

**PENDEKATAN IN VITRO DALAM PENILAIAN  
BIOAVAILABILITAS ZAT BESI PANGAN**  
*In vitro Approaches in Assessing Dietary Iron Bioavailability*

**I Kadek Adi Indrawan, Kelvin Then, Kent Pranata Tjandra, Yunna Teodor, Rike Tri Kumala  
Dewi\*, Dwining Putri Elfriede**

\*Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Prasetiya Mulya  
Edu Town Kavling Edu I No. 1, Jalan BSD Raya Barat 1, Serpong, Pagedangan, Kec. Pagedangan,  
Kabupaten Tangerang, Banten 15339

\*Korespondensi Penulis: [rike.dewi@prasetiyamulya.ac.id](mailto:rike.dewi@prasetiyamulya.ac.id)

**ABSTRACT**

*Iron availability in foods was determined not only by total iron content but also by its bioaccessibility and bioavailability. This review aimed to evaluate the role of in vitro testing methods in assessing iron availability from various food products and to identify food matrix factors influencing its absorption. The methods discussed included static gastrointestinal digestion simulation, total iron analysis using Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) or Inductively Coupled Plasma (ICP), and the Caco-2 cell model measuring ferritin formation as an indicator of bioavailability. The findings indicated that total iron content did not necessarily correlate with biological absorption. Several factors, such as fermentation, fortification, phytate degradation, and the addition of ascorbic acid, were found to significantly enhance iron availability, particularly in plant-based food matrices. These results suggested that food processing and formulation strategies played a critical role in improving iron uptake. Among the reviewed approaches, the combination of in vitro gastrointestinal digestion and Caco-2 cell models was identified as the most comprehensive method for future product development, as it allows simultaneous evaluation of bioaccessibility and cellular uptake. In conclusion, in vitro approaches were considered practical and efficient preliminary tools in the development and evaluation of iron-rich food products before proceeding to in vivo studies.*

**Keywords:** *iron bioavailability, in vitro digestion, Caco-2 cells, bioaccessibility*

**PENDAHULUAN**

Keberhasilan pemenuhan status zat besi dalam tubuh manusia tidak hanya ditentukan oleh total asupan Fe yang dikonsumsi, melainkan sangat bergantung pada aspek bioavailabilitas. Bioavailabilitas zat besi didefinisikan sebagai fraksi dari besi yang dikonsumsi yang berhasil dilepaskan dari matriks makanan, diserap oleh sel enterosit di usus halus, dan akhirnya masuk ke dalam sirkulasi sistemik untuk digunakan dalam sintesis hemoglobin atau disimpan sebagai feritin (Subroto *et al.*, 2023). Zat besi dalam makanan hadir dalam dua bentuk kimia utama dengan tingkat penyerapan yang sangat berbeda, yaitu besi *heme* yakni zat besi yang berasal dari hemoglobin dan

mioglobin hewan dengan efisiensi serap tinggi sekitar 15–35%, dan besi *non-heme* yang berasal dari nabati dan makanan terfortifikasi yang bioavailabilitasnya jauh lebih rendah dan sangat fluktuatif, berkisar antara 2–20% tergantung pada keberadaan faktor-faktor pendorong atau penghambat dalam saluran cerna (Piskin *et al.*, 2022). Masalah utama rendahnya penyerapan zat besi dipicu oleh interaksi kompleks antara zat besi *non-heme* dengan berbagai komponen antinutrisi dalam diet harian. Senyawa *phytic acid* yang dominan pada sereal dan kacang-kacangan, serta tanin dalam teh dan kopi, merupakan penghambat poten karena kemampuannya mengikat ion besi membentuk kompleks yang tidak larut, sehingga besi tidak dapat

dikenali oleh reseptor pada mikrovili usus (Hurrell, 2004). Selain faktor diet, kondisi fisiologis individu juga memegang peranan krusial, lingkungan lambung yang kurang asam akan menghambat konversi besi ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) menjadi bentuk ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) yang lebih mudah larut dan diserap (Correnti *et al.*, 2024). Di tingkat seluler, penyerapan Fe juga dikontrol secara ketat oleh hormon *hepcidin* yang diproduksi organ hati. Saat tubuh mengalami inflamasi kronis atau infeksi, kadar hormon *hepcidin* meningkat dan menutup pintu keluar ferroportin dari sel usus ke darah, yang pada akhirnya memicu kondisi anemia fungsional meskipun asupan makanan sudah cukup (Nemeth & Ganz, 2021).

