

RESPON PERUBAHAN MORFOLOGI VILLI DAN KRIPTA ILEUM TERHADAP PEMBERIAN KOMBUCHA DAUN SIRSAK, BUNGA TELANG, DAN KOMBINASI KEDUANYA

Anggie Wiarvela Tuzerina Nuraini, Aris Rosidah, Dini Sri Damayanti*

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Kombucha merupakan minuman probiotik yang diketahui meningkatkan fungsi penyerapan usus. Senyawa aktif yang ditemukan pada daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan bunga telang (*Clitoria ternatea*) dikenal memiliki berbagai manfaat, serta kombinasi keduanya memiliki efek sinergis sebagai antibakteri dan antioksidan, namun efeknya terhadap penyerapan usus belum banyak diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombucha daun sirsak, bunga telang, dan kombinasi keduanya terhadap perubahan rasio antara tinggi usus dan kedalaman kript ileum sebagai indikasi tingkat penyerapan usus.

Metode: Mencit Galur BALB/c berjumlah 24 ekor dirandomisasi menjadi empat kelompok, yaitu K0 (aquades), K1 (kombucha daun sirsak), K2 (kombucha bunga telang), dan K3 (kombucha kombinasi) diberikan kombucha $\pm 0,7$ cc/hari per sonde lambung selama satu bulan. Pada akhir perlakuan, mencit dikorbankan dengan pembedahan untuk diambil sampel usus ileum. Preparasi histologi ileum dilakukan menggunakan metode parafin dan pewarnaan dengan HE (Hematoxylin Eosin), diukur rasio villi/kripta dengan melihat panjang villi dan kedalaman kript menggunakan mikroskop dotSlide pada pembesaran 200x dan aplikasi Miconos Image Raster 3. Analisis data dilakukan menggunakan One Way Analysis of Variance (ANOVA) dan uji *Post-Hoc* Tukey dengan taraf signifikansi $p < 0,05$.

Hasil: Rasio villi/kripta kelompok K1, K2, dan K3 memiliki perbedaan yang signifikan dibanding K0 ($p < 0,05$) dalam meningkatkan rasio villi/kripta ileum. Kelompok K1 dan K2 tidak memiliki perbedaan yang signifikan dalam meningkatkan rasio, namun keduanya memiliki rasio yang signifikan lebih baik dibanding K0 dan K3 dalam meningkatkan rasio villi/kripta ileum ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombucha kombinasi keduanya memiliki pengaruh terhadap morfologi villi dan kript ileum. Penggunaan kombucha tunggal memiliki hasil lebih baik dibandingkan kombinasi. Hasil yang paling baik ditemukan pada perlakuan kombucha daun sirsak dengan rasio villi/kripta tertinggi.

Kata Kunci: Kombucha, Daun Sirsak, Bunga Telang, Panjang villi, Kedalaman Kripta.

*Korespondensi:

Dr.dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes

Alamat: Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

E-mail : dinisridamayanti@unisma.ac.id

MORPHOLOGICAL CHANGES RESPONSE OF VILLI AND CRYPTS SMALL INTESTINE TO ADMINISTRATION KOMBUCHA OF SOURSOP LEAVES, BUTTERFLY PEA FLOWERS, AND THE COMBINATION OF BOTH

Anggie Wiarvela Tuzerina Nuraini, Aris Rosidah, Dini Sri Damayanti*

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Kombucha is a probiotic beverage known to enhance intestinal absorption function. Active compounds found in soursop leaves (*Annona muricata L.*) and butterfly pea flowers (*Clitoria ternatea*) are known to have various benefits, and the combination of both has synergistic effects as antibacterial and antioxidants, but their effects on intestinal absorption are not well-known. This study aimed to determine the influence of administering soursop kombucha, butterfly pea kombucha, and their combination on the changes in the ratio between intestinal height and ileum crypt depth as an indication of intestinal absorption level.

