

DISERTASI

**ANALISIS MIKROBIOTA USUS
PADA SUBJEK REMAJA OBESITAS YANG DIBERI KONSUMSI
EKSTRAK BERAS HITAM (*ORYZA SATIVA L*)**

**ANALYSIS INTESTINAL MICROBIOTA
IN OBESITY ADOLESCENT SUBJECTS THAT CONSUMED
EXTRACT BLACK RICE (*ORYZA SATIVA L*)**



**RACHMAT FAISAL SYAMSU
C013172015**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

DISERTASI

**ANALISIS MIKROBIOTA USUS
PADA SUBJEK REMAJA OBESITAS YANG DIBERI KONSUMSI
EKSTRAK BERAS HITAM (*ORYZA SATIVA L*)**

**ANALYSIS INTESTINAL MICROBIOTA
IN OBESITY ADOLESCENT SUBJECTS THAT CONSUMED
EXTRACT BLACK RICE (*ORYZA SATIVA L*)**

Disertasi
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

**RACHMAT FAISAL SYAMSU
C013172015**

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

DISERTASI

**ANALISIS MIKROBIOTA USUS PADA SUBJEK REMAJA OBESITAS YANG
DIBERI KONSUMSI EKSTRAK BERAS HITAM (ORYZA SATIVA L).
ANALYSIS OF GUT MICROBIOTA IN OBESITY ADOLESCENT SUBJECTS
THAT CONSUMED BLACK RICE (ORYZA SATIVA L) EXTRACT.**

Disusun dan diajukan
Oleh

Rachmat Faisal Syamsu
C013172015

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 11 Februari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui
Promotor,

dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)
Nip. 19700821 199903 1 001

Co. Promotor

Co. Promotor

Prof. Dr. dr. Nurpudji Astuti Daud, MPH, Sp.GK(K) — **dr. Aminuddin, Ph.D, M.Nut & Diet, Sp.GK**
Nip. 19561020 198503 2 001 Nip. 19760704 200212 1 003

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,

dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K) — **Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, Sp.GK**
Nip. 19700821 199903 1 001 Nip. 19680530 199603 2 001

ABSTRAK

RACHMAT FAISAL SYAMSU. *Analisis Mikrobiota Usus pada Subjek Remaja Obesitas yang Diberi Konsumsi Ekstrak Beras Hitam (Oriza sativa L.)* (dibimbing oleh Agussalim Bukhari, Nurpudji A. Taslim, dan Aminuddin).

Penelitian ini bertujuan mengetahui analisis mikrobiota usus *filum firmicutes bacteroidetes*, *actinobacteria*, dan *protobacteria* pada subjek obesitas yang diberi konsumsi ekstrak beras hitam melalui pemeriksaan feces.

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian berupa rancangan kelompok kontrol (*the pre and posttest control group design*). Sampel penelitian adalah pasien obesitas berusia 18-25 tahun. Kelompok 1 berat badan ideal diberikan placebo; kelompok 2 obesitas diberikan placebo; dan kelompok 3 obesitas diberikan ekstrak beras hitam 5,6 gr/dl. Data disajikan secara deskriptif melalui uji-T beda berpasangan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa di kelompok 1 dan 2 ada perbedaan antara pra uji dan pasca uji, tetapi tidak signifikan. Sementara di kelompok 3 terdapat perbedaan signifikan penurunan nilai di pasca uji Mikrobiota Filum Firmicutes Genus Clostridium Leptum.

Kata kunci: obesitas, mikrobiota usus, ekstrak beras hitam



ABSTRACT

RACHMAT FAISAL SYAMSU. *Analysis of Intelligent Microbiotas in Obesity Adolescent Subject That Consumed Black Rice (Oryza Sativa L) Extract*
(Supervised by Agussalim Bukhari and Nurpudji A. Taslim Aminuddin)

This study aims to determine the analysis of intestinal microbiota of Phylum Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and protobacteria in Obesity Subjects who are given black rice extract consumption through stool examination. Obesity is an abnormal or excessive fat accumulation that poses a risk to health. According to the Asia Pacific criteria, obesity in adults was defined as BMI 25. The gut microbiota has recently been proposed as an environmental factor responsible for weight gain and impaired energy metabolism leading to obesity. Polyphenols such as anthocyanins found in black rice (*Oryza sativa* L) are expected to play a role in intestinal microbiota homeostasis in suppressing obesity and other metabolic diseases.

This type of research was a quasi-experimental laboratory with a double-blind Randomized Control Trial (RCT) design. The research design used was a control group design (The Pre and Post Test Control Group Design). The sample was Obesity Patients aged 18-25 years. This research was divided into 3 groups, where Group 1 ideal body weight was given a placebo, group 2 Obesity was given a placebo, and group 3 Obesity was given Black Rice Extract 5.6 g/dl. The data was presented descriptively and the paired t-test was different.

The result of the study find that in group 1 and 2 there is a difference between the pre and post tests, but it is not significant. While in group 3 there is a significant difference in the decrease in scores in the post-test Microbiota Phylum Firmicutes Genus *Clostridium* Leptum. So it is concluded that Obesity patients who are given black rice extract for 4 weeks experience a significant decrease in the post-test of *Clostridium* Leptum microbiota which is a gram-positive pathogen.

Keywords: Obesity, Intestinal Microbiota, Black rice extract





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Kampus Tamalanrea Km. 10 Makassar 90245
Telp. (0411) 586010, 585836, 586200 Psw. 2767 Fax. (0411) 586297

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : **Rachmat Faisal Syamsu**
Nomor Pokok : C013172015
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulis saya berjudul : **Analisis Mikrobiota Usus Pada Subjek Remaja Obesitas yang diberi Konsumsi Ekstrak Beras Hitam (*Oryza Sativa* L.)**.

Adalah karya tulis saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 30 Mei 2022
Yang menyatakan,



Rachmat Faisal Syamsu

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rachmat Faisal Syamsu
Nomor Mahasiswa : C013172015
Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari disertasi ini terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Februari 2022

Yang menyatakan

Rachmat Faisal Syamsu

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Dengan menyebut Asma Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, atas kasih sayang-Nya penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Untuk ini penulis mengucapkan rasa syukur kehadiran-Nya seraya mengucapkan segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam, dengan terselesaikannya disertasi ini yang merupakan salah satu persyaratan akademik guna memperoleh gelar Doktor dalam Program Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Judul yang diangkat dalam disertasi ini adalah ; ***Analisis Mikrobiota Usus Pada Subjek Remaja Obesitas Yang Diberi Konsumsi Ekstrak Beras Hitam (Oryza Sativa L).*** Pada kesempatan ini perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada **dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D., Sp. GK(K)** sebagai promotor, **Prof. Dr.dr. Pudji Astuti Daud, MPH, Sp.GK(K)** sebagai Ko-promotor I, **dr. Aminuddin, Ph.D, M.Nut & Diet, Sp.GK** sebagai Ko-promotor II, yang dengan tulus hati telah menyediakan waktu memberikan bimbingan, perhatian dan dorongan serta semangat kepada penulis selama menyelesaikan disertasi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada para penguji; drh. Safarina Malik, Ph.D sebagai penguji eksternal, **Prof. Dr. Elly Wahyuddin, DEA, Apt, Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS, Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes, Dr. dr. Nu'man As Daud, Sp. PD(K)-GEH** sebagai penguji internal yang telah banyak

memberikan masukan, saran, koreksi, dorongan, serta dukungan untuk penyempurnaan disertasi ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Rektor Universitas Hasanuddin, **Prof. Dr. Ir. Jamaludin Jompa, M.Sc.**, Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin, **Prof Dr. Hamka Naping, M.A.** Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, **Prof. dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGHSp.GK**, Ketua Program Studi S3 Kedokteran, **dr Agussalim Bukhari M.Med., Ph.D., Sp.GK (K)**, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk dapat menempuh jenjang Pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.

Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muslim Indonesia serta jajaran dan pimpinanya yang telah memberikan izin dan senantiasa memberikan bantuan moril serta motivasi untuk melanjutkan pendidikan. Staf administrasi Prodi S3 Kedokteran Unhas yang telah memberikan bantuan sejak awal hingga akhir penyelesaian studi. Teman-teman seangkatan selama pendidikan yang sudah banyak membantu selama proses penelitian.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada orangtua saya tercinta, Ayahanda H.Syamsu dan Ibunda Hj. Lies Meyer yang telah melahirkan, membesarkan, dan mendidik saya sejak kecil dengan penuh kasih sayang, mereka tetap menginspirasi hingga saya mampu mencapai keadaan seperti ini. Ucapan terima kasih yang tulus kepada mertua saya Ayahanda Abdul Karim dan Ibunda Dewi Kartika.

Rasa bangga dan terima kasih yang tidak terhingga kepada mereka yang amat saya sayangi ; istri, Apt.Siska Nuryanti,S.Farm,M.kes dan anak-anakku tersayang Najwa Ramadhani Faisal, Nafeeza Ramadhani Faisal dan Nadine Hafidzah Faisal atas segala pengertian, kesabaran, dukungan doa dan cinta kasih yang tidak ternilai.

Akhir kata penulis ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu penulis mulai dari awal penelitian hingga dapat menyelesaikan pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan keberkahannya pada kita semua. Aamiin.

Makassar, Juni 2022

Rachmat Faisal Syamsu

ABSTRAK

ANALISIS MIKROBIOTA USUS PADA SUBJEK REMAJA OBESITAS YANG DIBERI KONSUMSI EKSTRAK BERAS HITAM (*ORYZA SATIVA L*).