Dampak dari rendahnya bioavailabilitas zat besi ini terlihat nyata pada beban kesehatan di berbagai tingkatan. Secara global, *World Health Organization* (WHO) mencatat bahwa anemia defisiensi besi merupakan masalah gizi tunggal terbesar di dunia yang memengaruhi lebih dari 1,62 miliar orang, dengan dampak signifikan pada penurunan produktivitas kerja dan gangguan kognitif. Di tingkat nasional, berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), Indonesia menghadapi tantangan besar dengan prevalensi anemia pada ibu hamil yang mencapai 48,9%, sebuah angka yang mengindikasikan bahwa hampir satu dari dua ibu hamil gagal memenuhi kebutuhan besinya akibat buruknya kualitas penyerapan. Secara lokal, di daerah pedesaan yang pola makannya didominasi oleh pangan nabati tinggi fitat tanpa asupan protein hewani yang memadai, fenomena *hidden hunger* masih menjadi penyebab utama tingginya angka *stunting*, di mana defisiensi besi mengganggu proses pembelahan sel dan metabolisme energi yang diperlukan untuk pertumbuhan linier anak (Kittisakmontri *et al.*, 2021).

Pengujian *in vitro* zat besi merupakan metode analisis yang digunakan untuk mengetahui ketersediaan zat besi dalam bahan pangan dengan cara meniru

proses pencernaan manusia di laboratorium (Sulaiman *et al.*, 2021a). Metode ini digunakan untuk memperkirakan jumlah zat besi yang dapat dilepaskan dari matriks pangan selama proses pencernaan, sehingga dapat memberikan gambaran mengenai potensi zat besi untuk diserap oleh tubuh. Kandungan zat besi total dalam suatu makanan belum tentu menunjukkan jumlah zat besi yang benar-benar dapat dimanfaatkan secara biologis, sehingga pengujian bioaksesibilitas diperlukan untuk menilai fraksi zat besi yang tersedia selama proses pencernaan (Sulaiman *et al.*, 2021b).

Selain bioaksesibilitas, pengujian *in vitro* juga sering digunakan untuk menilai bioavailabilitas zat besi, yaitu jumlah zat besi yang dapat diserap oleh sel usus setelah proses pencernaan berlangsung. Pengukuran bioavailabilitas penting karena zat besi yang telah dilepaskan dari matriks pangan belum tentu dapat diserap secara optimal oleh tubuh. Untuk menilai hal tersebut, beberapa penelitian menggunakan model sel usus manusia seperti sel Caco-2 yang mampu meniru proses penyerapan zat besi di usus halus (Khoja *et al.*, 2020a).

Metode *in vitro* banyak digunakan dalam penelitian pangan karena dapat mensimulasikan kondisi pencernaan manusia secara terkendali, relatif cepat, dan lebih ekonomis (Zhou *et al.*, 2023). Selain itu, metode ini juga memungkinkan evaluasi pengaruh berbagai komponen pangan terhadap penyerapan zat besi. Senyawa seperti vitamin C, protein hewani, dan beberapa asam organik diketahui dapat meningkatkan ketersediaan zat besi, sedangkan fitat, polifenol, serat, serta beberapa mineral lain dapat menghambat proses penyerapannya. Oleh karena itu, pengujian *in vitro* menjadi pendekatan penting dalam menilai kualitas gizi suatu bahan pangan, terutama dalam pengembangan pangan fortifikasi zat besi.

Berdasarkan uraian tersebut, kajian ini bertujuan untuk mengevaluasi pendekatan pengujian *in vitro* dalam menilai bioaksesibilitas dan bioavailabilitas

zat besi pada berbagai matriks pangan, mengidentifikasi faktor-faktor yang memengaruhi pelepasan dan penyerapan zat besi selama proses pencernaan, serta menelaah keunggulan dan keterbatasan metode *in vitro* sebagai alat prediksi awal ketersediaan biologis zat besi dalam pengembangan pangan fortifikasi dan peningkatan kualitas gizi berbasis pangan.

### **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini menggunakan pendekatan kajian literatur untuk mengevaluasi metode *in vitro* dalam penilaian bioavailabilitas zat besi pangan. Pendekatan ini bersifat interpretatif dan bertujuan memberikan ringkasan komprehensif, kritik, serta perspektif konseptual terhadap topik yang kompleks. Pemilihan pendekatan ini didasarkan pada luasnya variasi metode bioavailabilitas zat besi secara *in vitro*, mulai dari simulasi pencernaan statis hingga model sel Caco-2 dan pendekatan molekuler absorpsi besi, sehingga diperlukan pemetaan yang integratif dan menyeluruh. Pencarian literatur dilakukan melalui beberapa basis data ilmiah utama, yaitu Scopus, ScienceDirect, PubMed, dan Google Scholar. Kata kunci yang digunakan meliputi kombinasi istilah: “iron bioavailability”, “*in vitro* digestion”, dan “Caco-2 cell model”. Kriteria inklusi mencakup artikel penelitian dan tinjauan ilmiah yang dipublikasikan dalam 10 tahun terakhir, berbahasa Inggris atau Indonesia,

