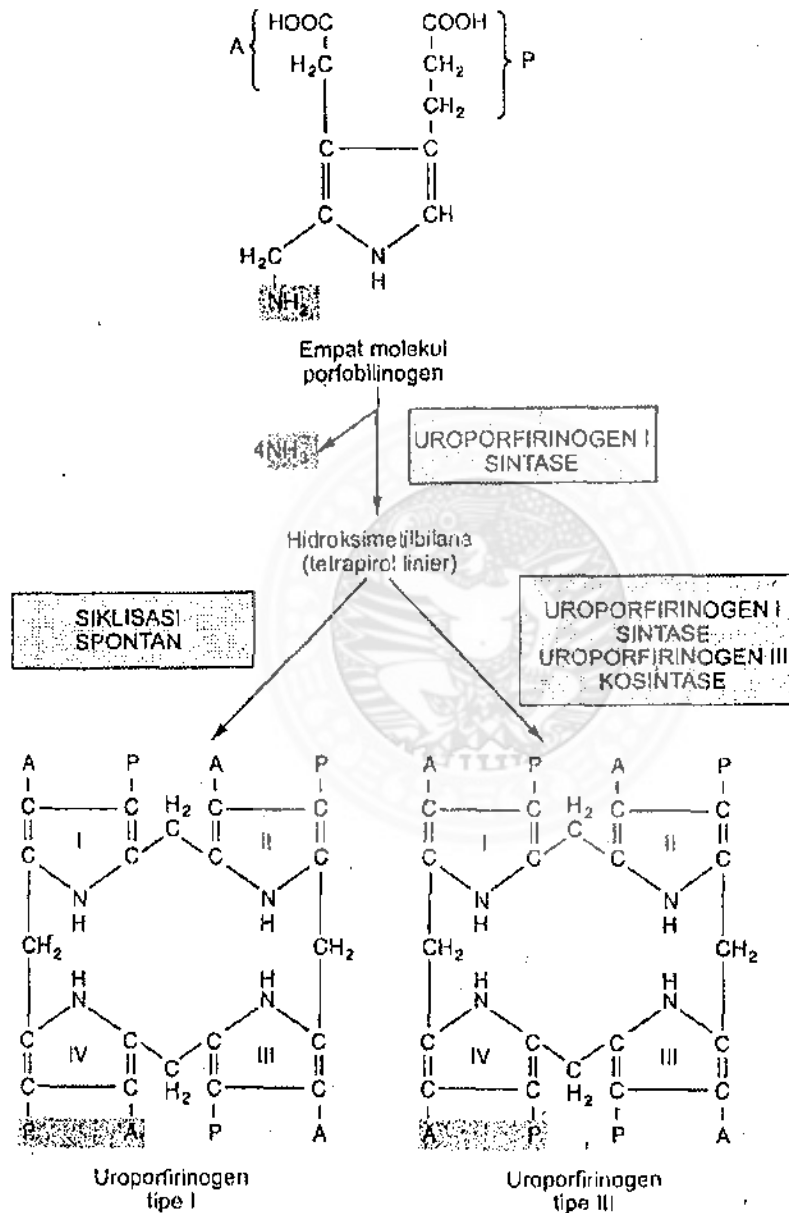


Gambar 2.5 Biosintesis porpobilinogen.

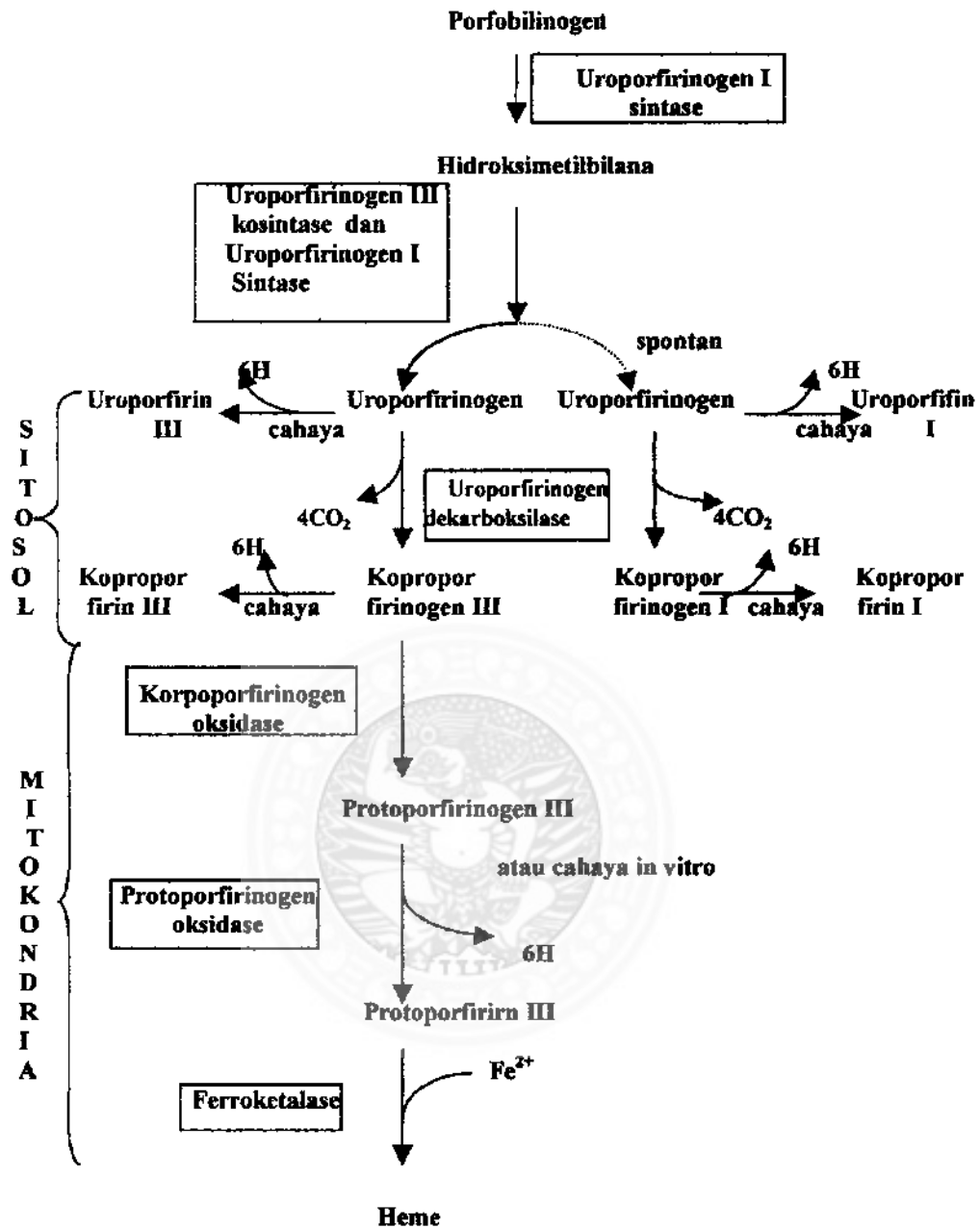
Sumber: Murray, 1996.

Pembentukan tetrapirrol suatu jenis porfirin, terjadi lewat kondensasi empat molekul PBG dan menghasilkan tetrapirrol linier yang disebut hidroksimetilbilana dengan bantuan enzim uroporfirinogen I sintase atau enzim PBG deaminase. Hidroksimetilbilana mengadakan reaksi siklisasi spontan untuk membentuk uro-

porfirinogen I atau diubah menjadi uroporfirinogen III melalui kerja enzim uroporfirinogen I sintase dengan uroporfirinogen III kosintase. Dalam keadaan normal uroporfirinogen yang terbentuk hampir selalu berupa isomer III (Murray, 1996).



Gambar. 2.6 Pembentukan Uroporfirinogen
Sumber: Murray, 1996



Gambar.2.7 Tahapan dalam biosintesis porfirin (heme) dari porfobilinogen
 Sumber: Murray, 1996

Uroporfirinogen III mengalami dekarboksilasi menjadi koproporfirinogen III dikatalisis oleh enzim uroporfirinogen dekarboksilase. Enzim ini juga dapat mengubah uroporfirinogen I menjadi koproporfirinogen I. Koproporfirinogen III memasuki mitokondria dan diubah menjadi protoporfirinogen III, kemudian menjadi protoporfirin III. Enzim mitokondria koproporfirinogen oksidase mengkatalisis reaksi dekarboksilasi dan oksidasi dua buah rantai samping propionat untuk membentuk protoporfirinogen. Enzim ini hanya dapat bekerja pada koproporfirinogen III. Oksidasi protoporfirinogen menjadi protoporfirin dikatalisis oleh enzim protoporfirinogen oksidase (Murray, 1996).

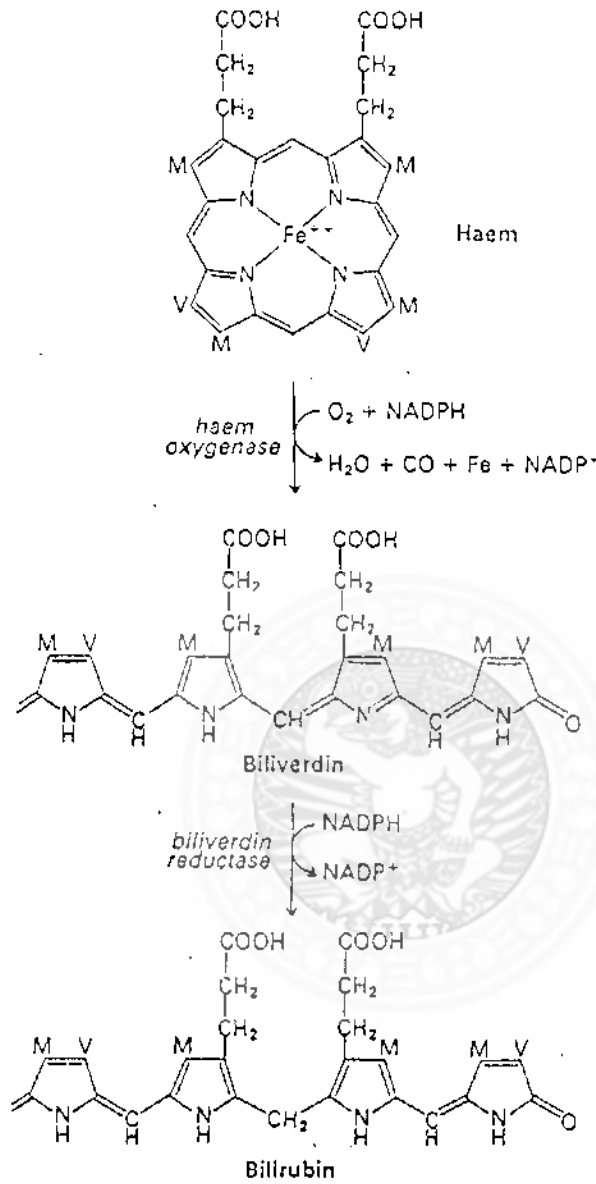
Tahap akhir dalam sintesis *heme* meliputi proses penyatuan besi ferro dengan protoporfirin dalam reaksi yang dikatalisis oleh enzim *heme* sintase atau ferokelatase yaitu suatu enzim mitokondria. Biosintesis *heme* terjadi hampir di dalam sebagian besar jaringan, kecuali eritrosit matang yang tidak mengandung mitokondria (Murray, 1996).

2.1.6.2 Degradasi hemoglobin

Dalam keadaan fisiologi pada manusia dewasa, $1-2 \times 10^8$ eritrosit dihancurkan setiap jam. Dalam waktu satu hari seseorang dengan berat badan 70 kg akan mengganti hemoglobin sekitar 6 gram. Jika hemoglobin dihancurkan dalam tubuh, globin diuraikan menjadi asam amino pembentuknya yang kemudian akan digunakan kembali, sedangkan besi dari *heme* akan memasuki depot zat besi juga untuk pemakaian kembali. Bagian porfirin tanpa besi pada *heme* juga diuraikan, terutama di dalam sel sel retikuloendotel pada hepar, limpa dan sumsum tulang (Murray, 1996).

Katabolisme *heme* terjadi dalam fraksi mikrosom sel retikuloendotel oleh sebuah sistem enzim yang kompleks yang disebut *heme oksigenase* yang memerlukan oksigen dan NADPH (Wells & William, 1992; Murray, 1996). Melalui sistem enzim, *heme oksigenase*, zat besi mengalami oksidasi membentuk ferri yang merupakan *hemin*. Selanjutnya *hemin* direduksi dengan bantuan NADPH dan penambahan oksigen pada jembatan α -methene antara pirol I dan pirol II porfirin. Zat besi bentuk ferro teroksidasi kembali menjadi bentuk ferri. Dengan penambahan oksigen lagi ion ferri dilepaskan, dihasilkan karbon monoksida dan terjadi pemecahan cincin tetrapirrol sehingga terbentuk biliverdin IX- α (Wells & William, 1992; Murray, 1996).

Biliverdin IX- α akan mengalami reduksi pada jembatan methene antara pirol III dan pirol IV untuk menghasilkan bilirubin IX- α , yaitu suatu pigmen berwarna kuning. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim biliverdin reduktase. Diperkirakan 1 gram hemoglobin menghasilkan 35 mg bilirubin. Bilirubin yang terbentuk tiap hari pada manusia dewasa sekitar 250-350 mg terutama berasal dari hemoglobin, juga dari proses eritropoiesis yang tidak efektif dan protein *heme* lainnya seperti sitokrom P-450. Bilirubin yang terbentuk dalam jaringan perifer akan diangkut ke dalam hepar oleh albumin plasma (Wells & Williams, 1992; Murray, 1996).



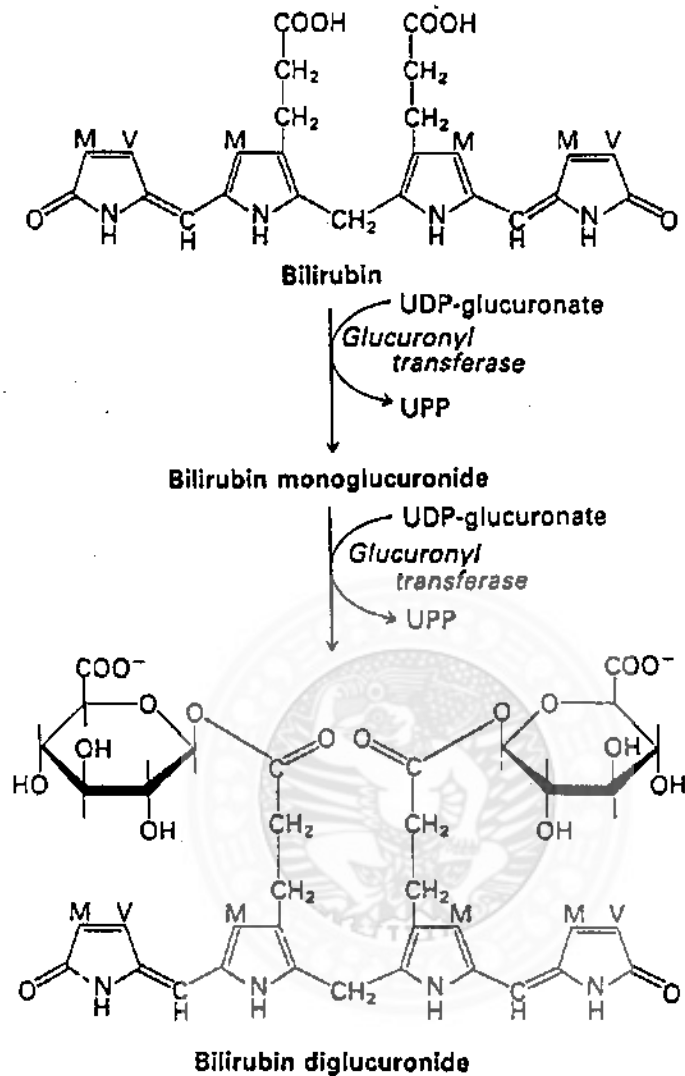
Gambar. 2.8 Ringkasan degradasi hemoglobin.
Sumber : Paterson, 1987.

Metabolisme bilirubin selanjutnya terutama terjadi dalam hepar yang terbagi dalam tiga proses, yaitu : pengambilan bilirubin oleh sel parenkim hepar, konjugasi bilirubin dalam retikulum endoplasma halus dan sekresi bilirubin terkonjugasi ke-

dalam empedu. Dalam hepar bilirubin dilepas dari albumin dan selanjutnya melintasi permukaan sinusoidal dengan bantuan mikrovili hepatosit yang ada dipermukaan (Paterson, 1987). Bilirubin bersifat nonpolar dan akan tertahan dalam sel (terikat lipid) jika tidak dibuat dapat larut dalam air. Dalam sel hepatosit, bilirubin akan diikat oleh protein sehingga menjadi bentuk yang polar. Selanjutnya dengan penambahan asam glukuronat maka bilirubin dapat diekskresikan dengan mudah ke dalam empedu (Paterson, 1987; Murray, 1996).

Hepar mengandung sedikitnya dua buah isoform enzim glukoroniltransferase yang keduanya bekerja pada bilirubin. Enzim ini terutama terdapat dalam retikulum endoplasma halus dan menggunakan UDP-asam glukuronat sebagai donor glukuronat. Bilirubin monoglukoronida merupakan senyawa antara yang selanjutnya akan dikonversikan menjadi bentuk diglukoronida. Sebagian besar bilirubin yang diekskresikan ke dalam empedu mamalia berbentuk bilirubin diglukuronida (Wells & William, 1992; Murray, 1996).

Ekskresi bilirubin terkonjugasi ke dalam empedu terjadi melalui mekanisme pengangkutan aktif. Dalam keadaan fisiologi seluruh bilirubin yang diekskresikan kedalam empedu berada dalam bentuk terkonjugasi. Setelah bilirubin terkonjugasi mencapai ileum terminalis dan usus besar, glukuronida dilepaskan oleh enzim bakteri yang khusus (enzim β -glukuronidase), dan pigmen tersebut selanjutnya direduksi oleh flora feses menjadi senyawa tetrapirrol tak berwarna yang disebut urobilinogen. Dalam illeum dan usus besar, sebagian kecil urobilinogen diserap kembali dan diekskresikan kembali lewat hepar sehingga terbentuk siklus urobilinogen intra-hepatik.



Gambar. 2.9. Konjugasi bilirubin.
Sumber. Pateson, 1987.

Dalam keadaan normal sebagian besar urobilinogen tak berwarna yang terbentuk dalam kolon oleh flora feces akan teroksidasi menjadi urobilin (senyawa berwarna) dan diekskresikan ke dalam feces. Warna feces berubah menjadi coklat tua ketika dibiarkan terpapar udara disebabkan oleh oksidasi urobilinogen sisa menjadi urobilin (Wells & Williams, 1992; Murray, 1996).

2.1.7 Defisiensi zat besi.

Defisiensi zat besi adalah keadaan dimana kandungan zat besi dalam tubuh kurang dari normal. Defisiensi zat besi mungkin terjadi sebagai akibat dari beberapa faktor seperti; masukan zat besi yang ada dalam makanan tidak mencukupi, gangguan absorpsi zat besi, kehilangan darah kronik, pengalihan zat besi pada fetus dan eritropoiesis bayi selama kehamilan dan laktasi, hemolisis intravaskular dengan hemoglobinuria, atau kombinasi dari faktor-faktor tersebut (Fairbanks & Beutler, 1995).