Methods: Twenty-four Galur BALB/c mice were randomized into four groups, namely K0 (aquadest), K1 (soursop leaf kombucha), K2 (butterfly pea flower kombucha), and K3 (combination of both). Mice given kombucha ± 0.7 cc/day through the stomach tube for one month. At the end of treatment, the mice were sacrificed by surgery to take ileum samples. Ileum histology preparations were performed using the paraffin method and staining with HE (Hematoxylin Eosin). The villi/crypt ratio was measured by observing the villi length and crypt depth using a dotSlide microscope with 200x magnification and Miconos Image Raster 3 application. Data analysis was performed using One Way Analysis of Variance (ANOVA) and Post-Hoc Tukey test with a significance level of $p < 0.05$.

Results: The villi/crypt ratio of groups K1, K2, and K3 showed a significant difference compared to K0 ($p < 0.05$) in improving the villi/crypt ratio of the ileum. Groups K1 and K2 did not have a significant difference in improving the ratio, but both had significantly better ratios compared to K0 and K3 in enhancing the villi/crypt ratio of the ileum ($p < 0.05$).

Conclusion: Soursop kombucha, butterfly pea kombucha, and their combination have an influence on the morphology of ileum villi and crypts. The use of a single kombucha better results compared to a combination. The best results were found in the treatment with soursop kombucha, which showed the highest villi/crypt ratio.

Keywords: Kombucha, Soursop Leaf, Butterfly Pea Flower, Villi Length, Crypt Depth.

*Correspondence:

Dr.dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes

Address: Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

E-mail : dinisridamayanti@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Kombucha merupakan produk minuman hasil fermentasi teh dan sukrosa oleh *Symbiotic Culture Bacteria and Yeast* (SCOBY)¹. Kombucha sebagai probiotik diketahui memiliki berbagai manfaat untuk kesehatan, seperti produksi zat antimikroba (asam organik, diasetil, bakteriosin, antibiotik dan hidrogen peroksida)², modulasi sistem imun, menyeimbangkan mikrobiota usus, dan mempertahankan fungsi penghalang epitel usus (*intestinal barrier*)^{3,4}. Usus memainkan peran penting dalam tubuh, seperti penyerapan nutrisi. Mukosa tempat penyerapan nutrisi terdiri dari sel-sel lapisan epitel dan struktur absorptif disebut "villi" dan "kripta". Villi adalah struktur seperti jari yang menonjol ke dalam lumen usus dan di setiap sisi villi terdapat kripta, yaitu struktur invaginasi epitel³. Villi yang panjang dengan kedalaman kripta yang dangkal menunjukkan kapasitas absorpsi yang tinggi. Ukuran panjang villi berkorelasi positif dengan luasnya bidang penyerapan^{5,6} dan kripta yang semakin dangkal menunjukkan peningkatan aktivitas enzimatis dari usus kecil yang mempengaruhi kemampuan penyerapan⁷.

Kombucha terdiri dari sejumlah asam organik, purin, vitamin, gula, lipid, protein, etanol, kafein, polifenol, anion, mineral, D-saccharic acid-1, 4-lactone (DSL), amina biogenik, asam amino, beberapa enzim hidrolitik, dan dominasi bakteri metabolit meliputi bakteri asetat (seperti *Komagataeibacter sp.* dan *Gluconobacter sp.*), bakteri asam laktat (seperti *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.* atau *Lecunosctoc sp.*)^{2,8}.

Bakteri asam laktat dan kandungan asam amino dapat mempengaruhi perubahan morfologi dari villi usus. Bakteri asam laktat menghasilkan SCFA sebagai produk akhir dari degradasi gula dan *non-digestible carbohydrate* sebagai metabolismenya. SCFA dalam tubuh diproduksi oleh mikrobiota intestinal terbanyak di terminal ileum dan descending kolon⁹. SCFA akan berikatan dengan reseptor GPCR dan memberikan respon sekresi GLP-2 yang berperan sebagai faktor pertumbuhan spesifik sel epitel usus. Sedangkan, asam amino akan diserap melalui transporter yang ada di membran epitel usus dengan ekspresi gen mRNA SLC6A19 yang mana diketahui berkorelasi positif terhadap perubahan panjang villi usus^{1,9}.

