

AKTIVITAS BIOLOGIS TEPUNG BIJI TERATAI PRA-MASAK SEBAGAI PRODUK PANGAN PENCEGAH DIARE

Biological Activity of Pre-Cooked Waterlily Seeds Flour as a Food Product Preventing Diarrhea

Yuspihana F^{1*}, Rita Khairina¹, Ika K. Oktavianti²

¹Jurusan Pengolahan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan Universitas Lambung Mangkurat

²Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat

Diterima 19 Maret 2012/Disetujui 24 September 2012

Abstract

Raw waterlily seeds are known to have activity to prevent diarrhea. It has been proven through testing both in vitro and in vivo against *E. coli* K1.1 Enteropathogenic (EPEC), the bacteria that causes diarrhea. This study aimed to determine the biological activity of pre-cooked waterlily seed flour as the prevention of diarrhea through in vivo testing. Results showed that mice fed a ransum substituted with waterlily seed flour and intervened with EPEC had an increased in body weight 25% lower compared with controls, as well as a declining in fecal water content average of 2% a day after the EPEC intervention was stopped. Rationing followed by EPEC intervention did not increase the number of microbes, causing reduction in the number of *E. coli*, and did not cause a decrease in lactic acid bacteria (LAB). Rationing waterlily seed flour shown to inhibit inflammation in the intestinal villi, preventing necrosis of the intestinal mucosa cell (jejunum), reduce inflammation, and prevent adhesion of *E. coli* in the intestinal mucosa.

Key words: diarrhea, EPEC, jejunum, waterlily seeds pre-cooked flour

Abstrak

Biji teratai mentah diketahui memiliki aktivitas untuk mencegah diare. Hal tersebut telah dibuktikan melalui pengujian baik secara in vitro maupun in vivo terhadap *E. coli* Enteropatogenik K1.1 (EPEC), bakteri penyebab diare. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas biologis tepung biji teratai pra masak sebagai pencegah diare melalui uji in vivo. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tikus yang diberi ransum yang disubstitusi dengan tepung biji teratai dan diintervensi dengan EPEC mengalami kenaikan bobot badan 25% lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, juga terjadi penurunan kadar air feses rata-rata 2% sehari setelah intervensi EPEC dihentikan. Pemberian ransum tersebut yang diikuti dengan intervensi EPEC tidak meningkatkan jumlah mikroba, menyebabkan penurunan jumlah *E. coli*, serta tidak menyebabkan penurunan bakteri asam laktat (BAL). Pemberian ransum yang disubstitusi tepung biji teratai terbukti dapat menghambat terjadinya peradangan pada vili usus, mencegah nekrosis pada mukosa usus, mengurangi inflamasi, dan mencegah melekatnya *E. coli* pada mukosa usus.

Kata kunci: biji teratai, diare, EPEC, jejunum, pra masak

PENDAHULUAN

Teratai merupakan tanaman air yang banyak tumbuh secara alami di perairan rawa dan sungai yang tidak begitu dalam dan berair tenang. Bagian tanaman teratai yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan makanan

adalah bunga, biji, batang dan umbinya, akan tetapi yang paling banyak dimanfaatkan oleh penduduk, terutama di daerah Hulu Sungai Utara Kalimantan Selatan, adalah bijinya. Biji teratai oleh penduduk setempat dijadikan sebagai sumber karbohidrat pengganti beras saat paceklik ataupun tepung untuk membuat kue. Biji teratai yang dijual di pasar adalah biji kering yang sudah dikupas kulitnya.

*Korespondensi: Jl. Batu Piring No. 25 Banjarmasin,
Telp. +628157747377 email: yuspis@yahoo.com

Potensi rawa di Kalimantan Selatan sangat memungkinkan biji teratai dijual di pasar tradisional dengan harga yang hampir sama dengan beras.

Biji teratai merupakan sumber karbohidrat (78% bk), kadar proteinnya relatif tinggi (9% bk) dan asam amino esensial yang lengkap, kadar lemaknya yang rendah dengan asam lemak utamanya adalah linoleat dan stearat. Kadar serat biji teratai yang tinggi merupakan sumber serat yang baik (Khairina dan Fitriani 2002).

Hasil penelitian sebelumnya membuktikan bahwa biji teratai memiliki aktivitas antidiare, baik secara *in vitro* maupun *in vivo* terhadap *E. coli* Enteropatogenik K.1.1 (EPEC) penyebab diare dan *Salmonella typhimurium* (Fitriani et al. 2008; Fitriani et al. 2012). Biji teratai mampu mencegah terjadinya diare akibat EPEC K.1.1 setelah dikonsumsi selama dua minggu dengan kadar per hari 1,87 g tepung biji teratai atau \approx 13,23 mg/g bobot badan tikus percobaan. Biji teratai juga dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri asam laktat pada tikus percobaan karena mengandung rafinosa yang diketahui mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri asam laktat, dengan demikian diduga biji teratai memiliki potensi sebagai sumber prebiotik.

Pengembangan biji teratai menjadi produk tepung pra masak dan kajian aktivitas biologisnya sebagai pencegah diare dilakukan sebagai upaya untuk memanfaatkannya sebagai pangan fungsional. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas biologis tepung biji teratai pra-masak sebagai pencegah diare.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Biji teratai dari jenis *Nymphaea pubescens* diperoleh dari daerah Hulu Sungai Utara, Kalimantan Selatan. Mikroba uji adalah *Escherichia coli* yang merupakan Enteropatogenik (EPEC) diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Tikus jantan jenis Sprague Dawley (140 \pm 5 g).