Kebutuhan zat besi yang direkomendasikan oleh RDA (*Recommended Dietary Allowance*) untuk laki-laki dewasa sebesar 10 mg, untuk wanita dewasa adalah 15 mg, selama kehamilan sebesar 30 mg (Brody, 1994). Untuk kebutuhan sehari-hari tergantung pada usia dan juga tingkat pertumbuhan dan perkembangan pada anak. *The Commite on Nutrition of America Academy of Pediatrics* memberikan rekomendasi 1 mg/kg/hr maksimal 15 mg untuk bayi cukup bulan dan 2 mg/kg/hr maksimal 15 mg untuk bayi kurang bulan, 10 mg/kg/hr untuk anak sampai umur 10 tahun dan 18 mg/kg/hr pada anak umur 11 tahun ke atas (Tamboen, 1991 dalam Kuswarini, 1998).

Bila masukan zat besi yang dapat diabsorpsi cukup maka mukosa usus mengatur absorpsi zat besi untuk menjaga kandungan zat besi tubuh tetap konstan. Pada keadaan defisiensi zat besi, absorpsi zat besi meningkat dari 10% menjadi 20% atau 30 %. Namun respon ini mungkin tidak cukup untuk mencegah anemia defisiensi zat besi dimana masukan zat besi terbatas. Dari hasil penelitian di Amerika Serikat dikemukakan bahwa dalam periode kehidupan ada empat masa/waktu, dimana

asupan zat besi tidak mencukupi yaitu: pada masa umur 6 bulan – 4 tahun, masa pertumbuhan remaja, masa periode reproduksi dan masa kehamilan (Herbert, 1987).

Defisiensi zat besi dapat terjadi dalam berbagai tingkat keparahan yaitu: (Herbert, 1987; Fairbanks & Beutler, 1995) Kekurangan zat besi (*iron depletion*), kekurangan zat besi tanpa anemia (*normocytic iron-deficient erythropoiesis*) dan anemia kurang zat besi tingkat yang paling lanjut dari kekurangan zat besi.

Kekurangan zat besi (*Iron depletion*) merupakan tahap awal kekurangan zat besi, simpanan zat besi menurun atau tidak ada atau kadar ferritin plasma menurun $<12 \mu\text{g/L}$, namun konsentrasi zat besi dalam serum dan kadar hemoglobin normal. Pada kekurangan zat besi tanpa anemia dimana telah terjadi penurunan atau tidak adanya cadangan zat besi, konsentrasi zat besi dalam serum dan saturasi transferrin menurun, sedangkan kadar hemoglobin dalam batas 95 %, yang disertai protoporfirin sel darah merah meningkat. Sedangkan pada anemia kurang zat besi tingkat paling lanjut cadangan zat besi menurun atau tidak ada, terjadi penurunan konsentrasi zat besi serum, saturasi transferrin dan kadar hemoglobin. Pada tingkat ini kadar Hb menurun sampai di bawah normal dan sel darah berbentuk mikrositik dan hipokromik.

Dalam mengukur status zat besi dari individu ada tiga bagian utama dari zat besi tubuh yang perlu dipertimbangkan, yaitu (Channarin, 1991 b):

1. Simpanan zat besi, dalam bentuk ferritin dan hemosiderin dalam makrofag dan hepatosit.
2. Bentuk transport zat besi, zat besi dalam plasma terikat pada protein transport, yaitu transferin.

3. Zat besi dalam sel darah merah, sebagai hemoglobin

Konsentrasi ferritin serum berhubungan erat dengan konsentrasi zat besi *non heme* jaringan dan dapat digunakan untuk mengukur secara tidak langsung total persediaan zat besi tubuh. Hal ini karena zat besi intraseluler adalah perangsang utama sintesis ferritin dan sejumlah kecil protein yang baru disintesis, yang disekresi ke sirkulasi oleh makrofag dan hepatosit (Chanarin, 1991 b). Sintesis transferrin dalam hepar berbanding terbalik dengan simpanan besi dengan kapasitas total pengikatan zat besi dalam serum (TIBC), yaitu pada keadaan defisiensi zat besi sintesis transferrin meningkat dan menurun pada keadaan kelebihan zat besi. Konsentrasi zat besi serum dan saturasi transferrin memberikan suatu ukuran pada aliran asupan zat besi ke jaringan. Persentase saturasi transferrin memberikan petunjuk pada ketersediaan zat besi menuju jaringan. Nilai saturasi transferrin dibawah 16% pada orang dewasa menimbulkan eritropoiesis defisiensi zat besi (Chanarin, 1991).

2.2. Asam askorbat (Vitamin C)

2.2.1 Kebutuhan asam askorbat bagi tubuh.

Vitamin C merupakan vitamin yang larut air, suatu vitamin yang esensial bagi tubuh manusia, primata lain, marmut dan hewan pemakan buah yang tidak dapat mensintesis vitamin. Vitamin C terdapat dalam sayuran, buah-buahan, dan organ-organ hewan seperti hati, ginjal, dan otak (Bender,*dkk.*, 1997).

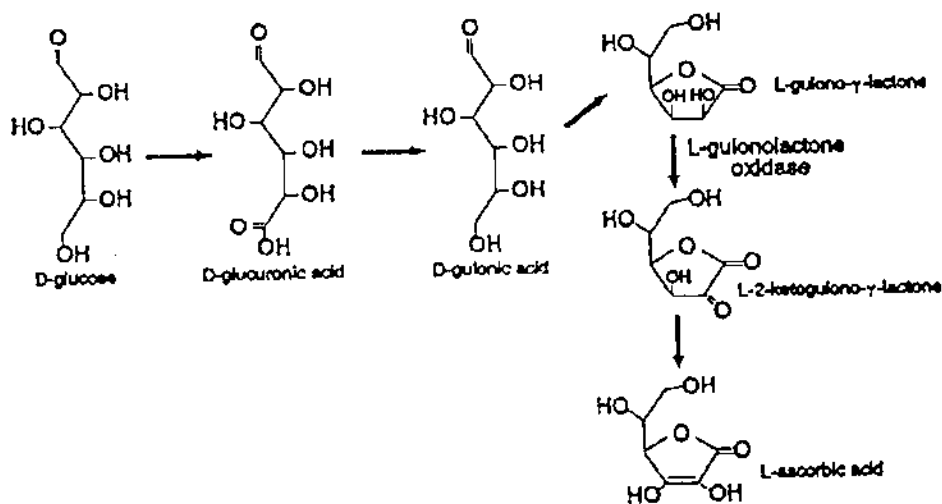
Kebutuhan asam askorbat sesuai dengan yang direkomendasikan oleh RDA (Recommended Dietary Allowance) untuk dewasa adalah 60 mg/hari dengan absorpsi

85% dari asupan. RDA asam askorbat untuk wanita hamil adalah dengan penambahan 10 mg/hari selama kehamilan untuk memenuhi kebutuhan fetus yang meningkat dan untuk wanita menyusui dengan penambahan 35 mg/hari selama menyusui untuk menjaga kadar askorbat dalam susu. RDA untuk bayi adalah 30 mg/hari dan anak lebih dari 6 bulan adalah 60 mg/hari. Sedangkan RDA untuk perokok sekitar 100 mg/hari (Halsted, 1994). Pada kelebihan asupan vitamin C, kadar cadangan vitamin C dalam jaringan menjadi jenuh dan jumlah vitamin C yang diekskresikan melalui urine akan meningkat (Bender, *dkk.*, 1997).

Vitamin C merupakan donor elektron untuk oksidan termasuk oksigen dan ion-ion logam untuk menghasilkan asam dehidroaskorbat dan mereduksi oksidan. Vitamin C juga bekerja sebagai kofaktor dalam reaksi hidroksilasi yang memerlukan oksigen (Bender, *dkk.*, 1997).

2.2.2 Metabolisme asam askorbat.

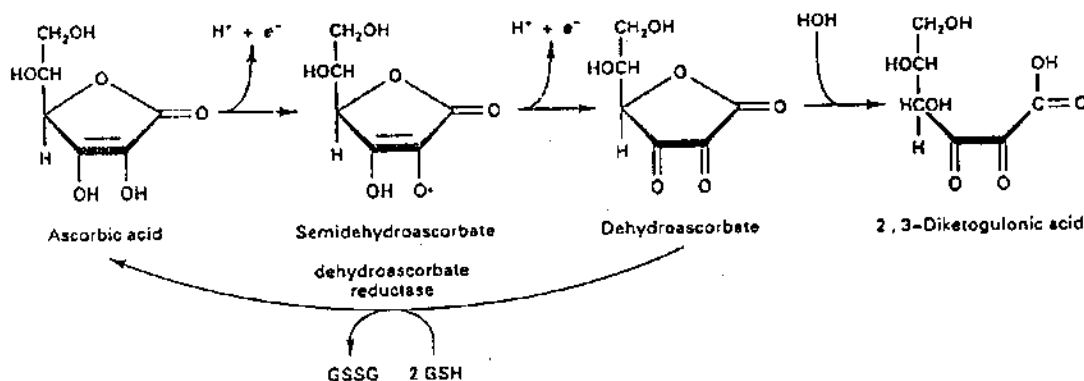
Asam askorbat adalah bahan kristal warna putih yang disintesis dari D-glukosa atau D-galaktosa, yang merupakan senyawa antara dalam jalur glukonolaktone dari metabolisme glukosa. Secara reversible asam askorbat dioksidasi menjadi asam L-dehidroaskorbat. Asam askorbat dan dehidroaskorbat secara fisiologi adalah bentuk aktif dari vitamin. Asam askorbat merupakan agent pereduksi yang kuat; sebagai antioksidan dan sebagai kofaktor dalam reaksi hidroksilasi (Halsted, 1994).



Gambar 2.10 Biosintesis asam askorbat.

Sumber : Combs, 1992

Secara umum bentuk vitamin C adalah asam askorbat yang merupakan bentuk tereduksi dari vitamin. Pemindahan satu elektron dari asam askorbat menghasilkan asam semidehidroaskorbat. Bentuk ini merupakan suatu radikal bebas mengandung elektron yang tidak berpasangan. Pemindahan elektron kedua menghasilkan asam dehidroaskorbat. Konversi askorbat menjadi dehidroaskorbat melewati pemindahan dua elektron. Enzim dehidroaskorbat reduktase mengkatalisis pembentukan kembali asam askorbat dari dehidroaskorbat. Asam askorbat dan dehidroaskorbat mempunyai aktivitas biologi. Selanjutnya dehidroaskorbat membentuk asam diketogulonat yang tidak mempunyai aktivitas biologi atau fungsi vitamin hilang (Brody, 1994).



Gambar 2.11 Metabolisme asam askorbat
Sumber. Brody, 1994.

Asam askorbat dapat berinteraksi dengan beberapa elemen logam dari nutrisi secara signifikan. Dalam lumen usus asam askorbat berfungsi dalam mengikat zat besi dan mempertahankannya dalam keadaan tereduksi sehingga meningkatkan jumlah zat besi yang diabsorpsi. Asam askorbat juga aktif mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} pada transferrin plasma untuk simpanan ferritin dalam hepar atau sintesis *heme*. Namun belum diketahui apakah kerja dari askorbat ini spesifik sebab terdapatnya agent-agent pereduksi yang lain seperti glutathion yang juga meningkatkan sintesis *heme* dan enzim reduktase tergantung NADH yang merupakan faktor pengontrol utama transfer zat besi antara transferrin dan ferritin (Bender, *dkk.*,1997).

Asam askorbat diabsorpsi melalui membran brush border mukosa usus dengan proses transport aktif. Dehidroaskorbat diabsorpsi mukosa usus diperantarai *carrier* yang diikuti dengan tereduksinya dehidroaskorbat menjadi askorbat. Pada asupan asam askorbat biasa (~100mg/hari) sebanyak 80–95% askorbat akan diabsorpsi. Bila jumlah asam askorbat lebih besar maka efisiensi absorpsi akan lebih

rendah. Pada dosis asupan asam askorbat 1,5 g absorpsi akan menurun menjadi 50%. Sedangkan pada dosis asupan asam askorbat 6 g absorpsi akan menurun menjadi 25% dan pada dosis asupan 12 g absorpsi akan menurun menjadi 16% (Olson, *dkk.*, 1987; Bender, *dkk.*, 1997).

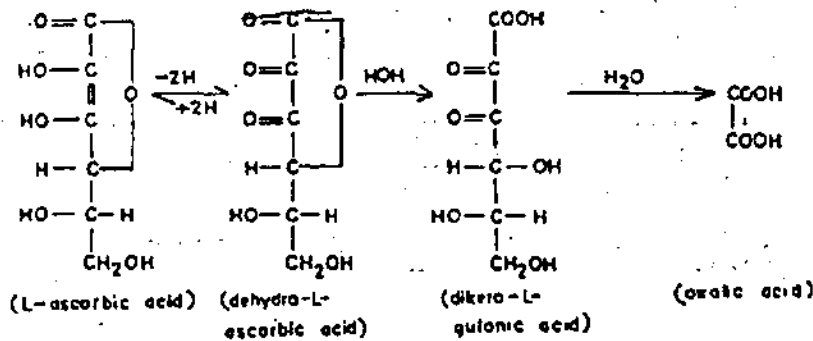
Asam askorbat terdistribusi secara luas pada semua jaringan tubuh. Beberapa jaringan seperti kelenjar adrenal, kelenjar pituitary, retina secara normal mengandung asam askorbat pada konsentrasi yang tinggi sekitar 1-2 mg/g, dan jaringan lain seperti hepar, paru-paru pancreas dan leukosit mempunyai kadar asam askorbat sedang sekitar 0,1- 1 mg/g. Sedangkan jaringan lain seperti ginjal, otot dan sel darah merah mempunyai kadar yang lebih rendah sekitar 0,02-0.1 mg/g. Konsentrasi asam askorbat pada jaringan biasanya 3-10 kali lebih besar dari konsentrasi asam askorbat pada plasma (Olson, *dkk.*, 1987).

Asam askorbat ditransport dalam plasma, berhubungan dengan protein albumin. Secara normal sekitar 5% vitamin C plasma adalah dehidroaskorbat. Pada keadaan fisiologi asam askorbat berada sebagai askorbat monoamin yang tidak dapat melewati banyak membran secara cepat. Asupan dari asam askorbat selluler yaitu pada eritrosit, limposit dan neutrofil membutuhkan asam dehidroaskorbat yang dapat melewati membran masuk melalui sistem transport aktif ke dalam sel. Pada saat asam dehidroaskorbat dibawa masuk ke dalam sel dengan cepat asam dehidroaskorbat direduksi menjadi asam askorbat oleh enzim intraselluler yaitu dehidroaskorbat reduktase dengan bantuan glutathion dalam bentuk tereduksi (Combs, 1992 Bender, *dkk.*, 1997).

Jumlah total asam askorbat dalam tubuh dipengaruhi oleh terbatasnya absorpsi usus dan tubulus renalis. Asam askorbat dalam tubuh mencapai maksimum 20 mg/kg berat badan, dengan kata lain bila asupan asam askorbat sekitar 30 – 180 mg/hari maka jumlah total asam askorbat dalam tubuh sekitar 1,5 gram. Bila masukan asam askorbat lebih besar dari kadar tersebut di atas maka ekskresi asam askorbat melalui urine akan meningkat dengan cepat (Haisted, 1994).

Asam askorbat terutama diekskresi melalui urine. Asam askorbat dan dehidroaskorbat difiltrasi pada glomerulus, kemudian diresorpsi dengan cara difusi dan tidak tergantung natrium. Dehidroaskorbat diresorpsi dan direduksi menjadi asam askorbat dalam ginjal. Bila filtrasi glomerulus dari asam askorbat dan dehidroaskorbat melebihi kapasitas sistem transport pada konsentrasi asam askorbat antara 70–80 $\mu\text{mol/L}$, maka vitamin diekskresi melalui urine dalam jumlah yang sebanding dengan jumlah asupan (Bender, *dkk.*, 1997). Bila asupan asam askorbat < 100mg/hari maka produk ekskresi melalui urine yang utama adalah oksalat dan bila asupan asam askorbat > 1 gram sebagian besar asam askorbat diekskresi dalam bentuk yang tidak dimetabolisir walaupun kadar oksalat juga meningkat (Herbert, 1987).

Asam askorbat berperan dalam absorpsi zat besi terutama pada permukaan sel mukosa usus dengan cara mengikat zat besi dan mereduksi ion ferri menjadi ion ferro serta mempertahankan zat besi dalam bentuk tereduksi.



Gambar, 2.12 Pembentukan asam oksalat
Sumber. Talwar, 1980

2.3. Asam sitrat.

Asam sitrat adalah asam trikarboksilat dimana tiap molekulnya mengandung tiga gugus karboksil dan satu gugus hidroksil yang terikat pada atom karbon. Asam sitrat merupakan zat yang mempunyai efek antioksidan relatif kecil bila digunakan sendiri, namun akan menaikkan aktivitas antioksidan bila digunakan bersama dengan antioksidan tersebut. Selain sebagai senyawa sinergis asam sitrat sangat efektif sebagai bahan pengikat logam (*metal chelating agent*). Sebagai *chelating agent*, asam sitrat dapat mengikat ion-ion logam sehingga dapat meningkatkan efisiensi dari antioksidan (Grosch, 1987; Min, 1992).

Scheele (1784) melaporkan bahwa asam sitrat dapat diisolasi dari perasan buah jeruk dalam bentuk kristal. Pada tahun 1893 Wehmer menemukan bahwa asam sitrat dapat dihasilkan dari fungi tertentu bila ditumbuhkan pada larutan gula. Peneliti

lain juga melaporkan bahwa asam sitrat dapat disintesis dari gliserol. Sedangkan sekarang produksi komersial dari asam sitrat diperoleh melalui proses fermentasi (Othmer, 1979).

Asam sitrat berupa hablur, tidak berwarna atau serbuk putih, tidak berbau, rasa asam, dalam udara lembab agak higroskopis, dalam udara kering dan panas agak rapuh. Asam sitrat mudah larut dalam air, paling banyak terdapat pada buah-buahan misalnya tomat, jeruk, apel, nenas, strawberries, dan sayur-sayuran misalnya asparagus maupun kentang (Othmer, 1979).

Dalam tubuh asam sitrat terdapat dalam sistem metabolik oksidatif terminal seperti pada siklus asam trikarboksilat (TCA) merupakan siklus metabolik antara yang melibatkan langkah-langkah terminal dalam konversi karbohidrat, lemak atau protein menjadi karbon dioksida dan air dengan melepaskan energi yang diperlukan untuk pertumbuhan, pergerakan dan reproduksi (Othmer, 1979). Ion-ion sitrat terdapat pada jaringan hewan. Darah manusia mengandung kadar asam sitrat sekitar 15 ppm, plasma darah sekitar 25 ppm, dan sel darah merah sekitar 10 ppm.

Kandungan asam sitrat pada susu sekitar 500-1250 ppm, pada urine sekitar 100-750 ppm, pada semen sekitar 2000-4000 ppm, dan pada cairan cerebrospinal sekitar 25 – 50 ppm. Sedangkan kandungan asam sitrat pada kelenjar susu sekitar 3000 ppm, pada kelenjar tiroid sekitar 750 – 900 ppm dan pada ginjal sekitar 20 ppm. Dalam tulang, cairan amnion, air mata, air ludah dan keringat, kandungan asam sitratnya berturut-turut sekitar 500 ppm, 17 -100 ppm, 5-7 ppm, 4-24 ppm, 1-2 ppm. Sedangkan otot kerangka, hepar, dan otak kadar asam sitratnya sekitar 2-100 ppm. Pada ayam kandungan asam sitrat dalam hepar sekitar 108 ppm, sedangkan pada

ginjal dan jantung sekitar 142 ppm, pancreas sekitar 667 ppm dan jaringan-jaringan lain kandungan asam sitratnya sekitar 507 ppm. Sirkulasi total asam sitrat dalam serum pada manusia diperkirakan 1mg/kg berat badan. Ekskresi harian dalam urine manusia normalnya adalah 0,2 – 1 g (Othmer 1979).