Rachmat Faisal Syamsu¹, Agussalim Bukhari², Nurpudji A.Taslim², Aminuddin²

¹Bagian IKM-IKK Fakultas Kedokteran Universitas Muslim Indonesia Makassar

²Bagian Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar

Corresponding author e-mail : rachmatfaisal.syamsu@umi.ac.id

Abstrak :

Obesitas merupakan akumulasi lemak abnormal atau berlebihan yang menimbulkan resiko terhadap kesehatan. Menurut kriteria asia pasifik, obesitas pada orang dewasa didefinisikan sebagai IMT ≥ 25 . *Mikrobiota* usus baru-baru ini telah dikemukakan sebagai faktor lingkungan yang bertanggung jawab untuk kenaikan berat badan dan gangguan metabolisme energi yang menyebabkan Obesitas. Polifenol seperti antosianin yang terdapat dalam beras hitam (*Oryza sativa L*) diharapkan mampu berperan dalam homeostatis mikrobiota usus dalam menekan Obesitas dan penyakit metabolik lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui analisis Mikrobiota usus Filum *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, dan *protobacteria* pada Subjek Obesitas yang diberi konsumsi ekstrak Beras hitam melalui pemeriksaan feces. Jenis penelitian ini adalah Quasi Eksperimental laboratorium dengan desain Randomized Control Trial (RCT) *double blind*. Rancangan

penelitian yang digunakan adalah rancangan dengan kelompok kontrol (*The Pre and Post Test Control Group Design*). Sampel adalah Pasien Obesitas berusia 18-25 tahun. Penelitian ini terbagi menjadi 3 kelompok. Dimana Kelompok 1 Berat badan ideal diberi placebo, kelompok 2 Obesitas diberi placebo, dan kelompok 3 Obesitas diberi Ekstrak Beras Hitam 5,6 gr/dl. Data disajikan secara deskriptif dan Uji beda paired t-test. Hasil penelitian mendapatkan pada kelompok 1 dan 2 ada perbedaan antara pre dan post tes tetapi tidak signifikan. Sedangkan pada kelompok 3 terdapat perbedaan signifikan pada penurunan nilai post tes Mikrobiota Filum Firmicutes Genus Clostridium Leptum dan perbandingan dengan total bacteria pada post test. Simpulan : Ekstrak Beras hitam mengandung Antosianin yang tinggi sehingga dapat digunakan sebagai bahan prebiotik bagi mikrobiota usus pada subjek Obesitas. Hal ini dibuktikan bahwa pasien Obesitas yang diberikan Ekstrak beras hitam selama 4 minggu mengalami penurunan yang signifikan pada post tes Mikrobiota Clostridium Leptum yang merupakan Bakteri Patogen gram positif.

Kata kunci: Obesitas, Mikrobiota Usus, Ekstrak beras hitam

DAFTAR ISI

SAMPUL

LEMBAR PERSETUJUAN

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

KATA PENGANTAR

ABSTRAK

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

DAFTAR GAMBAR

DAFTAR DIAGRAM

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang	15
1.2. Rumusan Masalah	18
1.3. Tujuan Penelitian	19
1.4. Manfaat Penelitian	20

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Obesitas	21
2.2. Dampak Obesitas	22
2.3 Klasifikasi Obesitas	23
2.4 Mikrobiota Usus	25
2.5. Beras Hitam	34
2.6 Kerangka Teori	49
2.7 Kerangka Konsep	51

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Dan Desain Penelitian	53
3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	 53
3.3 Alat dan Bahan	 54
3.4 Populasi dan Sampel	55
3.5 Variabel Penelitian	56
3.6 Instrumen Penelitian	56
3.7 Defenisi Operasional	56
3.8 Prosedur Penelitian	57

BAB IV HASIL PENELITIAN

4.1. Hasil	 64
4.2 Pembahasan	 83

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan	 97
5.2 Saran	 97

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Perbandingan Komposisi Beras Hitam dan Beras Putih per 100 gr Bahan

Tabel 2. Pembagian Kelompok Sampe 40

Tabel 3. Defenisi Operasiona

Tabel 4. Hasil Uji Kadar Etano

Tabel 5. Profil Mikrobiota pada Kelompok 1

Tabel 6. Profil Mikrobiota pada Kelompok 2

Tabel 7. Profil Mikrobiota pada Kelompok 3

Tabel 8. Profil Pre Test Mikrobiota pada semua kelompo

Tabel 9. Profil Post Test Mikrobiota pada semua kelompok

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Bakteri utama dan Archaea dalam Mikrobiota Usus manusia

Gambar 2. Mekanisme *mikrobiota* usus mengendalikankan obesitas. *Mikrobiota* dapat mempengaruhi jalur metabolik dengan memodulasi energi *harvesting*, inflamasi dan kontrol rasa kenyang

Gambar 3. Perbandingan prosedur PCR konvensional dan *real time*

DAFTAR DIAGRAM

Diagram 1. Perbandingan nilai rata-rata Mikrobiota Pre dan Post Test pada Kelompok 1 BBI + Placebo

Diagram 2. Perbandingan nilai rata-rata Mikrobiota Pre dan Post Test pada Kelompok 2 Obesitas + Placebo

Diagram 3. Perbandingan nilai rata-rata Mikrobiota Pre dan Post Test pada Kelompok 3 Obesitas + EBH

Diagram 4. Perbandingan nilai rata-rata Pre Test Mikrobiota pada semua Kelompok.

Diagram 5. Perbandingan nilai rata-rata Post Test Mikrobiota pada semua Kelompok

LAMPIRAN LAMPIRAN

Lampiran 1 Persetujuan Etik

Lampiran 2 Surat Keterangan Izin Penelitian

Lampiran 3 *Out put* Data SPSS

Lampiran 4 Daftar Food Recall

Lampiran 5 Daftar Sampel LPS

Lampiran 6 Daftar Sampel ZO-1

Lampiran 7 Laporan Pengujian Analisis Cemarkan Mikroba/Mikrobiologi

Lampiran 8 Data Hasil Analisa Kadar Etanol

Lampiran 9 Surat Pencatatan Clptaan

Lampiran 10 Foto Kegiatan Penelitian

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas merupakan masalah yang sering ditemukan di seluruh dunia. Obesitas adalah suatu kondisi yang perbandingan berat badan dan tinggi badan melebihi standar yang ditentukan. Menurut *World Health Organization* (WHO), obesitas adalah penimbunan atau akumulasi dari lemak yang dapat mengganggu kesehatan. Sebuah metode untuk memperkirakan obesitas adalah indeks massa tubuh atau *Body Mass Index* (BMI) [berat badan (dalam kilogram) dibagi dengan tinggi badan (dalam meter)²].¹

Prevalensi obesitas telah melonjak tinggi pada sebagian besar negara-negara barat lebih dari 30 tahun terakhir. USA dan Ukraina telah menunjukkan peningkatan besar sejak 1980 an, sedangkan beberapa negara Eropa lainnya menunjukkan peningkatan yang lebih kecil. WHO memperkirakan bahwa sekitar 1.5 milyar dewasa dewasa usia >20 tahun mengalami *overweight* (kegemukan) di seluruh dunia, 200 juta laki-laki serta 300 juta perempuan mengalami obesitas pada tahun 2008. WHO juga memproyeksikan bahwa sekitar 2.3 milyar dewasa yang akan mengalami kegemukan dan lebih dari 700 juta obesitas pada tahun 2019.¹

Di Indonesia, menurut data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), pada tahun 2018, prevalensi obesitas pada orang dewasa (>18 tahun) 21,8 persen. Persentase tersebut mengalami kenaikan, dimana pada Riskesdas tahun 2013, sebesar 14,8 persen, naik 7 persen. Dan pada

Riskesdas tahun 2007, sebesar 10,5 persen, naik 11,3 persen. Jika ditinjau prevalensi obesitas pada orang dewasa (>18 tahun) untuk sebaran wilayah indonesia, sulawesi selatan menempati peringkat ke-16 yaitu sekitar 18%. Ditinjau dari jenis obesitas, obesitas sentral pada umur ≥ 15 tahun sebesar 31 persen pada tahun 2018, naik 65% dari tahun 2007 (18,8%) sedangkan prevalensi obesitas sentral pada umur ≥ 18 tahun untuk sebaran wilayah indonesia sulawesi selatan menempati peringkat ke-19 yaitu sekitar 32%.²

Saluran pencernaan manusia terdiri dari ekosistem mikroorganisme yang beragam, secara kolektif dikenal sebagai mikrobiota usus. Komposisi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti usia, etnis, obat-obatan dan makanan. Mikrobiota usus baru-baru ini telah dikemukakan sebagai faktor lingkungan yang bertanggung jawab untuk kenaikan berat badan dan gangguan metabolisme energi yang menyebabkan penyakit *kardiometabolik* lain seperti aterosklerosis, obesitas dan diabetes melitus *type 2*. Mikrobiota usus mengubah metabolisme dengan meningkatkan ekstraksi energi, modulasi sistem imunologi, dan mempengaruhi metabolisme lipid. Penelitian terbaru lebih difokuskan pada modifikasi mikrobiota usus sebagai strategi dalam pengobatan penyakit kardiovaskuler dan gangguan metabolik.^{3,4,5}

Mikrobiota usus manusia mengandung sekitar 40 triliun mikroorganisme. Sebagian besar mikroorganisme ini adalah bakteri (kira-kira sekitar 500–1.000 spesies bakteri berbeda) meskipun virus, komunitas archaea, jamur, dan protozoa, mempunyai hubungan mutualistik dengan

sel epitel usus besar. Komposisi mikrobiota usus terdiri dari lebih kurang 10^{13} - 10^{14} bakteri dan didapatkan lima Filum bakteri, yaitu *Firmicutes* dan *Actinobacteria* (gram positif). *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* dan *Verrucomicrobia* (gram negatif) yang mendominasi mikrobiota usus manusia.(D'Aversa et al., 2013). Filum bakteri terpadat, yang merupakan lebih dari 90% mikrobiota usus adalah *Bacteriodetes* dan *Firmicutes*. Sisanya terdiri dari banyak spesies di filum lain dengan kelimpahan lebih rendah. (S. Kim & Jazwinski, 2018). Pada beberapa penelitian di hewan coba dan manusia yang mengalami obesitas ditemukan peningkatan Filum *Firmicutes* pada Genus *Clostridium leptum* dan penurunan Filum *Bakteroidetes* pada Genus *Bacteroides Fragilis*. Mikrobiota usus unik untuk setiap individu, berkembang seumur hidup, dan dapat diubah oleh faktor internal dan eksternal (khususnya diet).^{6.7}

Beras merupakan makanan pokok yang dikonsumsi oleh lebih dari setengah populasi dunia. Dalam situasi normal, konsumsi beras tidak dapat digantikan oleh komoditas pangan lain. Pigmen warna yang terletak pada lapisan luar padi atau aleurone dari beras hitam telah dilaporkan mengandung campuran senyawa antosianin yang termasuk dalam kelas flavonoid. Secara khusus, beras hitam (*Oryza Sativa L*) memiliki banyak komponen nutrisi dan bioaktif, seperti antosianin (terutama sianidin-3,5-diglukosida, sianidin-3-O-glukosida, dan petunidin-3-O-glukosida), asam fenolik (terutama asam protocatechuic, 2, asam 5-dihidroksibenzoat, dan asam vanilat), serat makanan (terutama, pati resisten, selulosa, hemiselulosa, dan pektin), dan mineral (terutama Fe, Ca, Zn, K, Cu, dan

