

POTENSI BIJI DAN EKSTRAK BIJI TERATAI (*Nymphaea pubescens* Willd) SEBAGAI PENCEGAH DIARE PADA TIKUS PERCOBAAN YANG DIINTERVENSI *E.coli* ENTEROPATOGENIK

The Potency of Waterlily's Seed (*Nymphaea pubescens* Willd) and Its Extract as Diarrhea Preventative in Rats that Intervened with Enteropathogenic *Escherichia coli*

Yuspihana Fitri¹, Made Astawan², Soewarno T.Soekarto²,
Komang G.Wiryawan³, Tutik Wresdiyati⁴

¹Jurusan Pengolahan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan, Universitas Lambung Mangkurat, Jl. Jenderal Ahmad Yani, Km. 36, PO Box 6, Banjarbaru 70714

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, PO Box 220 Bogor 16002

³Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

⁴Departemen Anatomi, Fisiologi & Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
Email: yuspis@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komponen fitokimia yang terdapat pada biji teratai dan ekstrak etil asetat biji teratai dan mengetahui aktivitas antibakterinya terhadap *E.coli* penyebab diare (*E.coli* Enteropatogenik K1.1, EPEC K1.1) pada tikus percobaan. Perlakuan diberikan pada tikus jantan jenis Sprague Dawley (berat 140 ± 5 g) selama 28 hari. Tikus percobaan dibagi menjadi 4 grup yaitu, grup 1, kontrol (mendapatkan ransum standar), grup 2 yang mendapat ransum yang disubstitusi tepung biji teratai (18,7 g/100 g), grup 3 yang mendapat ransum yang disubstitusi FOS (fruktooligosakarida, 6 g/100 g), dan grup 4 yang mendapat ransum standar dan ekstrak etil asetat biji teratai (17,8 mg/ml). Setelah 2 minggu perlakuan ransum, tikus percobaan diintervensi secara oral dengan 0,3 ml dari 10⁶ CFU/ml EPEC K1.1 selama 1 minggu sehingga diare. Aktivitas biologis ransum perlakuan diamati dengan mengamati bobot badan, konsumsi ransum per hari, efisiensi ransum, total mikroba, total *E.coli* dan total bakteri asam laktat dari isi sekum tikus percobaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biji teratai mengandung alkaloid, flavonoid, steroid, glikosida, tanin, saponin, dan triterpenoid, sedangkan ekstrak etil asetat biji teratai mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, glikosida, saponin dan triterpenoid. Substitusi biji teratai pada ransum mampu menurunkan total *E.coli* isi sekum, baik setelah intervensi maupun setelah intervensi EPEC dihentikan. Sementara pemberian ekstrak biji teratai mampu menurunkan total *E.coli* isi sekum setelah intervensi dihentikan. Efisiensi ransum pada grup yang disubstitusi biji teratai lebih tinggi dibandingkan kontrol dan ekstrak biji teratai (P<0.05). Perlakuan substitusi biji teratai, dan pemberian ekstrak biji teratai dapat mencegah kerusakan pada vili usus halus akibat dari serangan *E.coli* enteropatogenik. Berdasarkan penelitian ini, baik biji teratai maupun ekstrak biji teratai mengandung senyawa aktif yang mampu mencegah dan menghambat pertumbuhan *E.coli* penyebab diare.

Kata kunci: Biji teratai, *Enteropathogenic Escherichia coli*, ekstrak etil asetat, antibakteri, diare

ABSTRACT

The aims of this study were to observe phytochemical components contained in waterlily seeds and its ethyl acetate extract; and to observe their antibacterial activities on rats that were intervened with diarrhea-causing bacteria (Enteropathogenic *E. coli* K1.1, EPEC). Treatment was given on the Sprague Dawley male rats (weighing 140 ± 5 g) for 28 days. Male rats were fed a basal diet (grup control) or the same diet containing 18.7 g/100g of waterlily's seed flour or the same diet containing 6 g/100 g of FOS or a basal diet with 17.8 mg/ml waterlily's seeds extract (orally

route) for 2,3 or 4 weeks. After 2 weeks treatment feedings, rats were orally infected with 0.3 ml of 10^6 CFU/ml *E. coli* in a week. Cecal contents were collected at the end of each time period. The biological activity of treatment was observed by observing body weight, daily feed intake, feed efficiency, total microorganisms, total *E. coli* and total lactic acid bacteria from the cecum contents of rats and histological picture of the small intestine of rats. The results showed that water lily seed contain alkaloids, flavonoids, steroids, glycosides, tannins, saponins, and triterpenoids, whereas ethyl acetate extract of water lily seed contain alkaloids, flavonoids, tannins, glycosides, saponins and triterpenoid. Substitution treatment with waterlily seed in rations affect to total *E. coli* in the cecum, both after EPEC intervention and after the intervention stopped. While the provision of waterlily seed extracts affect to total *E. coli* in the cecum after the intervention stopped. The feed efficiency in group substituted with waterlily seed was higher than the control and its extract ($P < 0.05$). Substitution treatment of waterlily seed and the extract could prevent damage to the intestinal villi resulting from enteropathogenic *E. coli* attack. The results of this study indicated that both waterlily seed and its extract contain active compounds that could prevent and inhibit the growth of *E. coli* causing diarrhea in rats.