Asam sitrat merupakan zat yang aman untuk makanan. Jumlah garam asam sitrat yang dapat ditambahkan pada makanan diperkirakan 500 mg/orang/hari (Othmer,1979). Sebagai asam lemah asam sitrat menyebabkan sedikit kerusakan pada logam-logam substrat, namun seperti ion logam, asam sitrat mempercepat pergerakan dari oksida-oksida logam. Disamping itu asam sitrat menginaktifkan beberapa enzim dan mengikat elemen runutan dalam larutan mikroelemen. Sebagai antioksidan sinergis asam sitrat dapat meningkatkan aktivitas antioksidan lain.

Dalam hubungannya dengan absorpsi zat besi ke dalam tubuh, asam sitrat dapat berperan membentuk kompleks dengan besi sehingga zat besi dengan mudah dapat diabsorpsi kedalam mukosa usus. Konstanta ikatan pembentukan kompleks ferri sitrat adalah 3×10^{12} sedangkan ferro sitrat adalah 10^3 , dan ferro askorbat adalah 20 (Crawford, 1995).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konseptual penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka, asam askorbat maupun asam sitrat adalah senyawa organik yang dapat meningkatkan absorpsi zat besi dalam tubuh.

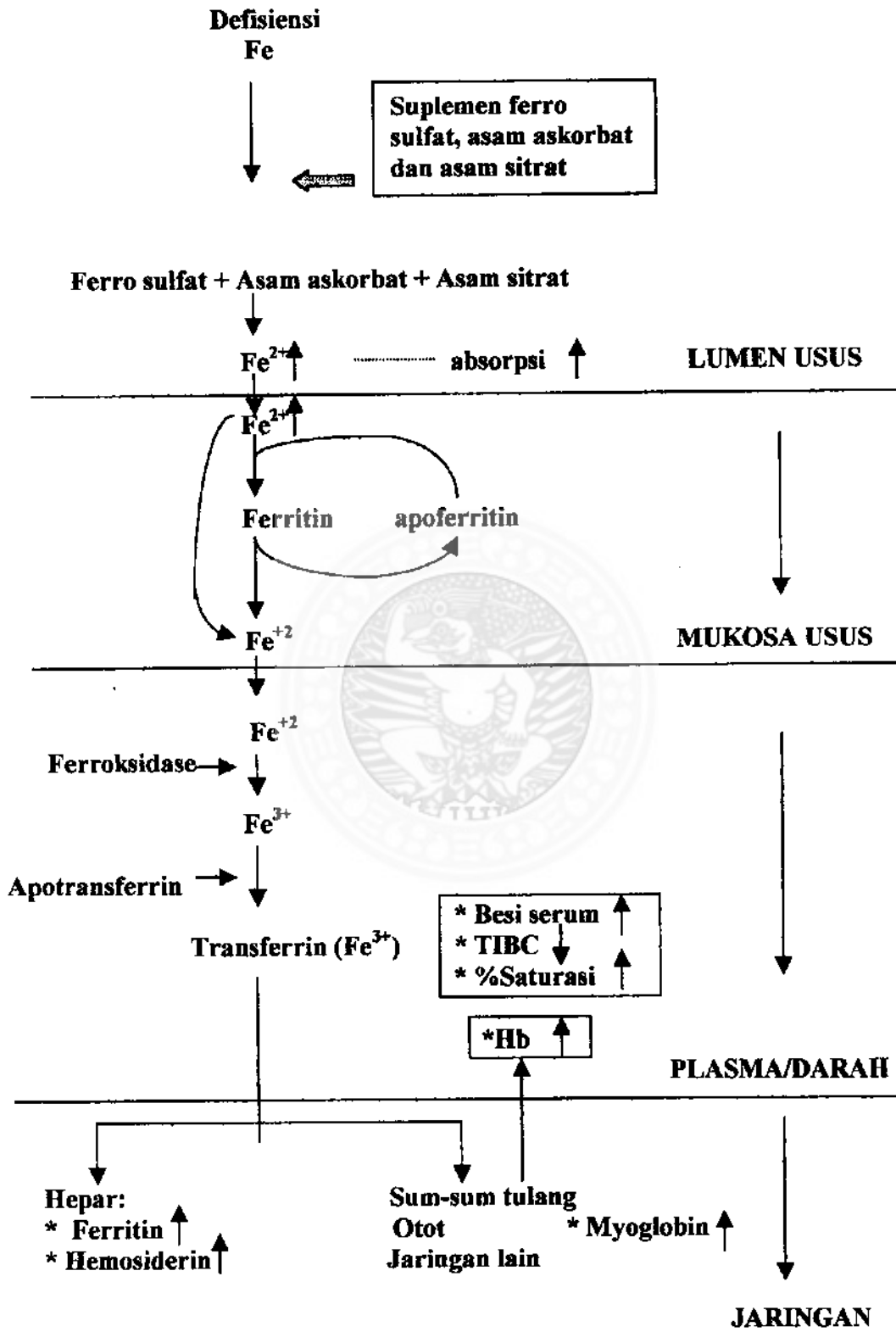
Keadaan defisiensi zat besi sangat dipengaruhi oleh asupan zat besi yang rendah maupun kurangnya absorpsi zat besi oleh mukosa usus. Untuk mengatasi anemia defisiensi zat besi perlu asupan zat besi yang cukup. Selain itu asam askorbat dan asam sitrat dapat meningkatkan absorpsi zat besi pada permukaan mukosa usus. Untuk itu bagaimana bila kedua senyawa ini dikombinasikan dengan ferro sulfat untuk meningkatkan absorpsi zat besi ke dalam tubuh, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Walaupun penelitian mengenai pengaruh asam askorbat terhadap absorpsi zat besi ini sudah banyak dilakukan namun, mengingat penelitian ini dilakukan pada kondisi yang berbeda dengan penelitian sebelumnya, maka penelitian tentang kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap status zat besi di dalam tubuh.

Dengan pemberian preparat besi bersama asam askorbat dan asam sitrat akan terjadi peningkatan absorpsi zat besi dalam usus sehingga diharapkan meningkatkan status zat besi dalam tubuh. Untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat terhadap status zat besi, dapat dilakukan penelitian dengan menggunakan tikus sebagai model. Dosis zat besi dan

asam askorbat maupun asam sitrat yang digunakan adalah sesuai dengan dosis yang telah dikonversi sesuai dengan berat badan tikus terhadap berat badan manusia sehingga diperoleh dosis ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat yang sesuai untuk tikus percobaan . Untuk mengetahui peningkatan status zat besi dalam tubuh parameter yang digunakan adalah peningkatan kadar hemoglobin, zat besi dalam serum (SI), persen saturasi transferrin dan penurunan kadar *total iron binding capacity* (TIBC). Lebih jelasnya dapat dilihat dalam bagan dibawah ini.





Gambar 3.1 Bagan Kerangka konseptual penelitian

3.2 Hipotesis.

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.
2. Pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi.
3. Pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi lebih baik dari kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat.

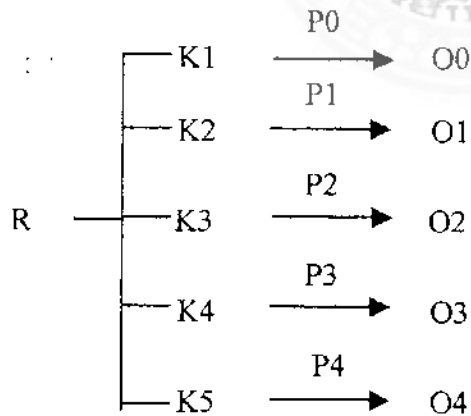


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Jenis penelitian yang akan dilaksanakan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian *The Post-test Only Control Group Design* (Zainuddin, 1999). Rancangan penelitian ini disusun sebagai langkah untuk menjawab permasalahan mengenai pengaruh pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat yang diberikan pada kelompok perlakuan pada hewan coba tikus, yang masing-masing diberikan ferro sulfat (P1), kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat (P2), kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat (P3), dan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat (P4) dibandingkan dengan kelompok hewan coba tikus pada keadaan defisiensi zat besi (P0). Rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan : R = Random

K (1,2,...5) = Kelompok

P0 = keadaan defisiensi zat besi

P1,P2, P3, P4 = Perlakuan.

O0, O1, O2,O3,O4 = Pengamatan/ pengukuran.

4.2. Populasi, sampel, besar sampel dan teknik pengambilan sampel.

Populasi dalam penelitian ini adalah hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, jenis kelamin betina, berumur kurang lebih 4 minggu dari laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Populasi hewan coba tikus sebelum diberikan pakan perlakuan dibuat defisiensi zat besi. Sampel diambil dari populasi hewan coba yang sudah dibuat defisiensi zat besi dan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yang diambil secara random dengan cara mengundi setiap tikus yang sebelumnya sudah diberi nomor .

Dua minggu sebelum dilakukan penelitian hewan coba dipelihara dalam kondisi yang sama dengan menggunakan pakan standard jenis Par G dari PT. Coomfeed, sedangkan air minum yang digunakan adalah air PDAM. Makanan dan minuman diberikan secara ad libitum. Untuk membuat defisiensi zat besi hewan coba tikus diberi pakan rendah zat besi selama 8 minggu.

Besar sampel atau jumlah ulangan (replikasi) dihitung dengan rumus sebagai berikut : (Steel & Torrie, 1991).

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2_D}{\delta^2}$$

Keterangan : $\alpha = 0,05$

$$Z_{\alpha} = Z_{0,05} .$$

$$\begin{aligned}Z_{\beta} &= Z_{0,20} = 0,85 \\n &= (1,65 + 0,85)^2 \\&= 6,25 \text{ (dibulatkan 6)}.\end{aligned}$$

Dalam penelitian ini jumlah replikasi (ulangan) minimal 6 ekor pada tiap kelompok. Dengan memperhitungkan risiko kematian pada hewan coba maka jumlah sampel ditambah menjadi 10 ekor tiap kelompok perlakuan.

4.3. Variabel penelitian dan Definisi operasional

4.3.1 Variabel penelitian

4.3.1.1 Variabel bebas: adalah perlakuan pemberian ferro sulfat, kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat, kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat dan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat .

4.3.1.2 Variabel terikat: adalah kadar hemoglobin (Hb), kadar zat besi serum (SI), kadar *total iron binding capacity* (TIBC), persen saturasi transferrin (% ST).

4.3.1.3 Variabel kendali :

- umur dan jenis kelamin hewan coba
- keadaan defisiensi zat besi
- pakan hewan coba
- waktu pemberian pakan perlakuan

4.3.2 . Definisi Operasional variabel.

4.3.2.1 Pemberian ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat.

Pemberian bahan/ kombinasi bahan dari ferro sulfat asam askorbat dan asam sitrat semua dilakukan dengan sonde langsung ke lambung.

4.3.2.2 Keadaan defisiensi zat besi.

Defisiensi zat besi adalah suatu keadaan dimana kandungan zat besi dalam tubuh kurang dari normal. Pada saat diberi pakan perlakuan, hewan coba sudah dalam keadaan defisiensi zat besi. Keadaan defisiensi zat besi dicapai dengan cara pemberian pakan rendah zat besi. Dikatakan defisiensi bila :

1. Kadar zat besi serum menurun dibawah 181 ug/dl,
2. Kadar TIBC meningkat lebih dari 537 ug/dl,
3. Persen saturasi menurun < 16 %,
4. Disertai penurunan kadar Hb atau tidak. Bila kadar Hb dibawah 12 g/dl maka tikus dikatakan anemia defisiensi zat besi.

Tikus dikatakan telah mengalami defisiensi zat besi bila memenuhi kriteria 1 dan 3 atau 2 dan 3. Dengan demikian defisiensi zat besi adalah merupakan suatu kondisi yang terjadi karena berkurangnya jumlah total besi dalam tubuh yang mengakibatkan penurunan persediaan zat besi untuk eritropoesis.

4.3.2.8 Pakan hewan coba.

Pakan hewan coba yang digunakan terdiri dari pakan standar, pakan rendah zat besi dan pakan perlakuan. Pakan standar yang digunakan adalah pakan jenis Par G dari PT Comfeed. Untuk pakan rendah zat besi adalah pakan yang dibuat dengan komposisi zat besi yang rendah. Komposisi pakan rendah zat besi terdapat pada lampiran 2 halaman 89. Sedangkan pakan perlakuan yang digunakan adalah pakan rendah zat besi yang disuplemen dengan ferro sulfat, asam askorbat maupun /dan asam sitrat (lampiran 2 halaman 89).

4.3.2.3 Waktu pemberian pakan perlakuan

Pemberian pakan perlakuan dilakukan selama 2 minggu pada hewan coba tikus yang telah dibuat defisiensi zat besi sehingga terjadi perubahan pada kadar Hb, kadar zat besi serum, kadar TIBC dan persen saturasi transferrin (Santi & Ries, 1998, Kuswarini, 1998). Untuk membuat defisiensi zat besi hewan coba tikus diberi pakan rendah zat besi selama 8 minggu.

4.4 Bahan penelitian .

4.4.1 Bahan pakan penelitian

Bahan pakan dalam penelitian terdiri dari pakan standar, pakan defisiensi zat besi dan pakan perlakuan. Pakan standar yang digunakan adalah pakan jenis Par G dari PT Comfeed berbentuk pellet. Untuk pakan rendah zat besi dibuat dengan komposisi zat besi yang rendah. Agar tidak mempengaruhi kadar zat besi dalam pakan atau untuk menghindari kontaminasi zat besi, semua bahan makanan dibuat dalam bentuk pellet, dikerjakan dengan tidak menggunakan peralatan dari besi tetapi peralatan dari plastik. Untuk memenuhi kebutuhan cairan pada pemrosesan makanan digunakan aquabidestilata dan diaduk dengan tangan.

Pakan perlakuan menggunakan pakan defisiensi zat besi yang diberikan secara *ad libitum* dan disuplemen dengan ferro sulfat, kombinasi ferro sulfat dan asam askorbat, kombinasi ferro sulfat dan asam sitrat dan kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat, untuk P1, P2, P3 dan P4 berturut-turut yang diberikan melalui sonde langsung ke lambung . Untuk air minum hewan coba selama perlakuan diberi aquabidestilata secara *ad libitum*.

Zat besi yang digunakan dalam penelitian ini dalam bentuk ferro sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) dengan dosis 3,6 mg, asam askorbat dengan dosis 4,5 mg dan asam sitrat dengan dosis 5,4 mg. Untuk perhitungan dapat dilihat pada lampiran 1 halaman 87. Ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat dilarutkan dengan aquabidestilata dalam 2 ml dan diberikan melalui sonde langsung kelambung.

4.4.3 Bahan yang diperiksa

Bahan yang diperiksa adalah darah. Darah diambil dari jantung hewan coba, dimana terlebih dahulu hewan coba dianestesi dengan menggunakan dietileter.

4.5 Instrumen penelitian.

4.5.1 Pemeriksaan kadar hemoglobin.

Pemeriksaan laboratorium untuk mengukur kadar hemoglobin dilakukan dengan metode sianmethemoglobin dengan menggunakan "reagen kit" dari Merckotest katalog no. 1.03317.0001 dari Diagnostica Merck (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany).

Prinsip pemeriksaan parameter kadar hemoglobin.

Dengan menggunakan larutan pereaksi, derivat hemoglobin dalam darah dikonversi menjadi sianmethemoglobin. Larutan yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer. Prosedur pemeriksaan dapat dilihat pada lampiran 3 halaman 92.

4.5.2 Pemeriksaan kadar zat besi serum

Kadar zat besi dalam serum ditentukan dengan menggunakan "reagent kit" dari Merckotest katalog no. 1.12978 dari Diagnostica Merck (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany).

Prinsip pemeriksaan kadar zat besi serum .

Dalam darah zat besi terikat transferrin. Dalam buffer asam klorida zat besi dilepaskan dari transferrin dan zat besi direduksi menjadi bentuk ferro oleh asam askorbat. Dengan penambahan reagen warna ferrozine menghasilkan bentuk kompleks Ferrozine-Fe yang berwarna merah. Intensitas warna secara langsung proporsional dengan konsentrasi zat besi dan diukur dengan spektrofotometer. Adanya tiourea pada reagen warna akan mengikat Cu dan mencegah pembentukan kompleks Ferrozine—Cu (Tietz, 1982). Prosedur pemeriksaan dapat dilihat pada lampiran 3 halaman 93.

4.5. 3 Pemeriksaan *Total Iron Binding Capacity* (TIBC).

Pemeriksaan TIBC menggunakan *reagen kit* dari Merckotest katalog no. 1.1432.0001. dari Diagnostica Merck (Merck, 64271 Darmstadt, Germany).

Prinsip pemeriksaan kadar *total iron binding capacity* (TIBC).

Dalam serum zat besi terikat protein transferrin (siderofilin). Dalam keadaan normal sepertiga dari protein transferrin jenuh dengan zat besi (besi serum). Banyaknya zat besi yang dapat dibawa oleh transferrin disebut *the latent iron binding capacity* (IBC latent). Jumlah total zat besi dalam serum setelah transferrin mencapai kejenuhan disebut *total iron binding capacity* (TIBC).

$TIBC = IBC \text{ latent} + \text{serum iron.}$

Untuk menjenuhkan transferrin serum diberi zat besi yang berlebih . Zat besi yang tidak terikat dipresipitasi dengan magnesium hidroksi karbonat dan kemudian zat besi dalam supernatan ditentukan (Tietz, 1982). Prosedure pemeriksaan dapat dilihat pada lampiran 3 halaman 94

4.5.4 Perhitungan Persen saturasi

$$\% \text{ Saturasi} = \frac{\text{Zat Besi serum}}{\text{TIBC}} \times 100\%$$

4.4 Waktu dan tempat penelitian.

Penelitian ini dilakukan selama 12 minggu di kandang Eksperimental Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Untuk analisis kadar zat besi serum, kadar TIBC, persen saturasi dan kadar Hb dilakukan di Laboratorium Klinik Utama Kedung Doro Jalan Kertajaya 157 Surabaya.