Bahan penyusun ransum terdiri atas kasein sebagai sumber protein yang digunakan dan minyak jagung sebagai sumber lemak. Mineral yang digunakan merupakan mineral mixed yang terdiri atas KI 0,79 g, NaCl 139,30 g, KH₂PO₄ 389,00 g, MgSO₄ anhidrat 53,702 g, CaCO₃ 381,40 g, FeSO₄.7H₂O 27,00 g, MnSO₄.2H₂O 4,01 g, ZnSO₄.7H₂O 0,55 g, CuSO₄.5H₂O 0,48 g dan CoCl₂.6H₂O 0,02 g. Air yang digunakan adalah air minum kemasan, sebagai sumber serat adalah selulosa dan vitamin yang digunakan adalah vitamin mixed (Vitamin A, B1, B2, B3, B6, B12, C, D3, E, Ca Panthotenat). Pati yang digunakan adalah pati jagung.

Media pertumbuhan mikroba yaitu Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), De Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA), Plate Count Agar (PCA), dan Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX). Pembuatan preparat histologi yaitu formaldehid (untuk fiksasi jaringan), alkohol, xylol, hematoksin, eosin, dan parafin.

Pengolahan tepung biji teratai pra-masak dilakukan dengan terlebih dahulu merendam biji teratai yang sudah dikupas kulitnya, dilanjutkan dengan pengukusan dan pengeringan lalu dihaluskan sehingga menjadi tepung.

Metode Penelitian

Analisis fitokimia

Analisis fitokimia dari biji teratai dan tepung biji teratai pra-masak, meliputi alkaloid, tanin, saponin, glikosida, flavonoid, triterpenoid dan steroid (Harborne 1987).

Pengujian aktivitas biologis tepung biji teratai

Pengujian secara *in vivo* dilakukan dengan tikus percobaan (jenis Sprague Dawley selama 28 hari) untuk mengevaluasi aktivitas biologis produk biji teratai. Pada tahap ini, tepung biji teratai disubstitusikan ke dalam ransum standar tikus percobaan (secara isokalori dan isonitrogen). Substitusi mempertimbangkan dosis tepung biji teratai mentah yang telah diketahui mampu mencegah diare pada

tikus percobaan pada penelitian sebelumnya, yaitu sebesar 0,187 g tepung biji teratai per g ransum atau setara dengan 13,23 mg/g bobot badan tikus percobaan. Pembuatan ransum standar mengikuti metode AOAC (1990) dengan kasein sebagai sumber protein ransum (10%). Tikus percobaan dibagi menjadi 3 grup tikus, yaitu grup tikus yang mendapat ransum standar (tidak diintervensi *E.coli*) (kontrol A), grup tikus yang mendapat ransum standar (diintervensi *E.coli*) (kontrol B), dan grup tikus yang mendapat ransum yang disubstitusi dengan tepung biji teratai pra-masak (diintervensi *E.coli*).

Pemberian ransum dilakukan dari hari ke-1 hingga ke-28 sebanyak 10 g/hari/ekor tikus percobaan. Perlakuan ransum yang diberikan adalah ransum standar (kontrol) dan ransum standar disubstitusi dengan tepung biji teratai pra-masak (secara isokalori dan isonitrogen).

Tikus percobaan diintervensi (dicekok) dengan *E. coli* pada konsentrasi sel tertentu (koloni/mL) yang sudah diketahui dari hasil penelitian sebelumnya yaitu 0,3 mL dari 10^6 cfu/mL *E.coli* agar terjadi diare pada tikus percobaan (Fitriah *et al.* 2012).

Evaluasi aktivitas biologis produk olahan biji teratai dilakukan dengan mengamati bobot badan tikus (setiap 4 hari), konsumsi ransum (setiap hari), kadar air feses, jumlah bakteri asam laktat (pada hari ke-0, 14, 21 dan 28), total mikroba (pada hari ke-0, 14, 21 dan 28), total *E. coli* feses (pada hari ke-0, 14, 21 dan 28), histopatologi dan sel inflamasi usus halus (jejunum) tikus percobaan (pada hari ke-0, 14, 21, 28). Pada hari ke-7 tidak dilakukan pengamatan karena berdasarkan hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian produk biji teratai dengan dosis yang diberikan tersebut selama 7 hari tidak menunjukkan adanya respon yang berbeda dibandingkan dengan kontrol (ransum standar).

Pengambilan contoh dilakukan terlebih dahulu dengan membius tikus percobaan dengan dietil eter, dan selanjutnya tikus

dibedah untuk diambil bagian ususnya. Pengamatan mikroba usus dilakukan dengan cara menggunting dinding sekum untuk dikeluarkan isi sekumnya. Tahapan ini dilakukan secara aseptis, selanjutnya sesegera mungkin dilakukan pengujian mikroba utama usus.

Pengamatan terhadap mikroba usus pada penelitian ini dilakukan pada bagian sekum, yaitu isi sekum (lumen). Pengamatan terhadap isi sekum dengan pertimbangan bahwa sekum merupakan bagian proksimal usus besar, diketahui pada hewan non-ruminansia seperti tikus, proses fermentasi oleh mikroba sebagian besar terjadi di bagian sekum (Le Blay *et al.* 1990).

Pengamatan mikroba isi sekum (total mikroba, total *E.coli* dan bakteri asam laktat) dianalisis dengan terlebih dahulu membuat larutan contoh (Prestamo *et al.* 2003). Larutan contoh dibuat dengan cara mengambil 0,5 g isi sekum, kemudian dilarutkan ke dalam NaCl fisiologis (0,85% NaCl) (5 mL) sehingga terbentuk suspensi contoh, selanjutnya dibuat serangkaian pengenceran menggunakan pengencer NaCl fisiologis.

Total mikroba. Suspensi contoh (pengenceran 10^{-1}) dibuat serangkaian pengenceran. Suspensi contoh dipipet secara aseptik pada tingkat pengenceran yang sesuai, dan digoreskan sebanyak 1 mL ke dalam cawan petri steril (duplo), selanjutnya dituangi PCA, dan digoyang. Inkubasi pada suhu 35-37 °C selama 48 ± 2 jam dilakukan setelah agar membeku. Koloni yang tumbuh dihitung sebagai total mikroba (cfu/mL).