Mg) pada lapisan dedak dan embrio dibandingkan dengan nasi putih halus. Ditemukan adanya hubungan antara tingginya kadar antosianin dengan penurunan marker inflamasi dan perubahan mikrobiota intestinal. Antosianin juga diketahui memiliki peranan dalam memperbaiki pelindung intestinal melalui peningkatan ekspresi MUC2 serta menstimulasi produksi peptida antimikroba (DEFP2) pada kondisi obesitas. Beras hitam juga mempunyai kandungan serat pangan (*dietary fiber*) dan hemiselulosa yang lebih tinggi dibandingkan beras putih.^{8,9}

Beras hitam biasanya dikonsumsi dalam bentuk olahan. Namun beberapa hasil penelitian telah mengembangkan minuman isotonik yang terbuat dari ekstrak antosianin. Kemampuan beras berwarna sebagai pangan fungsional berkaitan erat dengan adsorpsi dan bioavailabilitasnya di dalam tubuh. Beberapa Pendekatan farmakologi terhadap obesitas dinilai memiliki efek samping yang berbahaya. Sehingga pendekatan dengan menggunakan bahan pangan lokal seperti beras hitam menjadi alternatif lain untuk penanganan Obesitas.¹⁰

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti melakukan penelitian untuk melihat efek pemberian ekstrak beras hitam terhadap perubahan mikrobiota usus pada subjek remaja obesitas.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah: bagaimana Analisis Mikrobiota Usus pada Subjek

Remaja Obesitas Yang Diberi Konsumsi Ekstrak Beras Hitam (*Oryza Sativa L*).

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui Analisis Mikrobiota Usus pada Subjek Remaja Obesitas yang diberi konsumsi Ekstrak Beras Hitam (*Oryza Sativa L*).

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui kandungan Antosianin Beras Hitam (*Oryza sativa L*).

2. Untuk mengetahui analisis mikrobiota usus Genus *Bifidobacterium*, *Bacteroides Fragilis*, *Lactobacillus*, *Clostridium leptum*, dan *E.Coli* pada Subjek Remaja dengan berat badan ideal yang diberikan placebo melalui pemeriksaan feces.

3. Untuk mengetahui analisis mikrobiota usus Genus *Bifidobacterium*, *Bacteroides Fragilis*, *Lactobacillus*, *Clostridium leptum*, dan *E.Coli* pada Subjek Remaja Obesitas yang diberikan placebo melalui pemeriksaan feces..

4. Untuk mengetahui analisis mikrobiota usus Genus *Bifidobacterium*, *Bacteroides Fragilis*, *Lactobacillus*, *Clostridium leptum*, dan *E.Coli* pada Subjek Remaja obesitas yang diberikan Ekstraksi beras hitam melalui pemeriksaan feces.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Bagi Bidang Akademik

Sumber data ilmiah dan informasi tentang efek pemberian Beras Hitam (*Oryza Sativa L*) terhadap perubahan mikrobiota usus pada subjek Obesitas.

1.4.2. Bagi Masyarakat Umum

Memberi informasi kepada masyarakat tentang Beras Hitam (*Oryza Sativa L*) sebagai kekayaan pangan lokal yang sangat banyak manfaatnya.

1.4.3. Bagi Peneliti

Sebagai kajian awal dalam proses penyelesaian studi, dan referensi untuk melakukan penelitian dan studi selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Obesitas

Kegemukan (obesitas) sering didefinisikan sebagai kondisi abnormal atau kelebihan lemak yang serius dalam jaringan adipose sedemikian sehingga mengganggu kesehatan. Obesitas adalah kelebihan berat badan akibat dari penimbunan lemak tubuh yang berlebih. Banyak faktor penyebab obesitas seperti faktor keturunan, gangguan hormonal, dan faktor psikologi. Seseorang baru disebut obesitas bila berat badannya pada laki-laki melebihi 15% dan pada wanita melebihi 20% dari berat badan ideal. Pada orang yang menderita obesitas, organ-organ dipaksa harus bekerja lebih berat, karena harus membawa kelebihan berat badan yang tidak memberikan manfaat langsung. Karena itu mereka lebih cepat gerah (merasa panas) dan lebih cepat berkeringat untuk menghilangkan kelebihan panas badan tersebut. Penderita obesitas mempunyai kecenderungan untuk lebih mudah membuat kekeliruan dalam bekerja dan cenderung lebih mudah mendapat kecelakaan.¹¹

Berdasarkan penyebaran lemak, obesitas akan membahayakan kesehatan jika kelebihan lemak di dalam tubuh tersebar pada tubuh bagian atas, seperti perut, dada, leher dan muka. Berdasarkan ini maka dapat digolongkan atas kegemukan tipe buah apel (sebahagian besar berupa sel lemak yang besar dan jenuh) dan tipe buah pir (sebahagian besar berupa sel lemak yang kecil dan tidak jenuh).¹¹

2.2 Etiologi Obesitas

Perubahan gaya hidup, yakni dari *traditional life style* berubah menjadi *sedentary life style* yaitu kehidupan dengan aktivitas fisik sangat kurang menyebabkan kejadian *overweight* atau kegemukan yang lama kelamaan akan menjadi obesitas. Faktor penyebab obesitas pada remaja bersifat Multifaktorial. Peningkatan konsumsi makanan cepat saji (*fast food*), rendahnya aktivitas fisik, faktor genetik, pengaruh iklan, faktor psikologis, status sosial ekonomi, program diet, usia, dan jenis kelamin merupakan faktor-faktor yang berkontribusi pada perubahan keseimbangan energi dan berujung pada kejadian obesitas. Ketidakseimbangan energi antara yang dikonsumsi dan dikeluarkan merupakan penyebab utama dibalik kelebihan berat badan dan obesitas. Pola makan dan perilaku sedenter dikatakan telah menyebabkan meningkatnya prevalensi kelebihan berat badan atau kegemukan dan obesitas. Kurangnya aktivitas fisik menyebabkan banyak energi yang tersimpan sebagai lemak, sehingga pada orang-orang yang kurang melakukan aktivitas dengan pola makan konsumsi tinggi cenderung menjadi gemuk.¹²

2.2 Dampak dari Obesitas

Beberapa studi menunjukkan bahwa risiko yang paling rendah untuk penyakit jantung, DM, dan beberapa jenis kanker adalah mereka yang mempunyai nilai IMT 21-25, risiko meningkat sedikit jika nilai IMT 25-27, risiko nyata jika IMT 27-30, risiko sangat menonjol jika IMT >30. Pada umumnya, obesitas dapat memperberat penyakit dengan beberapa cara:¹¹

1. Perubahan metabolisme : Akibat lemak yang meningkat, sel lemak membesar dan menghasilkan sejumlah zat kimia yang meningkatkan risiko untuk mendapat penyakit, seperti DM, hipertensi, batu empedu, dan beberapa jenis kanker.
2. Meningkatnya massa : meningkatnya BB menyebabkan gangguan struktur tubuh yang mengakibatkan kerusakan sel dan penyakit, termasuk osteoarthritis dan sleep apnea.
3. Jenis sel lemak yang berbahaya : lemak yang terdistribusi pada daerah perut dan bahagian atas dari tubuh menyebabkan risiko kesehatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan lemak yang tersebar dalam bentuk buah pir disekitar paha dan panggul.

2.3 Klasifikasi Obesitas

Terdapat dua jenis obesitas berdasarkan distribusi lemak, yaitu obesitas tubuh bagian atas (*Upper body obesity*) dan obesitas tubuh bagian bawah (*lower body obesity*). *Upper body obesity* juga disebut sebagai obesitas sentral, abdominal, atau *male obesity*. *Lower body obesity* juga disebut sebagai obesitas perifer, gluteofemoral, atau *female obesity*. Jenis obesitas ditentukan dengan membagi lingkar pinggang dengan sirkumferensia hip. WHR (*waist hip ratio*) yang lebih dari 1.0 pada laki-laki dan 0.8 pada wanita menunjukkan *upper body obesity*. Penelitian menunjukkan bahwa distribusi lemak kemungkinan merupakan faktor yang lebih penting dalam morbiditas dan mortalitas dibandingkan obesitas itu sendiri. Obesitas sentral selanjutnya dapat dibedakan menjadi lemak intraabdominal atau visceral, dan lemak subkutan. Meskipun, lemak intra

abdomen biasanya sinonim dengan distribusi lemak sentral. Salah satu karakteristik lemak intraabdominal adalah bahwa asam lemak yang dilepaskan dari viseral secara langsung menuju ke hepar sebelum memasuki sirkulasi sistemik, yang berpotensi memengaruhi fungsi hepar. Pada anak - anak, IMT di atas persentil ke-85 umumnya diklasifikasikan sebagai kegemukan, dan IMT di atas persentil ke-95 diklasifikasikan sebagai obesitas.¹¹

Pada orang dewasa, klasifikasi obesitas menurut WHO dalam regional Asia-Pasifik berdasarkan (IMT), adalah sebagai berikut:¹¹

1. Underweight = $< 18,5 \text{ kg/m}^2$
2. Normal = $18,5 - 22,9 \text{ kg/m}^2$
3. Overweight = $23 - 24,9 \text{ kg/m}^2$
4. Obesitas I = $25 - 29,9 \text{ kg/m}^2$
5. Obesitas II = $\geq 30 \text{ kg/m}^2$

Berdasarkan penyebab, obesitas dapat dibedakan menjadi dua yaitu : ¹¹

1. Obesitas primer, yang disebabkan karena asupan gizi yang terlalu berlebihan. Biasanya pada orang yang sulit mengatur konsumsi makanan,. Dan, Obesitas sekunder yang tidak dihubungkan dengan konsumsi makanan.

- 2.Obesiitas sekunder merupakan obesitas yang disebabkan oleh karena suatu kelainan atau penyakit seperti hipotiroid, hipogonadisme, hiperkortisolisme, dll.