4.7 Prosedure Penelitian.

Pada permulaan penelitian, semua hewan coba yang berumur 4 minggu berjenis kelamin betina diberi pakan standar selama 2 minggu. Selanjutnya secara acak 5 ekor tikus diambil darah untuk diperiksa kadar Hb, kadar zat besi serum, kadar TIBC, persen saturasi sebagai data awal. Untuk mendapatkan keadaan tikus yang defisiensi zat besi, semua tikus diberi pakan rendah zat besi selama 8 minggu, dan setiap 4 minggu dilakukan pemeriksaan kadar Hb, kadar zat besi serum, kadar TIBC, persen saturasi transferrin. Pada 4 minggu pertama 5 ekor tikus diambil secara acak dan pada 4 minggu terakhir diambil 10 ekor tikus sebagai kelompok kontrol. Selama 8 minggu dilakukan pemeriksaan sebanyak 2 kali sehingga tercapai keadaan defisiensi zat besi. Setelah tercapai keadaan defisiensi zat besi, selanjutnya hewan coba dibagi dalam 4 kelompok perlakuan masing-masing:

- P1 adalah kelompok hewan coba tikus yang diberi diet defisiensi zat besi dan disuplemen dengan ferro sulfat dosis 3.6 mg.
- P2 adalah kelompok hewan coba tikus yang diberi diet defisiensi zat besi dan disuplemen dengan ferro sulfat dosis 3.6 mg dan asam askorbat dosis 4.5 mg.
- P3 adalah kelompok hewan coba tikus yang diberi diet defisiensi zat besi dan disuplemen dengan ferro sulfat dosis 3.6 mg dan asam sitrat dosis 5.4 mg
- P4 adalah kelompok hewan coba tikus yang diberi diet defisiensi zat besi dan disuplemen dengan ferro sulfat dosis 3.6 mg, asam askorbat dosis 4.5 mg dan asam sitrat dosis 5.4 mg

Pemberian suplemen dalam bentuk larutan, dilakukan dengan cara disondekan langsung ke lambung setiap hari pada pagi hari selama 2 minggu. Berat badan hewan coba diukur sebelum dan sesudah perlakuan.

Setelah 2 minggu diberi perlakuan, dilakukan pemeriksaan kadar Hb, kadar zat besi serum, kadar TIBC dan persen saturasi pada hewan coba. Sampel darah diambil dari jantung, dengan terlebih dahulu tikus dianestesi dengan menggunakan dietileter. Setelah tikus dianestesi diletakkan di meja dengan posisi terlentang. Selanjutnya dilakukan pembukaan dinding perut dan dada. Darah diambil langsung dari jantung sebanyak 4 sampai 5 ml. Untuk pengambilan darah digunakan spuit steril 5 cc, dengan panjang jarum $\frac{1}{2}$ inch. Dengan jarum suntik ini secara perlahan ditekan sampai masuk ke ruang thoraks yang terbuka menuju titik denyutan dengan arah spuit membentuk sudut sekitar 45° . Darah yang mengalir dihisap ke dalam spuit secara

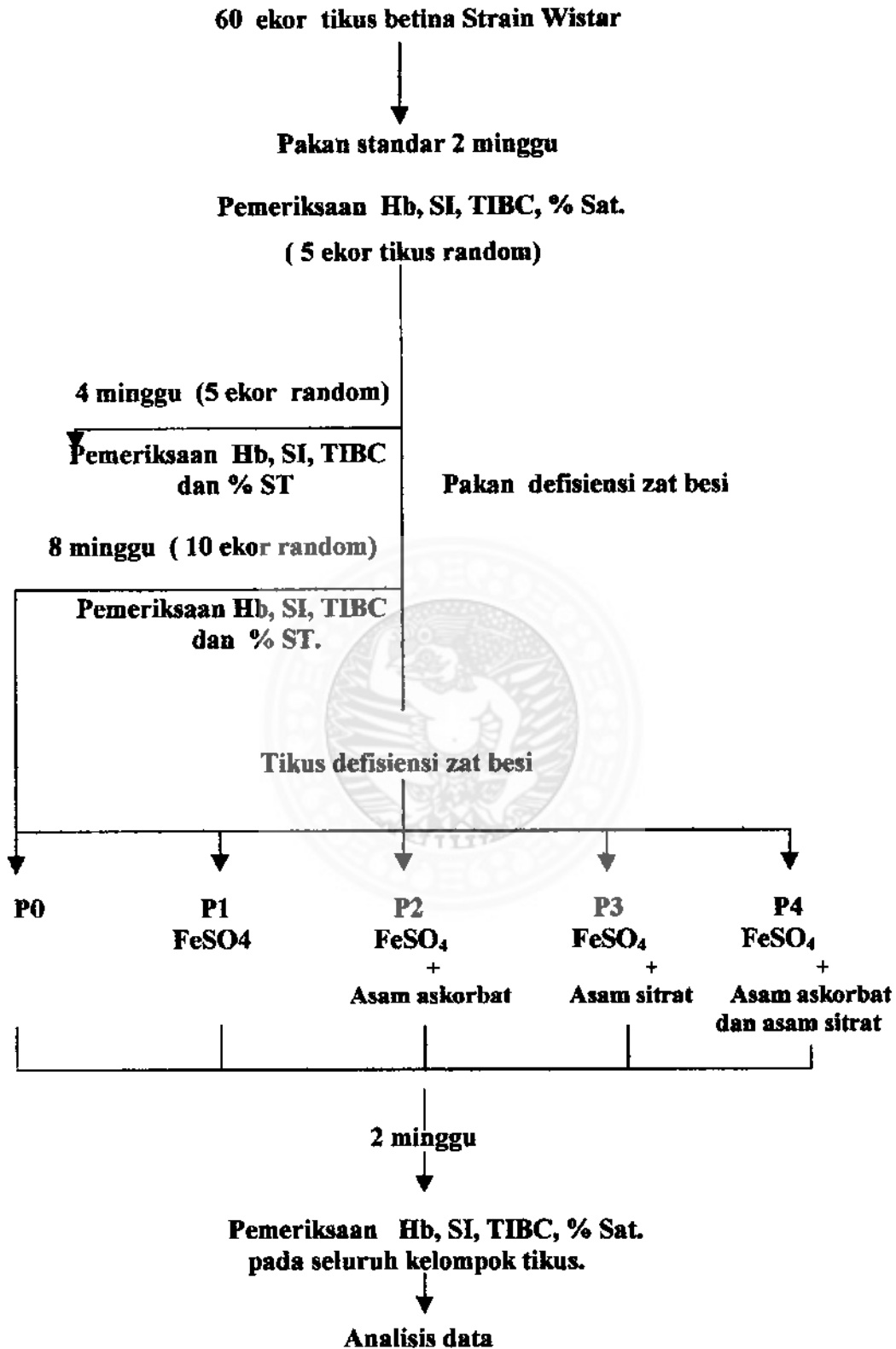
bertahap, kemudian dimasukkan kedalam botol yang sudah diberi EDTA sebagai antikoagulan.

4.8 Analisis data .

Data-data hasil penelitian yang diperoleh setelah ditabulasi kemudian dianalisis melalui uji analisis varians (Anava) dengan derajat kemaknaan 5 %. Setelah itu dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significant Difference Test) untuk mengetahui rincian perbedaan lebih lanjut.

Rumus untuk menghitung LSD:

$$t_{1/2 \alpha} \sqrt{\frac{\text{MSE}}{n}}$$



Gambar 4.1 Bagan Kerangka Operasional Penelitian

BAB 5**ANALISIS HASIL PENELITIAN****5.1 Data hasil pemberian pakan rendah zat besi.**

Pada awal penelitian seluruh tikus diberi pakan standar selama 2 minggu dengan tujuan agar tikus beradaptasi dengan lingkungan sekitarnya. Setelah itu dilakukan pemeriksaan terhadap status zat besi tikus dengan parameter yang diukur yaitu kadar hemoglobin (Hb), zat besi serum (SI), TIBC dan persen saturasi transferrin. Hasil pemeriksaan ini merupakan data awal (dapat dilihat pada lampiran 6 halaman 99).

Dalam usaha membuat tikus menjadi defisiensi zat besi, maka tikus diberi pakan rendah zat besi. Data status zat besi tikus setelah pemberian pakan rendah zat besi selama 8 minggu dapat dilihat pada tabel 5.1 dan tampilan gambar 5.1, 5.2, 5.3, dan 5.4 di bawah ini.

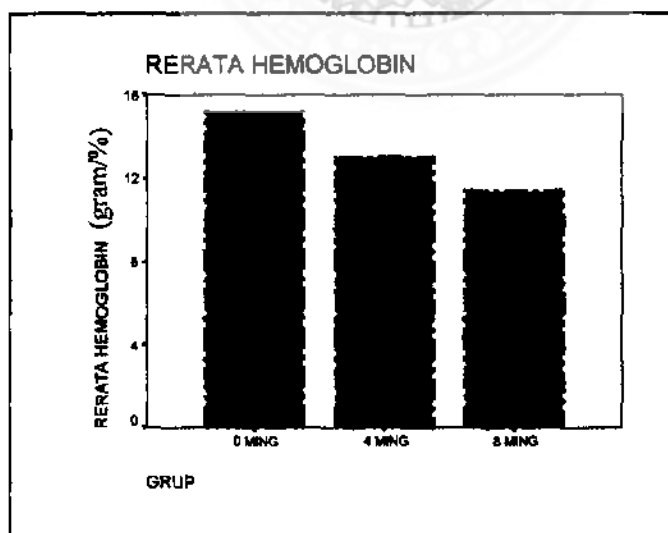
Tabel 5.1 Data status zat besi setelah pemberian pakan rendah zat besi menurut waktu pengamatan

Status zat besi	Waktu pengamatan					
	0 minggu		4 minggu		8 minggu	
	Rerata	Simpangan baku	Rerata	Simpangan baku	Rerata	Simpangan baku
Hemoglobin (gram%)	15.160 ^a	0.305	12.980	0.687	11.300 ^a	0.753
Zat besi serum (µg/dl)	222.900 ^b	20.336	125.060	16.197	72.290 ^b	8.614
TIBC (µg/dl)	474.280	34.778	490.220	18.635	543.150	98.682
Saturasi Fe (%)	47.060 ^c	3.281	25.620	4.143	13.320 ^c	1.699

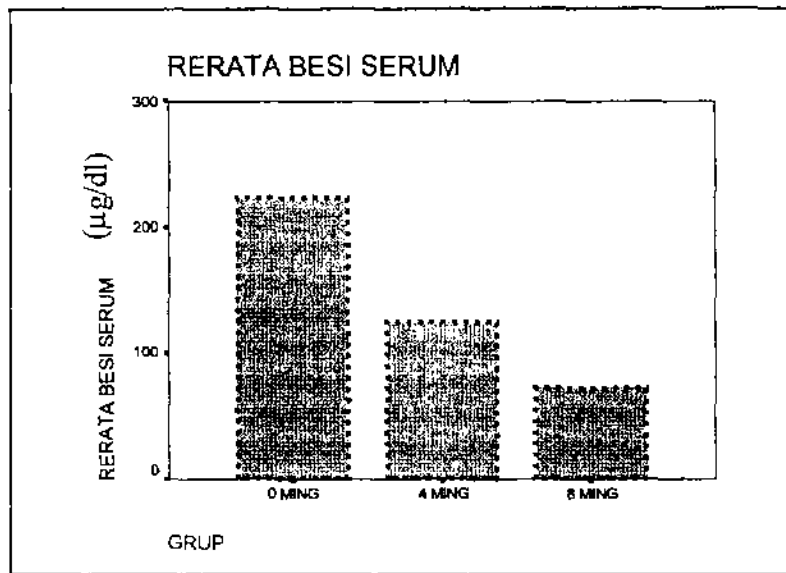
Keterangan: - a,b,c untuk $p < 0.05$ (analisis varians)

- Data 0 minggu diambil dari lampiran 5 halaman 99 yaitu setelah tikus diberi pakan standar untuk adaptasi

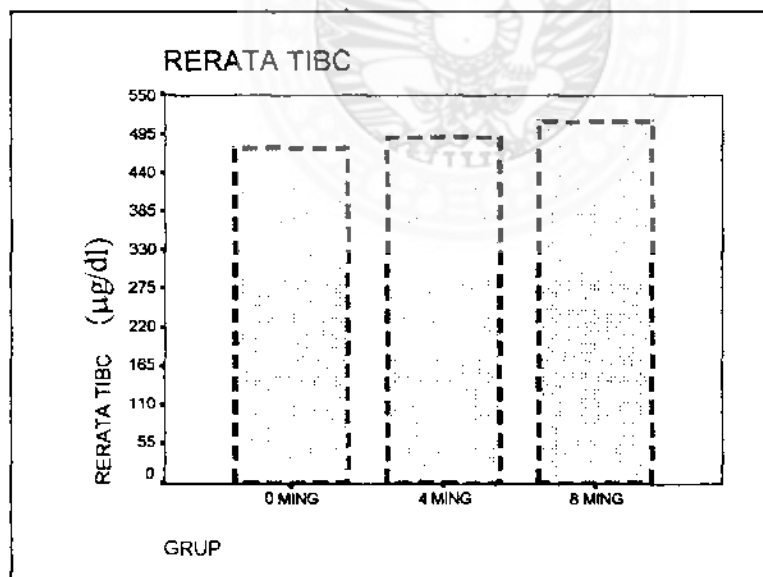
Hasil uji statistik menunjukkan bahwa setelah 4 minggu pemberian pakan rendah zat besi terjadi penurunan status zat besi dimana terjadi penurunan zat besi serum secara bermakna, sedangkan parameter Hb, TIBC dan saturasi transferrin masih dalam batas normal (kadar normal status zat besi dapat dilihat pada lampiran 4 halaman 99). Setelah 8 minggu pemberian pakan rendah zat besi terjadi penurunan secara bermakna pada beberapa parameter status zat besi hewan coba tikus yang diukur pada penelitian ini yaitu: kadar Hb, SI, dan saturasi transferrin, bila dibandingkan dengan keadaan awal sebelum diberi pakan rendah zat besi ($p < 0.05$). Sedangkan peningkatan TIBC tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dibanding dengan keadaan awal sebelum diberi pakan rendah zat besi ($p > 0.05$). Berdasarkan pengukuran parameter status zat besi sesuai dengan kriteria defisiensi zat besi pada metodologi, dapat dikatakan bahwa tikus telah mengalami defisiensi zat besi seperti yang diharapkan. Analisis data penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 6 halaman 104. Berikut ini ditampilkan gambar rerata dari kadar Hb, SI, TIBC dan saturasi transferrin menurut waktu pengamatan.



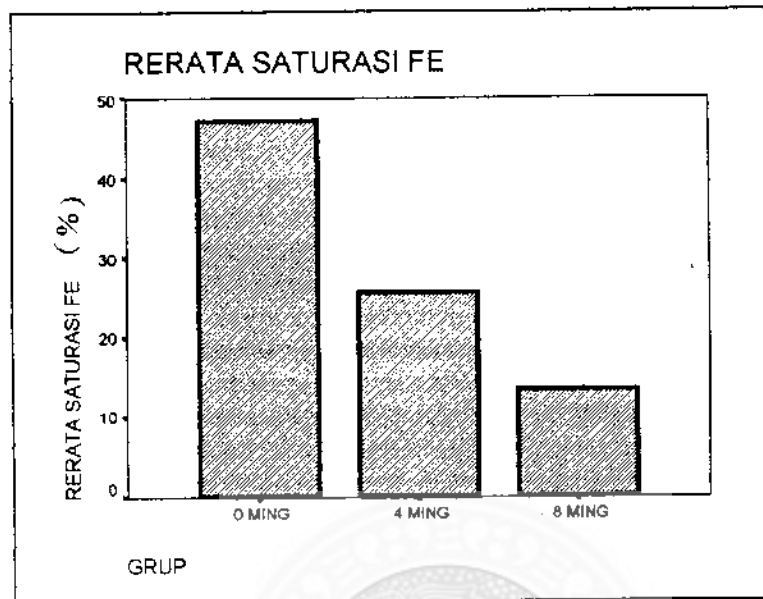
Gambar 5.1 Rerata kadar hemoglobin menurut waktu pengamatan.



Gambar 5.2 Rerata kadar zat besi dalam serum menurut waktu pengamatan.



Gambar 5.3 Rerata kadar TIBC menurut waktu pengamatan.



Gambar 5.4 Rerata saturasi transferrin menurut waktu pengamatan.

5.2 Data hasil pengukuran berat badan sebelum dan sesudah perlakuan

Parameter yang diperoleh dari hewan coba tikus yang telah dibuat defisiensi zat besi dengan pemberian pakan rendah zat besi selama 8 minggu akan digunakan sebagai awal untuk diberi perlakuan. Selama masa penelitian dilakukan pengukuran berat badan sebanyak dua kali, pertama sebelum pemberian perlakuan dan kedua sesudah mendapat perlakuan selama 2 minggu. Pada penelitian ini kelompok perlakuan dapat diurutkan sebagai berikut: kelompok perlakuan dengan pemberian ferro sulfat (P1), kelompok perlakuan dengan pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat (P2), kelompok perlakuan dengan pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat (P3), dan kelompok perlakuan dengan pemberian kombinasi ferro sulfat bersama asam

askorbat dan asam sitrat (P4). Data hasil pengukuran berat badan dan pertambahan berat badan hewan coba tikus dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut ini:

Tabel 5.2 Data hasil pengukuran berat badan dan pertambahan berat badan tikus (gram).

	FeSO ₄ 3.6 mg (P1)			FeSO ₄ 3.6 mg + Asam Askorbat 4.5 mg (P2)			FeSO ₄ 3.6 mg + Asam sitrat 5.4 mg (P3)			FeSO ₄ 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg + Asam Sitrat 5.4 mg (P4)		
	BB Sebelum	BB Sesudah	Per- tambahan	BB Sebelum	BB Sesudah	Per- tambahan	BB Sebelum	BB Sesudah	Per- tambahan	BB Sebelum	BB Sesudah	Per- tambahan
ata	117.30 ^a	122.0 ^a	4.70	118.40 ^b	122.40 ^b	4.00	117.80 ^c	121.70 ^c	3.90	118.20 ^d	122.40 ^d	4.20
ng- ku	12.73	12.06	3.09	11.32	11.79	0.94	13.08	12.44	1.19	11.46	11.73	1.13

Keterangan : a,b,c,d untuk $p < 0.05$ (uji t)

BB: Berat badan

Hasil uji statistik (uji t) terhadap berat badan hewan coba tikus sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok meningkat secara bermakna ($p < 0.05$), dimana nilai t hitung untuk kelompok perlakuan masing-masing P1 = 4.805; P2 = 13.416; P3 = 10.301 dan P4 = 11.699. Nilai ini ternyata lebih besar dari nilai t daftar pada taraf kemaknaan $\alpha = 0.05$ yaitu 1.83. Dari hasil uji statistik dengan anava terhadap kelompok perlakuan menunjukkan bahwa pertambahan berat badan hewan coba tikus tidak berbeda bermakna antara kelompok perlakuan ($p > 0.05$). Dari hasil analisis varians diperoleh nilai F hitung sebesar 0.384. Nilai ini ternyata lebih kecil dari nilai F daftar pada taraf kemaknaan $\alpha = 0.05$ yaitu $F_{0.05 (3,36)} = 2.80$. Untuk analisis statistik data penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 8 halaman 110.

5.3. Data hasil pengukuran status zat besi setelah perlakuan selama 2 minggu.

5.3.1. Kadar hemoglobin (Hb).

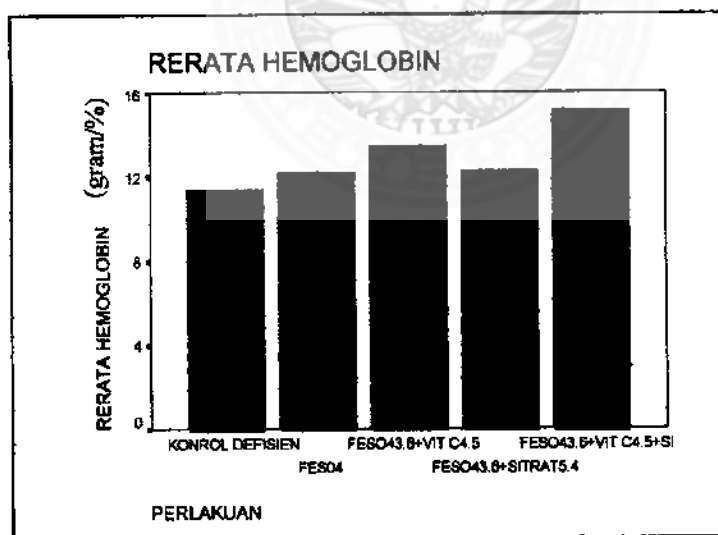
Hasil pengukuran kadar Hb hewan coba tikus setelah pemberian pakan perlakuan selama 2 minggu dibandingkan dengan kadar Hb sebelum perlakuan (keadaan defisiensi zat besi) dikemukakan pada tabel 5.3 dan tampilan gambar 5.5 berikut ini.