Total E. coli. Perhitungan total *E. coli* isi sekum dilakukan pertama-tama dengan membuat suspensi isi sekum dengan pengenceran yang sesuai. Pada tingkat pengenceran tertentu (dimana diharapkan hasil 30-3000 koloni) dipipet 1 mL dan dipupuk ke TBX dengan metode tuang dan diinkubasi secara aerob pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Koloni tipikal *E. coli* adalah koloni dengan warna hijau metalik, shiny, konveks, diameter 1-2 mm, sel berbentuk batang, Gram-negatif dan katalase positif.

Total bakteri asam laktat. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* spp. adalah MRS agar yang ditambahkan CaCO_3 dengan waktu inkubasi 3 hari. Inkubasi secara anaerob dilakukan menggunakan anaerobic jar yang dilengkapi gas generating kit, pada temperatur 37°C .

Jumlah koloni spesifik (yaitu koloni yang dikelilingi zona bening) dihitung dengan metode hitungan cawan. Hasil kuantifikasi dinyatakan dalam log CFU per gram isi sekum.

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan program SPSS 11.5 dan uji beda lanjut dengan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Pengolahan Biji Teratai terhadap Komponen Fitokimia Tepung Biji Teratai

Pengaruh pengolahan tepung biji teratai terhadap komposisi fitokimia disajikan pada Tabel 1. Perendaman dilakukan sebelum penepungan dan dilanjutkan dengan pengukusan dan pengeringan terhadap komponen fitokimia pada produk tepung. Komponen fitokimia yang terdapat pada biji teratai tidak hilang akibat pengolahan meskipun ada beberapa yang diduga mengalami penurunan akibat pengolahan.

Biji teratai mengandung komponen fitokimia yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, glikosida, fenolik, saponin, tanin dan triterpenoid. Ekstrak biji teratai yang diekstrak secara bertingkat diawali dengan pelarut tidak polar (heksana), dilanjutkan dengan pelarut semi polar (etil asetat) kemudian diekstrak dengan pelarut polar (etanol) diperoleh penyebaran komponen fitokimia di dalam masing-masing ekstrak. Alkaloid, saponin, dan glikosida terdapat pada ekstrak heksana. Alkaloid, tanin, glikosida, saponin, flavonoid dan triterpenoid terdapat pada ekstrak etil asetat (semi polar) dan saponin, tanin, flavonoid dan alkaloid terdapat pada

Tabel 1 Komposisi fitokimia biji teratai dan tepung biji teratai pra-masak

Komponen fitokimia	Biji teratai	Tepung biji teratai pra masak
Alkaloid	++++	++++
Saponin	+	+
Tannin	+	+
Flavonoid	+++	+
Glikosida	++	++++
Triterpenoid	+	+++
Steroid	+++	++

Keterangan: - = negatif; + = positif lemah; ++ = positif; +++ = positif kuat; ++++ = positif kuat sekali

ekstrak etanol (polar) (Fitriani *et al.* 2008), hal ini menunjukkan bahwa alkaloid yang merupakan komponen utama biji teratai larut pada pelarut tidak polar, semi polar maupun polar. Alkaloid yang terdapat pada biji teratai diduga tidak rusak akibat proses perendaman, pengukusan dan pengeringan, demikian pula pada komponen fitokimia yang lain, kecuali flavonoid. Flavonoid yang terdapat pada biji teratai bersifat semi polar dan polar. Komponen tersebut diduga menjadi rusak akibat proses perendaman, yang dilanjutkan dengan pengukusan dan pengeringan, sebaliknya terjadi pada triterpenoid, setelah melalui proses pengolahan meningkat secara kualitatif dari positif lemah menjadi positif kuat.

Beberapa bahan pangan lainnya yang juga mengandung komponen fitokimia yang diketahui memiliki aktivitas biologis untuk kesehatan, mengalami penurunan kadarnya akibat proses pengolahan dari beberapa komponen tersebut, seperti pada biji karabenguk (pensubstitusi kedelai) (Nwaoguikpe *et al.* 2011), sayuran seperti brokoli (Yuan *et al.* 2009) dan sawi (Palegrini *et al.* 2010), serta buah-buahan seperti *acai berry* (Pacheco-Palencia *et al.* 2009). Berdasarkan beberapa cara pengolahan tersebut, diantaranya adalah perebusan, pengukusan, *microwaving*, dan penggorengan,

cara pengukusan menyebabkan penurunan terhadap kadar komponen fitokimia yang paling rendah.

Interaksinyasenyawaaktifantimikroba(seperti fenolik) dengan protein dan komponen pangan lainnya terjadi selama proses pengolahan dan aktivitasnya mungkin berubah sebagai hasil dari proses hidrolisis karena glikosida dan ester dikonversi menjadi derivatif fenolik bebas. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenolik. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan, dalam bentuk aglikon maupun terikat pada gula sebagai glikosida (Harborne 1987). Kemungkinan lainnya adalah terjadinya kompleks antara senyawa fenolik dengan logam.

Proses pemanasan berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat biji teratai. Semakin tinggi suhu maka aktivitas antibakteri semakin menurun, meskipun demikian pada suhu 121°C ekstrak etil asetat biji teratai masih memiliki aktivitas antibakteri (Fitriani 2011).

Proses pemanasan berpengaruh terhadap kestabilan fraksi ekstrak etil asetat biji teratai. Fraksi dari ekstrak etil asetat yang berperan sebagai antibakteri diantaranya adalah fraksi 5 dan 6 yang relatif lebih polar dibandingkan fraksi lainnya yang lebih tidak polar dan kedua fraksi ini relatif tidak stabil terhadap pemanasan suhu 100 dan 121 °C (Fitriani 2011), meskipun demikian menurut Naufalin (2006), pemanasan pada suhu 80 °C dan 100 °C selama 10, 20 dan 30 menit dan 121°C selama 10 menit tidak berpengaruh terhadap aktivitas antimikroba dari ekstrak etil asetat kecombrang terhadap *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* dan *Aeromonas hydrophila*.