Produk kombucha umumnya berbasis

daun teh (*Camellia sinensis*). Namun, bahan tersebut dapat digantikan dengan bahan dasar lain seperti daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dan bunga telang (*Clitoria ternatea*) yang sudah banyak digunakan sebagai salah satu bahan herbal yang aman dikonsumsi. Senyawa aktif pada bunga telang meliputi flavonoid, tanin, saponin, antosianin, serta fenol¹⁰. Senyawa aktif yang dapat ditemukan pada daun sirsak seperti annonaceous acetogenin, polifenol, flavonoid, saponin, dan tanin. Senyawa aktif pada kedua tanaman tersebut diketahui dapat bermanfaat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, dan antidiabetes^{6,11}. Beberapa uji yang telah dilakukan membuktikan bahwa penggunaan kombinasi keduanya memiliki efek sinergis sebagai antibakteri dan antioksidan^{12,13}, namun belum diketahui pengaruhnya terhadap morfologi villi usus.

Penelitian dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombinasi keduanya terhadap kemampuan penyerapan usus melalui pengukuran rasio panjang villi usus dengan kedalaman kripta ileum.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian laboratorium secara *in vivo* menggunakan desain post-test control only group. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2022 hingga Februari 2023.

Pernyataan Etik

Protokol eksperimental telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (No. 050/LE.001/X/04/2022).

Penentuan Sampel Hewan Coba

Sampel populasi penelitian menggunakan hewan coba mencit galur BALB/c jantan berumur 8 minggu dengan bobot badan 20-25 gr. Jumlah sampel ditentukan dengan rumus Federer¹⁴:

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

n = jumlah sampel hewan uji; t = jumlah kelompok

didapatkan jumlah populasi 24 ekor mencit dari perhitungan untuk empat kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari enam ekor per kelompok.

Pengambilan Bahan Dasar Kombucha

Sampel simplisia daun sirsak (*Annona muricata* Linn) didapatkan dari Unit Pelaksana Teknis (UPT) Materia Medika Batu, simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea*) dari Rosellaku, dan Kultur SCOBY dari natsilver.

Perawatan Hewan Coba

Mencit diaklimatisasi selama 2 minggu, kemudian dirandomisasi menjadi 4 kelompok yaitu K0 (kelompok kontrol), K1 (kelompok daun sirsak), K2 (kelompok bunga telang), dan K3 (kelompok kombinasi). Pencahayaan diberikan selama 12 jam, dengan suhu ruangan 18-26°C, dan sirkulasi udara yang baik. Mencit diberi jenis pakan PARS 15% dari berat badan ± 3 gr. Pemberian minum berupa aquadest secara *ad libitum*. Pemberian kombucha dilakukan secara *per os* selama satu bulan dengan volume $\pm 0,7$ cc/hari pada pagi hari.

Pembuatan Kombucha

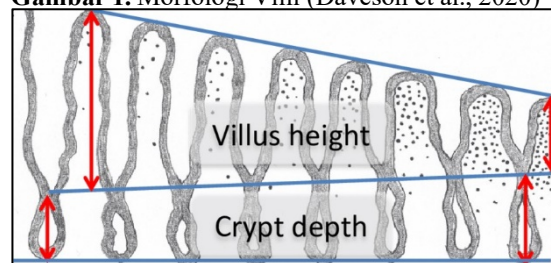
Kombucha daun sirsak dibuat dengan langkah awal merebus 1000 mL air. Gula 100g dan kantong teh berisi 12g simplisia daun sirsak dimasukkan kedalam air yang mendidih selama 4 menit, kemudian disaring dan ditunggu hingga dingin. Air yang sudah dingin dimasukkan kedalam jar kaca. Setelah itu, stater kombucha cair 30 ml SCOBY ditambahkan dan jar ditutup dengan kain katun serta diikat dengan karet. Hal yang sama dilakukan pada pembuatan kombucha bunga telang dan kombucha kombinasi, namun untuk kombucha kombinasi dibuat dengan menggunakan satu kantong 6g simplisia daun sirsak dan satu kantong teh 6g simplisia bunga telang. Fermentasi dilakukan selama 14 hari pada suhu ruang dan terhindar dari sinar matahari secara langsung¹⁵.