Key words: waterlily seed, Enteropathogenic *Escherichia coli*, ethyl acetate extract, antibacterial, diarrhea

PENDAHULUAN

Teratai merupakan tanaman air yang banyak tumbuh secara alami di perairan rawa atau sungai yang tidak begitu dalam dan berair tenang. Bagian tanaman teratai ini yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan 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 buah teratai oleh penduduk setempat sering dijadikan sebagai sumber karbohidrat pengganti beras di saat paceklik ataupun dijadikan tepung untuk membuat kue. Berdasarkan hasil penelitian Kairina dan Fitriani (2002), diperoleh hasil bahwa dari setiap rumpun teratai rata-rata terdapat 5 buah teratai tua yang menghasilkan 63,10 gram biji teratai kering. Biji teratai kering inilah yang kemudian dikupas kulitnya dan dijual di pasar.

Biji teratai putih yang biasa dijadikan bahan pangan berasal dari spesies *Nymphaea pubescens* Willd. Di Filipina dan India, biji teratai dijadikan tepung untuk pembuatan roti (Sastrapradja dan Bimantoro, 1981). Di daerah Tuban (Jawa Timur) biji teratai dijadikan dodol atau jenang yang dicampur dengan beras ketan (Marianto, 2001).

Secara tradisional, tanaman teratai digunakan sebagai bahan obat-obatan. Bagian umbi dimanfaatkan sebagai jamu-jamuan yang direbus untuk mengobati disentri atau diare yang disebabkan oleh sindrom iritasi pada usus besar, gonorrhoe, bisul dan tumor (Grieve, 2004; Depkes, 1997). Biji teratai memiliki khasiat meningkatkan fungsi hati dan limfa, memperbaiki stamina, membuat awet muda, dan menyembuhkan diare dan disentri. Bagian biji mengandung alkaloid, nupharine (Hughes, 2004). Selain alkaloid yang berperan sebagai antibakteri (Cowan, 1999), diduga ada komponen lain dari karbohidrat (78,13 %, dari biji) yang berperan mencegah berlanjutnya diare, yaitu oligosakarida.

Biji teratai diketahui mengandung oligosakarida jenis rafinosa. Menurut Zopt dan Roth (1996) oligosakarida dengan rantai sisi manosa dapat menghalangi pelekatan mikroorganisme patogen (*E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*) pada dinding usus. Selain itu, pada perkembangan selanjutnya diketahui pula bahwa oligosakarida juga dapat berperan sebagai prebiotik yang dapat menstimulasi secara selektif pertumbuhan dan atau aktivitas flora di dalam usus besar seperti *Lactobacillus* dan atau *Bifidobacterium* (Manning dan Gibson, 2004). Oleh karena itu perlu kajian lebih lanjut mengenai potensi biji dan ekstrak biji teratai sebagai pencegah diare pada tikus percobaan yang diintervensi *E. coli* penyebab diare.

METODE PENELITIAN

Bahan

Biji teratai jenis *Nymphaea pubescens* (Willd) diperoleh dari daerah Hulu Sungai Utara, Kalimantan Selatan. Mikroba uji adalah *Escherichia coli* Enteropatogenik K1.1 (EPEC K1.1) koleksi Laboratorium Bioteknologi Hewan dan Biomedis, Pusat Penelitian Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi adalah heksana dan etil asetat. Media pengujian mikrobiologis adalah MRSA, PCA dan EMBA. Hematoxilin dan eosin sebagai bahan pewarna untuk preparat histologi.

Sumber protein ransum yang digunakan adalah kasein sedangkan sebagai sumber lemak adalah minyak jagung. Mineral yang digunakan merupakan mineral *mix* yang terdiri dari KI 0.79 g, NaCl 139.30 g, KH_2PO_4 389.00 g, MgSO_4 anhidrat 53.702 g, CaCO_3 381.40 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.00 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.01 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.55 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.48 g dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g. Air yang digunakan adalah air minum kemasan. Sebagai sumber serat adalah selulosa dan

vitamin yang digunakan adalah vitamin *mix* (Vitamin A, B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C, D₃, E, Ca Panthotenat). Pati yang digunakan adalah pati jagung. FOS (fruktooligosakarida) komersial diperoleh dari PT. Foodtech Indonesia. Bahan-bahan lain yang diperlukan berupa bahan-bahan kimia dan media yang menunjang.