Pengaruh Pemberian Tepung Biji Teratai Pra-Masak terhadap Konsumsi Ransum dan Bobot Badan Tikus Percobaan

Penyusunan ransum yang disubstitusi dengan produk olahan biji teratai dilakukan secara isokalori dan isonitrogen dengan

mempertimbangkan zat gizi yang terdapat pada tepung biji teratai yang mempengaruhi pertumbuhan tikus percobaan, seperti protein, lemak dan karbohidrat. Komposisi ransum pada penelitian disajikan pada Tabel 2.

Total konsumsi, kenaikan bobot badan selama perlakuan (28 hari) dan efisiensi ransum disajikan pada Tabel 3. Efisiensi penggunaan ransum merupakan perbandingan antara kenaikan berat dengan total konsumsi. Pengaruh perlakuan ransum pada kelompok tikus yang sehat, berpengaruh nyata terhadap nilai efisiensi ransum.

Kelompok tikus percobaan yang diberi ransum standar dan tidak diintervensi EPEC menunjukkan kenaikan bobot badan yang lebih tinggi (30,8 g) dibanding kelompok lainnya yang diintervensi EPEC. Grup kontrol yang diberi ransum standar dan diintervensi EPEC menunjukkan kenaikan bobot badan yang paling rendah (16,8 g) dan efisiensi ransum yang paling rendah (7,38%) dibandingkan dengan grup lainnya, hal ini menunjukkan bahwa intervensi EPEC mengakibatkan menurunnya konsumsi ransum yang berakibat terhadap kenaikan

Tabel 2 Komposisi ransum tikus percobaan

Bahan (%)	Grup tikus percobaan	
	Kontrol	Tepung biji teratai
Kasein	11,36	9,24
Minyak jagung	7,94	6,46
Mineral mix	4,55	3,70
Air	4,50	3,66
Selulosa	1	0,81
Vitamin mix	1	0,81
Pati jagung	69,65	56,65
Tepung pra masak	0	18,66
	100	100

Keterangan : Grup kontrol menggunakan ransum standar (Modifikasi AOAC 1990). Ransum yang diberikan: 10 g/hari/ekor tikus. Kasein sebagai sumber protein ransum (10%)

berat badan. Intervensi EPEC selama 7 hari mengakibatkan menurunnya berat badan tikus percobaan mencapai 54% dan efisiensi ransum menurun hingga 38%.

Grup yang pada ransumnya disubstitusi dengan tepung biji teratai pra-masak dan diintervensi EPEC terjadi penurunan konsumsi ransum mencapai 12% akibat intervensi *E. coli* dan kenaikan berat badan mencapai 23,2 g atau lebih rendah 25% dibandingkan dengan grup kontrol (tanpa intervensi EPEC), akan tetapi masih lebih tinggi dibandingkan dengan grup kontrol yang diintervensi EPEC yang lebih rendah mencapai 45%, hal ini menunjukkan bahwa substitusi produk olahan biji teratai dapat membantu mengatasi penurunan berat badan akibat infeksi EPEC pada pencernaan. Efisiensi ransum tepung biji teratai mencapai 10%. Kadar protein 10% pada ransum merupakan kebutuhan tubuh akan protein untuk pemeliharaan bukan untuk pertumbuhan yang membutuhkan protein >10%, jadi sangat memungkinkan mengapa kenaikan berat badan tikus percobaan hanya berkisar 30% pada tikus yang normal.

Pengaruh Pemberian Tepung Biji Teratai Pra Masak terhadap Kadar Air Feses Tikus Percobaan

Pengamatan mengenai pengaruh pemberian tepung biji teratai pra-masak terhadap kadar air feses tikus percobaan yang dicekok EPEC dilakukan sebelum tikus percobaan dicekok EPEC yaitu hari ke-14 perlakuan ransum, hari ke-17 (dua hari setelah dicekok EPEC), hari ke-20 (hari ke-6 dicekok EPEC), hari ke-22 (sehari setelah cekok EPEC dihentikan), hari ke 24 (hari ke-3 setelah cekok

EPEC dihentikan) dan hari ke-28 (tujuh hari setelah cekok EPEC dihentikan) (Gambar 1).

Peningkatan kadar air feses sekitar 10% terjadi setelah 2 hari dicekok EPEC yang diduga telah terjadi diare pada tikus percobaan untuk semua perlakuan yang dicekok EPEC, hal ini berbeda dengan grup yang tidak diintervensi EPEC, kadar air fesesnya tidak berbeda dengan kadar air feses sebelumnya ($P < 0,05$). Penurunan kadar air feses sekitar 5% terjadi setelah hari ke-6 intervensi EPEC dilakukan. Penurunan kadar air feses rata-rata 2% dari sebelumnya pada grup yang diberi produk olahan biji teratai ($P < 0,05$) terjadi setelah sehari intervensi EPEC dihentikan. Kondisi sebaliknya pada grup kontrol yang diintervensi EPEC, terjadi peningkatan kadar air feses walaupun intervensi sudah dihentikan, hal ini menunjukkan terjadi diare yang berlanjut. Kondisi ini terus berlanjut hingga 7 hari setelah intervensi EPEC dihentikan. Tikus percobaan yang diberi tepung biji teratai pra masak, setelah tiga hari intervensi EPEC dihentikan, kadar air fesesnya normal kembali seperti sebelum dilakukan intervensi EPEC. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh dari ransum terhadap pertumbuhan EPEC di pencernaan tikus percobaan.