Pengamatan Histologi Ileum

Sampel histologi adalah bagian ileum mencit yang diambil sepanjang 4 cm sebelum bagian ileocecal valve¹⁶. Preparat histologi dibuat dengan metode parafin dan staining menggunakan pewarna H&E (Hematoxylin & Eosin). Pengamatan preparat histologi meliputi panjang villi dan kedalaman kriptas yang dilihat

menggunakan mikroskop *dotSlide* pada pembesaran 200x dengan ketentuan panjang villi ditentukan dengan mengukur jarak vertikal dari ujung villi sampai persimpangan villi dan kedalaman kriptas dengan mengukur jarak vertikal dari persimpangan villi kriptas sampai batas terbawah kriptas seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 1**^{17,18}. Hanya villi berbentuk jari penuh dan berorientasi baik yang digunakan. Morfologi usus pada preparat yang terlihat sesuai kriteria dilakukan pemotretan. Pengukuran panjang villi dan kedalaman kriptas dilakukan menggunakan mikroskop *dotSlide* dan aplikasi Miconos Image Raster 3 dalam settingan satuan panjang μm pada lima lapang pandang setiap preparat^{19,20}.

Gambar 1. Morfologi Villi (Daveson et al., 2020)



Keterangan: Morfologi tinggi villi dan kedalaman kriptas usus.

Teknik Analisis Data

Data yang didapatkan diolah dengan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) edisi 22 dengan uji homogenitas serta normalitas. Setelah data terdistribusi homogen dan normal ($p > 0,05$), dilakukan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dan kemudian dilanjutkan uji *Post-Hoc* Tukey dengan signifikansi $p < 0,05$ ²¹.

HASIL DAN ANALISIS DATA

Pada **Tabel 1** disajikan data panjang villi, kedalaman kriptas, dan rasio villi/kriptas mencit kelompok perlakuan kombucha dari hasil pengukuran yang diperoleh dari **Gambar 2**. Panjang villi pada kelompok K1 memiliki perbedaan yang signifikan dengan K0, K1, dan K2. Mencit kelompok kombucha sirsak memiliki villi yang paling tinggi sebesar 518.15 ± 75.78 dibandingkan kelompok lainnya dengan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Hasil pengukuran kedalaman kriptas menunjukkan kelompok K1 memiliki kriptas yang dangkal sebesar 251.33 ± 33.19 . Nilai ini memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan kelompok K2 ($p = 0.251 > 0,05$) dengan kedalaman kriptas sebesar 220.85 ± 51.13 dan

K3 ($p = 0.454 > 0,05$) sebesar 275.55 ± 84.40 . Kripta yang paling dalam ditemukan pada kelompok K0 sebesar 339.47 ± 72.69 yang memiliki perbedaan signifikan dibanding kelompok perlakuan lainnya.

Rasio villi/kripta kelompok K1

memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan K2 ($p = 0.305 > 0,05$), namun keduanya memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok K0 dan K3. Rasio villi/kripta tertinggi ditemukan pada kelompok K1 sebesar 2.09 ± 0.51 .