Persiapan Ekstrak Etil Asetat Biji Teratai

Biji teratai jenis *Nymphaea pubescens* (Willd) diperoleh dari daerah Hulu Sungai Utara, Kalimantan Selatan. Biji teratai diekstrak dengan cara maserasi yang diawali dengan ekstraksi menggunakan heksana selama 24 jam dengan menggunakan *shaker* (150 rpm) pada suhu ruang. Filtrat dipisahkan dari ampas, selanjutnya ampas dikering-anginkan. Ampas biji teratai yang sudah kering ditambahkan etil asetat kemudian dimaserasi menggunakan *shaker* selama 24 jam pada suhu ruang. Filtrat diambil, disaring dan diuapkan dengan *vacuum evaporator* pada suhu 40 °C. Sisa pelarut diuapkan dengan menggunakan gas nitrogen sehingga diperoleh ekstrak etil asetat biji teratai.

Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dari ekstrak etil asetat biji teratai dan tepung biji teratai meliputi alkaloid, tanin, saponin, glikosida, flavonoid, triterpenoid dan steroid (Depkes, 1995).

Pengujian Secara *In Vivo*

Pengujian secara *in vivo* dilakukan dengan menggunakan tikus percobaan (jenis Sprague Dawley jantan, berat 140±5 g) untuk mengevaluasi aktivitas biologis biji teratai (berupa tepung dan ekstrak etil asetat) dibandingkan dengan FOS komersial. Tepung biji teratai dan FOS disubstitusikan ke dalam ransum tikus percobaan secara *isokalori* dan *isonitrogen*. Biji teratai dan ekstrak yang diberikan adalah 1,87 g biji atau ≈1,78mg/ml ekstrak etil asetat (atau setara 20 MIC yang diperoleh dari pengujian secara *in vitro* (Fitrial dkk., 2008) dan FOS sebesar 6 %. Pada perlakuan dengan FOS diberikan sebanyak 6 % dari ransum dan diberikan dengan cara dicekok. Bahan penyusun ransum standar (grup kontrol) adalah kasein, maizena, minyak jagung, vitamin *mix*, mineral *mix*, selulosa, sesuai modifikasi (AOAC, 1990). Kasein sebagai sumber protein ransum (10 %).

Pada penelitian ini dilakukan intervensi EPEC K1.1 dengan cara dicekok pada konsentrasi 0,3 ml dari 10⁶ CFU/ml EPEC K1.1 selama 1 minggu sehingga tikus menjadi diare yang ditandai dengan feses yang lembek/ cair dan berlendir. Intervensi *E. coli* dilakukan selama 7 hari, yaitu setelah masing-masing grup tikus percobaan mendapat ransum perlakuan selama 14 hari. Setelah hari ke-21 intervensi dihentikan. Pemberian ransum percobaan dilakukan selama

28 hari. Tikus percobaan dibagi menjadi 4 grup tikus (@n=12 ekor), yaitu:

1. Grup yang mendapat ransum standar
2. Grup yang mendapat ransum standar yang disubstitusi dengan tepung biji teratai
3. Grup yang mendapat ransum standar + ekstrak etil asetat biji teratai (dicekok)
4. Grup yang mendapat ransum standar yang disubstitusi dengan FOS komersial (dicekok)

Evaluasi aktivitas biologis biji teratai dan ekstrak biji teratai terhadap tikus percobaan dilakukan dengan mengamati jumlah konsumsi ransum (setiap hari), berat badan (setiap 4 hari), jumlah bakteri asam laktat (BAL) aerob dan anaerob, total mikroba dan total *E.coli* yang terdapat pada isi sekum pada hari ke-0, 14, 21 dan 28.