serta secara eksplisit membahas metode *in vitro* dalam evaluasi bioavailabilitas zat besi pangan. Proses seleksi dilakukan melalui penyaringan judul dan abstrak, kemudian dilanjutkan dengan telaah teks lengkap untuk memastikan kesesuaian dengan fokus kajian. Artikel yang terpilih dianalisis berdasarkan jenis metode simulasi pencernaan, model absorpsi seluler, parameter analisis, serta faktor matriks pangan yang memengaruhi hasil. Pendekatan ini memungkinkan penyusunan sintesis yang terstruktur mengenai perkembangan metode *in vitro* serta relevansinya dalam menilai kualitas sumber zat besi pangan.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Kajian mengenai ketersediaan zat besi dari bahan pangan secara *in vitro* telah banyak dilakukan sebagai pendekatan awal untuk mengevaluasi potensi pemanfaatannya dalam tubuh. Metode ini digunakan untuk mensimulasikan kondisi fisiologis saluran pencernaan sehingga dapat memberikan gambaran mengenai pelepasan dan ketersediaan zat besi dari matriks pangan. Variasi hasil antara penelitian dapat dipengaruhi oleh perbedaan jenis bahan, proses pengolahan, serta metode analisis yang diterapkan. Rangkuman beberapa penelitian terkait disajikan dalam Tabel 1 guna memberikan gambaran komparatif dan mendukung pemahaman yang lebih sistematis terhadap temuan yang ada.

**Tabel 1.** Penelitian Terdahulu *In Vitro* Zat Besi dalam Bahan/Produk Pangan

Bahan/Produk	Teknik pengujian	Hasil	Referensi
Tempeh kedelai, tempeh campuran <i>Tenebrio molitor</i> (mealworm), daging sapi, <i>Impossible Burger</i> , <i>Beyond Burger</i>	Simulasi pencernaan <i>in vitro</i> dengan pepsin pH 2, dilanjutkan pankreatin + empedu pH 7, analisis Fe dengan ICP-MS, uji bioavailabilitas menggunakan sel Caco-2 dan pengukuran ferritin (ELISA)	Total zat besi dan besi terlarut tidak selalu berkorelasi dengan bioavailabilitas. Tempeh kedelai menunjukkan bioavailabilitas lebih tinggi dibanding kontrol kedelai. Produk serangga dan daging memiliki tingkat serupa (~20 ng/g protein).	(Wilson <i>et al.</i> , 2024)

<p>Burger nabati (berbasis kedelai, jamur, mycoprotein, sayuran) dan burger daging sapi</p>	<p>Simulasi pencernaan <i>in vitro</i> (pepsin pH 2 dilanjutkan pankreatin + empedu pH 7), analisis mineral menggunakan ICP-OES setelah microwave digestion, uji bioavailabilitas menggunakan sel Caco-2 dengan pengukuran penyerapan Fe oleh sel</p>	<p>Kandungan total dan bioaksesibilitas Fe lebih tinggi pada daging sapi dibandingkan sebagian besar burger nabati. Namun, bioavailabilitas Fe pada sebagian besar burger nabati tidak berbeda signifikan dengan daging sapi. Hal ini menunjukkan bahwa bioaksesibilitas tidak selalu mencerminkan bioavailabilitas. Faktor matriks pangan, keberadaan enhancer (misalnya asam askorbat), serta inhibitor seperti fitat berpengaruh terhadap penyerapan Fe.</p>	<p>(Latunde-Dada <i>et al.</i>, 2023)</p>
<p>Hummus (chickpea + tahini + lemon juice + garlic)</p>	<p>Simulasi pencernaan <i>in vitro</i> + dialisis Fe, dilanjutkan model sel Caco-2 (ferritin ELISA), analisis Fe (AAS)</p>	<p>Lemon juice meningkatkan bioaksesibilitas Fe secara signifikan (+15,9%), autoklaf juga meningkatkan (+9,5%), sedangkan tahini menurunkan (-8,9%). Bioavailabilitas Fe hummus lebih tinggi dibanding chickpea saja (30,4 vs 7,23 ng ferritin/mg protein). Menunjukkan bahwa formulasi pangan berperan besar dalam meningkatkan penyerapan Fe non-heme.</p>	<p>(Doumani <i>et al.</i>, 2020)</p>
<p>Bibit sayur dan sayuran dewasa</p>	<p>Menggunakan enzim pepsin dan pankreatin serta model sel Caco-2 untuk mengukur bioavailabilitas zat besi melalui pembentukan protein ferritin sebagai indikator penyerapan oleh sel usus manusia</p>	<p>Meskipun sayuran fase dewasa terutama <i>fenugreek</i> dan <i>rocket</i> memiliki kadar zat besi total yang lebih tinggi, <i>microgreen fenugreek</i> menunjukkan bioavailabilitas zat besi yang jauh lebih baik dibandingkan versi dewasanya.</p>	<p>(Khoja <i>et al.</i>, 2020b)</p>
<p>Daging nabati</p>	<p>Simulasi pencernaan gastrointestinal <i>in vitro</i> untuk menentukan bioaksesibilitas Fe, dilanjutkan dengan evaluasi bioavailabilitas melalui pengukuran Fe terlarut dan rasio fitat/Fe sebagai indikator potensi penyerapan zat besi.</p>	<p>Fortifikasi besi pada produk daging nabati secara signifikan meningkatkan bioaksesibilitas Fe dan menurunkan rasio fitat/Fe dibandingkan produk tanpa fortifikasi. Ketersediaan besi setelah pencernaan <i>in vitro</i> mendekati atau setara dengan daging hewani, menunjukkan bahwa fortifikasi efektif meningkatkan potensi penyerapan Fe pada matriks pangan nabati.</p>	<p>(Kose <i>et al.</i>, 2025)</p>