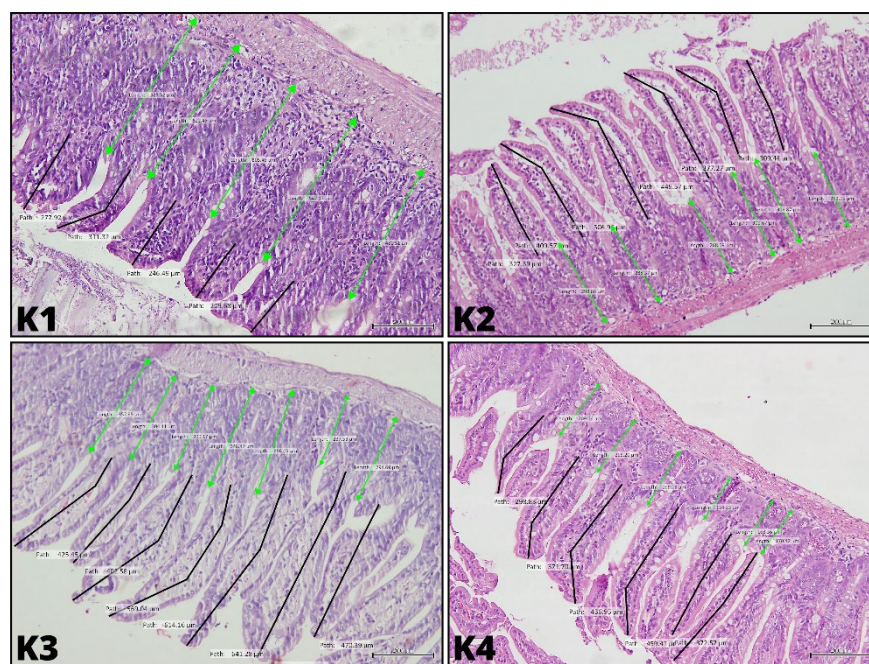
Tabel 1. Data panjang villi, kedalaman kripta, dan rasio villi/kripta mencit (Mean $\pm$ SD) yang diberikan kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombucha kombinasi keduanya.

Variabel	Ketinggian Villi (μm) (Mean $\pm$ SD)	Kedalaman Kripta (μm) (Mean $\pm$ SD)	Rasio panjang villi/kedalaman kripta (μm) (Mean $\pm$ SD)
K0 (KONTROL)	361.93 ± 93.87^a	339.47 ± 72.69^c	1.13 ± 0.43^a
K1 (SIRSAK)	518.15 ± 75.78^b	251.33 ± 33.19^{ab}	2.09 ± 0.51^c
K2 (TELANG)	404.47 ± 51.13^a	220.85 ± 51.13^a	1.89 ± 0.40^c
K3 (KOMBINASI)	402.07 ± 80.60^a	275.55 ± 84.40^{ab}	1.55 ± 0.46^b

Keterangan: K0= Aquades, K1 = kombucha daun sirsak, K2 = kombucha bunga telang, dan K3= Kombucha kombinasi daun sirsak-bunga telang.

^{a-c} Perbedaan notasi pada nilai di kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$.

Gambar 2. Hasil Pengukuran Morfologi Panjang villi dan Kedalaman Kripta



Keterangan: Struktur histologi ileum mencit dengan pewarnaan HE dilihat pada perbesaran 200x. K0 (kelompok kontrol), K1 (kelompok daun sirsak), K2 (kelompok bunga telang), dan K3 (kelompok kombinasi).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kombucha memiliki pengaruh terhadap perubahan morfologi villi dan kripta mencit perlakuan kombucha daun sirsak, bunga telang, dan kombinasi keduanya. Pertumbuhan villi didapatkan pada semua kelompok kombucha. Mencit kelompok kombucha sirsak memiliki villi paling tinggi

dibanding kelompok kontrol, kombucha sirsak, dan kombinasi. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya senyawa aktif, seperti flavonoid pada daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dan bunga telang (*Clitoria ternatea*). Daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) mengandung *kaempferol*, *procyanidins*, *catechin*, serta *quercetin* dan bunga telang (*Clitoria ternatea*) mengandung *ternatin*, *rutin*, *quercetin*, serta

serta *quercetin* dan bunga telang (*Clitoria ternatea*) mengandung *ternatin*, *rutin*, *quercetin*, serta *myricetin*. Hal ini didukung oleh studi yang dilakukan Prakatur *et al.*, (2019) dan Prihambodo *et al.*, (2021) bahwa flavanoid memiliki pengaruh terhadap perubahan morfologi villi dan kriptas ileum^{22,23}.