2.4 Mikrobiota usus

2.4.1 Definisi

Mikrobiota usus adalah semua mikroorganisme atau mikroba yang bisa ditemukan di usus. Mikroba yang ada di dalam usus terdiri dari bakteri, jamur, parasit, hingga virus. Sejumlah mikroba usus bisa hidup saling menguntungkan (simbiosis mutualisme) dengan manusia, tapi ada juga yang bersifat patogenik atau bisa menyebabkan penyakit. Dalam tubuh yang sehat terdapat Mikrobiota yang bersifat sebagai probiotik dan pathogen. Mereka bisa hidup berdampingan tanpa menimbulkan masalah kesehatan. Akan tetapi, ada kondisi yang menyebabkan jumlah mikrobiota usus tidak seimbang (disbiosis) dan dapat menyebabkan penyakit autoimun, obesitas, dan kondisi kardiometabolik pada usia lanjut.¹³

2.4.2 Peran mikrobiota usus

Bakteri yang hidup di dalam tubuh manusia merupakan koloni bakteri yang bermanfaat. Peran mikrobiota adalah membantu mencerna makanan, mengatur sistem imun, dan perlindungan terhadap bakteri pathogen. Mikrobioma berada di kulit, sistem gastrointestinal, saluran napas, dan saluran urogenital; saluran yang berhubungan langsung dengan dunia luar sehingga dapat terpajan langsung oleh faktor eksternal, seperti makanan, udara, dan obat-obatan. Setiap individu memiliki respons berbeda pada metabolisme mikrobioma.¹⁴

Tanpa mikrobiota usus, tubuh manusia tidak akan mampu memanfaatkan beberapa karbohidrat yang belum tercerna untuk

mengonsumsi, karena beberapa jenis mikrobiota usus memiliki enzim dimana sel-sel manusia tidak mampu untuk memecahkannya khususnya polisakarida. Bakteri mengubah karbohidrat dengan cara berfermentasi menjadi asam lemak rantai pendek (SCFAs) disebut fermentasi sakarolitik. Produknya meliputi asam asetat, asam propionat, dan asam butirat. Produk ini dapat digunakan oleh sel inang, menyediakan sumber utama energi dan nutrisi bagi manusia, serta membantu tubuh menyerap mineral penting seperti kalsium, magnesium, dan zat besi. Gas dan asam organik (seperti asam laktat) juga diproduksi oleh fermentasi sakarolitik. Asam asetat digunakan oleh otot, asam propionat membantu hati menghasilkan ATP, dan asam butirat memberikan energi untuk sel usus dan dapat mencegah kanker. Bukti lain yang menunjukkan bahwa bakteri meningkatkan penyerapan dan penyimpanan lipid kemudian memfasilitasi tubuh untuk menyerap vitamin yang diperlukan seperti vitamin K.¹⁴

Mikrobiota juga mensintesis vitamin (seperti biotin dan folat) dan membantu penyerapan unsur makanan (termasuk magnesium, kalsium dan zat besi). Archae seperti *Methanobrevibacter smithii* terlibat dalam pemindahan produk akhir fermentasi bakteri seperti hidrogen. Disfungsi mikrobioma dapat menimbulkan penyakit seperti penyakit autoimun (diabetes, rheumatoid arthritis, distrofi otot, multiple sclerosis, dan fibromialgia). Akumulasi mikroba penyebab penyakit akan menyebabkan perubahan aktivitas gen dan metabolik. Akibat perubahan tersebut adalah abnormalitas sistem imun, sehingga akan menyerang zat dan jaringan yang pada keadaan normal terdapat di dalam tubuh.¹⁴

2.4.3 Mikrobiota Usus Pada Orang Normal

Populasi mikroorganisme membawa seperangkat genom yang luas, beragam, dan dapat dimodifikasi yang telah terbukti mempengaruhi kesehatan dan penyakit manusia. Genom organisme ini terdiri dari metagenom, kumpulan elemen genetik yang sangat serbaguna yang sekarang berfungsi sebagai target untuk penelitian medis.¹⁵

Manusia dewasa yang sehat masing-masing biasanya menyimpan lebih dari 1000 species milik phyla bakteri yang relative lebih sedikit diketahui dengan *Bacteroidetes* dan *Firmicutes* menjadi phyla dominan (98%) diikuti oleh *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, dan *Verrucomicrobia*. Secara kuantitatif, esofagus dan lambung memiliki jumlah bakteri terendah dan bakteri budidaya yang dominan adalah anaerob fakultatif yang berasal dari rongga mulut (misalnya, *Streptococci* dan *Lactobacilli*). Beban bakteri meningkat secara progresif di sepanjang saluran usus saat potensi redoks turun. Selain itu, genus *Streptococcus* adalah yang paling banyak di wakili di antara mikrobiota jejunum. Namun, populasi bakteri yang jauh lebih tinggi (10^8 - 10^9 /g feses) menggambarkan secara khusus area ileocecal. Faktanya, usus halus diperkaya oleh subkelompok bakteri *Bacillus* (filum *Firmicutes*, terutama *Streptococcaceae*, sesuai dengan 23% dari genom urutan diidentifikasi dibandingkan dengan 5% di usus besar). Selain itu, hingga 8% dari urutan genom milik anggota filum *Actinobacteria* dan, khususnya ke subkelompok *Actinomycinaeae* dan *Corynebacteriaceae*. Di usus halus, persentase kecil *Bacteroidetes* dan *Lachnospiraceae* telah diidentifikasi vs. konsentrasinya di usus besar.

Jumlah bakteri terbesar dan Keragaman mikroba terluas (10¹¹-10¹² / mL isi luminal) di usus manusia telah diamati dibagian distal ileum dan usus besar. Porsi terbesar disusun oleh anaerobik ketat, seringkali tidak membentuk spora, terutama Gram-positif (*Bacteroides* dan *Clostridium*). Kemudian fakultatif anaerob seperti *Lactobacillus*, *Enterococcus* dan *Enterobacteriaceae*. Jauh lebih tinggi konsentrasi bakteri ini disebabkan motilitas yang lebih lambat yang ditandai dengan kontraksi anti-peristaltik memungkinkan retensi kolon untuk waktu yang lama. Selain itu, pH usus disangga melalui sekresi bikarbonat yang membuat lingkungan lebih mendukung kolonisasi bakteri.¹⁴

Terdapat 2172 spesies mikrobiota usus yang terisolasi dari manusia, diklasifikasikan menjadi 12 Filum yang berbeda, di mana 93,5% di antaranya milik Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria dan Bacteroidetes. Tiga dari 12 Filum yang diidentifikasi hanya mengandung satu spesies yang terisolasi dari manusia, termasuk spesies usus, *Akkermansia muciniphila*, satu-satunya perwakilan yang diketahui dari phyla Verrucomicrobia. Pada manusia, 386 spesies yang diidentifikasi secara ketat anaerobik dan ditemukan di daerah mukosa seperti rongga mulut dan saluran GI.¹⁶

Mikrobiota usus tidak beragam seperti komunitas mikroba dari beberapa bagian tubuh lainnya dan mengungkapkan tingkat redundansi fungsional yang tinggi. Luas dari kapasitas fungsional mikrobiota usus manusia baru-baru ini diperoleh, di mana diidentifikasi melalui kombinasi 249 sampel yang baru diurutkan. Studi ini mengidentifikasi adanya

species identik mikroba khusus berdasarkan negara, menunjukkan bahwa komposisi mikrobiota usus dibentuk oleh faktor lingkungan, seperti diet, dan mungkin juga oleh genetika inang. Namun, perlu juga dicatat bahwa mikrobiota yang berbeda dalam hal komposisi dapat berbagi beberapa tingkat redundansi fungsional, menghasilkan protein atau profil metabolit serupa. Informasi ini sangat penting untuk mengembangkan strategi terapeutik untuk memodifikasi dan membentuk komunitas mikroba dalam penyakit.¹⁶

Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus
<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
				<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Xylanibacter</i>
				<i>Clostridiaceae</i>	<i>Rikenella</i>
				<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>
				<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Faecalibacterium</i>
					<i>Ruminococcus</i>
				<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
		<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Fusibacter</i>
				<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>
				<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>
				<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Roseburia</i>
				<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
				<i>Lysteriaceae</i>	<i>Lysteria</i>
				<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
				<i>Pasteuriaceae</i>	<i>Pasteuria</i>
			<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
				<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>
				<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
				<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>		<i>Gardnerella</i>
					<i>Actinomices</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i>
			<i>Desulfobacteriales</i>	<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Escherichia</i>
		<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>
					<i>Klebsiella</i>
		<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Campylobacteriales</i>		<i>Proteus</i>
				<i>Campylobacteriaceae</i>	<i>Campylobacter</i>
				<i>Helicobacteriaceae</i>	<i>Helicobacter</i>
				<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>
				<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
				<i>Synergistaceae</i>	<i>Synergistes</i>
				<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Spirochaeta</i>
					<i>Treponema</i>
	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriales</i>		
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>		
	<i>Synergistetes</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>		
	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetales</i>		
<i>Archaea</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>			
	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobrevibacter</i>
					<i>Methanobacterium</i>
					<i>Methanosphera</i>

Gambar 1. Bakteri utama dan Archaea dalam Mikrobiota Usus manusia.¹⁴

2.4.4 Mikrobiota Usus Pada Obesitas

Mikrobiota usus telah diakui sebagai faktor penting dalam perkembangan metabolisme penyakit seperti obesitas dan dianggap sebagai organ endokrin yang terlibat dalam pemeliharaan homeostasis energi dan imunitas pejamu. Disbiosis dapat mengubah fungsi usus penghalang dan jaringan limfoid terkait usus (GALT) dengan memungkinkan lewatnya struktur komponen bakteri, seperti lipopolisakarida (LPS), yang mengaktifkan jalur inflamasi yang dapat berkontribusi pada pengembangan resistensi insulin. Selanjutnya, dysbiosis usus dapat mengubah produksi peptida gastrointestinal yang terkait dengan rasa kenyang, menghasilkan peningkatan makanan pemasukan. Pada obesitas, dysbiosis ini tampaknya terkait dengan peningkatan filum Firmicutes, genus *Clostridium*, dan spesies *Eubacterium rectale*, *Clostridium coccoides*, *Lactobacillus reuteri*, *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium histolyticum*, dan *Staphylococcus aureus*.¹⁷

Mikrobiota penderita obesitas mengandung lebih rendah proporsi *Bacteroides* dan proporsi yang lebih tinggi *Firmicutes* dibandingkan dengan orang tanpa obesitas. Perbedaan terkait obesitas juga telah diidentifikasi dalam kandungan mikroba seperti sebagai *Clostridium innocuum*, *Eubacterium dolichum*, *Catenibacterium mitsuokai*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, dan *Actinobacteria*, dan dalam jumlah *Archaea* yang lebih langka organisme seperti *Methanobrevibacter smithii*.¹⁸