Tahu dan susu kedelai	Teknik Pengujian dilakukan melalui metode uji <i>in vitro</i> menggunakan enzim pepsin, pankreatin, dan ekstrak bile. Analisis total kadar zat besi dalam sampel dilakukan dengan menggunakan metode <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i> (AAS)	Fortifikasi biji wijen merupakan solusi alami yang potensial untuk meningkatkan ketersediaan zat besi pada produk kedelai, kadar tertinggi pada tahu rebus mencapai 1,9106 mg dengan substitusi fortifikan 40% dan kadar Fe tertinggi ditemukan pada sampel dengan campuran 60 g kedelai dan 40 g biji wijen, yaitu rata-rata sebesar 1,0015 mg	(Amin, 2021)
-----------------------	--	---	--------------

Penelitian (Wilson *et al.*, 2024) meneliti kandungan total besi, besi terlarut, dan bioavailabilitas zat besi pada produk tempe berbasis kedelai dan serangga, serta membandingkannya dengan daging sapi konvensional dan produk pengganti daging berbasis nabati. Proses fermentasi dengan kapang *Rhizopus oligosporus* diketahui berpotensi untuk meningkatkan ketersediaan mineral melalui aktivitas enzimatis seperti fitase yang dapat mendegradasi asam fitat, namun di sisi lain juga berpotensi menghasilkan *siderofor* yang dapat mengikat besi dan menurunkan ketersediaannya. Analisis dilakukan dalam tiga tahap utama. Pertama, kadar total besi diukur pada sampel liofilisasi sebelum dan sesudah fermentasi. Hasil menunjukkan adanya peningkatan kecil namun signifikan secara keseluruhan setelah fermentasi. Hal ini menjelaskan bahwa perubahan kadar total besi tidak secara langsung mencerminkan perubahan ketersediaan biologis, dan kemungkinan dipengaruhi oleh kontribusi biomassa miselium kapang selama fermentasi. Tahap kedua adalah pengukuran besi terlarut setelah simulasi pencernaan gastrointestinal *in vitro*, yang mencakup fase lambung dan fase usus. Hasil menunjukkan bahwa fermentasi tidak secara konsisten meningkatkan jumlah besi terlarut. Temuan ini mengindikasikan bahwa fermentasi tidak selalu secara langsung meningkatkan ketersediaan besi pada tahap bioaksesibilitas. Hal ini diduga karena waktu fermentasi yang relatif

singkat sehingga belum cukup untuk menghasilkan perubahan signifikan. Tahap ketiga adalah evaluasi bioavailabilitas menggunakan model sel Caco-2. Model ini mensimulasikan epitel usus halus manusia dan bioavailabilitas dinilai berdasarkan jumlah ferritin yang terbentuk setelah sel diinkubasi selama 24 jam dengan hasil digesti yang telah dinetralkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar total besi maupun besi terlarut tidak selalu berkorelasi dengan pembentukan ferritin. Preparasi yang mengandung kedelai, menunjukkan peningkatan ferritin yang signifikan dibandingkan kontrol non-fermentasi. Sebaliknya, formulasi berbasis serangga murni memiliki tingkat bioavailabilitas yang lebih rendah dibandingkan preparasi campuran kedelai-serangga maupun tempe kedelai murni. Temuan ini menunjukkan bahwa keberadaan matriks kedelai dan efek fermentasi berperan lebih besar dalam meningkatkan penyerapan besi dibandingkan sekadar kandungan besi total dalam bahan. Ketika dibandingkan dengan daging sapi serta produk alternatif daging berbasis nabati, hasil menunjukkan bahwa meskipun beberapa produk nabati memiliki kadar besi terlarut yang tinggi setelah simulasi pencernaan, hal tersebut tidak selalu meningkatkan bioavailabilitasnya.