Perubahan morfologi dari villi dan kriptas dapat dipengaruhi oleh bakteri asam laktat dalam kombucha. Hal ini didukung oleh penelitian Ariyadi dan Harimurti (2015) bahwa bakteri asam laktat mampu menstimulasi proliferasi sel epitel sehingga mempengaruhi struktur dari villi dan kriptas²⁴. Bakteri asam laktat menghasilkan SCFA sebagai produk akhir dari degradasi gula dan *non-digestible carbohydrate* sebagai metabolisminya. SCFA akan berikatan dengan reseptor GPCR dan memberikan respon sekresi GLP-1 dan GLP-2. GLP-2 ini memiliki peran sebagai faktor pertumbuhan spesifik sel epitel usus^{1,9}.

Perbedaan rasio villi/kriptas dapat dipengaruhi dari kandungan asam amino kombucha. Penelitian Shazali *et al.*, (2019) membuktikan bahwa terdapat pengaruh suplementasi asam amino terhadap perubahan ratio villi dan kriptas²⁵. Leusin dan isoleusin merupakan konsentrasi asam amino tertinggi pada SCOBY dalam kombucha. Asam amino tersebut akan meningkat seiring waktu fermentasi. Penyerapan asam amino dalam tubuh bergantung pada transporter yang ada pada membran sel epitel usus (enterosit), salah satunya yang berperan adalah SLC6A19. SLC6A19 adalah gen yang mengkode protein B⁰AT1 dimana berperan aktif dalam transport asam amino netral seperti leusin dan isoleusin ke membran apikal sel epitel. mRNA SLC6A19 semakin meningkat dari duodenum ke ileum dan ekspresi mRNA SLC6A19 meningkat sepanjang sumbu kriptas-villus di usus kecil^{1,26,27}. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Wang *et al.*, (2020) dimana ekspresi dari mRNA SLC6A19 berkorelasi positif dengan panjang villi di ileum.

Rasio villi/kriptas kelompok kombucha kombinasi lebih rendah dengan villi yang lebih pendek dan kriptas yang lebih dalam dibanding kombucha daun sirsak dan bunga telang. Rasio yang lebih rendah berkorelasi dengan rendahnya jumlah sel absorbtif dan banyaknya sel sekretori yang berperan dalam sekresi musin. Musin merupakan struktur glikoprotein dan polisakarida yang menjadi garis pertahanan pertama usus yang disintesis dan disekresikan

oleh sel goblet di kriptas^{16,28,29}. Aktivitas percampuran senyawa daun sirsak dan bunga telang dalam kombucha kombinasi juga mungkin mempengaruhi perbedaan rasio. Interaksi dari berbagai senyawa aktif pada kombinasi dapat menunjukkan efek sinergis, aditif, atau antagonis. Kombinasi efek yang berbeda dapat menurunkan aktivitas senyawa aktif³⁰. Selain itu, proses pembuatan juga terlibat dalam mempengaruhi rasio villi/kriptas. Flavanoid diketahui memiliki pengaruh menstimulasi pertumbuhan villi intestinal, namun flavonoid memiliki sifat tidak tahan suhu tinggi diatas 50°C³¹. Flavanoid terkandung dalam daun sirsak dan bunga telang, keduanya dalam proses pembuatan dimasukkan ke dalam air yang mendidih sehingga hal ini mungkin mengurangi efektivitas dari kombucha dalam memengaruhi tinggi villi.

Rasio villi/kriptas pada kelompok mencit perlakuan kombucha sirsak dengan kombucha bunga telang memiliki perbedaan yang tidak signifikan, namun keduanya memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kombucha kombinasi. Hal ini menunjukkan bahwa kombucha daun sirsak dan kombucha bunga telang memiliki efektivitas yang hampir sama dalam mempengaruhi panjang villi dan kriptas pada usus, tetapi efektivitas keduanya berbeda jika dibandingkan dengan kombucha kombinasi. Pada penelitian yang dilakukan Wang *et al.*, (2020), aktivitas enzim digestif diantara brush border akan meningkat seiring dengan semakin memanjangnya villi. Rasio villi yang tinggi berbanding lurus dengan tingginya kemampuan usus dalam absorpsi nutrisi^{21,32}.

KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombucha kombinasi keduanya memiliki pengaruh terhadap morfologi villi dan kriptas intestinal. Hasil yang paling baik ditemukan pada perlakuan kombucha daun sirsak dengan rasio villi/kriptas tertinggi.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang luas permukaan penyerapan usus dengan mempertimbangkan ukuran dari panjang villi, kedalaman kriptas, lebar basal villi, dan lebar apikal villi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada kedua orang tua, laboran FK UNISMA dan FK UB, serta dalam membantu jalannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H. & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*, **16**(1): 390–399.
2. Bogdan, M. *et al.* (2018). Lactic acid bacteria strains isolated from kombucha with potential probiotic effect. *Rom. Biotechnol. Lett*, **23**(3): 13592–13597.
3. Heak, C., Sukon, P., Kongpechr, S., Tengjaroenkul, B. & Chuachan, K. (2017). Effect of direct-fed microbials on intestinal villus height in broiler chickens: A systematic review and meta-analysis of controlled trials. *International Journal of Poultry Science*, **16**(10): 403–414.
4. Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llrente, C. & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of nutrition & metabolism*, **61**(2): 160–174.
5. Ramadhan, R. A., Widodo, E. & Sjoefjan, O. (2022). Pengaruh penambahan ekstrak kunyit (*Curcuma longa* Linn) pada perkembangan dan histopatologi usus halus pada puyuh petelur. *Jurnal Nutrisi Ternak Tropis*, **5**(2): 115–124.
6. Fard, S. H., Toghyani, M. & Tabeidian, S. A. (2014). Effect of oyster mushroom wastes on performance, immune responses and intestinal morphology of broiler chickens. *Int. J. Recycl. Org. Waste. Agricult*, **3**(4): 141–146.
7. Nguyen, D. T. N. *et al.* (2021). Relationship between the ratio of villous height: crypt depth and gut bacteria counts as well production parameters in broiler chickens. *The Journal of Agriculture and Development*, **20**(3): 1–10.
8. Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D. & Thompson-Witrick, K. A. Preprint at <https://doi.org/10.3390/beverages8030045> (2022). Chemical Composition of Kombucha. *Beverages* vol.
9. Hee, B. van der & Wells, J. M. (2021). Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids. *CelPress: Trends in Microbiology*, **29**(8): 700–712.
10. Makasana, J., Dholakiya, B. Z., Gajbhiye, N. A. & Raju, S. (2017). Extractive determination of bioactive flavonoids from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Linn.). *Res Chem Intermed*, **43**(2): 783–799.
11. Husnayain, K. I., Sukohar, A. & Susantiningsih, T. (2014). The utilization of ethanol extract of the soursop leaves (*Annona muricata* L.) as breast cancer chemopreventive. *Jurnal Agromedicine*, **1**(1): 72–76.
12. Putri, N. M., Slamet, N. S., Wicita, P. S. & Imran, A. K. (2021). Granul effervescent kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*) dan jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) sebagai alternatif minuman kesehatan. *Journal of Experimental and Clinical Pharmacy*, **1**(1): 16–23.
13. Rikantara, F. S., Utami, M. R. & Kasasiah, A. (2022). Aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan metode DPPH. *Lambung Farmasi*, **3**(2): 124–133.
14. Akmal, M. *et al.* (2022). Studi gambaran histologi, histomorfometri dan histokimia sebaran glikogen pada otot dada dan paha ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*) periode sebelum dan setelah menetas. *JURNAL ILMIAH MAHASISWA VETERINER*, **6**(3):.
15. Wistiana, D. & Zubaidah, E. (2015). KARAKTERISTIK KIMIAWI DAN MIKROBIOLOGIS KOMBUCHA DARI BERBAGAI DAUN TINGGI FENOL SELAMA FERMENTASI *Chemical and Microbiological Characteristics of Kombucha from Various High Leaf Phenols During Fermentation. Jurnal Pangan dan Agroindustri* vol.
16. Nguyen, D. T. N. *et al.* (2021). Relationship between the ratio of