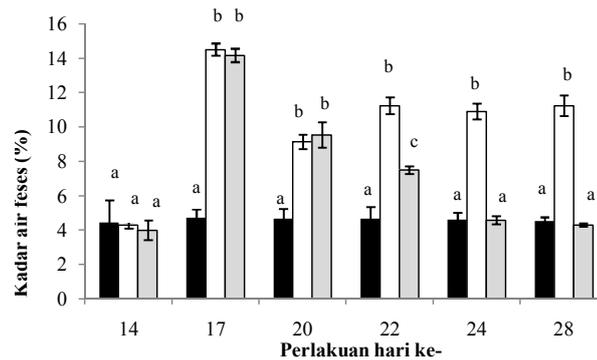
Pengaruh Pemberian Tepung Biji Teratai Pra Masak terhadap Total Mikroba, Total *E. coli* dan Total Bakteri Asam Laktat Isi Sekum Tikus Percobaan

Pengamatan terhadap pengaruh substitusi tepung biji teratai terhadap total mikroba tikus percobaan yang diintervensi EPEC dilakukan dengan menghitung total mikroba yang ada dalam isi sekum. Total mikroba pada grup yang diberi ransum yang disubstitusi tepung

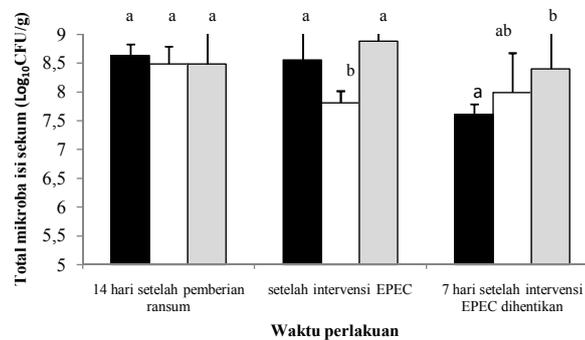
Tabel 3 Total konsumsi, kenaikan berat badan dan efisiensi ransum tikus percobaan

	Total konsumsi (g)	Kenaikan berat badan (g)	Efisiensi ransum (%)
Kontrol A	260,6a	30,8a	11,83a
Kontrol B	227,6b	16,8c	7,38b
Grup tepung biji teratai	228,2b	23,2b	10,17a

Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)



Gambar 1 Kadar air feses tikus percobaan, sebelum, saat diintervensi EPEC dan setelah intervensi EPEC dihentikan. Huruf yang sama pada setiap tahap perlakuan menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Kontrol A tidak diintervensi *E. coli* (black shading); Kontrol B, yang diintervensi *E. coli* (empty shading); Tepung biji teratai pra-masak (grey shading)



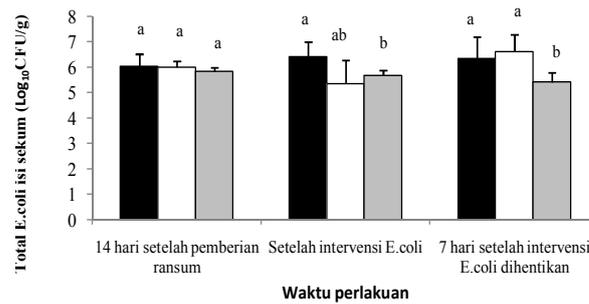
Gambar 2 Total mikroba isi sekum tikus percobaan selama 28 hari perlakuan. Huruf yang sama pada setiap tahap perlakuan menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Kontrol A tidak diintervensi *E. coli* (black shading); Kontrol B, yang diintervensi *E. coli* (empty shading); Tepung biji teratai pra-masak (grey shading).

biji teratai terlihat tidak berbeda dibandingkan dengan grup lainnya ($P > 0,05$) setelah 14 hari pemberian ransum perlakuan (Gambar 2). Total mikroba dari grup tikus percobaan kontrol yang dicekok *E.coli* selama 7 hari, terlihat mengalami penurunan dibandingkan dengan grup lainnya ($P < 0,05$), sedangkan pada grup yang disubstitusi tepung biji teratai total mikrobanya lebih tinggi dari kondisi sebelumnya. Kondisi setelah 7 hari intervensi *E.coli* dihentikan, total mikroba isi sekum dari grup kontrol yang diintervensi *E.coli* mengalami peningkatan dari sebelumnya, sementara pada grup yang disubstitusi tepung biji teratai tidak menunjukkan perbedaan dengan kondisi sebelumnya.

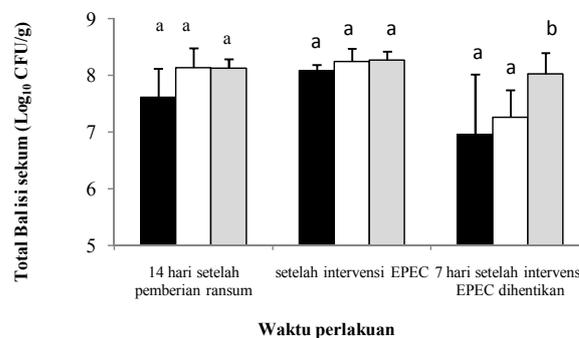
Pengamatan terhadap pengaruh substitusi biji teratai terhadap total *E. coli* tikus

percobaan yang diintervensi EPEC dilakukan dengan menghitung total *E. coli* yang ada di dalam isi sekum. Setelah 14 hari pemberian ransum perlakuan, total *E. coli* pada grup yang diberi ransum yang disubstitusi tepung biji teratai terlihat lebih rendah dibandingkan dengan grup lainnya (Gambar 3).

Total *E. coli* terlihat tidak berbeda pada semua grup ($P > 0,05$) setelah 7 hari diintervensi EPEC, akan tetapi setelah 7 hari intervensi dihentikan terjadi penurunan total *E. coli* pada grup yang diberi tepung biji teratai ($P < 0,05$). Hal sebaliknya terjadi pada grup kontrol yang diintervensi *E. coli*, dimana terjadi peningkatan pada total *E.coli*. Hal ini menunjukkan tepung biji teratai dapat menghambat atau mencegah tumbuhnya *E. coli* patogen pada saluran pencernaan hewan percobaan.