Tabel 5.3 Data hasil pengukuran kadar hemoglobin (gram %).

	FeSO ₄ 0 mg + Asam Askorbat 0 mg + Asam Sitrat 0 mg (P0)	FeSO ₄ 3.6 mg (P1)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam Askorbat 4.5 mg (P2)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam sitrat 5.4 mg (P3)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam Askorbat 4.5 mg + Asam Sitrat 5.4 mg (P4)
Rerata	11.300 ^{a,b,c,d}	12.144 ^d	13.380 ^b	12.170 ^c	15.020 ^a
Simpangan baku	0.753	0.422	0.658	0.437	0.459

Keterangan : a,b,c,d untuk $p < 0.05$ (analisis varians)

Urutan abjad menunjukkan tingkat kemaknaan.



Keterangan : - Kontrol defisiensi adalah keadaan awal sebelum perlakuan

Gambar 5.5 Rerata kadar hemoglobin setelah perlakuan selama 2 minggu.

Hasil analisis varians dan uji LSD menunjukkan bahwa kadar Hb hewan coba tikus pada semua kelompok perlakuan meningkat secara bermakna dibandingkan dengan kadar Hb hewan coba tikus pada keadaan defisiensi zat besi (P0) ($p < 0.05$) dan diperoleh nilai F hitung sebesar 65.028. Nilai ini ternyata lebih besar dari nilai F daftar pada taraf kemaknaan $\alpha = 0,05$ yaitu $F_{0,05 (4,44)} = 2.58$. Secara statistik jika dibandingkan antara keempat kelompok perlakuan (P1,P2,P3 dan P4) maka P4 dengan kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat merupakan kelompok dengan peningkatan kadar Hb tertinggi dibandingkan dengan tiga kelompok perlakuan lainnya. Analisis statistik selengkapnya dari data ini dapat dilihat pada lampiran 9 halaman 116.

5.3.2 Kadar zat besi dalam serum

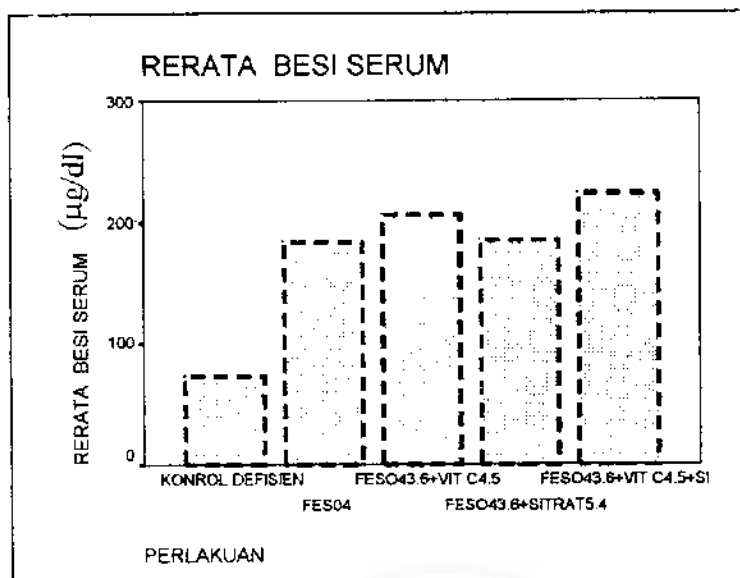
Hasil pengukuran kadar zat besi serum hewan coba tikus setelah pemberian pakan perlakuan selama 2 minggu dibandingkan dengan kadar zat besi serum sebelum perlakuan (keadaan defisiensi zat besi) dikemukakan pada tabel 5.4 dan tampilan gambar 5.6 berikut ini.

Tabel 5.4 Data hasil pengukuran kadar zat besi dalam serum ($\mu\text{g/dl}$)

	FeSO ₄ 0mg +Asam askorbat 0 mg + Asam sitrat 0 mg (P0)	FeSO ₄ 3.6 mg (P1)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg (P2)	FeSO ₄ 3.6 mg +Asam sitrat 5.4 mg (P3)	FeSo ₄ 3.6 mg + Asam Askorbat 4.5 mg + Asam sitrat 5.4 mg (P4)
Rerata	72.290 ^{a,b,c,d}	183.122 ^d	206.460 ^b	184.920 ^c	223.280 ^a
Simpangan baku	8.614	16.210	12.907	12.719	17.293

Keterangan : a,b,c,d untuk $p < 0.05$ (analisis varians)

Urutan abjad menunjukkan tingkat kemaknaan



Keterangan : - Kontrol defisiensi adalah keadaan awal sebelum perlakuan

Gambar 5.6 Rerata kadar zat besi dalam serum setelah perlakuan selama 2 minggu

Hasil analisis varians dan uji LSD menunjukkan bahwa kadar zat besi serum hewan coba tikus setelah pemberian pakan perlakuan selama 2 minggu pada semua kelompok perlakuan meningkat secara bermakna dibandingkan dengan kadar zat besi serum hewan coba tikus pada keadaan defisiensi zat besi (P0) ($p < 0.05$), dimana diperoleh nilai F hitung sebesar 183.247. Nilai ini lebih besar dengan nilai F daftar pada taraf kemaknaan $\alpha = 0,05$ yaitu $F_{0,05 (4,44)} = 2.58$. Secara statistik jika dibandingkan antara semua kelompok perlakuan (P1,P2,P3,dan P4) maka P4 dengan kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat merupakan kelompok dengan peningkatan kadar zat besi serum tertinggi dibandingkan dengan tiga kelompok perlakuan lainnya. Analisis statistik data ini dapat dilihat pada lampiran 9 halaman 116.

5.3.3 Kadar kapasitas total pengikatan zat besi dalam serum (TIBC).

Hasil pengukuran TIBC hewan coba tikus setelah pemberian pakan perlakuan selama 2 minggu dibandingkan dengan kadar TIBC sebelum perlakuan (keadaan defisiensi zat besi) dikemukakan pada tabel 5.5 dan tampilan gambar 5.7 berikut ini.

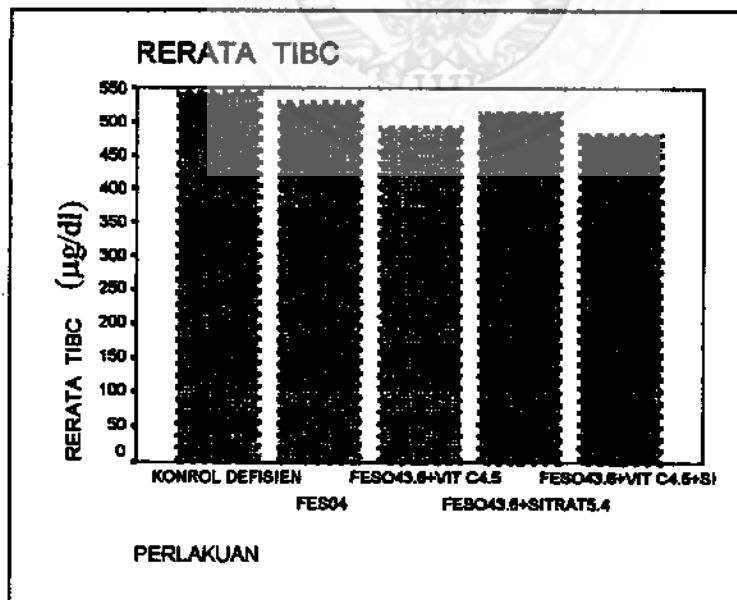
Tabel 5.5 Data hasil pengukuran kadar total kapasitas pengikatan zat besi dalam serum

(TIBC) ($\mu\text{g}/\text{dl}$)

	FeSO ₄ 0 mg + Asam askorbat 0 mg + Asam sitrat 0 mg (P0)	FeSO ₄ 3.6 mg (P1)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg (P2)	FeSO ₄ 3.6 mg +Asam sitrat 5.4 mg (P3)	FeSo ₄ 3.6 mg + Asam Askorbat 4.5 mg + Asam sitrat 5.4 mg (P4)
Rata-rata	543.150 ^{a,b,c,d}	526.833 ^d	489.400 ^b	512.560 ^e	479.627 ^a
Simpangan Baku	98.682	21.349	13.898	18.226	20.007

Keterangan : a,b,c,d untuk $p < 0.05$ (analisis varians)

Urutan abjad menunjukkan tingkat kemaknaan



Keterangan : Kontrol defisiensi adalah keadaan awal sebelum perlakuan

Gambar 5.7 Rerata kadar kapasitas total pengikatan zat besi (TIBC) setelah perlakuan selama 2 minggu.

Hasil analisis varians dan uji LSD menunjukkan bahwa kadar TIBC hewan coba tikus setelah pemberian pakan perlakuan selama 2 minggu mengalami penurunan secara bermakna dibandingkan dengan kadar TIBC hewan coba tikus pada keadaan defisien zat besi (P0) ($p < 0.05$), dimana diperoleh nilai F hitung sebesar 17.818. Nilai ini lebih besar dari nilai F daftar pada taraf kemaknaan $\alpha = 0,05$ yaitu $F_{0,05 (4,44)} = 2.58$. Secara statistik jika dibandingkan antara semua kelompok perlakuan maka kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat (P4) yang merupakan kelompok dengan penurunan kadar TIBC yang terendah dibanding dengan tiga kelompok perlakuan lainnya. Analisis statistik data penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 9 halaman 116.

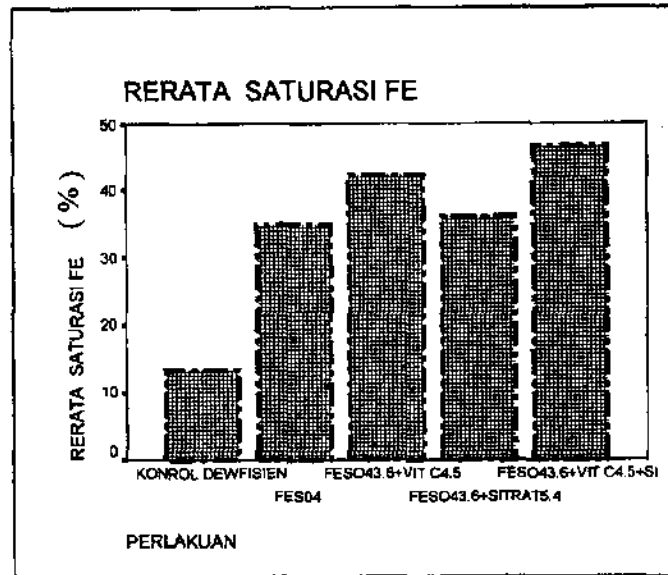
5.3.4 Saturasi transferrin dalam serum

Hasil pengukuran saturasi transferrin dalam serum hewan coba tikus setelah pemberian pakan perlakuan selama 2 minggu dibanding dengan saturasi transferrin sebelum perlakuan (keadaan defisiensi zat besi) diperoleh data seperti pada tabel 5.6 dan tampilan gambar 5.8 berikut ini.

Tabel 5.6 Data hasil pengukuran saturasi transferrin (%).

	FeSO ₄ 0 mg + Asam askorbat 0 mg + Asam sitrat 0 mg (P0)	FeSO ₄ 3.6 mg (P1)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg (P2)	FeSO ₄ 3.6 mg +Asam sitrat 5.4 mg (P3)	FeSo ₄ 3.6 mg + Asam Askorbat 4.5 mg + Asam sitrat 5.4 mg (P4)
Rata-rata	13.320 ^{a,b,c,d}	34.900 ^d	42.240 ^b	36.170 ^c	46.610 ^a
Simpangan Baku	1.699	4.345	3.421	2.747	3.368

Keterangan : a,b,c,d untuk $p < 0.05$ (analisis varians)
Urutan abjad menunjukkan tingkat kemaknaan



Keterangan : - Kontrol defisiensi adalah keadaan sebelum perlakuan

Gambar 5.8 Rerata saturasi transferrin dalam serum setelah perlakuan selama 2 minggu.

Hasil analisis varians dan uji LSD menunjukkan bahwa persentase saturasi transferrin dalam serum hewan coba tikus setelah pemberian pakan perlakuan selama 2 minggu mengalami peningkatan yang bermakna pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan persentase saturasi transferrin hewan coba tikus sebelum perlakuan (keadaan defisiensi zat besi) (P0) ($p < 0.05$), dimana diperoleh nilai F hitung sebesar 160.012. Nilai ini lebih besar dari nilai F daftar pada taraf kemaknaan $\alpha = 0,05$ yaitu $F_{0,05 (4,44)} = 2.58$. Secara statistik jika dibandingkan antara kelompok perlakuan maka kelompok dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat (P4) yang merupakan kelompok dengan peningkatan saturasi transferrin tertinggi dibanding dengan ketiga kelompok perlakuan lainnya. Analisis statistik data penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 9 halaman 116.

BAB 6

PEMBAHASAN

Anemia kurang zat besi merupakan masalah yang sudah cukup lama di Indonesia, walaupun sudah ada penanggulangannya namun masih kurang tersosialisasikan. Angka prevalensi anemi kurang zat besi ini masih cukup tinggi terutama pada wanita hamil dan menyusui, wanita dewasa, balita dan anak usia sekolah (Sumarno, 1996; Sedioetama, 1999).

Telah banyak penelitian-penelitian yang dilakukan terutama difokuskan pada intervensi pil besi. karena sebagian besar anemia disebabkan oleh kekurangan zat besi (Muhilal & Darwin, 1996).

Penelitian kali ini menggunakan hewan coba tikus yang dibuat defisiensi zat besi sebagai model karena tikus memiliki sistem pencernaan yang menyerupai sistem pencernaan pada manusia (Smith, 1959 dalam Pariassa, 1983). Untuk memperoleh tikus dalam keadaan defisiensi zat besi, maka hewan coba tikus diberi pakan rendah zat besi selama 8 minggu. Sebelum diberi pakan rendah zat besi dilakukan pemeriksaan status zat besi awal, dan dari parameter yang diukur diperoleh hasil rerata kadar hemoglobin (Hb) 15.16 g/dl, rerata kadar zat besi serum (SI) 222.90 µg/dl, rerata kadar TIBC 474.28 µg/dl, dan rerata saturasi transferrin 47.06 % . Hal ini sesuai dengan kadar normal dari status zat besi tikus untuk zat besi serum 186 – 205 ug/dl, TIBC 432 ug/dl – 516 ug/dl dan saturasi transferrin 20 % – 55 % (Barton, 1983) sedangkan kadar Hb normal tikus adalah 15.44 – 16,06 g/dl (Creskoff, 1962).

Setelah 4 minggu pemberian pakan rendah zat besi terjadi penurunan pada status zat besi, namun penurunan ini masih dalam batas normal terlihat pada beberapa parameter seperti kadar Hb, dan saturasi transferrin, serta kadar TIBC meningkat dan peningkatannya ini masih dalam batas normal. Sedangkan zat besi serum menurun dibawah batas normal.

Pada 8 minggu pemberian pakan rendah zat besi pada kelompok tikus yang lain dilakukan pemeriksaan pada parameter status zat besi. Dari hasil pemeriksaan diperoleh bahwa hewan coba tikus telah mengalami defisiensi zat besi yang ditandai dengan penurunan pada kadar hemoglobin, kadar zat besi serum dan saturasi transferrin secara bermakna dibanding dengan keadaan awal ($p < 0.05$), dimana nilai F hitung diperoleh untuk masing-masing parameter yaitu Hb = 58.028; SI = 190.698 dan saturasi transferrin = 234,500. Nilai ini ternyata lebih besar dari nilai F daftar pada taraf kemaknaan $\alpha = 0.05$ yaitu $F_{0.05 (2,17)} = 3.59$. Sedangkan peningkatan kadar TIBC tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dibanding dengan keadaan awal ($P > 0.05$) dengan nilai F hitung sebesar 0.490. yang lebih kecil dari nilai F daftar. Sesuai dengan kriteria defisiensi zat besi pada metodologi dengan menurunnya zat besi serum dan saturasi transferrin secara bermakna dapat dikatakan bahwa tikus telah mengalami defisiensi zat besi. Berdasarkan hasil pemeriksaan ini maka penelitian dapat dilanjutkan dengan pemberian pakan perlakuan.

Hasil analisis statistik terhadap berat badan hewan coba tikus setelah diberi perlakuan selama 2 minggu menunjukkan peningkatan yang bermakna pada masing-masing kelompok perlakuan dibandingkan dengan sebelum diberi perlakuan ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa hewan coba tidak mengalami per-

ubahan/kesulitan dalam menyesuaikan dengan makanan selama perlakuan. Namun penambahan berat badan hewan coba tikus selama perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna diantara keempat kelompok perlakuan. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa tidak terdapat perbedaan dalam pola makan diantara keempat kelompok perlakuan. Dari data yang diperoleh bahwa rata-rata penambahan berat badan hewan coba tikus pada masing-masing kelompok kurang lebih sama .

Berdasarkan hasil analisis statistik (anava) diperoleh hasil pemeriksaan status zat besi dengan parameter Hb, zat besi serum, TIBC dan saturasi transferrin setelah pemberian perlakuan selama 2 minggu hewan coba tikus mengalami peningkatan status zat besi jika dibandingkan dengan keadaan sebelum diberi perlakuan (keadaan defisiensi zat besi) yang ditandai dengan meningkatnya kadar Hb, zat besi serum dan saturasi transferrin serta menurunnya kadar TIBC secara bermakna ($p < 0.05$) pada semua kelompok perlakuan. Dari keempat kelompok perlakuan, kelompok dengan pemberian kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat (P4) merupakan kelompok yang mengalami peningkatan status zat besi yang paling besar, urutan kedua adalah kelompok dengan kombinasi ferro sulfat dan asam askorbat (P2), urutan ketiga adalah kelompok dengan kombinasi ferro sulfat dan asam sitrat (P3) dan yang terakhir adalah kelompok perlakuan dengan ferro sulfat (P1). Peningkatan status zat besi yang terjadi pada kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat ini disebabkan karena penambahan asam askorbat dan asam sitrat secara bersama-sama. Asam askorbat dan asam sitrat merupakan dua senyawa organik yang dapat membantu meningkatkan absorpsi zat besi ke dalam tubuh (Crawford, 1995).

Dalam keadaan status zat besi tubuh rendah, secara otomatis akan terjadi peningkatan absorpsi zat besi. Hal ini terjadi pada penderita dengan keadaan defisiensi zat besi yang berat. Dalam keadaan defisiensi zat besi, absorpsi zat besi ke dalam tubuh meningkat 10 % sampai 30 % (Herbert, 1987).