Penelitian oleh Latunde-Dada *et al.* (2023) mengkaji kandungan mineral serta bioaksesibilitas dan bioavailabilitas zat besi pada berbagai burger berbasis nabati dibandingkan dengan burger daging sapi

menggunakan pendekatan *in vitro*. Metode yang digunakan meliputi simulasi pencernaan gastrointestinal dengan enzim pepsin pada pH 2 yang dilanjutkan dengan pankreatin dan empedu pada pH 7 untuk memperoleh fraksi zat besi yang bioaksesibel. Selanjutnya, bioavailabilitas dianalisis menggunakan model sel Caco-2 sebagai representasi epitel usus manusia, dengan mengukur jumlah zat besi yang diserap oleh sel setelah inkubasi dengan hasil digesti. Kandungan total mineral dalam sampel ditentukan menggunakan teknik ICP-OES setelah proses destruksi menggunakan microwave digestion. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar total dan bioaksesibilitas zat besi pada burger daging sapi secara signifikan lebih tinggi dibandingkan sebagian besar produk berbasis nabati. Hal ini berkaitan dengan keberadaan besi heme pada daging yang memiliki stabilitas dan efisiensi penyerapan lebih tinggi dibandingkan besi non-heme pada pangan nabati. Namun demikian, pada tahap bioavailabilitas, sebagian besar burger nabati menunjukkan tingkat penyerapan zat besi yang tidak berbeda signifikan dengan daging sapi. Temuan ini menunjukkan bahwa bioaksesibilitas tidak selalu berbanding lurus dengan bioavailabilitas, karena dipengaruhi oleh interaksi komponen dalam matriks pangan. Keberadaan senyawa inhibitor seperti asam fitat dapat menurunkan ketersediaan zat besi, sedangkan komponen lain seperti asam askorbat dapat meningkatkan penyerapannya. Maka dari itu, penelitian ini menekankan pentingnya mengukur bioavailabilitas zat besi dengan pendekatan yang komprehensif, tidak hanya berdasarkan kadar total atau fraksi terlarut, tetapi juga melalui model biologis seperti sel Caco-2 untuk menggambarkan potensi penyerapan yang lebih akurat.

Penelitian oleh Doumani *et al.* (2020) memberikan kontribusi penting dalam memahami bahwa bioavailabilitas zat besi pada pangan nabati merupakan hasil interaksi kompleks antara proses

pengolahan dan formulasi produk, bukan sekadar kandungan zat besi total. Melalui pendekatan kombinasi simulasi pencernaan *in vitro* dan model sel Caco-2, studi ini menunjukkan bahwa faktor formulasi seperti penambahan lemon juice memiliki efek peningkatan paling signifikan terhadap bioaksesibilitas dan bioavailabilitas besi non-heme, terutama melalui mekanisme penurunan pH dan pembentukan kompleks kelat yang meningkatkan kelarutan besi. Sebaliknya, keberadaan tahini teridentifikasi sebagai faktor penghambat, yang kemungkinan berkaitan dengan kandungan fitat, polifenol, dan mineral kompetitif seperti kalsium. Selain itu, proses termal seperti autoklaf terbukti meningkatkan bioaksesibilitas besi melalui reduksi senyawa antinutrisi, menunjukkan bahwa perlakuan panas dengan kondisi tertentu dapat lebih efektif dibanding metode konvensional seperti perebusan. Secara kritis, penelitian ini juga menyoroti bahwa peningkatan bioaksesibilitas tidak selalu identik dengan peningkatan bioavailabilitas, meskipun keduanya menunjukkan korelasi positif dalam konteks variasi faktor yang luas. Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan metode *in vitro* berbasis dialisis dapat berfungsi sebagai tahap skrining awal, namun tetap memerlukan validasi menggunakan model biologis yang lebih representatif. Dengan demikian, studi ini mensintesis bahwa strategi peningkatan ketersediaan zat besi pada pangan nabati sebaiknya difokuskan pada optimasi formulasi dan proses secara simultan, serta mempertimbangkan keseimbangan antara komponen *enhancer* dan inhibitor dalam matriks pangan.