Gambar 3 Total *E. coli* isi sekum percobaan selama 28 hari perlakuan. Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$) Huruf yang sama pada setiap tahap Kontrol A tidak diintervensi *E. coli* (black shading); Kontrol B, yang diintervensi *E. coli* (empty shading); Tepung biji teratai pra-masak (grey shading).



Gambar 4 Total bakteri asam laktat isi sekum tikus percobaan. Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$) Kontrol A tidak diintervensi *E. coli* (black shading); Kontrol B, yang diintervensi *E. coli* (empty shading); Tepung biji teratai pra-masak (grey shading).

Mekanisme penghambatan terhadap EPEC pada perlakuan substitusi tepung biji teratai, karena adanya komponen antimikroba yang diketahui dapat menghambat pertumbuhan EPEC. Adanya tanin pada tepung biji teratai dapat menghambat aktivitas protease (Scalbert 1991) yang diproduksi oleh EPEC K1.1 (Budiarti dan Mubarik 2007) untuk mendegradasi mucin yang merupakan salah satu mekanisme pertahanan inang untuk mencegah melekatnya patogen pada sel epitel usus, selain itu terutama adanya alkaloid yang juga berperan sebagai antibakteri (Ramkumar et al. 2007).

Pengamatan terhadap total BAL aerob diharapkan dapat mewakili pengamatan terhadap BAL aerob, terutama *Lactobacillus*. Pengaruh intervensi EPEC terhadap pertumbuhan BAL aerob isi sekum pada hewan percobaan yang diberi ransum yang

disubstitusi tepung biji teratai disajikan pada Gambar 4.

Pemberian ransum yang disubstitusi tepung biji teratai selama 14 hari terlihat tidak dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri asam laktat di sekum tikus percobaan. Hal ini dapat dilihat pada total BAL yang tidak berbeda dengan total BAL pada kontrol yang diberi ransum standar ($P>0,05$). Hal yang sama terjadi setelah intervensi EPEC (pada hari ke-22), dimana BAL aerob isi sekum pertumbuhannya tidak terpengaruh dengan adanya intervensi EPEC pada grup tikus yang diberi ransum yang disubstitusi tepung biji teratai.

Total BAL isi sekum dari grup kontrol yang terinfeksi EPEC terlihat mengalami penurunan setelah intervensi EPEC dihentikan, yang berbeda dengan kondisi sebelumnya. Hal ini menunjukkan intervensi EPEC mengakibatkan penurunan total BAL aerob isi sekum,

yang mengakibatkan terjadinya perubahan keseimbangan mikroflora di sekum. Berbeda halnya dengan grup yang diberi ransum tepung biji teratai yang menunjukkan jumlah BAL aerob yang tidak berbeda dengan jumlah BAL sebelumnya ($P < 0,05$), meskipun terjadi sedikit penurunan jumlah BAL aerob jika dibandingkan dengan kondisi sehat (tidak diintervensi EPEC), akan tetapi jumlahnya masih lebih tinggi dibandingkan dengan grup kontrol (mendekati 1 unit log). Hal ini menunjukkan pemberian tepung biji teratai sebelum inang terinfeksi bakteri patogen mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang masuk ke dalam tubuh inang dan pemberian perlakuan dilanjutkan terus setelah terinfeksi patogen, mampu mempertahankan kondisi yang sama dengan sebelum terinfeksi. BAL aerob yang distimulasi oleh biji teratai mampu bertahan akibat adanya intervensi patogen.

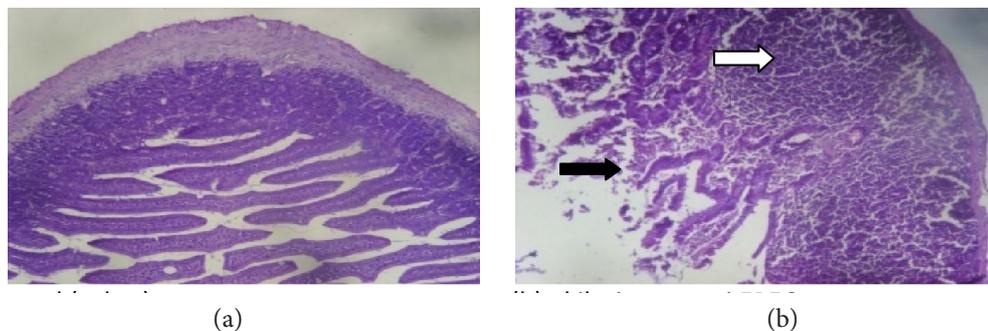
Ballongue (2004) menyatakan bahwa keseimbangan ekosistem saluran gastrointestinal dapat terjaga melalui beberapa faktor berupa mekanisme secara fisik, kimia dan pengaturan biologis seperti gerakan peristaltik usus yang dapat menyebabkan eliminasi mikroorganisme dan interaksi-interaksi yang terjadi antara berbagai macam spesies bakteri yang terdapat dalam usus baik simbiosis maupun antagonis. Mekanisme dan kandungan mikroflora yang amat kompleks dalam saluran pencernaan hewan percobaan dapat menyebabkan BAL aerob tidak dapat beradaptasi dan bersaing dalam saluran pencernaan hewan.

Histologi Mukosa Usus Halus Tikus Percobaan dan Sel Inflamasi

Pengamatan histopatologi dari mukosa usus halus (jejunum) tikus percobaan dilakukan dengan mengamati sel inflamasi (sel radang) (secara kualitatif, dari 10 lapangan pandang per sampel pada pembesaran 100x) dan kerusakan pada vili usus (nekrosis) yang hasilnya disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 5. Pengamatan histopatologi sebelum diberikannya perlakuan menunjukkan tidak ditemukannya sel radang pada sampel. Ditemukan adanya sel radang dari tidak ada hingga dalam jumlah yang ringan pada perlakuan tepung biji teratai pra masak setelah 14 hari perlakuan. Akibat intervensi EPEC, pada grup kontrol yang diberi ransum standar jumlah sel radangnya mengalami peningkatan dari tidak ada menjadi sedang.