Diet tinggi lemak secara konsisten baik pada hewan coba maupun manusia, menyebabkan perubahan komposisi mikrobiota usus. Rasio Firmicutes dan Bacteroidetes berubah, ditandai dengan peningkatan jumlah Firmicutes (bakteri gram positif) dan penurunan jumlah Bacteroidetes (bakteri gram negatif). Selain itu, pada tingkat genus, terdapat penurunan jumlah *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* yang berperan pada pertahanan barier mukosa usus, serta terdapat penurunan jumlah *Eubacterium rectale*, yang merupakan bakteri penghasil butirat dan berperan mencetus mediator antiinflamasi pada saluran cerna.¹⁹

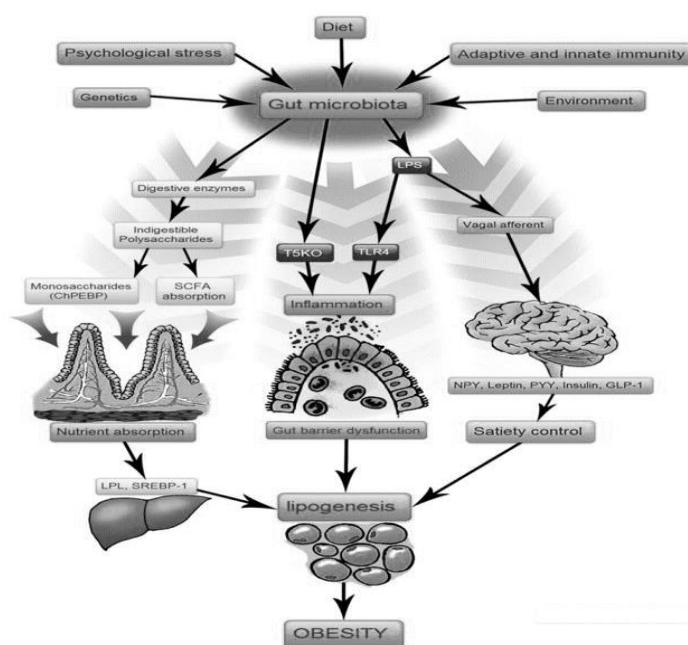
Subjek obesitas menunjukkan penurunan proporsi Bacteroidetes dan tingkat Firmicutes yang lebih tinggi. Dan setelah diberikan intervensi diet maka proporsi Bacteroidetes meningkat sedangkan Firmicutes menurun. Hal tersebut juga dapat terjadi pada *Lactobacillus* atau *Bifidobacterium* pada kondisi Obesitas mengalami dimana penurunan.¹⁴

2.4.5 Peran mikrobiota usus terhadap perkembangan obesitas

Mekanisme pasti peran mikrobiota usus terhadap perkembangan obesitas masih belum jelas. Walaupun ada beberapa mekanisme utama peran mikrobiota terhadap perkembangan obesitas.

Pertama, mikrobiota usus merupakan organ metabolik yang dapat memfermentasi karbohidrat yang tidak bisa dicerna (*non-digestible carbohydrates*) untuk menghasilkan Short Chain Fatty Acids (SCFA), yang mengatur penyimpanan lemak (lipogenesis) melalui *Carbohydrate*

Response Element Binding Protein (ChREBP) dan *Sterol Response Element Binding Protein 1* (SREBP1) serta melalui penekanan *fasting induced adipocyte factor* atau *Angiopoietin-Like Protein 4* (Fiaf/ANGPTL4) sebagai penghambat lipoprotein lipase LPL yang mengakibatkan penumpukan lemak di jaringan perifer. Fiaf diproduksi oleh *white dan brown adipose tissue* serta usus halus yang menghambat lipoprotein lipase (LPL) yang mengakibatkan penurunan oksidasi asam lemak di jaringan adiposa dan jaringan otot.³



Gambar 2. Mekanisme *mikrobiota* usus mengendalikan obesitas. *Mikrobiota* dapat mempengaruhi jalur metabolik dengan memodulasi energi *harvesting*, inflamasi dan kontrol rasa kenyang.³

Kedua, metabolit mikroba dapat menginduksi modifikasi epigenetik (yaitu, perubahan metilasi DNA dan ekspresi micro-RNA), dengan implikasi potensial untuk status kesehatan dan kerentanan terhadap obesitas. Selain itu, produk mikroba, seperti asam lemak rantai pendek

atau protein membran, dapat memengaruhi metabolisme tubuh dengan mengatur nafsu makan, lipogenesis, glukoneogenesis, peradangan, dan fungsi lainnya. Pendekatan metabolomik digunakan untuk mengidentifikasi postbiotik baru dengan aktivitas biologis dalam inang, memungkinkan penemuan target dan alat baru untuk digabungkan ke dalam terapi yang dipersonalisasi. Ulasan ini merangkum pemahaman saat ini tentang hubungan antara mikrobiota usus manusia dan permulaan dan perkembangan obesitas. Wawasan ilmiah ini membuka jalan untuk memahami hubungan kompleks antara obesitas dan mikrobiota. Di antara pendekatan baru, prebiotik, probiotik, postbiotik, dan transplantasi mikrobioma tinja dapat berguna untuk memulihkan disbiosis usus. Produk mikroba, seperti asam lemak rantai pendek atau protein membran, dapat memengaruhi metabolisme tubuh dengan mengatur nafsu makan, lipogenesis, glukoneogenesis, dan peradangan.²⁰

Ketiga, diet tinggi lemak menyebabkan rusaknya protein *tight-junction* yaitu Zonula Occludens-1 (ZO-1) dan Occludin, yang terlibat dalam mekanisme pertahanan usus. Selain itu, meningkatkan ekspresi enokanabiod system dan reseptornya, sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas usus. Konsumsi diet tinggi lemak, juga menyebabkan penurunan fungsi enzim *Intestinal alkaline phosphatase* (IAP), yang berfungsi dalam detoksifikasi LPS dari dinding bakteri. Beberapa hal tersebut menyebabkan infiltrasi LPS bakteri gram positif (dari filum Firmicutes) dan mencetus terjadinya endotoksemia metabolik

dan menyebabkan sistemik *low grade inflammation* dan penurunan sensitivitas insulin pada hati, otot, dan jaringan adiposa, yang berakhir dengan resistensi insulin.¹⁹

Keempat, Mekanisme lain yang menyebabkan terjadinya resistensi insulin akibat perubahan mikrobiota usus dapat disebabkan oleh perubahan pada sistem imun. Lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri gram negatif, yang jumlahnya meningkat pada diet tinggi lemak, menyebabkan aktivasi pada *innate immune system*, yang dikenali oleh *Toll-like receptor*. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa aktivasi TLR akibat gangguan keseimbangan mikrobiota usus, mengaktifkan mediator inflamasi, dan menyebabkan sindrom metabolik.¹⁹

Beberapa mekanisme tersebut menunjukkan bahwa perubahan metabolik dapat dipengaruhi oleh perubahan komposisi mikrobiota usus, sehingga modulasi mikrobiota usus dapat menjadi alternatif baru dapat mengurangi gangguan metabolik yang terjadi, salah satunya dengan pemberian prebiotik.

2.5 Beras Hitam

Beras hitam merupakan varietas lokal yang mengandung pigmen yang paling baik dibandingkan beras putih atau beras warna yang lain. Beras hitam merupakan salah satu jenis beras yang mulai populer di masyarakat dan dikonsumsi sebagai pangan fungsional karena bermanfaat bagi kesehatan. Beras hitam merupakan varietas padi yang mengandung pigmen antosianin paling tinggi dibandingkan dengan jenis

padi yang lain. Kandungan antosianin dalam produk beras hitam sekitar 200 – 400 mg/100g, sementara beras merah hanya 0,33-1,39 mg/100g dan ketan hitam sekitar 109,52 - 256,61 mg/100g. Beras hitam lokal memiliki sebutan yang beragam tergantung daerah asalnya. Di provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta dikenal dengan nama Cempo Ireng dan beras Jliteng, sedangkan di Bantul dikenal beras Melik. Perbedaan nama beras hitam tersebut diduga disebabkan oleh keragaman warna berasnya, dari hitam cerah sampai hitam pekat. Perbedaan warna beras hitam terjadi sebagai akibat adanya perbedaan kandungan antosianinnya. Kedudukan taksonomi beras hitam menurut Tjitrosoepomo (2005) dan penampakan beras hitam dapat dilihat sebagai berikut ; ²¹

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Monocotyledoneae
Bangsa : Poales (Glumiflorae)
Family : Poaceae (Graminea)
Marga : *Oryza*
Spesies : *Oryza sativa* L.

Kandungan antosianin dalam beras hitam terdapat dalam perikarp, aleuron, dan endosperm yang berwarna merah, biru, dan ungu pekat sehingga terlihat sebagai warna hitam (Purwanto, 2010). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak antosianin dari beras hitam memiliki aktivitas antioksidan yang hampir sama dengan aktivitas

antioksidan sintetis seperti pada *Butylated Hydroxy Toluene* (BHT). Degradasi antosianin dapat terjadi selama proses ekstraksi, pengolahan makanan, dan penyimpanan. Faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas antosianin yaitu adanya modifikasi pada struktur spesifik antosianin (glikosilasi, asilasi dengan asam alifatik atau aromatik), pH, temperatur, cahaya, keberadaan ion logam, oksigen, kadar gula, enzim, dan pengaruh sulfur dioksida (Anon., 2013). Antosianin di dalam larutan berada dalam lima bentuk kesetimbangan tergantung pada kondisi pH. Kelima bentuk tersebut yaitu kation flavilium, basa karbinol, kalkon, basa quinonoidal dan quinonoidal anionik. Pada pH sangat asam (pH 1-2) bentuk dominan antosianin adalah kation flavilium. Pada bentuk ini, antosianin berada dalam kondisi paling stabil dan paling berwarna. Ketika pH meningkat menjadi di atas 4 terbentuk senyawa antosianin berwarna kuning, senyawa berwarna biru, atau senyawa yang tidak berwarna. Temperatur juga dapat menggeser kesetimbangan antosianin. (Anon., 2013).²²