Penelitian yang dilakukan oleh (K. Khoja *et al.*, 2020b) ini bertujuan untuk mengevaluasi kandungan mineral serta bioavailabilitas zat besi pada sayuran *fenugreek* (kelabat), *rocket*, dan brokoli dalam dua fase pertumbuhan, yaitu fase *microgreen* (bibit muda usia 10 hari) dan fase dewasa. Teknik pengujian yang

diterapkan meliputi analisis kadar mineral menggunakan sistem *microwave digestion* dan ICP-OES, simulasi pencernaan gastrointestinal *in vitro* dengan enzim pepsin dan pankreatin, serta uji bioavailabilitas menggunakan model sel Caco-2 di mana pembentukan protein ferritin digunakan sebagai indikator penyerapan zat besi oleh sel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa meskipun sayuran fase dewasa terutama *fenugreek* dan *rocket* memiliki kadar zat besi total yang lebih tinggi dibandingkan *microgreen*-nya, *microgreen fenugreek* menunjukkan bioavailabilitas zat besi yang jauh lebih tinggi secara signifikan dibandingkan versi dewasanya. Selain itu, ditemukan bahwa penambahan asam askorbat (Vitamin C) secara nyata mampu meningkatkan penyerapan zat besi pada *fenugreek* dan *rocket* dewasa. Secara keseluruhan, *microgreen fenugreek* berpotensi menjadi sumber nutrisi unggul untuk membantu mengatasi defisiensi zat besi karena daya serapnya yang lebih efisien dalam sistem pencernaan manusia. Penelitian ini berhasil mengungkap potensi *microgreen fenugreek* yang ditanam secara hidroponik sebagai sumber zat besi unggul meskipun kadar zat besi totalnya lebih rendah daripada sayuran dewasa. Hal ini memberikan wawasan penting bahwa kualitas nutrisi tidak hanya ditentukan oleh kuantitas mineral pada label, tetapi lebih pada efektivitas penyerapan tubuh, sekaligus menawarkan solusi untuk inovasi berkelanjutan karena *microgreen* membutuhkan air 200 kali lebih sedikit dan waktu tumbuh 95% lebih cepat dibandingkan sayuran dewasa. Namun, penelitian ini memiliki keterbatasan karena belum mempertimbangkan aspek sensorik (rasa) dan pengaruh pengolahan sayuran segar dalam penggunaan sehari-hari. Secara keseluruhan, jurnal ini sangat baik dalam mempromosikan *microgreen* sebagai "*superfood*" untuk melawan anemia.

Penelitian lain yang dilakukan oleh (Kose *et al.*, 2025) bertujuan untuk mengevaluasi kandungan dan bioavailabilitas mineral pada produk daging nabati (*plant-based mince* atau PBM) berbasis protein kedelai dan gandum dibandingkan dengan daging sapi cincang, di mana produk PBM diuji dalam kondisi tanpa fortifikasi maupun dengan fortifikasi zat besi. Teknik pengujian yang diterapkan meliputi analisis kadar mineral menggunakan *microwave digestion* dan ICP-MS, simulasi pencernaan gastrointestinal *in vitro* menggunakan enzim pepsin dan pankreatin untuk mengukur bioaksesibilitas, serta model sel Caco-2 untuk menilai bioavailabilitas melalui penyerapan mineral oleh sel usus manusia. Selain itu, dilakukan pengukuran kadar asam fitat untuk menghitung rasio molar asam fitat terhadap mineral sebagai indikator penghambat penyerapan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fortifikasi Fe pada daging nabati tersebut berhasil menurunkan rasio asam fitat dan Fe hingga di bawah 10, sehingga meningkatkan bioavailabilitas Fe hingga mencapai level yang setara dengan daging sapi. Secara keseluruhan, fortifikasi Fe pada daging nabati terbukti efektif untuk mendukung kecukupan nutrisi.

Terakhir merupakan penelitian dari (Amin, 2021) yang bertujuan untuk mengatasi masalah anemia melalui fortifikasi pangan berbasis kedelai, yaitu tahu dan susu kedelai, dengan memanfaatkan biji wijen sebagai bahan fortifikan alami yang kaya akan zat besi. Teknik pengujian yang diterapkan adalah metode simulasi pencernaan *in vitro* untuk menentukan ketersediaan zat besi dalam kondisi fisiologis tubuh menggunakan enzim pepsin, pankreatin, dan ekstrak empedu, serta bantuan alat *shaking water bath* untuk meniru gerak peristaltik lambung. Kadar zat besi dalam sampel kemudian dianalisis secara kuantitatif menggunakan metode *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS). Hasil penelitian