Terjadinya nekrosis pada usus yang ditemukan pada 2 individu hewan percobaan menunjukkan bahwa intervensi enteropatogenik *E. coli* dapat menyebabkan terjadinya nekrosis pada sel-sel di usus halus, sebaliknya pada usus halus hewan coba yang diberi perlakuan tepung biji teratai pra-masak tidak menunjukkan adanya nekrosis dan sel inflamasi dari tidak ada hingga ringan. Pemberian tepung biji teratai mampu mencegah melekatnya *E. coli* pada mukosa usus dan mencegah timbulnya nekrosis pada sel akibat aktivitas bakteri tersebut.

Jumlah sel radang pada grup kontrol, setelah 7 hari intervensi EPEC dihentikan



Gambar 5 Gambaran histopatologi jejunum tikus percobaan (a) normal (sehat), (b) akibat intervensi EPEC. **➡** Necrosis **⇨** Sel radang

berkisar antara sedang hingga berat yang disertai adanya nekrosis pada 3 individu yang diamati, hal ini menunjukkan walaupun intervensi sudah dihentikan akan tetapi kerusakan pada sel mukosa usus terus berlanjut, sebaliknya pada perlakuan pemberian tepung biji teratai, kerusakan pada sel mukosa usus tidak ditemukan, dan adanya sel inflamasi berkisar dari ringan hingga moderat.

Ringler (1996) menyatakan bahwa suatu fenomena patologi yang telah lama diketahui tentang inflamasi adalah timbulnya suatu reaksi dari jaringan terhadap adanya suatu iritan. Iritan tersebut dapat berupa toksin yang dihasilkan oleh mikroba atau bagian dari sel mikroba. Inflamasi merupakan suatu proses yang dinamis dan tidak stabil, dan proses tersebut tergantung dari jenis jaringan tubuh. Inflamasi dapat bermula dari adanya kerusakan jaringan yang sublethal dan dapat diakhiri dengan penyembuhan, selain hiperemi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah, reaksi inflamasi akut juga ditandai dengan adanya kejadian yang lebih penting yaitu keluarnya leukosit dari sirkulasi perifer ke ruang ekstraseluler. Sel leukosit tersebut berfungsi dalam proses fagositosis agens penyebab inflamasi, dan dalam proses tersebut akan dihasilkan radikal bebas. Secara fisiologis, pada keadaan normal sel memproduksi radikal bebas sebagai konsekuensi logis pada reaksi biokimia dalam kehidupan aerobik. Radikal bebas dianggap berbahaya karena terjadinya reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya (Wresdiyati *et al.* 2003). Radikal bebas dalam jumlah banyak akan menarik elektron makromolekul seperti protein, asam lemak dan polisakarida, reaksi tersebut akan merusak membran sel yang komponennya adalah makromolekul tersebut, yang kemudian akan berakhir pada kerusakan sel. Kerusakan sel dalam hal ini termasuk kerusakan sel usus dan kerusakan sel endotel pembuluh darah yang mengakibatkan permeabilitas pembuluh darah meningkat sel diapadesis sel radang atau leukosit. Proses fagositosis yang dilakukan oleh sel-sel inflamasi juga dapat menghasilkan

radikal bebas. Kondisi ini lebih memperparah kerusakan sel akibat radikal bebas, termasuk terjadinya inflamasi.

Nekrosis merupakan sebuah kematian sel yang terjadi secara tidak alami dan umumnya disebabkan oleh faktor dari luar secara langsung, misalnya kematian sel karena kecelakaan, infeksi virus, radiasi sinar radio aktif atau keracunan zat kimia. Sel tidak akan dapat mati secara nekrosis tanpa adanya tekanan dari luar (Hoerr 1998). Nekrosis merupakan proses kematian sel yang melibatkan sekelompok sel, dengan ciri membran sel mengalami kehilangan integritas dan membran sel terlihat membengkak untuk kemudian mengalami lisis. Nekrosis juga menyebabkan terjadinya kebocoran lisosom dan sel yang mengalami nekrosis kromatinnya bergerombol dan terjadi agregasi. Terlihat respon peradangan yang nyata di sekitar sel-sel yang mengalami nekrosis. Sel yang mengalami nekrosis akan dimakan oleh makrofag. Nekrosis terjadi karena trauma nonfisiologis dan tidak disertai proses sintesis makromolekul baru.

Intervensi EPEC menyebabkan terjadinya inflamasi sel dan berlanjut dengan terjadinya nekrosis pada sel mukosa usus halus (jejunum) tikus percobaan. Substitusi tepung biji teratai pada ransum dapat mencegah terjadinya nekrosis pada sel mukosa usus akibat intervensi EPEC. Makanan berperan penting pada masuknya suatu nutrisi dan senyawa fitokimia ke dalam tubuh. Aktivitas biologis suatu senyawa aktif tidak tergantung pada tinggi atau rendahnya kadar suatu senyawa aktif, akan tetapi lebih ditentukan oleh kualitas nutrisinya (*bioavailability*), salah satunya ditentukan oleh struktur kimia dari suatu fitokimia yang terdapat pada bahan pangan (Scalbert dan Williamson 2000). Hal tersebut menentukan apakah suatu senyawa mudah diserap, tidak cepat didegradasi dalam jaringan dan dapat mencapai target, sebagai contoh flavonoid yang tidak dapat diserap. Flavonoid tersebut mengalami degradasi oleh mikroflora usus sehingga peranannya

hanya terbatas pada pencegahan kerusakan oksidatif di dalam kolon. Contoh lainnya adalah quercetin- β -glukosida (terikat) lebih mudah diserap daripada quercetin aglikon (tidak terikat), demikian pula pada flavonol glikosida lebih mudah diserap daripada bentuk aglikonnya (Scalbert dan Williamson 2000).