Asam askorbat berperan penting dalam meningkatkan absorpsi zat besi terutama pada permukaan sel mukosa usus dengan mereduksi zat besi dari bentuk Fe^{+3} menjadi Fe^{+2} dan mempertahankan zat besi tetap dalam keadaan terlarut ketika dalam lumen terjadi peningkatan pH dari lambung masuk ke duodenum. (Hallberg, *dkk.*, 1994; Bender, *dkk.*, 1997). Zat besi terutama zat besi nonhem hanya dapat masuk ke dalam sel melewati mukosa usus dalam bentuk Fe^{+2} (Hallberg, *dkk.*, 1994). Dengan adanya asam askorbat dalam lumen usus maka jumlah zat besi yang dapat diabsorpsi meningkat. Meningkatnya absorpsi zat besi di usus akan menyebabkan konsentrasi zat besi dalam serum meningkat, artinya zat besi yang terikat pada protein serum (apotransferrin) meningkat sehingga zat besi yang diangkut oleh transferrin ke jaringan juga meningkat. Dari hasil analisis statistik terlihat pada kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat (P2) status zat besi meningkat secara bermakna dibanding dengan kelompok pada keadaan defisiensi zat besi ($p < 0.05$).

Asam sitrat memiliki kemampuan mengikat zat besi dan membentuk kompleks dengan zat besi yang larut sehingga dapat meningkatkan absorpsi zat besi ke dalam dinding usus (Crawford, 1995). Pada kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat dan asam sitrat (P3), status zat besi tubuh meningkat secara bermakna dibanding dengan kelompok pada keadaan defisiensi zat besi ($p < 0.05$). Jika

kelompok P3 dibandingkan dengan kelompok P2, peningkatan status zat besi lebih besar pada kelompok P2, sedangkan bila kelompok P3 dibandingkan dengan kelompok P1 peningkatan status zat besi tidak berbeda bermakna. Hal ini disebabkan oleh karena asam sitrat bila digunakan sendiri mempunyai efek antioksidan yang relatif kecil (Grosch, 1987; Min,1992) sehingga peningkatan status zat besi pada kelompok P3 lebih kecil dibanding dengan kelompok P2. Namun bila asam sitrat berada bersama-sama dengan asam askorbat dalam lumen mukosa usus maka kedua senyawa ini dapat bekerja sinergis untuk meningkatkan absorpsi zat besi ke dalam tubuh (Crawford, 1995). Dengan lebih meningkatnya absorpsi zat besi ke dalam tubuh maka status zat besi juga akan lebih meningkat.

Pada penelitian ini jika dibandingkan keempat kelompok perlakuan, maka kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan asam sitrat (P4) menunjukkan peningkatan status zat besi yang lebih bermakna. Dari hasil uji statistik membuktikan bahwa pemberian kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat menunjukkan hasil yang berbeda bermakna ($p < 0,05$) dalam peningkatan semua parameter status zat besi (Hb, SI, TIBC dan saturasi transferrin) dibandingkan kelompok perlakuan dengan ferro sulfat, kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa kadar Hb pada setiap kelompok perlakuan meningkat secara bermakna, jika dibandingkan dengan kelompok pada keadaan sebelum perlakuan. Menurut Husaini (1989) bahwa seseorang yang menderita anemi defisiensi zat besi dapat dilihat dari respon terhadap pengobatan atau

pemberian preparat, bila terjadi kenaikan kadar Hb sebesar 1 gram/dl atau lebih setelah suplemen zat besi selama 2 minggu maka dapat dipastikan yang bersangkutan nyata menderita anemi defisiensi zat besi. Santi & Ries, (1998) juga mengemukakan bahwa pada keadaan anemi defisiensi zat besi kadar Hb akan meningkat secara bermakna dalam 2-4 minggu pemberian ferro sulfat dan mencapai kadar normal setelah 1-3 bulan. Sedangkan menurut De Meyer (1989), penyerapan zat besi pada kondisi defisiensi selama minggu pertama meningkat sampai 14 %, kemudian setelah 3 minggu peningkatan penyerapan hanya 7 % dan sesudah 4 bulan penyerapan zat besi tersebut hanya 2 %. Dengan demikian pemberian suplemen zat besi pada bulan pertama merupakan saat yang paling penting untuk memastikan keberhasilan peningkatan zat besi dalam tubuh. Dari hasil penelitian tersebut dikemukakan bahwa respon positif terhadap suplementasi zat besi ini dapat diartikan peningkatan kadar Hb 0.1 gram % per hari.

Peningkatan kadar Hb yang terjadi pada kelompok P2, P3 dan P4 disebabkan selain dipengaruhi oleh zat besi dan protein juga oleh karena penambahan asam askorbat maupun/dan asam sitrat. Kadar protein dalam pakan yang digunakan dalam penelitian adalah 14,37 %. Kadar ini sudah memenuhi kadar protein yang ada pada pakan standar tikus, yaitu 12 % jika mengandung semua asam amino yang diperlukan (Smith & Mangkoewidjojo, 1989).

Penambahan asam askorbat maupun asam sitrat akan meningkatkan absorpsi zat besi ke dalam tubuh. Dengan meningkatnya absorpsi zat besi, sintesis apotransferrin meningkat, sehingga jumlah zat besi yang diikat oleh apotransferrin makin banyak (Guyton, 1991; Combs, 1992). Ikatan apotransferrin dengan zat besi

akan membentuk transferrin. Transferrin akan membawa zat besi dalam plasma menuju eritroblas di dalam sumsum tulang untuk pembentukan hemoglobin (Fairbanks & Beutler, 1995). Dalam penelitian ini terlihat bahwa kelompok dengan kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat (P4) dengan hasil uji statistik (anava) menunjukkan hasil yang berbeda bermakna dalam peningkatan kadar Hb dibanding kelompok perlakuan dengan ferro sulfat, kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat dan kelompok perlakuan dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat.

Dalam penelitian ini digunakan zat besi dalam bentuk ferro sulfat 200 mg yang biasa dipakai pada puskesmas-puskesmas, sedangkan kristal asam askorbat dengan dosis 250 mg dan kristal asam sitrat dengan dosis 300 mg. Dalam penelitian terdahulu dikemukakan bahwa dengan pemberian zat besi 200 mg per hari jumlah zat besi yang diabsorpsi cukup untuk meningkatkan status zat besi (Hillman, 1996). Pada keadaan defisiensi zat besi kemampuan sel-sel mukosa usus dalam mengabsorpsi zat besi meningkat hingga 30 % (Herbert, 1987). Dengan penambahan asam askorbat dan asam sitrat ketersediaan zat besi yang dapat diabsorpsi lebih meningkat sehingga jumlah zat besi yang masuk ke dalam darah lebih meningkat dan hal ini akan meningkatkan status zat besi dalam tubuh. Menurut Hillman (1996) dengan penambahan asam askorbat 200mg/hari atau lebih, akan meningkatkan absorpsi zat besi minimal 30 %.

Dari penelitian ini, pemberian kombinasi ferro sulfat 3,6 mg bersama asam askorbat 4.5 mg dan asam sitrat 5.4 mg yang diperoleh dari hasil konversi dengan faktor koreksi 0.018 terhadap dosis yang digunakan manusia ternyata meningkatkan

status zat besi hewan coba tikus dengan keadaan defisiensi zat besi lebih baik dari pemberian dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat maupun pemberian dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam sitrat .

Penggunaan dosis 200 mg ferro sulfat sudah optimal dalam meningkatkan status zat besi bila ditinjau dari efek samping yang ditimbulkan (Hillman, 1996). Penggunaan 250 mg asam askorbat dapat ditingkatkan seperti yang dikemukakan oleh (Hui, 1983) bahwa asam askorbat hanya dapat meningkatkan absorpsi zat besi jika menggunakan dosis 200 – 500 mg per hari. Dalam penelitian terdahulu Sharma & Mathur (1995), melaporkan bahwa dengan pemberian 500 mg asam askorbat pada kelompok vegetarian dapat meningkatkan status zat besi (Hb, SI, TIBC dan saturasi transferrin) secara signifikan. Berdasarkan penelitian ini, nampaknya suplemen asam askorbat untuk tujuan meningkatkan status zat besi dapat diberikan dengan dosis yang lebih tinggi. Hal ini masih perlu pembuktian lebih lanjut, yaitu dilakukan penelitian pada beberapa kelompok dengan berbagai kombinasi dosis ferro sulfat, asam sitrat dengan menggunakan berbagai kombinasi dosis asam askorbat yang diberikan.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan.

Berdasarkan analisis statistik hasil penelitian yang dilakukan pada hewan coba tikus dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian kombinasi ferro sulfat dan asam askorbat secara bersama-sama selama 2 minggu meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi .
2. Pemberian kombinasi ferro sulfat dan asam sitrat secara bersama-sama selama 2 minggu meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi, walaupun peningkatannya tidak setinggi pada kelompok dengan kombinasi ferro sulfat bersama asam askorbat.
3. Pemberian kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat secara bersama-sama selama 2 minggu meningkatkan status zat besi pada tikus dengan keadaan defisiensi zat besi, dan peningkatan ini lebih tinggi dari pada kombinasi ferro sulfat bersama askorbat maupun ferro sulfat bersama asam sitrat.

7.2 Saran.

Dari hasil penelitian dan pembahasan dapat disarankan hal – hal sebagai berikut:

1. Pemberian kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat meningkatkan status zat besi dalam darah tikus, maka kombinasi tersebut dapat disarankan untuk digunakan dikemudian hari sebagai upaya dalam penanggulangan anemi defisiensi zat besi.

2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan kombinasi ferro sulfat, asam askorbat dan asam sitrat dengan berbagai dosis yang diberikan secara bersamaan untuk mendapatkan dosis optimum untuk tujuan penanggulangan anemi pada masa kehamilan maupun masa pertumbuhan anak yang banyak terjadi di masyarakat..



DAFTAR PUSTAKA

- Andrew NC, Mark DF and Hiromi G, 1999. Iron Transport Across Biologic Membranes. *Nutr. Rev.* Vol 59 (4):114 – 123.
- Barton JC, Marcel EC, and Richard TP, 1983. Calcium Inhibitor of inorganic Iron Absorpsi in Rats. *Gastr.* 84: 90 – 101.
- Bakta IM, 1993. Infeksi cacing tambang pada orang dewasa dan perannya sebagai salah satu penyebab defisiensi besi. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Beck ME, 1993. *Nutrition and Dietetics For Nurces*. Penerjemah Anton Hartono. Yayasan Essential medica.
- Bender DA and Arnold EB, 1997. Vitamin C (ascorbic acid). In: *Nutrition a reference handbook*. New York: Oxford University Press. p.361 – 372.
- Brody T, 1994. Inorganic Nutrient. In. *Nutritional Biochemistry*. London: Academic Press limited. p. 485 – 572.
- Chanarrin I., 1991 (a). The blood count, its quality control and related methods. In: *Laboratory Haematology An account of laboratory techniques*. New York: Churchill Livingstone. p. 13-14.
- Chanarrin I., 1991 (b). Assessment of iron status. In: *Laboratory Haematology An account of laboratory techniques*. New York: Churchill Livingstone. p.83 – 91.
- Combs G, 1992. The Vitamins C. In *The Vitamins. Fundamentals Aspect In nutrition and Health*. New York. Academic press. p. 225 – 248.
- Crawford RD, 1995. Review. Proposed Role for a Combination of Citric Acid and Ascorbic Acid in Production of Dietary Iron Overload: A Fundamental Cause of Disease. *Biochem. And Molec. Med.* 54: 1 – 11.

- Creskoff AJ, Thomas F Jr, and Edmond JF, 1962. Hematology of the rat- methods and standarts In: (Edmond J Farris and J. Q Griefith, eds.). The Rat in Laboratory Investigation. New York: Hafner Publishing Company. p. 406 – 419.
- Davidson L, Thomas W, Audrey M, and Richard FH, 1998. Influence of ascorbic acid on iron from an iron-fortified, chocolate-flavored milk drink in Jamaica children. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 873-877.
- Fairbanks VF, and Ernest B, 1995. Iron metabolism. In: (Ernest B, Lichman, Collier, Kipps. Eds). *Williams Hematology*. 5th edition. New York: McGraw-Hill. p 369-377.
- Garperz V., 1994. Metode perancangan percobaan. Bandung: armico, hlm. 180-185.
- Grosch W, Belitz HD, 1997. *Food Chemistry*. Berlin: Springer – Verlag. p 175-178.
- Guyton AC, 1991. Red blood cells, anemia, and polycythemia. *Textbook of Medical Physiology* 8th edition W.B. Saunders Company. USA. pp. 356-363
- Hallberg LB, Sandtrom and Agget, 1994. Iron, zinc and other trace elements In: (Garrow and James. Eds). *Human Nutrition and Dietetics*. New York: Churchill Livingstone. p. 174-324.
- Halsted, 1994. Water – Soluble Vitamins. In: (Garrow and James. Eds) *Human Nutrition and Dietetics*. New York. Churchill Livingston. p. 239-242
- Hanafi M, 1983. Pengaruh fraksi galek terhadap penyerapan zat besi dalam diet tikus. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga Surabaya.
- Hanafi M, 1996. Metabolisme besi. Seminar Epidemiologi Diagnostik dan Pengendalian Anemi. TDRC-UNAIR-RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
- Hariyanti K, 1995. Pengaruh pemberian zat besi dan seng terhadap kadar Hb dan kadar seng pada tikus betina strain wistar dengan diet Fe dan Zn yang marginal. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Herbert V, 1987. Recommended dietary intakes (RDI) of iron in humans. *Am.J. Clin. Nutr.* 45:679-686.

- Hilman, RS, 1996. Hematopoietic Agents In (Goodman & Gilman's eds). The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th New York. McGraw – Hill p. 1311 –1324.
- Hui, YH, 1983 Vitamin. Human Nutrition & Diet Therapy. California. A Division of wodsworth Inc.
- Husaini MA, 1989. Study Nutritional Anemia an Assessment of Information Compilation For Supporting And Formulating National Policy Program, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Keeler CE, 1962. Blood group of rat In: (Edmond J Farris and J.Q. Grieffith, Eds) The Rat in Laboratory Investigation. New York: Hafner Publishing Company. p. 406-419.
- Kuswarini S, 1998. Pengaruh konsumsi tempe kedelai atau kedelai sebagai sumber utama protein terhadap kadar hemoglobin dan volume eritrosit rata-rata dalam darah tikus dengan keadaan defisiensi besi. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Linder MC, 1991. Nutrition and metabolism of the trace element In: (Maria C Linders Eds). Nutritional Biochemistry and Metabolism. Conneticut: Apleton & Lange. p. 215-265.
- Lynch SR, 1997. Interaction of iron with other nutrients. Nutr. Rev. 55(4): 102-110.
- Mahan LK, dan Stump S, 1996: Food, Nutrition & Diet Therapy 9th edition. London. W.B Saunders Company. p. 137-142.
- Makarem, A. 1974. Determination of Haemoglobin. In: (Richard JH,Donald CC, James WW. Eds) In: Clinical Chemistry. Principles and Technics. New York. Medical Departemen. p. 1125-1135
- Martha, JW, 1996. Efektivitas tambahan vitamin C pada tablet besi oral terhadap hemoglobin ibu hamil di puskesmas Situ, Sumedang. Medika. 4: 263-265.
- Martyn DW, 1990. Air dan Mineral. In (Peter AM, Daryl KG, Victor WR and David WM, Eds) Biokimia Harper. Edisi 20. Penerjemah Iyan Darmawan. Jakatra. Buku Kedokteran EGG. H. hlm.722 – 729.
- Martindale, 1973. The extra Pharmacopoeia. 26th ed. . London. The Pharmaceutical Press p. 880 – 88
- Min. BD, 1992. Encyclopedia of Food Science and technology. Vol.11. E-H. Canada: John Wiewy and Sons Inc. p 828-829.

- McCoy, RH, 1962. Dietary requirements of the rat In : (Edmond J Farris and J. Q. Griffith, Eds): *The Rat in Laboratory Investigation*. New York. Hafner Publishing Company. p. 68-75.
- Murray RK, 1996. Porfirin dan pigmen empedu In: (Peter A meyes, Daryl K. Granner, Victor W. Rodwel, and David W. martin. Eds). *Biokimia Harper*. Edisi 24. Penerjemah Andry Hartono. Jakarta penerbit Buku Kedokteran EGC. hlm. 352-365.
- Muhilal dan Darwin ,1996. *Kecukupan gizi yang dianjurkan*. Gramedia . Jakarta.
- Olson, James Allen, and Robert E Hodges,1987. Recommended Dietary Intakes (RDI) of Vitamin C in Humans. In: *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 693-703.
- Othmer K, 1979. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3th edition. Vol. 6 New York. John Wiley & Sons. p. 150-172.
- Pariassa WN, 1983. Pengaruh Vitamin A terhadap status Hb pada tikus. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Paterson CR, 1987. Haemoglobin. *Essentials of Human Biochemistry*. New York. Churchill Livingstone. p. 195-208.
- Rand ML, Elizabeth JH, and Robert KM. 1996. In: (Murray Granner PA. Meyes, VW. Rodwel Eds) *Biokimia Harper*. Edisi 24. Penerjemah Andry Hartono. Jakarta. Penerbit buku Kedokteran EGC. hlm. 728-754
- Santi DV, and Curt AR, 1998. Agents Used in Anemias; hematopoitic growth factor. In (Bertram GK, Ed.) *Basic and clinical Pharmacology*. Ed. 7th. London; Prentice Hall International. p. 533-536.
- Sartono A, 1996. Komentor hasil penelitian efektivitas pemberian zat besi terhadap peningkatan kadar hemoglobin dan serum ferritin ibu hamil di puskesmas. *Medika*. 2 :142-145.
- Sediaoetama AD, 2000. *Ilmu Gizi untuk mahasiswa dan profesi*. Jilid I. Jakarta. Dian Rakyat.
- Smith JB, Soesanto M, 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. Penerbit Universitas Indonesia. hlm. 37 - 57 .

- Steel RDG, and Torrie, 1991. Principles and procedures of statistics a biometrical approach Ed. 2nd. New York: McGraw-Hill Book Company, p. 113-119.
- Sumarno I, 1996. Dampak suplementasi pil besi + asam folat dan vitamin C terhadap peningkatan kadar Hb pada ibu hamil anemi. Jilid 19. Badan penelitian & pengembangan kesehatan . Penelitian gizi & makanan . Bogor. hlm. 1-11
- Talwar GP., 1980. Textbook of Biochemistry and Human Biology . New Delhi. Prentice-Hall of India Private limited. p. 467- 470
- Tiezts. NW. 1982. Fudamentals of Clinical Chemistry. London. W.B Saunders Company. p.921 - 929
- Weissman N, and Vincent. JP, 1974. Serum iron/ Total Iron Binding Capacity. In: (Richard.JH, Donald CC, James W. Ed) Clinical Chemistry. Principles and Technics . New York. Medical Departement. p. 679 – 695.
- Wells MS, and William MA, 1992. Iron and heme metabolism In: (Thomas MD, Eds) Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. New York: Wiley-Lies. p. 1001-1023.
- Wilson CB.,Ole G, Robert FD, 1971. Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. Sixth edition. J.B. Lippincott Company. Toronto
- Wirakusumah ES, 1999. Anemi Gizi Besi. PT. Trubus Agriwijaya.
- Zainuddin M, 1999. Metodologi Penelitian. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.

LAMPIRAN 1

Perhitungan dosis untuk zat besi, asam askorbat dan asam sitrat

Dosis untuk zat besi, didasarkan pada dosis yang diberikan untuk anemia defisiensi zat besi pada manusia yaitu 200 mg (Hillman, 1996).