Pengambilan Contoh pada Pengujian Secara *In Vivo*

Pengambilan contoh untuk analisis mikroba isi sekum dilakukan secara bertahap, yaitu awal sebelum perlakuan, 2 minggu setelah perlakuan, 3 minggu setelah perlakuan dan 4 minggu setelah perlakuan. Pada saat pengambilan contoh tikus dibius dengan menggunakan dietil eter dan dibedah untuk diambil bagian usus. Untuk pengamatan mikroba usus, pengambilan contoh dilakukan dengan mengeluarkan isi sekum dengan cara menggantung dinding sekum. 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, dimana pada hewan non-ruminansia seperti tikus, proses fermentasi oleh mikroba sebagian besar terjadi di bagian sekum (Le Blay dkk., 1999). Menurut Surono (2004), ekosistem mikroba pada bagian bawah saluran pencernaan dibagi menjadi dua sub ekosistem, salah satunya adalah bakteri luminal, dimana komposisi bakteri saluran pencernaan lumen hanya ditentukan oleh ketersediaan nutrisi dan pengaruh senyawa antimikroba.

Pengamatan mikroba isi sekum (total mikroba, total *E.coli* dan bakteri asam laktat) dianalisis dengan terlebih dahulu membuat larutan contoh. Larutan contoh dibuat dengan cara mengambil 0.5 gram isi sekum, kemudian dilarutkan ke dalam NaCl fisiologis (5 ml) sehingga terbentuk suspensi contoh. Selanjutnya dibuat serangkaian pengenceran menggunakan pengencer NaCl fisiologis.

Total mikroba. Suspensi contoh (pengenceran 10⁻¹) dibuat serangkaian pengenceran. Pada tingkat pengenceran yang sesuai, suspensi dipipet secara aseptik dan dipupukan sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri steril (*duplo*). Selanjutnya

dituangi PCA, digoyang dan setelah beku diinkubasi pada suhu 35-37 °C selama 48±2 jam, koloni yang tumbuh dihitung sebagai total mikrobia.

Total *E.coli*. Dari suspensi contoh dibuat pengenceran yang sesuai. Pada tingkat pengenceran tertentu (dimana diharapkan hasil 30-3000 koloni) dipipet 1 ml dan dipupuk ke EMBA (*eosin methylene blue agar*) 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 CaCO₃ dengan waktu inkubasi 3 hari. Inkubasi secara anaerob dilakukan dengan menggunakan *anaerobic jar* yang dilengkapi *gas generating kit*, pada suhu 37 °C.

Setelah inkubasi, mikroba diidentifikasi (morfologi koloni, morfologi sel, pewarnaan gram serta uji katalase) dan jumlah koloni spesifik dihitung dengan metode hitungan cawan. Hasil kuantifikasi dinyatakan dalam log CFU per gram isi sekum.

Analisis Histologi Jaringan Usus Halus Tikus Percobaan

Analisis histologi jaringan usus halus (*duodenum* dan *jejunum*) tikus percobaan dengan pewarnaan HE (hematoksin-eosin) dilakukan dengan metode Kiernan (1990).

Analisis Data

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komponen Fitokimia Biji Teratai dan Ekstrak Etil Asetat Biji Teratai

Analisis fitokimia secara kualitatif terhadap tepung biji teratai dan ekstrak biji teratai dilakukan untuk melihat komponen-komponen fitokimia yang diduga berperan sebagai antimikroba. Pada Tabel 1 terlihat biji teratai mengandung

hampir semua komponen fitokimia seperti alkaloid, tanin, saponin, glikosida, flavonoid, dan steroid/triterpenoid.

Hasil penelitian Fitriani dkk. (2008) menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat biji teratai memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* dan *Salmonella Typhimurium*. Ahmad dan Beg (2001) melakukan analisis fitokimia terhadap 40 ekstrak tanaman yang memiliki aktivitas antimikroba. Komponen fitokimia yang terdapat pada ekstrak tersebut adalah fenol (79 %), epi/gallotanin atau tanin terkondensasi (77 %), glikosida (49 %), saponin (38 %), flavonoid (28 %) dan alkaloid (25 %).

Aktivitas tanin sebagai antimikroba menurut Scalbert (1991) ada tiga mekanisme, yaitu (1) bersifat astringen (zat yang menciutkan), dimana tanin dapat membentuk kompleks dengan enzim mikroba ataupun substrat, (2) mekanisme terhadap membran mikroba, untuk mencapai membran tanin harus melewati dinding sel mikroba. Dinding sel terbuat dari polisakarida dan protein yang berbeda yang memungkinkan bagian dari tanin masuk, (3) tanin mengkompleks ion metal. Kebanyakan tanin memiliki lebih dari dua grup *o*-difenol pada molekulnya, yang dapat membentuk kelat dengan ion-ion metal seperti Cu dan Fe. Tanin mereduksi ketersediaan ion metal esensial untuk mikroorganisme.