Anthocyanin dapat memberikan proteksi sel endotel terhadap stres oksidatif dan inflamasi akibat LPS dengan menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi. Selain itu, penelitian lain melaporkan bahwa senyawa ini memiliki potensi dalam menstimulasi kolonisasi bakteri intestinal yang bermanfaat bagi kesehatan intestinal. Ditemukan adanya hubungan antara tingginya kadar antosianin dengan penurunan marker inflamasi dan perubahan mikrobiota intestinal. Antosianin juga diketahui memiliki peranan dalam memperbaiki pelindung intestinal melalui peningkatan ekspresi MUC2 serta menstimulasi produksi peptida antimikroba (DEFP2)

pada kondisi obesitas. Beras hitam juga mempunyai kandungan serat pangan (*dietary fiber*) dan hemiselulosa yang lebih tinggi dibandingkan beras putih. Kandungan serat pangan dan hemiselulosa beras hitam masing-masing sebesar 7,5% dan 5,8%, sementara beras putih mengandung 5,4% serat pangan dan 2,2% hemiselulosa (Sa'adah *et al.*, 2013). Selain itu, beras hitam memiliki kandungan zat besi tiga kali lipat lebih banyak, serta asam amino, kalium, kalsium, magnesium, dan flavonoid lima kali lebih banyak dibandingkan dengan beras putih. Kandungan kalori beras hitam lebih rendah dibandingkan dengan beras lain yaitu hanya 362 kkal per 100 gram (Kereh *et al.*, 2016).²³

Sejumlah senyawa fenolik telah teridentifikasi dalam beras. Padi dengan warna *pericarp* coklat muda mengandung fenol dengan berat molekul rendah (kira-kira 85%), sementara padi dengan *pericarp* berwarna merah atau hitam mengandung senyawa fenolik dengan berat molekul lebih tinggi. Padi dengan *pericarp* berwarna merah dan hitam mengandung senyawa fenolik utama yaitu antosianin sianidin-3-O- β -D-glukosida dan peonidin-3-O- β -D-glukosida. Senyawa lain yang teridentifikasi yaitu antosianin pelargonidin-3,5-diglukosida dan sianidin-3,5-diglukosida dan asam fenolik seperti ferulik, caffeik dan asam protokatekuik. Sesuai dengan laporan penelitian, sifat utama yang menentukan tipe dari senyawa fenolik pada padi yaitu warna *pericarp* bukan subspeciesnya apakah *indica* atau *japonica*. Warna *pericarp* juga dihubungkan dengan konsentrasi senyawa fenolik dalam padi dan biasanya konsentrasi tertinggi ada pada padi dengan warna *pericarpanya*

merah dan hitam. Selain warna padi kandungan total senyawa fenolik bervariasi di antara genotipe dengan warna *pericarp* yang berbeda, juga dipengaruhi cara pengolahan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa distribusi senyawa fenolik berubah sepanjang penyimpanan. Mengamati berkurangnya kandungan ikatan fenolik selama penyimpanan, pengurangan ini lebih tinggi pada suhu 37^o C dibandingkan pada suhu 4^oC.⁸

Prebiotik adalah nondigestible food ingredient yang mempunyai pengaruh baik terhadap host dengan memicu aktivitas, pertumbuhan yang selektif, atau keduanya terhadap satu jenis atau lebih bakteri penghuni kolon. Prebiotik pada umumnya adalah karbohidrat yang tidak dapat dicerna oleh tubuh dan tidak dapat diserap yang pada umumnya dalam bentuk Fruktooligosakarida (FOS) dan Galaktooligosakarida (GOS), laktosa, dan serat pangan Beras hitam adalah salah satu bahan makanan yang memiliki kemampuan sebagai prebiotik berdasarkan kandungan karbohidrat dan seratnya.⁹

Tabel 1. Perbandingan Komposisi Beras Hitam dan Beras Putih per 100 gr Bahan

Komposisi	Beras hitam	Beras Putih
Protein, <i>g</i>	13.90	12.20
Lemak, <i>g</i>	13.20	14.10
Karbohidrat, <i>g</i>	47.36	50.95
Air, <i>g</i>	9.80	7.96
Serat, <i>g</i>	8.32	7.04
Mineral, <i>mg</i>	7420	7750
Fosfor	1694.10	1542.50
Kalsium	60.20	45.30
Kalium	673.70	624.60
Magnesium	79.40	80.40
Natrium	2.11	4.35
Besi	16.46	6.30
Seng	8.96	4.92
Tembaga	1.49	0.91
Selenium	0.15	0.06
Vitamins, <i>mg</i>		
Thiamin	2.30	1.20
Riboflavin	0.40	0.14
VitaminE	0.60	0.30
Niacin	21.00	13.00
Flavonoids, <i>g</i>	6.40	1.17

(Sumber; Ling, *et al.*, 2002)

2.5.1 Efek beras hitam terhadap profil Mikrobiota Usus

Beras hitam biasanya dikonsumsi dalam bentuk olahan. Namun beberapa hasil penelitian telah mengembangkan minuman isotonik yang terbuat dari ekstrak antosianin. Antosianin mempunyai efek yang menguntungkan bagi tubuh, seperti perlindungan terhadap penyakit kardiovaskuler, diabetes melitus, anti inflamasi, anti kanker dan antioksidan. Kemampuan beras berwarna sebagai pangan fungsional berkaitan erat dengan adsorpsi dan bioavailabilitasnya di dalam tubuh.¹⁰

Kelompok pigmen ini (antosianin) diabsorpsi oleh tubuh dengan jumlah yang sangat sedikit daripada jenis flavonoid yang lain. Reaksi hidrolisis diduga merupakan langkah awal dari jalur degradasi antosianin atau pembentukan metabolit lain. Studi secara *in vitro* menunjukkan

bahwa deglikosidasi antosianin monoglukosida dan diglukosida oleh mikrobiota intestin terjadi 20 menit setelah konsumsi hingga 2 jam, tergantung pada struktur kimianya.¹⁰

Tingginya asupan antosianin memiliki keterkaitan dengan berkurangnya kecenderungan peningkatan berat badan pada masa dewasa. Konsumsi makanan yang mengandung antosianin yang tinggi juga berhubungan dengan adipose visceral yang rendah, dan diversitas mikrobiota yang lebih besar. Dilaporkan bahwa aktivitas biologis antosianin disebabkan oleh metabolitnya yang berasal dari mikroba dan menetap dalam sirkulasi dalam waktu lebih lama dan dalam konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan antosianin sendiri. Metabolit ini memiliki aktivitas anti inflamasi yang lebih besar dibandingkan dengan metabolit yang diabsorpsi di usus halus. Penelitian Jennings et al (2019) menunjukkan bahwa bakteri penghasil butyrate merupakan kemungkinan mekanisme yang mendasari asosiasi antara asupan makanan kaya antosianin dengan jaringan adipose yang lebih rendah. Selain itu, dilaporkan bahwa konsumsi 70.7 mg anthocyanin setiap harinya selama 8 minggu menginduksi perubahan komposisi bakteri family *Lachnospiraceae* dan *Ruminococaceae*. Bakteri ini merupakan jenis bakteri penghasil butyrate. Butyrate berperan dalam proteksi terhadap obesitas melalui peningkatan fungsi pelindung intestinal, sehingga menginhibisi masuknya molekul proinflamasi ke dalam sirkulasi sistemik dan mencegah timbulnya endotoksemia metabolik.²⁴

Kandungan antosianin juga secara spesifik meningkatkan populasi mikrobiota *Bifidobacterium spp.* dan *Lactobacillus-Enterococcus spp.* Penelitian yang dilakukan oleh Flores et al. menunjukkan bahwa kadar antosianin 20 mg/L tidak cukup signifikan dalam menyebabkan perubahan pada profil mikrobiota. Efek proliferasi dan inhibisi terhadap populasi mikrobiota dapat diamati pada pemberian antosianin dengan kadar yang lebih tinggi yaitu 200 mg/L. Mekanisme lain yang kemungkinan mendasari peran antosianin terhadap profil mikrobiota adalah bahwa antosianin dapat mengurangi *oxygen tension* pada lumen usus, sehingga meningkatkan proliferasi populasi bakteri yang sensitive oksigen.²⁴

2.5.2 Efek beras hitam pada obesitas

Beras hitam merupakan pangan dengan banyak fungsi tambahan sehingga dapat dijadikan pangan fungsional berkaitan erat dengan adsorpsi dan bioavailabilitasnya di dalam tubuh. Tingginya asupan antosianin dalam beras hitam memiliki keterkaitan dengan berkurangnya kecenderungan peningkatan berat badan pada masa remaja ke dewasa.²³

Pada Obesitas dapat didahului dengan terjadinya reaksi oksidasi yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi radikal bebas stress oksidatif di dalam tubuh manusia hingga merusak sel dan menyebabkan keadaan seperti hiperglikemik, hiperlipidemia, chronic low grade inflammation hiperleptinemia, peningkatan aktifitas otot, dan disfungsi endotelial. Semua keadaan ini dapat menyebabkan obesitas.²⁵

Penderita obesitas biasanya memiliki pertahanan antioksidan yang lebih rendah dari orang yang memiliki berat badan normal. Stres oksidatif merupakan keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan jumlah oksidan (radikal bebas) dengan jumlah antioksidan dalam tubuh sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan beruntun yang dimulai dari sel hingga tingkatan yang lebih tinggi. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan sel dan merupakan dasar patogenesis bagi proses penyakit kronik seperti kardiovaskuler, autoimun, pulmoner, gangguan metabolik dan Aging (penuaan) (Halliwell dan Gutteridge, 2007). Radikal bebas adalah suatu gugus molekul atom atau ion yang mempunyai satu elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif yang memiliki kecenderungan untuk menangkap elektron dari molekul lain (oksidasi) (Rimbach et al., 1999). Beberapa radikal bebas dalam tubuh merupakan derivat nitrogen yang disebut reactive nitrogen species (RNS) dan derivat oksigen yang disebut reactive oxygen species (ROS). ROS bisa terdapat dalam bentuk O_2 , radikal hidroksil (OH), asam hipoklorit (HOCL), radikal alkoksil dan radikal peroksil. ROS dapat merusak sel dengan merusak membran lipid melalui serangkaian reaksi kimia yang disebut peroksidasi lipid. Hal ini terjadi karena membran sel mengandung asam lemak tak jenuh ganda (Polyunsaturated Fatty Acid $\pm$ PUFA) dalam jumlah tinggi. Peroksidasi membran lipid akan menyebabkan perubahan pada sel, seperti peningkatan permeabilitas membran, penurunan transport kalsium dalam retikulum sarkoplasma, gangguan fungsi mitokondria (Halliwell and Gutteridge, 2007).²⁵