Hal lain yang menjadi pertimbangan adalah bahwa senyawa aktif yang terdapat di dalam tepung biji teratai pra-masak meskipun sudah mengalami proses pengolahan masih memiliki aktivitas antimikroba. Hal yang sama juga terjadi pada senyawa aktif lycopene dan beta-karoten yang terdapat di tomat. Kualitas antioksidan lycopene meningkat pada pasta tomat dibandingkan pada tomat segar (Gartner *et al.* 1997), demikian pula kualitas beta-karoten pada wortel dan bayam mentah lebih rendah dibandingkan setelah dimasak (Rock *et al.* 1998). Proses pengalengan mampu meningkatkan 50-53% aktivitas antioksidan dari fenolik pada blueberry, demikian pula proses blanching pada awal proses pengalengan meningkatkan retensi fitokimia blueberry (Sablani *et al.* 2010).

Senyawa aktif yang terdapat di dalam tepung biji teratai pra-masak diduga juga tidak terpengaruh oleh pH lambung sehingga masih memiliki aktivitas mencegah diare. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang mengamati pengaruh pH lambung terhadap aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi ekstrak etil asetat biji teratai secara *in vitro* menunjukkan bahwa hingga pH 1 aktivitas penghambatannya terhadap mikroba uji tidak berubah (Fitriani 2011).

KESIMPULAN

Substitusi tepung biji teratai pra-masak sebelum, selama dan sesudah intervensi EPEC dapat mencegah diare yang berkepanjangan pada tikus dan dapat melindungi kerusakan epitel usus halus akibat intervensi EPEC.

DAFTAR PUSTAKA

[AOAC] Association of Official Agricultural Chemists. 1990. Official Methods of

Analysis. Washington DC: Association of Official Agricultural Chemists.

Ballongue J. 1998. *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects: Bifidobacteria and Probiotic*. New York: Marcell Dekker Inc.

Budiarti S, Mubarik NR. 2007. Extracellular protease activity of Enteropathogenic *Escherichia coli* on mucin substrate. Short Communication. *HAYATI Journal of Biosciences* 14(1): 36-38.

Fitriani Y, Astawan M, Soekarto ST, Wiryawan KG, Wresdiyati T, Khairina R. 2008. Potensi biji teratai sebagai antidiare. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 19(2): 158-164.

Fitriani Y. 2011. Aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat biji teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) akibat pemanasan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 14(1): 43-48.

Fitriani Y, Astawan M, Soekarto ST, Wiryawan KG, Wresdiyati T. 2012. Potensi biji dan ekstrak biji teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) sebagai pencegah diare pada tikus percobaan yang diintervensi *E. coli* enteropatogenik. *Jurnal Agritech* 32(3): in press.

Gartner C, Stahl W, Sies H. 1997. Increased lycopene bioavailability from tomato paste as compared to fresh tomatoes. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66: 116-127

Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Ed ke-2. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: Penerbit ITB Bandung. Terjemahan dari: Phytochemical Methods.

Hoerr FJ. 1998. Pathogenesis of enteric diseases. *Poultry Science* 77: 1150-1155.

Khairina R, Fitriani Y. 2002. Produksi dan kandungan gizi biji teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) tanaman air yang terdapat di Hulu Sungai Utara. *Jurnal Ilmiah Fakultas Pertanian* 77-88.

Le Blay G, Michel C, Blottiere HM, Cherbut

- C. 1990. Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and persistent increase in cecal butyrate in rats. *Journal of Nutrition* 129: 2231-2235.
- Naufalin R, Jenie BSL, Kusnandar F, Sudarwanto M, Rukmini HS. 2006. Pengaruh pH, NaCl dan pemanasan terhadap kajian sifat antimikroba ekstrak bunga kecombrang terhadap stabilitas antibakteri bunga kecombrang dan aplikasinya pada daging sapi giling. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 17(3): 197-203.
- Nwaoguikpe RN, Braide W, Ojowundu CO. 2011. The effect of processing on proximate and phytochemical composition of *Mucuna pruriens* seeds (velvet beans). *Pakistan Journal of Nutrition* 10(10): 947-951.
- Palegrini N, Chiavaro E, Gardana C, Mazzeo T, Contino D, Gallo M, Riso P, Fagliano V, Porsini M. 2010. Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidants capacity of raws and frozen Brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(77): 4310-4321.
- Pacheco-Palencia LA, Duncan CE, Talcott ST. 2009. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial acai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chemistry* 115(4): 1199-1205.
- Prestamo G, Pedrozuelo A, Perias E, Lasuncion MA, Arroyo. 2003. Role of buckwheat diet on rats as prebiotic and healthy food. *Nutrition Research* 23(6): 803-814.
- Ramkumar KM, Rajaguru P, Ananthan R. 2007. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of an antidiabetic plant *Gymnema montanum*. *Advances in Biological Research* 1(1-2): 67-71.
- Ringler DJ. 1996. Inflammation and Repair. In: Jones TC (ed), *Veterinary Pathology*. Williams & Wilkins. p 113-157.
- Rock CL, Lovalvo JL, Emenniser C, Ruffin MT, Flatt SW, Schwartz SJ. 1998. Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *Journal of Nutrition* 128(5): 913-916.
- Sablani SS, Andrews PK, Davies NM, Walters T, Saez H, Syamaladevi RM, Mohekar PR. 2010. Effect of thermal treatments on phytochemicals in conventionally and organically grown berries. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 90(5):769-77.
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tanins. *Phytochemistry* 30(12): 3875-3883.
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130: 2073S-2085S.
- Wresdiyati T, Astawan M, Adnyane IKM. 2003. Aktivitas anti inflamasi oleoresin jahe (*Zingiber officinale*) pada ginjal tikus yang mengalami perlakuan stress. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 14(2): 113-120.
- Yuan GF, Sun B, Yuan J, Wang QM. 2009. Effects of different cooking methods on health-promotion compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University Science B* 10(8): 580-588.