- villous height: crypt depth and gut bacteria counts as well production parameters in broiler chickens. *The Journal of Agriculture and Development*, **20**(3): 1–10.
17. Sudira, I. W., Puja, I. K., Junaedi, I. P. & Merdana, I. M. (P4IPVI, 2018). Small intestinal morphology cross yorkshire landrace pigs by multiple strains probiotics. in *Veterinary medicine* vol. 1–5.
 18. Iji, P. A., Hughes, R. J., Choct, M. & Tivey, D. R. (2001). Intestinal structure and function of broiler chickens on wheat-based diets supplemented with a microbial enzyme. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **14**(1): 54–60.
 19. Harimurti, S. & Rahayu, E. S. (2009). Morfologi usus ayam broiler yang disuplementasi dengan probiotik strain tunggal dan campuran. *AGRITECH*, **29**(3): 180–182.
 20. Handayani, T., Witjaksono & Nugraheni, K. U. (2017). Induksi tetraploid pada tanaman jambu biji merah (*Psidium guajava* L.) secara in vitro. *Jurnal Biologi Indonesia*, **13**(2): 271–278.
 21. Zulfa, H. A. *et al.* (2021). Efek ekstrak etanolik jamur kuping pada performa pertumbuhan dan morfologi usus halus ayam jawa super. *Jurnal Veteriner*, **22**(2): 237–245.
 22. Prihambodo, T. R. *et al.* (2021). Effects of dietary flavonoids on performance, blood constituents, carcass composition and small intestinal morphology of broilers: a meta-analysis. **34**(3): 434–442.
 23. Prakatur, I. *et al.* (2019). Intestinal morphology in broiler chickens supplemented with propolis and bee pollen. *Animals : an open access journal from MDPI*, **9**(6):.
 24. Ariyadi, B. & Harimurti, S. (2015). Effect of Indigenous Probiotics Lactic Acid Bacteria on the Small Intestinal Histology Structure and the Expression of Mucins in the Ileum of Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science*, **14**(5): 276–278.
 25. Shazali, N., Loh, T. C., Foo, H. L. & Samsudin, A. A. (2019). Gut microflora and intestinal morphology changes of broiler chickens fed reducing dietary protein supplemented with lysine, methionine, and threonine in tropical environment. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **48**.
 26. Sari, R., Bintari, Y. R. & Damayanti, D. S. (2021). Pengaruh variasi konsentrasi sukrosa terhadap derajat keasaman dan total bakteri asam laktat kombucha daun sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Kedokteran Komunitas*, **10**(1): 1–5.
 27. Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z. & Li, L. (2017). The human microbiota in health and disease. *Engineering*, **3**(1): 71–82.
 28. Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K. & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, **153**(1–2): 216–222.
 29. Duangnumsawang, Y., Zentek, J. & Goodarzi Boroojeni, F. (2021). Development and Functional Properties of Intestinal Mucus Layer in Poultry. *Frontiers in Immunology*, **12** 3924.
 30. Syahrir, N. H. A., Afendi, F. M. & Susetyo, B. (2016). Intestinal morphology in broiler chickens supplemented with propolis and bee pollen. *Jurnal Jamu Indonesia*, **1**(1): 35–46.
 31. Yuliantari, N. W. A., Widarta, I. W. R. & Permana, I. D. G. M. (2017). Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi terhadap kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan daun sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan ultrasonik. *Scientific Journal of Food Technology*, **4**(1): 35–42.
 32. Wang, M. *et al.* (2020). The relationship between villous height and growth performance, small intestinal mucosal enzymes activities and nutrient transporters expression in weaned piglets. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, **104**(2): 606–615.
 33. Daveson, A. J. M. *et al.* (2020). Baseline quantitative histology in therapeutics trials reveals villus atrophy in most patients with coeliac disease who appear well controlled on gluten-free diet. *GastroHep*, **2**(1): 22–30.