Tubuh manusia dapat menetralkan radikal bebas bila jumlahnya tidak berlebihan, dengan mekanisme pertahanan antioksidan endogen. Bila antioksidan endogen tidak mencukupi, tubuh membutuhkan antioksidan dari luar. Berbagai pangan lokal dapat digunakan dengan kandungan tinggi antioksidan seperti beras hitam yang mengandung pigmen antosianin dalam jumlah yang tinggi. Dilaporkan pada penelitian bahwa senyawa ini memiliki potensi dalam menstimulasi kolonisasi bakteri intestinal yang bermanfaat bagi kesehatan intestinal. Ditemukan adanya hubungan antara tingginya kadar antosianin dengan penurunan marker inflamasi karena radikal bebas dan perubahan mikrobiota intestinal terutama hubungannya dengan Obesitas.²⁶

2.5.3 Efek beras hitam terhadap mikrobiota usus pada obesitas

Mikrobiota usus baru-baru ini telah dikemukakan sebagai faktor lingkungan yang bertanggung jawab untuk kenaikan berat badan dan gangguan metabolisme energi yang menyebabkan penyakit kardiometaabolik lain seperti aterosklerosis, obesitas dan diabetes melitus type 2.³

Perubahan komposisi mikroba usus manusia dikemukakan menjadi penyebab lain kejadian obesitas. Komposisi mikrobiota usus terdiri dari lebih kurang 10^{13} - 10^{14} bakteri dan kebanyakan termasuk dalam filum Firmicutes dan Bacteroidetes. Mikrobiota usus unik untuk setiap individu, berkembang seumur hidup, dan dapat diubah oleh faktor internal dan eksternal (khususnya diet). Komposisi mikrobiota usus dalam diri individu dipengaruhi oleh faktor internal seperti genotipe dan usia dan serta faktor

eksternal seperti pola makan, prebiotik dan antibiotik. Gangguan keseimbangan mikrobiota usus sering dihubungkan dengan proses inflamasi dan gangguan metabolik seperti (*inflammatory bowel diseases*, *irritable bowel syndrome* dan obesitas).³

Kandungan antosianin dalam beras hitam terdapat dalam perikarp, aleuron, dan endosperm yang berwarna merah, biru, dan ungu pekat sehingga terlihat sebagai warna hitam (Purwanto, 2010). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak antosianin dari beras hitam memiliki aktivitas antioksidan yang hampir sama dengan aktivitas antioksidan sintetik seperti pada *Butylated Hydroxy Toluene* (BHT). antosianin dapat memberikan proteksi sel endotel terhadap stres oksidatif dan inflamasi akibat LPS dengan menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi. Selain itu, penelitian lain melaporkan bahwa senyawa ini memiliki potensi dalam menstimulasi kolonisasi bakteri intestinal yang bermanfaat bagi kesehatan intestinal. Ditemukan adanya hubungan antara tingginya kadar antosianin dengan penurunan marker inflamasi dan perubahan mikrobiota intestinal. Antosianin juga diketahui memiliki peranan dalam memperbaiki pelindung intestinal melalui peningkatan ekspresi MUC2 serta menstimulasi produksi peptida antimikroba (DEFP2) pada kondisi obesitas.²⁷

Penelitian Jennings et al (2020) menunjukkan konsumsi 70.7 mg anthocyanin setiap harinya selama 8 minggu menginduksi perubahan komposisi bakteri. Dimana dihasilkan family *Lachnospiraceae* dan *Ruminococaceae* dengan jumlah yang banyak, dan *Clostridium* dengan

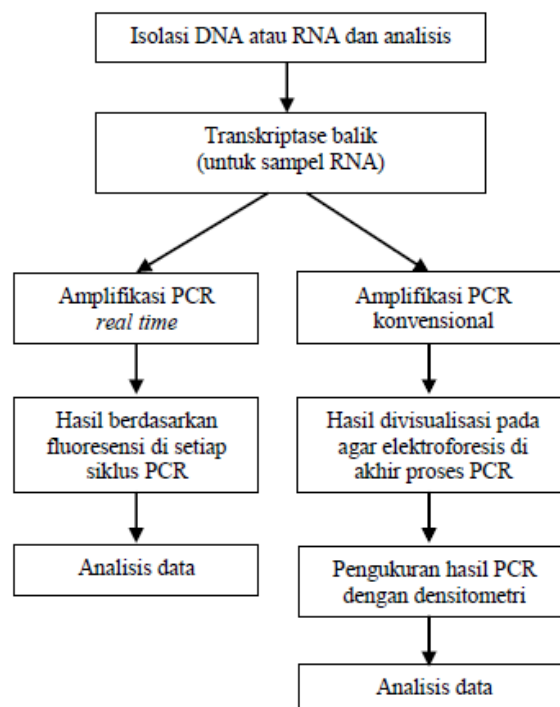
jumlah yang sedikit. *Lachnospiraceae* dan *Ruminococaceae* merupakan jenis bakteri penghasil butyrate. Dimana Butyrate berperan dalam proteksi terhadap obesitas melalui peningkatan fungsi pelindung intestinal, sehingga menginhibisi masuknya molekul proinflamasi ke dalam sirkulasi sistemik dan mencegah timbulnya endotoksemia metabolik.

2.6 Teknik Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Polymerase Chain Reaction adalah teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA. Teknik ini menggunakan metode enzimatik yang diperantarai primer. Prinsip dasar PCR adalah sekuen DNA spesifik diamplifikasi menjadi dua kopi selanjutnya menjadi empat kopi dan seterusnya. Pelipat gandaan ini membutuhkan enzim spesifik yang dikenal dengan polimerase. Polimerase adalah enzim yang mampu menggabungkan DNA cetakan tunggal, membentuk untaian molekul DNA yang panjang. Enzim ini membutuhkan primer serta DNA cetakan seperti nukleotida yang terdiri dari empat basa yaitu *Adenine* (A), *Thymine* (T), *Cytosine* (C) dan *Guanine* (G) (Gibbs 1990). Reaksi amplifikasi ini dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan yang berantai ganda menjadi rantai tunggal, kemudian suhu diturunkan sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada DNA cetakan yang berantai tunggal. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya sebagai cetakan bagi reaksi polimerase

berikutnya (Yuwono 2006).²⁸

Metode PCR dibedakan menjadi dua yaitu PCR konvensional dan *real time*. Analisis hasil amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan visualisasi di agar elektroforesis. Sedangkan PCR *real time*, jumlah DNA yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur di setiap siklus proses PCR. Perbandingan prosedur antara PCR konvensional dan PCR *real time* secara singkat dapat dilihat pada gambar berikut.



Sumber: Adaptasi dari Fraga et al. (2008)

Gambar 3. Perbandingan prosedur PCR konvensional dan *real time*

Selama beberapa tahun terakhir, pengujian PCR *real time* yang berdasarkan fluoresensi menjadi suatu metode pengujian yang sering digunakan untuk deteksi RNA, DNA dan *cDNA*. Teknik ini sangat sensitif yang memungkinkan amplifikasi terjadi secara bersama-sama serta

kuantitas sekuens asam nukleat dapat diketahui. Disamping memiliki sensitivitas lebih tinggi, kelebihan pengujian PCR *real time* jika dibandingkan dengan PCR konvensional adalah lebih dinamis, risiko kontaminasi silang lebih sedikit, kemampuan aplikasi penggunaannya untuk pengujian lebih banyak (Black et al. 2002). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *real time* tepat untuk berbagai aplikasi seperti analisis ekspresi gen, penentuan jumlah virus, deteksi organisme yang mengalami mutasi genetik, diskriminasi alel dan genotipe *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Penggunaan *probe* yang spesifik membantu peningkatan spesifisitas pada pengujian PCR *real time* jika dibandingkan dengan pengujian PCR konvensional (Chantratita et al. 2008). Namun demikian, PCR *real time* juga mempunyai kelemahan yaitu memerlukan peralatan dan reagen yang mahal serta pemahaman teknik yang benar untuk hasil yang akurat.²⁸

Tahapan-tahapan umum yang dilakukan selama pengujian PCR *real time* dimulai dari isolasi RNA atau DNA sampai analisis data. Prinsip kerja PCR *real time* adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya amplifikasi DNA PCR dalam reaksi. Reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus. Peningkatan hasil amplifikasi PCR pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi target gen. Makin tinggi tingkat ekspresi target gen maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Pardal 2010). Kuantitas urutan DNA target dicapai dengan menentukan

jumlah siklus amplifikasi. Jumlah siklus amplifikasi diperlukan untuk menghasilkan produk PCR berdasarkan fluoresensi di awal fase eksponensial PCR serta untuk melewati garis ambang fluoresensi/siklus *threshold* (Ct). Jumlah siklus yang diperlukan untuk mencapai ambang batas disebut Ct. Siklus Ct adalah prinsip dasar dari PCR *real time* dan sebagai bagian yang sangat penting untuk memperoleh data yang akurat. Nilai Ct PCR *real time* sangat berkorelasi dengan kuantitas urutan DNA target (Giglio et al. 2003). Apabila kuantitas urutan DNA target tinggi di awal reaksi, nilai Ct akan lebih cepat diketahui. Namun demikian, nilai Ct akan lebih sering ditemukan pada fase eksponensial di setiap siklus amplifikasi PCR. Hal ini yang menjadi alasan utama bahwa nilai Ct lebih mampu mengukur jumlah amplifikasi DNA target dari awal reaksi.²⁸