menunjukkan bahwa penambahan tepung biji wijen berhasil meningkatkan kadar zat besi pada produk olahan kedelai. Pada sampel tahu, ketersediaan Fe tertinggi ditemukan pada tahu rebus dengan substitusi fortifikan 40% mencapai 1,9106 mg, sedangkan pada susu kedelai, ketersediaan Fe tertinggi diperoleh pada campuran 60 g kedelai dan 40 g biji wijen dengan rata-rata sebesar 1,0015 mg. Secara keseluruhan, biji wijen terbukti menjadi fortifikan alami yang potensial karena efektif dalam meningkatkan ketersediaan zat besi serta bersifat ekonomis dan mudah didapat. Penelitian ini memberi wawasan yang baik karena penggunaan biji wijen sebagai fortifikan alami menyediakan opsi yang strategis dan ekonomis dibandingkan fortifikasi dengan bahan kimia, mengingat kandungan zat besinya yang secara alami sangat tinggi. Pemilihan bahan pangan berbasis kedelai, seperti tahu dan susu kedelai juga sangat tepat untuk mendukung keberlanjutan gizi masyarakat karena produk tersebut dikonsumsi secara luas oleh berbagai lapisan sosial. Temuan yang sangat menarik dalam studi ini adalah bahwa proses pemasakan yakni merebus dan menggoreng justru meningkatkan ketersediaan zat besi, yang diduga terjadi karena besi terlepas dari matriks sampel terfortifikasi selama pemanasan. Namun, penelitian ini belum memaparkan uji organoleptik (sensorik), mengingat substitusi biji wijen yang mencapai 50% kemungkinan besar akan mengubah rasa dan tekstur produk secara drastis, yang sangat krusial bagi penerimaan konsumen di lapangan. Secara metodologis, pengujian *in vitro* ini masih memiliki keterbatasan karena tidak dapat sepenuhnya meniru kompleksitas sistem pencernaan manusia.

Secara kritis, literatur yang digunakan sudah kuat secara metodologis karena memanfaatkan pendekatan *in vitro* dan model sel Caco-2, namun masih terbatas sebagai tahap skrining dan belum sepenuhnya merepresentasikan kondisi fisiologis manusia. Sebagian besar studi

juga menunjukkan bahwa bioaksesibilitas tidak selalu berkorelasi dengan bioavailabilitas, tetapi temuan ini belum disintesis sebagai kerangka utama. Di antara literatur yang ada, Doumani *et al.* (2020) merupakan pendekatan paling komprehensif karena mengintegrasikan aspek formulasi, interaksi komponen, dan proses, sehingga lebih aplikatif dibanding studi lain. Sementara itu, Latunde-Dada *et al.* (2023) dan Wilson *et al.* (2024) memberikan kontribusi penting dari sisi komparatif dan mekanistik.

Sebagai pembanding, beberapa studi dalam 5 tahun terakhir juga menunjukkan bahwa metode *in-vitro* seperti model INFOGEST method tetap relevan untuk mengevaluasi bioavailabilitas zat besi pada pangan nabati. Studi-studi terbaru menegaskan bahwa faktor seperti pengolahan, kandungan antinutrien, serta penambahan enhancer (misalnya asam askorbat) berpengaruh signifikan terhadap peningkatan bioavailabilitas, sehingga sejalan dengan temuan pada penelitian ini (Sulaiman *et al.*, 2021).

## **KESIMPULAN**

Pengujian *in vitro* zat besi merupakan metode yang efektif untuk mengevaluasi bioaksesibilitas dan bioavailabilitas Fe dari berbagai matriks pangan melalui simulasi pencernaan gastrointestinal dan model sel Caco-2. Berdasarkan berbagai studi yang dikaji, kandungan besi total tidak selalu mencerminkan tingkat penyerapan biologisnya, karena faktor matriks pangan, keberadaan inhibitor seperti asam fitat, serta proses fermentasi dan fortifikasi lebih menentukan ketersediaan Fe. Fortifikasi, baik dengan senyawa besi anorganik maupun fortifikan alami, terbukti meningkatkan bioavailabilitas dan dalam beberapa kasus mendekati sumber hewani. Meskipun memiliki keterbatasan dalam merepresentasikan kondisi fisiologis manusia secara utuh, metode *in vitro* tetap menjadi pendekatan awal yang penting dalam pengembangan pangan fortifikasi