Dosis untuk asam askorbat dan asam sitrat diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut. Untuk asam askorbat dosis yang digunakan 250 mg (Wilson dkk, 1971, sedangkan untuk asam sitrat dosis yang digunakan 300 mg. (Rafle, 1968) Dosis untuk tikus berat 200 gram didapat melalui perhitungan dosis berdasarkan tabel konversi dosis obat dari Laurence dan Bacharach 1964 dalam Hariyanti, 1995). Adapun tabel konversi dosis obat tersebut adalah sebagai berikut

Tabel 1. Konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan coba dan manusia

	Mencit 20 g	Tikus 200g	Marmot 400g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Jika diketahui :

- dosis ferro sulfat untuk manusia adalah 200 mg.
- dosis asam askorbat untuk manusia adalah 250 mg
- dosis asam sitrat untuk manusia adalah 300 mg

Faktor konversi manusia – tikus adalah 0,018 maka untuk tikus dengan berat badan 200 gram adalah :

$$\text{Ferro sulfat } 0.018 \times 200 \text{ mg} = 3.6 \text{ mg}$$

$$\text{Asam askorbat } 0.018 \times 250 \text{ mg} = 4.5 \text{ mg}$$

$$\text{Asam sitrat } 0.018 \times 300 \text{ mg} = 5.4 \text{ mg}$$

Dilaturkan dalam 2 cc aquabidest.

Untuk tikus dengan berat badan 120 gram = $120/200 \times 2 \text{ cc} = 1.2 \text{ cc}$ larutan obat.

LAMPIRAN 2**Susunan Pakan Penelitian****1. Komposisi Pakan Rendah Zat Besi.**

Per kg mengandung :

Susu skim		450 gram
Vitamin		5,1 gram
Vitamin A	50.000 IU	
Vitamin D	5.000 IU	
Vitamin E	40 IU	
Vitamin B1	300 mg	
Vitamin B2	30 mg	
Vitamin B6	300 mg	
Vitamin B12	100 mg	
Cal pantothenat	600 mg	
Asam nikotinat	600 mg	
Asam folat	100 mg	
Glukosa		ad 1000 gram

Kadar Fe per kilogram makanan mengandung 493 mg.

Sumber: Hanafi M. (1983).

2. Susunan pakan perlakuan.

Bahan	P1	P2	P3	P4
Pakan rendah zat besi	V	V	V	V
FeSO ₄	V	V	V	V
Asam Askorbat	-	V	-	V
Asam sitrat	-	-	V	V

Keterangan:

- Pakan rendah zat besi diberikan secara ad libitum
- FeSO₄, asam askorbat dan asam sitrat diberikan dengan cara disondekan langsung ke lambung.



3. Vitamin yang digunakan

Vitamin yang digunakan yaitu "Methiovit"

Tiap gram mengandung :

- Vitamin A	4.000 IU
- Vitamin D	1.000 IU
- Vitamin E	8 mg
- Vitamin B1	1,4 mg
- Vitamin B2	1 mg
- Vitamin B6	0.4 mg
- Vitamin B12	10 mg
- Vitamin K	0.8 mg
- Asam folat	1 mg
- Ca-Pantotenat	2 mg
- Asam nikotinat	6 mg
- Mehtionin	350 mg
- Lysin	50 mg

LAMPIRAN 3

Prosedur pemeriksaan darah

A. Prosedur pemeriksaan kadar hemoglobin

Bahan:

1. Darah vena atau kapiler yang telah diberi EDTA sebagai antikoagulan
2. Reagen.
 - larutan kalium heksasianoferrat (III)
 - larutan kalium sianida
3. Larutan pereaksi
 - kalium sianida 1.0 mmol/l
 - kalium heksasianoferrat (III) 0.6 mmol/l
 - buffer fosfat pH 7,4 2.5 mmol/l
 - natrium klorida 1.5 mmol/l
 - detergent 0.05 %

Cara pemeriksaan:

1. Pipet kedalam tabung test 5,0 ml larutan pereaksi.
2. Tambahkan 0,02 ml darah dengan pipet Sahli
3. Kocok dengan baik dan setelah 3 menit baca absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm, dibandingkan dengan larutan pereaksi. Perhitungan konsentrasi hemoglobin seperti yang tercantum di bawah ini.

Perhitungan :

$$\text{Konsentrasi Hb (g/dl)} = \text{Absorbansi} \times 36.8 \text{ g Hb/dl.}$$

Keterangan : angka 36.8 adalah faktor koreksi.

Dalam penelitian ini digunakan standar sianmethemoglobin dari Merckotest dengan 4 macam konsentrasi hemoglobin, yaitu ; 6 g/dl, 13 g/dl, 20 g/dl, dan 25 g/dl .

B. Prosedur pemeriksaan kadar zat besi serum

Bahan :

1. Serum darah
2. Reagen yang terdiri dari:
 - buffer
 - reagen warna
 - asam askorbat

Preparasi

1. Reagen untuk blanko sampel

Ke dalam satu botol larutan buffer ditambahkan satu sendok ukur asam askorbat.

Larutkan asam askorbat secara perlahan

2. Larutan pereaksi.

Ke dalam satu botol buffer tambahkan satu sendok ukur asam askorbat dan 0.5 ml reagen warna.

Konsentrasi dalam larutan

Glysin	165.0 mmol/l
Guanidine klorid	3.75 mmol/l
Asam askorbat	> 45 mmol/l
Ferrozin	>0.65 mmol/l
Tiourea	10 mmol/l

Cara pemeriksaan:

1. Masukkan 200 μl sampel serum kedalam 1000 μl larutan pereaksi.
 2. Sebagai blanko sampel masukkan ke dalam tabung lain 200 μl sampel ditambahkan 1000 μl reagen blanko.
 3. Campur dan diamkan pada suhu 20 – 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit
 4. Baca absorbansi sampel pada panjang gelombang 578 nm.
 5. Untuk setiap pemeriksaan, blanko reagen harus selalu dihitung
- Kadar zat besi dalam serum dapat dihitung dengan cara tersebut di bawah.

Perhitungan

$$\Delta A = A \text{ Sampel} - A \text{ blanko sampel} - \Delta A \text{ blanko reagen}$$

$$\text{Konsentrasi zat besi dalam serum } (\mu\text{g/dl}) = \Delta A \times 1363$$

Keterangan : A = absorban.

ΔA = selisih absorban

C. Prosedur pemeriksaan kadar TIBC

Bahan :

1. Serum darah
2. Reagen
 - larutan besi ($\text{Fe}^{3+} = 333 \mu\text{g/dl}$)
 - magnesium hidroksi karbonat

Cara pemeriksaan :

1. Pipet ke dalam 10 ml tabung sentrifugasi sampel sebanyak 0,5 ml dan larutan zat besi sebanyak 1,0 ml.
2. Kocok dengan baik biarkan selama 5 sampai 30 menit pada suhu kamar.
3. Tambahkan satu sendok ukur (sekitar 0,1 g) magnesium hidroksi karbonat dan biarkan selama 30 sampai 60 menit dan aduk presipitasi setiap 5 sampai 10 menit.
4. Kemudian sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm
5. Supernatan diambil dan absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 578 nm.
6. Penentuan zat besi dalam supernatan sesuai dengan metode ferrozin.

Perhitungan :

$$\text{Konsentrasi TIBC} = \Delta A \times 3 \times \text{faktor}$$

Keterangan: angka 3 adalah faktor pengenceran.

LAMPIRAN 4

Prosedur Pemeriksaan Kadar Fe dan Protein Pada Pakan

1. Prosedure pemeriksaan kadar Fe dengan metode AAS (Atomic Absorption Spectrofotometer).

Reagen : - HNO_3

- Asam perklorat
- Asam sulfat
- Standar Fe

Alat : - AAS Varian

- Lampu Fe
- Gas pembakar : Udara dan acetylene
- Pemanas/oil bath.

Prosedure pemeriksaan :

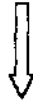
- Ambil bahan sebanyak 3 gram (3 ml bila cair).
- Tambahkan 1 ml asam sulfat pekat dan 5 ml campuran asam perklorat-asam nitrat (2:5)
- Blanko berisi 1 ml asam sulfat pekat dan 5 ml campuran asam perklorat-asam nitrat (2:5)
- Panaskan di dalam oil bath sampai jernih. Setelah jernih dinginkan sampai suhu kamar.
- Tambahkan 5 ml larutan standar Fe 10 ppm, kemudian tambahkan aquadest sampai 50 ml.
- Dibaca pada AAS dengan lampu Fe.

Hasil pemeriksaan kadar Fe pada aquabidest yang digunakan dalam penelitian adalah 0,00 mg/l.

Hasil pemeriksaan kadar Fe pada pakan (susu skim) yang digunakan adalah 4. 855 mg/kg.

2. Prosedur pemeriksaan protein dengan metode Kjeldahl

Timbang bahan 3 mg
 masukkan ke dalam labu kjeldahl
 tambahkan H₂SO₄ pekat 20 ml
 tambahkan katalisator Schelien 2 mg



destruksi sampai jernih



dinginkan, masukkan dalam labu ukur



baca pada spektrofotometer untuk kadar N

Perhitungan :

$$\text{Tot. protein} = \frac{100}{\text{berat sampel}} \times \text{pengenceran} \times \text{abs. Spektro.} \times \frac{\text{N}}{\text{NH}_4} \times 6,38$$

Hasil pemeriksaan kadar protein pakan 14.37 %

LAMPIRAN 5**Kadar Normal Parameter Status Zat Besi Tikus**

Parameter	Kadar Normal	Keadaan defisiensi
Hemoglobin (gr%)	15.44 – 16.06	Menurun <12
Zat besi serum ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	186 - 205	Menurun < 181
TIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	432 - 516	Meningkat > 537
Saturasi Fe (%)	20 - 50	Menurun < 16



LAMPIRAN 6

Hasil pengukuran status zat besi dan berat badan hewan coba tikus .

1. Hasil pengukuran status zat besi dan berat badan awal sebelum pemberian pakan rendah zat besi

Sampel	Berat badan (gram)	Status zat besi			
		Hemoglobin (gram%)	Zat besi serum ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	TIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Saturasi Fe (%)
1	87	14.9	206	477.9	43.1
2	90	15.2	210.5	480	43.9
3	85	15.5	257	526	48.9
4	89	14.8	216	432.5	49.9
5	90	15.4	225	455	49.5
Rata-rata	88.2	15.15	222.90	474.28	47.06
Simpangan baku	2.168	0.305	20.336	34.778	3.281

2. Hasil pengukuran status zat besi selama 4 dan 8 minggu pemberian pakan rendah zat besi

Sampel	Waktu pengamatan							
	4 minggu				8 minggu			
	Hb (gr%)	Zat besi serum ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	TIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Saturasi Fe (%)	Hb (gr%)	Zat besi serum ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	TIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Saturasi Fe (%)
1	12.7	128.2	478.9	26.8	11.6	60.8	538.2	11.3
2	13.9	145.3	465.8	31.2	9.8	69.9	550.1	12.7
3	12.3	125.4	510.2	24.6	11.5	75.6	560.4	13.5
4	12.5	100	506.5	19.7	11	81.8	540.3	15.1
5	13.5	126.4	489.7	25.8	10.5	73.5	490	15
6	-	-	-	-	12	70.2	570.4	12.3
7	-	-	-	-	11.6	80.7	525.9	15.3
8	-	-	-	-	12.3	75	568	13.2
9	-	-	-	-	11.8	80	550	14.5
10	-	-	-	-	10.9	55.4	538.2	10.3
Rerata	12.980	125.060	490.220	25.620	11.300	72.290	543.150	13.320
Simpangan baku	0.687	16.197	18.635	4.143	0.753	8.614	98.682	1.699

3. Hasil pengukuran Berat badan dan Pertambahan berat badan hewan coba tikus

No	Feso4 3.6 mg (P1)			FeSO4 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg (P2)			FeSO4 3.6 mg + asam sitrat 5.4 mg (P3)			FeSO4 3.6 mg + asam askorbat 4.5 mg + asam sitrat 5.4 mg (P4)		
	Sebelum	Sesudah	Pertambah An	Sebelum	Sesudah	Pertambah An	Sebelum	Sesudah	Pertambah an	Sebelum	Sesudah	Pertambah na
1	120	125	5	125	130	5	118	122	4	131	137	6
2	105	109	5	130	134	4	132	136	4	111	114	3
3	123	126	3	107	110	3	116	121	15	132	136	4
4	127	132	5	119	123	4	131	133	2	99	103	4
5	95	100	5	125	131	5	88	93	5	128	131	3
6	117	121	4	98	102	4	111	115	4	119	123	4
7	137	143	6	117	120	3	122	125	3	108	114	6
8	111	114	3	132	136	4	109	114	5	120	124	4
9	130	132	3	106	109	3	128	131	3	107	110	3
10	108	121	3	125	129	4	123	128	5	127	132	5
Rerata	117.30	122.00	4.70	118.40	122.40	4.0	117.80	121.70	3.90	118.20	122.40	4.20
Simpng an baku	12.73	12.06	3.09	11.32	1.79	0.49	13.08	12.44	1.19	11.46	11.73	1.13

4. Hasil pengukuran status zat besi setelah pemberian pakan perlakuan selama 2 minggu

a. Kadar Hemoglobin.

No	FeSO4 3,6 mg (P1)	FeSO4 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg (P2)	FeSO4 3.6 mg + Asam sitrat 5.4 mg (P3)	FeSO4 3.6 mg + asam askorbat 4.5 mg + asam sitrat 5.4 mg (P4)
1	12	13.5	12	14.7
2	11.6	14.6	11.8	15.3
3	12.2	13.9	13	14.9
4	12	13.9	12.2	15.6
5	12.1	12.9	12	14.3
6	12.6	13.7	12.3	15.8
7	11.8	13	11.5	14.6
8	12	12.4	12.3	14.9
9	13	13.1	12.7	14.9
10	-	12.8	11.9	15.2
Rerata	12.144	13.380	12.170	15.020
Simpng an baku	0.422	0.658	0.437	0.459

b. Kadar zat besi serum

No	FeSO ₄ 3,6 mg (P1)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg (P2)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam sitrat 5.4 mg (P3)	FeSO ₄ 3.6 mg + asam askorbat 4.5 mg + asam sitrat 5.4 mg (P4)
1	160.9	187.2	170.9	199.8
2	185.2	215.5	182.6	240.6
3	175.7	198.3	176.9	229.9
4	165.6	221.1	182.1	235.7
5	210.5	199.5	211.7	197.5
6	173.3	200.6	183.1	229.3
7	183.6	198.7	200	229.3
8	200.5	220.8	180.4	240.2
9	192.8	197.9	190.2	199.6
10	-	225	171.3	230.9
Rerata	183.122	206.460	184.920	223.280
Simpangan baku	16.210	12.907	12.719	17.293

3. Kadar Kapasitas total pengikatan zat besi dalam serum (TIBC)

No	FeSO ₄ 3,6 mg (P1)	FeSO ₄ 3.6 mg + asam askorbat 4.5 mg (P2)	FeSO ₄ 3.6 mg + asam sitrat 5.4 mg (P3)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg + Asam sitrat 5.4 mg (P4)
1	530.3	494.5	524	482.7
2	540	494.3	494.1	490.5
3	542.5	475.6	492.4	466.2
4	535.7	460.5	536.9	460.8
5	499.9	487.8	513	460.8
6	548.5	500.6	546.3	496.6
7	546.6	510.2	508.8	486.9
8	498	485.4	500.9	520.6
9	500	498.3	511.8	465.8
10	-	486.8	497.4	460.2
Rerata	526.833	489.400	512.560	479.627
Simpangan baku	21.349	13.898	18.226	20.007

4. Saturasi transferrin dalam serum (dalam %)

No	FeSO ₄ 3,6 mg (P1)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg (P2)	FeSO ₄ 3.6 mg + asam sitrat 5.4 mg (P3)	FeSO ₄ 3.6 mg + Asam askorbat 4.5 mg + asam sitrat 5.4 mg (P4)
1	30.3	37.8	32.6	41.4
2	34.3	43.6	36.9	49
3	32.4	41.7	35.9	49.3
4	30.9	48.0	33.9	51.1
5	42.1	40.9	41.3	42.9
6	31.6	40.1	33.5	46.2
7	33.6	38.9	39.3	47.1
8	40.3	45.5	36	46.1
9	38.6	39.7	37.9	42.8
10	-	46.2	34.4	50.2
Rerata	34.900	42.240	36.170	46.610
Simpangan baku	4.345	3.421	2.747	3.368

LAMPIRAN 7**Analisis statistik setelah pemberian pakan rendah zat besi****Means****Report**

GRUP		HEMO GLOBIN	BESI SERUM	TIBC	SATURASI FE
0 MING	Mean	15.160	222.900	474.280	47.060
	N	5	5	5	5
	Std. Deviation	.305	20.336	34.778	3.281
4 MING	Mean	12.980	125.060	490.220	25.620
	N	5	5	5	5
	Std. Deviation	.687	16.197	18.635	4.143
8 MING	Mean	11.300	72.290	543.150	13.320
	N	10	10	10	10
	Std. Deviation	.753	8.614	98.682	1.699
Total	Mean	12.685	123.135	497.700	24.830
	N	20	20	20	20
	Std. Deviation	1.741	64.485	72.286	14.394

ANOVA Table

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
HEMOGLOBIN * GRUP	Between Groups	50.246	2	25.123	58.028	.000
	Within Groups	7.360	17	.433		
	Total	57.605	19			
BESI SERUM * GRUP	Between Groups	75635.945	2	37817.972	190.695	.000
	Within Groups	3371.381	17	198.317		
	Total	79007.325	19			
TIBC * GRUP	Between Groups	5409.259	2	2704.629	.490	.621
	Within Groups	93869.541	17	5521.738		
	Total	99278.800	19			
SATURASI FE * GRUP	Between Groups	3798.786	2	1899.393	234.500	.000
	Within Groups	137.696	17	8.100		
	Total	3936.482	19			

Tests Npar

GRUP = 0 MINGGU

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		HEMO GLOBIN	BESI SERUM	TIBC	SATURASI FE
N		5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	15.160	222.900	474.280	47.060
	Std. Deviation	.305	20.336	34.778	3.281
Most Extreme Differences	Absolute	.203	.259	.235	.313
	Positive	.203	.259	.235	.232
	Negative	-.184	-.203	-.141	-.313
Kolmogorov-Smirnov Z		.454	.579	.525	.699
Asymp. Sig. (2-tailed)		.986	.891	.946	.713

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. GRUP = 0 MING

GRUP = 4 MINGGU**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		HEMO GLOBIN	BESI SERUM	TIBC	SATURASI FE
N		5	5	5	5
Normal Parameters	Mean	12.980	125.060	490.220	25.620
	Std. Deviation	.687	16.197	18.635	4.143
Most Extreme Differences	Absolute	.258	.308	.209	.203
	Positive	.258	.223	.142	.188
	Negative	-.175	-.308	-.209	-.203
Kolmogorov-Smirnov Z		.577	.690	.467	.453
Asymp. Sig. (2-tailed)		.893	.729	.981	.986

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = 4 MING

GRUP = 8 MINGGU**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		HEMO GLOBIN	BESI SERUM	TIBC	SATURASI FE
N		10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	11.300	72.290	543.150	13.320
	Std. Deviation	.753	8.614	98.682	1.699
Most Extreme Differences	Absolute	.205	.191	.351	.156
	Positive	.092	.135	.281	.122
	Negative	-.205	-.191	-.351	-.156
Kolmogorov-Smirnov Z		.648	.603	1.111	.494
Asymp. Sig. (2-tailed)		.796	.860	.169	.967