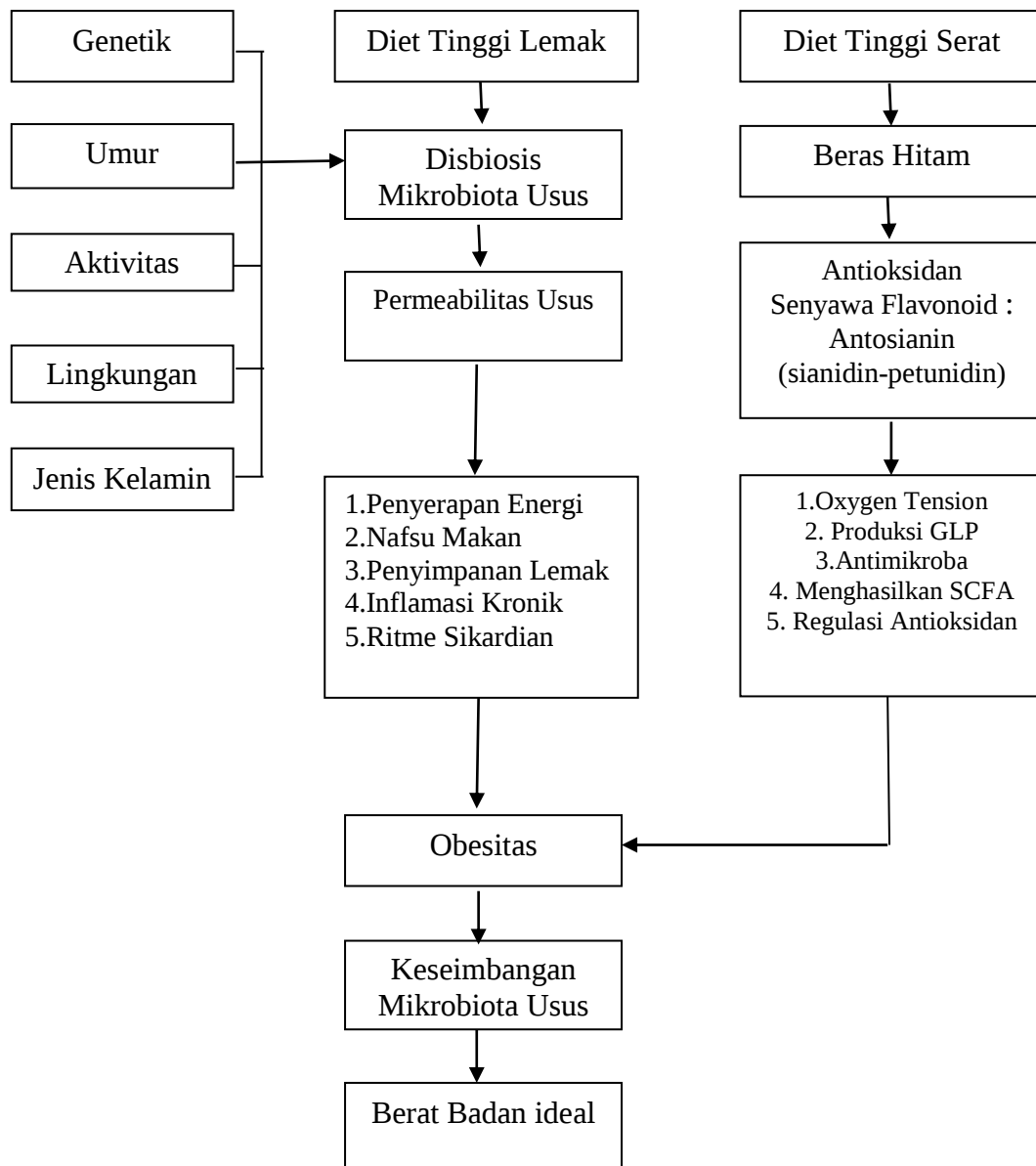
Reaksi PCR *real time* dapat dilakukan satu tahap (*one step real time PCR*) maupun dua tahap (*two step real time PCR*). Keseluruhan reaksi sintesis *cDNA* sampai amplifikasi PCR dalam PCR *real time* satu tahap dilakukan dalam satu tabung. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *real time* satu tahap dapat meminimalkan variasi perlakuan laboratorium karena reaksi kedua enzim terjadi dalam satu tabung. Reaksi *reverse transcriptase* pada proses PCR *real time* dua tahap dilakukan terpisah dari pengujian PCR *real time*. Prosedur PCR *real time* dua tahap akan bekerja lebih baik ketika menggunakan suatu DNA *binding dye* seperti SYBR *green I* karena akan lebih mempermudah untuk mengeliminasi primer-dimer melalui manipulasi *Tm*. SYBR *green I* merupakan salah satu jenis DNA *binding dye* yang mempunyai kemampuan mengikat 100 kali lebih

tinggi dan relatif lebih ramah lingkungan jika dibandingkan dengan *ethidium bromide*. Bahkan, DNA *binding dye* ini lebih mudah diterapkan karena tidak memerlukan adanya *probe* yang spesifik dan biaya yang dibutuhkan relatif terjangkau. PCR *real time* dua tahap memberikan kemungkinan untuk terjadinya peningkatan kontaminasi DNA (Vandesompele et al. 2002; Giglio et al. 2003).

Berbagai modifikasi PCR *real time* telah dikembangkan untuk meningkatkan kerja dari PCR *real time* seperti PCR *real time* multiplex. Saat ini, telah tersedia kit komersial untuk PCR *real time* multiplex yang memungkinkan untuk kombinasi beberapa pengujian dalam satu reaksi. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) multiplex adalah amplifikasi secara berkelanjutan dua atau lebih DNA atau cDNA target dalam satu reaksi tabung dan hanya dapat dilakukan dengan menggunakan *probe* berlabel spesifik pada setiap urutan DNA target. Kelebihan dari PCR multiplex adalah jumlah sampel yang dibutuhkan lebih sedikit sehingga berguna apabila jumlah sampel yang tersedia dalam jumlah terbatas dan kemampuannya untuk menggabungkan pengujian dalam satu sistem internal kontrol (Belak 2007; Hoffmann et al. 2007). Meskipun demikian, pengujian ini harus dioptimasi terlebih dahulu untuk meminimalkan adanya interaksi kompetitif yang akan sangat berpengaruh terhadap sensitivitas pengujian (Chantratita et al. 2008).

2.6 Kerangka Teori

2.6.1 Kerangka Teori



Penjelasan Kerangka Teori :

Genetik, umur, aktivitas fisik, lingkungan, jenis kelamin, dan diet tinggi lemak menjadi faktor risiko terjadinya Obesitas. Kondisi ini dapat mengganggu keseimbangan (Disbiosis) mikrobiota usus sehingga

menyebabkan beberapa hal yang akan semakin memperburuk keadaan Obesitas. Beberapa gangguan yang mungkin terjadi karena disbiosis tersebut adalah ;

1. Peningkatan penyerapan energi melalui perubahan ekspresi gen dan akumulasi berlebihan asam lemak rantai pendek (SCFA);
2. Peningkatan nafsu makan melalui jalur usus-otak, usus-hormon, dan neuromodulator;
3. Mengatur penyimpanan lemak melalui faktor transkripsi dan lipoprotein lipase;
4. Menyebabkan peradangan kronis melalui regulasi ekspresi gen inflamasi dan lipopolisakarida; dan
5. Mengganggu ritme sirkadian dengan mempengaruhi faktor transkripsi sirkadian, modifikasi epigenetik, dan sintesis empedu dan SCFA.

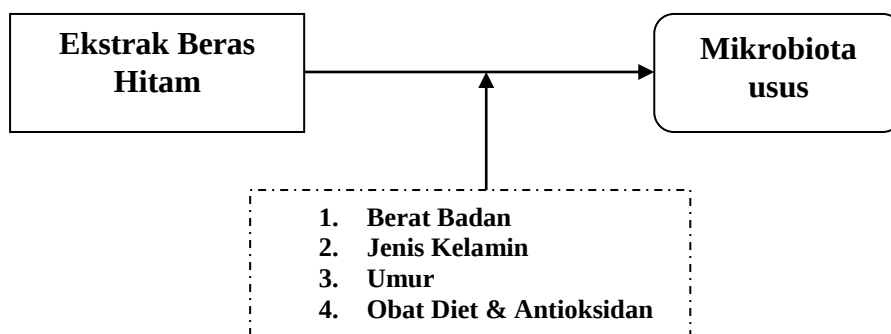
Beras hitam adalah bahan pangan yang mengandung serat dan kadar antioksidan yang tinggi yaitu senyawa Flavonoid bernama Antosianin. Kandungan Antosianin yang utama adalah sianidin-3,5-diglukosida, sianidin-3-O-glukosida, dan petunidin-3-O-glukosida), biasa disebut dengan C3G. Beberapa peran Antosianin adalah ;

1. Mengurangi *oxygen tension* pada lumen usus, sehingga meningkatkan proliferasi populasi bakteri yang sensitive oksigen.
2. Memiliki fungsi antimikroba dan anti adhesi terhadap bakteri patogen. Konsentrasi anthocyanin yang tinggi dalam ekstrak

tersebut akan mencapai intestinal bagian distal dan berinteraksi dengan atau dimetabolisme oleh mikrobiota usus.

3. Perbaikan Intestinal akan meningkatkan produksi GLP yang berperan dalam kontrol proliferasi sel epitel dan telah dibuktikan berperan sebagai regulator ekspresi dan lokalisasi protein *tight junction*.
4. Menghasilkan SCFA intestinal, seperti Asetat, Butyrate, dan Propionat dalam hal ini dapat berperan untuk meningkatkan produksi MUC2 oleh sel goblet di usus. Sehingga menstimulasi pencernaan melalui peningkatan aktivitas enzim yang berpartisipasi dalam proses pencernaan dan sekresi asam empedu, sehingga mengurangi *transit time* di usus - Berperan dalam meningkatkan regulasi jalur antioksidan, sehingga dapat memelihara integritas pelindung usus, melalui regulasi ekspresi protein *tight junction*.

2.7 Kerangka Konsep



Keterangan :

= Variabel Independen

= Variabel Kontrol

= Variabel Dependen

2.7 Hipotesis Penelitian

1. Terdapat kandungan Antosianin pada Beras Hitam (*Oryza sativa* L).
2. Terdapat perbedaan analisis mikrobiota usus Filum *Firmicutes*, Genus *Clostridium leptum* dan *Lactobacillus* pada Subjek Remaja Obesitas, sebelum dan sesudah pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza Sativa* L).
3. Terdapat perbedaan analisis mikrobiota usus Filum *Bacteroidetes*, Genus *Bacteroides fragilis* pada Subjek Remaja Obesitas, sebelum dan sesudah pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza Sativa* L).
4. Terdapat perbedaan analisis mikrobiota usus Filum *Actinobacteria*, Genus *Bifidobacterium* pada Subjek Remaja berat Obesitas, sebelum dan sesudah pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza Sativa* L).
5. Terdapat perbedaan analisis mikrobiota usus Filum *Proteobacteria*, Genus *Escherichia coli* pada Subjek Remaja Obesitas, sebelum dan sesudah pemberian ekstrak beras hitam (*Oryza Sativa* L).