untuk mendukung penanggulangan anemia defisiensi besi. Oleh karena itu, metode ini disarankan untuk dikombinasikan dengan uji *in vivo* pada tahap lanjutan guna memperoleh validasi yang lebih komprehensif dalam upaya pengembangan pangan fortifikasi untuk penanggulangan anemia defisiensi besi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Prasetiya Mulya atas dukungan institusional yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Penulis juga menyampaikan apresiasi kepada Ibu Rike Tri Kumala Dewi dan Ibu Dwining Putri Elfriede atas arahan dan masukan konstruktif selama proses penyusunan artikel ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Amin, F. (2021). Fortifikasi dan Ketersediaan Zat Besi pada Pangan Berbasis Kedelai Menggunakan Fortifikan Biji Wijen. *Jurnal Kartika Kimia*, 4(2), 8. <https://doi.org/10.26874/jkk.v4i2.91>
- Correnti, M., Gammella, E., Cairo, G., & Recalcati, S. (2024). Iron Absorption: Molecular and Pathophysiological Aspects. *Metabolites*, 14(4), 228. <https://doi.org/10.3390/metabo14040228>
- Doumani, N., Severin, I., Dahbi, L., Bou-Maroun, E., Tueni, M., Sok, N., Chagnon, M.-C., Maalouly, J., & Cayot, P. (2020). Lemon Juice, Sesame Paste, and Autoclaving Influence Iron Bioavailability of Hummus: Assessment by an In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Model. *Foods*, 9(4), 474. <https://doi.org/10.3390/foods9040474>
- Hurrell. (2004). Phytic Acid Degradation as a Means of Improving Iron Absorption. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74(6), 445–452. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.74.6.445>
- K. Khoja, K., Buckley, A., F. Aslam, M., A. Sharp, P., & Latunde-Dada, G. O. (2020a). In Vitro Bioaccessibility and Bioavailability of Iron from Mature and Microgreen Fenugreek, Rocket and Broccoli. *Nutrients*, 12(4), 1057. <https://doi.org/10.3390/nu12041057>
- K. Khoja, K., Buckley, A., F. Aslam, M., A. Sharp, P., & Latunde-Dada, G. O. (2020b). In Vitro Bioaccessibility and Bioavailability of Iron from Mature and Microgreen Fenugreek, Rocket and Broccoli. *Nutrients*, 12(4), 1057. <https://doi.org/10.3390/nu12041057>
- Kittisakmontri, K., Lanigan, J., Sangcakul, A., Tim-Aroon, T., Meemaew, P., Wangaeattachon, K., & Fewtrell, M. (2021). Comparison of 24-Hour Recall and 3-Day Food Records during the Complementary Feeding Period in Thai Infants and Evaluation of Plasma Amino Acids as Markers of Protein Intake. *Nutrients*, 13(2), 653. <https://doi.org/10.3390/nu13020653>
- Kose, T., De Bie, T., Wang, R., Eilander, A., Wanders, A. J., & Sharp, P. A. (2025). The effect of fortification on in vitro iron and zinc bioavailability in plant-based meat alternatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 146, 107951. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.107951>
- Latunde-Dada, G. O., Kajarabille, N., Rose, S., Arafsha, S. M., Kose, T., Aslam, M. F., Hall, W. L., & Sharp, P. A. (2023). Content and Availability of Minerals in Plant-Based Burgers Compared with a Meat Burger.

- Nutrients*, 15(12), 2732.  
<https://doi.org/10.3390/nu15122732>
- Nemeth, E., & Ganz, T. (2021). Hcpidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6493. <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>
- Piskin, E., Cianciosi, D., Gulec, S., Tomas, M., & Capanoglu, E. (2022). Iron Absorption: Factors, Limitations, and Improvement Methods. *ACS Omega*, 7(24), 20441–20456. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01833>
- Subroto, E., Indiarso, R., & Andoyo, R. (2023). Bioavailability of iron and its potential to improve the immune system and wardoff COVID-19: A review. *Food Research*, 7(1), 76–92. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.7\(1\).701](https://doi.org/10.26656/fr.2017.7(1).701)
- Sulaiman, N., Givens, D. I., & Anitha, S. (2021a). A Narrative Review: In-vitro Methods for Assessing Bio-Accessibility/Bioavailability of Iron in Plant-Based Foods. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 727533. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.727533>
- Sulaiman, N., Givens, D. I., & Anitha, S. (2021b). A Narrative Review: In-vitro Methods for Assessing Bio-Accessibility/Bioavailability of Iron in Plant-Based Foods. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 727533. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.727533>
- Wilson, J. W., Thompson, T. W., Wei, Y., Chaparro, J. M., Stull, V. J., Nair, M. N., & Weir, T. L. (2024). Comparison of the In Vitro Iron Bioavailability of Tempeh Made with *Tenebrio molitor* to Beef and Plant-Based Meat Alternatives. *Nutrients*, 16(16), 2756. <https://doi.org/10.3390/nu16162756>
- Zhou, H., Tan, Y., & McClements, D. J. (2023). Applications of the INFOGEST In Vitro Digestion Model to Foods: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*, 14(1), 135–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235>