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = 8 MING



General Linear Model

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
GRUP 1	0 MING	5
2	4 MING	5
3	8 MING	10

Descriptive Statistics

	GRUP	Mean	Std. Deviation	N
HEMOGLOBIN	0 MING	15.160	.305	5
	4 MING	12.980	.687	5
	8 MING	11.300	.753	10
	Total	12.685	1.741	20
BESI SERUM	0 MING	222.900	20.336	5
	4 MING	125.060	16.197	5
	8 MING	72.290	8.614	10
	Total	123.135	64.485	20
TIBC	0 MING	474.280	34.778	5
	4 MING	490.220	18.635	5
	8 MING	543.150	98.682	10
	Total	497.700	72.286	20
SATURASI FE	0 MING	47.060	3.281	5
	4 MING	25.620	4.143	5
	8 MING	13.320	1.699	10
	Total	24.830	14.394	20

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	HEMOGLOBIN	50.246 ^a	2	25.123	58.028	.000
	BESI SERUM	75635.945 ^b	2	37817.972	190.695	.000
	TIBC	5409.259 ^c	2	2704.629	.490	.621
	SATURASI FE	3798.786 ^d	2	1899.393	234.500	.000
Intercept	HEMOGLOBIN	3111.027	1	3111.027	7185.797	.000
	BESI SERUM	353220.125	1	353220.125	1781.093	.000
	TIBC	4366899.045	1	4366899.045	790.856	.000
	SATURASI FE	14792.000	1	14792.000	1826.226	.000
GRUP	HEMOGLOBIN	50.245	2	25.123	58.028	.000
	BESI SERUM	75635.945	2	37817.972	190.695	.000
	TIBC	5409.259	2	2704.629	.490	.621
	SATURASI FE	3798.786	2	1899.393	234.500	.000
Error	HEMOGLOBIN	7.360	17	.433		
	BESI SERUM	3371.381	17	198.317		
	TIBC	93869.541	17	5521.738		
	SATURASI FE	137.696	17	8.100		
Corrected Total	HEMOGLOBIN	57.606	19			
	BESI SERUM	79007.326	19			
	TIBC	99278.800	19			
	SATURASI FE	3936.482	19			

a. R Squared = .872 (Adjusted R Squared = .857)

b. R Squared = .957 (Adjusted R Squared = .952)

c. R Squared = .054 (Adjusted R Squared = -.057)

d. R Squared = .965 (Adjusted R Squared = .961)

Estimated Marginal Means GRUP

Estimates

Dependent Variable	GRUP	Mean	Std. Error
HEMOGLOBIN	0 MING	15.160	.294
	4 MING	12.980	.294
	8 MING	11.300	.208
BESI SERUM	0 MING	222.900	6.298
	4 MING	125.060	6.298
	8 MING	72.290	4.453
TIBC	0 MING	474.280	33.232
	4 MING	490.220	33.232
	8 MING	513.150	23.498
SATURASI FE	0 MING	47.060	1.273
	4 MING	25.620	1.273
	8 MING	13.320	.900

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
HEMOGLOBIN	0 MING	4 MING	2.180	.416	.000
		8 MING	3.860	.360	.000
	4 MING	8 MING	1.680	.360	.000
BESI SERUM	0 MING	4 MING	97.840	8.907	.000
		8 MING	150.610	7.713	.000
	4 MING	8 MING	52.770	7.713	.000
TIBC	0 MING	4 MING	-15.940	46.997	.739
		8 MING	-38.870	40.700	.353
	4 MING	8 MING	-22.930	40.700	.581
SATURASI FE	0 MING	4 MING	21.440	1.800	.000
		8 MING	33.740	1.559	.000
	4 MING	8 MING	12.300	1.559	.000

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

LAMPIRAN 8**Analisis statistik hasil pengukuran berat badan tikus****Means****Report**

PERLAKUAN		BERAT BADAN SEBELUM	BERAT BADAN SESUDAH
FES04	Mean	117.30	122.00
	Std. Deviation	12.73	12.06
FESO43.6+VIT C4.5	Mean	118.40	122.40
	Std. Deviation	11.32	11.79
FESO43.6+SITRAT5.4	Mean	117.80	121.70
	Std. Deviation	13.08	12.44
FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	Mean	118.20	122.40
	Std. Deviation	11.46	11.73
Total	Mean	117.93	122.13
	Std. Deviation	11.70	11.54

ANOVA Table

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BERAT BADAN SEBELUM * PERLAKUAN	Between Groups	7.075	3	2.358	.016	.997
	Within Groups	5331.700	36	148.103		
	Total	5338.775	39			
BERAT BADAN SESUDAH * PERLAKUAN	Between Groups	3.475	3	1.158	.008	.999
	Within Groups	5188.900	36	144.136		
	Total	5192.375	39			

T-Test**PERLAKUAN = FES04 3.6 mg****Paired Samples Statistics^a**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	BERAT BADAN SEBELUM	117.30	10	12.73	4.03
	BERAT BADAN SESUDAH	122.00	10	12.06	3.81

a. PERLAKUAN = FES04

Paired Samples Test

		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	BERAT BADAN SEBELUM - BERAT BADAN SESUDAH	-4.70	3.09	.98	-4.805	9	.001

a. PERLAKUAN = FES04

PERLAKUAN = FESO43.6 mg +VIT C4.5 mg**Paired Samples Statistics^a**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	BERAT BADAN SEBELUM	118.40	10	11.32	3.58
	BERAT BADAN SESUDAH	122.40	10	11.79	3.73

a. PERLAKUAN = FESO43.6+VIT C4.5

PERLAKUAN = FESO43.6 mg+SITRAT5.4 mg**Paired Samples Statistics^a**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	BERAT BADAN SEBELUM	117.80	10	13.08	4.14
	BERAT BADAN SESUDAH	121.70	10	12.44	3.93

a. PERLAKUAN = FESO43.6+SITRAT5.4

Paired Samples Test^a

		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	BERAT BADAN SEBELUM - BERAT BADAN SESUDAH	-3.90	1.20	.38	-10.301	9	.000

a. PERLAKUAN = FESO43.6+SITRAT5.4

PERLAKUAN = FESO43.6 mg+VIT C4.5 mg+SITRAT 5.4 mg**Paired Samples Statistics^a**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	BERAT BADAN SEBELUM	118.20	10	11.46	3.62
	BERAT BADAN SESUDAH	122.40	10	11.73	3.71

a. PERLAKUAN = FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4

Paired Samples Test^a

		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	BERAT BADAN SEBELUM - BERAT BADAN SESUDAH	-4.20	1.14	.36	-11.699	9	.000

a. PERLAKUAN = FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
PERLAKUAN	1	FES04	10
	2	FESO43.6+VIT C4.5	10
	3	FESO43.6+SITRAT5.4	10
	4	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	10

Descriptive Statistics

Dependent Variable: PERUBAHAN BERAT BADAN

PERLAKUAN	Mean	Std. Deviation	N
FES04	4.7000	3.0930	10
FESO43.6+VIT C4.5	4.0000	.9428	10
FESO43.6+SITRAT5.4	3.9000	1.1972	10
FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	4.2000	1.1353	10
Total	4.2000	1.7716	40

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PERUBAHAN BERAT BADAN

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.800 ^a	3	1.267	.384	.765
Intercept	705.600	1	705.600	214.179	.000
PER	3.800	3	1.267	.384	.765
Error	118.600	36	3.294		
Total	828.000	40			
Corrected Total	122.400	39			

a. R Squared = .031 (Adjusted R Squared = -.050)

Estimated Marginal Means PERLAKUAN

Estimates

Dependent Variable: PERUBAHAN BERAT BADAN

PERLAKUAN	Mean	Std. Error
FES04	4.700	.574
FESO43.6+VIT C4.5	4.000	.574
FESO43.6+SITRAT5.4	3.900	.574
FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	4.200	.574

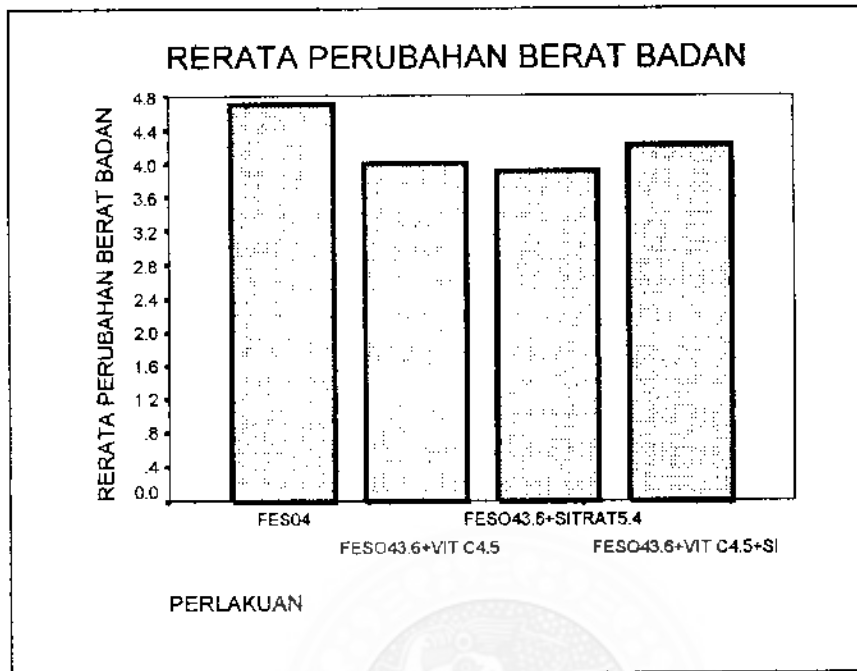
Univariate Tests

Dependent Variable: PERUBAHAN BERAT BADAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	3.800	3	1.267	.384	.765
Error	118.600	36	3.294		

The F tests the effect of PERLAKUAN. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Profile Plots



Keterangan : Satuan berat badan tikus dalam gram

LAMPIRAN 9**Analisis statistik setelah perlakuan****NPar Tests****PERLAKUAN = FES04 3.6 mg****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		HEMO GLOBIN	BESI SERUM	TIBC	SATU RASI FE
N		9	9	9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	12.144	163.122	526.8	34.900
	Std. Deviation	.422	16.210	21.349	4.345
Most Extreme Differences	Absolute	.225	.121	.231	.222
	Positive	.225	.121	.229	.222
	Negative	-.144	-.085	-.231	-.145
Kolmogorov-Smirnov Z		.676	.363	.693	.665
Asymp. Sig. (2-tailed)		.751	.999	.722	.769

- a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.
 c. PERLAKUAN = FES04

PERLAKUAN = FESO43.6 mg + Vitamin C 4.5 mg**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

			HEMOGLOBIN	BESI SERUM	TIBC	SATURASI FE
N			10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean		13.380	208.460	459.40	42.240
	Std. Deviation		.658	12.907	92.735	3.421
Most Extreme Differences	Absolute		.165	.275	.405	.163
	Positive		.165	.275	.292	.163
	Negative		-.089	-.167	-.405	-.130
Kolmogorov-Smirnov Z			.521	.870	1.280	.515
Asymp. Sig. (2-tailed)			.949	.436	.076	.954

- a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.
c. PERLAKUAN = FESO43.6+VIT C4.5

PERLAKUAN = FESO43.6 mg + ASAM SITRAT 5.4 mg**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

			HEMO GLOBIN	BESI SERU M	TIBC	SATU RASI FE
N			10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean		12.170	184.920	512.6	36.170
	Std. Deviation		.437	12.719	18.226	2.747
Most Extreme Differences	Absolute		.183	.257	.190	.140
	Positive		.183	.257	.190	.140
	Negative		-.099	-.135	-.134	-.097
Kolmogorov-Smirnov Z			.579	.812	.602	.444
Asymp. Sig. (2-tailed)			.891	.524	.862	.989

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. PERLAKUAN = FESO43.6+SITRAT5.4

PERLAKUAN = FESO4 3.6 mg+VITC 4.5 mg + SITRAT 5.4 mg**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

			HEMO GLOBIN	BESI SERUM	TIBC	SATU RASI FE
N			10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean		15.020	223.280	479.1	46.610
	Std. Deviation		.459	17.293	20.007	3.368
Most Extreme Differences	Absolute		.203	.336	.241	.165
	Positive		.203	.213	.241	.165
	Negative		-.097	-.336	-.172	-.161
Kolmogorov-Smirnov Z			.642	1.063	.761	.521
Asymp. Sig. (2-tailed)			.804	.209	.609	.949

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. PERLAKUAN = FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4

General Linear Model

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
PERLAKUAN 0	KONROL DEFISIEN	10
1	FES04	9
2	FESO43.6+VIT C4.5	10
3	FESO43.6+SITRAT5.4	10
4	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	10

Descriptive Statistics

	PERLAKUAN	Mean	Std. Deviation	N
HEMOGLOBIN	KONROL DEFISIEN	11.300	.753	10
	FES04	12.144	.422	9
	FESO43.6+VIT C4.5	13.380	.658	10
	FESO43.6+SITRAT5.4	12.170	.437	10
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	15.020	.459	10
	Total	12.816	1.422	49
BESI SERUM	KONROL DEFISIEN	72.290	8.614	10
	FES04	183.122	16.210	9
	FESO43.6+VIT C4.5	206.460	12.907	10
	FESO43.6+SITRAT5.4	184.920	12.719	10
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	223.280	17.293	10
	Total	173.829	55.645	49
TIBC	KONROL DEFISIEN	543.150	23.411	10
	FES04	526.833	21.349	9
	FESO43.6+VIT C4.5	489.400	13.898	10
	FESO43.6+SITRAT5.4	512.560	18.226	10
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	479.110	20.007	10
	Total	509.871	30.379	49
SATURASI FE	KONROL DEFISIEN	13.320	1.699	10
	FES04	34.900	4.345	9
	FESO43.6+VIT C4.5	42.240	3.421	10
	FESO43.6+SITRAT5.4	36.170	2.747	10
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	46.610	3.368	10
	Total	34.643	12.104	49

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	HEMOGLOBIN	82.972 ^a	4	20.743	65.028	.000
	BESI SERUM	140210.899 ^b	4	35052.725	183.247	.000
	TIBC	27389.722 ^c	4	6847.431	17.818	.000
	SATURASI FE	6579.850 ^d	4	1644.963	160.012	.000
Intercept	HEMOGLOBIN	8017.531	1	8017.531	25134.718	.000
	BESI SERUM	1481137.184	1	1481137.184	7743.035	.000
	TIBC	12732795.2	1	12732795.21	33132.244	.000
	SATURASI FE	58719.321	1	58719.321	5711.870	.000
PER	HEMOGLOBIN	82.972	4	20.743	65.028	.000
	BESI SERUM	140210.899	4	35052.725	183.247	.000
	TIBC	27389.722	4	6847.431	17.818	.000
	SATURASI FE	6579.850	4	1644.963	160.012	.000
Error	HEMOGLOBIN	14.035	44	.319		
	BESI SERUM	8416.601	44	191.286		
	TIBC	16909.298	44	384.302		
	SATURASI FE	452.330	44	10.280		
Corrected Total	HEMOGLOBIN	97.007	48			
	BESI SERUM	148627.500	48			
	TIBC	44299.020	48			
	SATURASI FE	7032.180	48			

a. R Squared = .855 (Adjusted R Squared = .842)

b. R Squared = .943 (Adjusted R Squared = .938)

c. R Squared = .618 (Adjusted R Squared = .584)

d. R Squared = .936 (Adjusted R Squared = .930)

Estimated Marginal Means PERLAKUAN

Estimates

Dependent Variable	PERLAKUAN	Mean	Std. Error
HEMOGLOBIN	KONROL DEFISIEN	11.300	.179
	FES04	12.144	.188
	FESO43.6+VIT C4.5	13.380	.179
	FESO43.6+SITRAT5.4	12.170	.179
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	15.020	.179
BESI SERUM	KONROL DEFISIEN	72.290	4.374
	FES04	183.122	4.610
	FESO43.6+VIT C4.5	206.460	4.374
	FESO43.6+SITRAT5.4	184.920	4.374
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	223.280	4.374
TIBC	KONROL DEFISIEN	543.150	6.199
	FES04	526.833	6.535
	FESO43.6+VIT C4.5	489.400	6.199
	FESO43.6+SITRAT5.4	512.560	6.199
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	479.110	6.199
SATURASI FE	KONROL DEFISIEN	13.320	1.014
	FES04	34.900	1.069
	FESO43.6+VIT C4.5	42.240	1.014
	FESO43.6+SITRAT5.4	36.170	1.014
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	46.610	1.014

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	
HEMOGLOBIN	KONROL DEFISIEN	FES04	-.844	.260	.002	
		FESO43.6+VIT C4.5	-2.080	.253	.000	
		FESO43.6+SITRAT5.4	-.870	.253	.001	
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-3.720	.253	.000	
	FES04	FESO43.6+VIT C4.5	-1.236	.260	.000	
		FESO43.6+SITRAT5.4	-2.556E-02	.260	.922	
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-2.876	.260	.000	
	FESO43.6+VIT C4.5	FESO43.6+SITRAT5.4	1.210	.253	.000	
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-1.840	.253	.000	
	FESO43.6+SITRAT5.4	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-2.850	.253	.000	
	BESI SERUM	KONROL DEFISIEN	FES04	-110.832	6.355	.000
			FESO43.6+VIT C4.5	-134.170	6.185	.000
FESO43.6+SITRAT5.4			-112.630	6.185	.000	
FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4			-150.990	6.185	.000	
FES04		FESO43.6+VIT C4.5	-23.338	6.355	.001	
		FESO43.6+SITRAT5.4	-1.798	6.355	.779	
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-40.158	6.355	.000	
FESO43.6+VIT C4.5		FESO43.6+SITRAT5.4	21.540	6.185	.001	
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-16.820	6.185	.009	
FESO43.6+SITRAT5.4		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-38.360	6.185	.000	
TIBC		KONROL DEFISIEN	FES04	16.317	9.007	.077
			FESO43.6+VIT C4.5	53.750	8.767	.000
	FESO43.6+SITRAT5.4		30.590	8.767	.001	
	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4		64.040	8.767	.000	
	FES04	FESO43.6+VIT C4.5	37.433	9.007	.000	
		FESO43.6+SITRAT5.4	14.273	9.007	.120	
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	47.723	9.007	.000	
	FESO43.6+VIT C4.5	FESO43.6+SITRAT5.4	-23.160	8.767	.011	
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	10.290	8.767	.247	
	FESO43.6+SITRAT5.4	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	33.450	8.767	.000	

Based on estimated marginal means

^a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
SATURASI FE	KONROL DEFISIEN	FESO4	-21.580	1.473	.000
		FESO43.6+VIT C4.5	-28.920	1.434	.000
		FESO43.6+SITRAT5.4	-22.850	1.434	.000
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-33.290	1.434	.000
	FESO4	FESO43.6+VIT C4.5	-7.340	1.473	.000
		FESO43.6+SITRAT5.4	-1.270	1.473	.393
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-11.710	1.473	.000
	FESO43.6+VIT C4.5	FESO43.6+SITRAT5.4	6.070	1.434	.000
		FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-4.370	1.434	.004
	FESO43.6+SITRAT5.4	FESO43.6+VIT C4.5+SITRAT 5.4	-10.440	1.434	.000

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