Pengaruh Pemberian Tepung dan Ekstrak Biji Teratai pada Konsumsi Ransum dan Berat Badan Tikus Percobaan

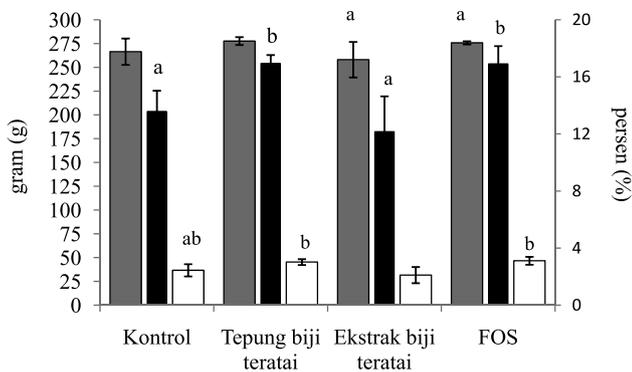
Penyusunan ransum yang disubstitusi dengan tepung biji teratai dilakukan secara *isokalori* dan *isonitrogen* dengan mempertimbangkan zat gizi yang terdapat pada biji teratai yang mempengaruhi pertumbuhan tikus percobaan seperti protein, lemak dan karbohidrat. Banyaknya konsumsi rata-rata tikus percobaan selama masa pemberian perlakuan (28 hari) dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada tikus percobaan yang diberi ransum standar, adanya intervensi EPEC menyebabkan tikus percobaan mengalami diare, meskipun total konsumsi ransumnya tidak berbeda dengan perlakuan lainnya ($P>0.05$), akan tetapi kenaikan bobot badannya lebih rendah 22 % jika dibandingkan dengan tepung biji teratai atau 21 % dibandingkan dengan FOS ($P<0.05$). Kondisi ini berpengaruh terhadap nilai efisiensi ransum (13,6 %) yang juga lebih rendah dibandingkan yang diberi tepung biji teratai (16,9 %) dan FOS (16,9 %). Hal

Tabel 1. Komponen fitokimia biji teratai dan ekstrak etil asetat biji teratai

	Komponen fitokimia						
	Alkaloid	Saponin	Tanin	Glikosida	Flavonoid	Steroid	Triterpenoid
Biji teratai	++++	+	+	++	+++	+++	+
Ekstrak etil Asetat biji teratai	++	+	++	++	+	-	++

Keterangan: + : positif lemah, ++ : positif, +++ : positif kuat, ++++ : positif kuat sekali, - : tidak terdapat pada sampel



Gambar 1. Konsumsi ransum rata-rata (g) ■, kenaikan bobot badan rata-rata (g) □ dan efisiensi ransum (%) ■ tikus percobaan yang diintervensi EPEC K1.1. Huruf yang sama pada histogram dengan warna yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

ini menunjukkan bahwa diare mengakibatkan terganggunya penyerapan zat gizi yang berkorelasi dengan bobot badan.

Nilai efisiensi ransum pada perlakuan tepung biji teratai dan FOS 4 % lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol dan ekstrak biji teratai ($P < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian tepung biji teratai dan FOS dapat mencegah terjadinya diare pada tikus percobaan dan mengefisienkan konsumsi ransum. Ransum digunakan untuk pertumbuhan yang ditunjukkan dengan peningkatan bobot badan walaupun dalam kondisi terinfeksi patogen.

Pada tikus percobaan yang diberi ekstrak biji teratai, meskipun setelah intervensi tidak menunjukkan gejala diare seperti halnya pada kontrol, tetapi kenaikan bobot badannya lebih rendah dibandingkan dengan yang diberi tepung biji teratai dan FOS. Meskipun total konsumsi rata-rata tidak berbeda dengan grup lainnya, akan tetapi pada grup yang diberi ekstrak biji teratai kenaikan bobot badan rata-rata per ekor tikus percobaan selama 28 hari lebih rendah hingga 32 % dibandingkan dengan grup lain ($P < 0.05$). Demikian pula dengan nilai efisiensi ransumnya. Adanya komponen aktif dari ekstrak biji teratai diduga menghambat penyerapan zat gizi oleh usus, yang mengakibatkan rendahnya kenaikan bobot badan. Komponen aktif yang diduga berpengaruh ter-

hadap penyerapan zat gizi diantaranya adalah tanin. Penambahan asam tanat pada ransum berpengaruh terhadap bobot badan tikus percobaan dan hal ini berkaitan erat dengan konsentrasi asam tanat dan kadar protein pada ransum (Barszcz dkk., 2011). Menurut Nakamura dkk. (2001) pemberian asam tanat 0,1 g/kg bobot badan tikus percobaan menyebabkan penurunan pada bobot badan. Sementara menurut Barszcz dkk. (2011) pemberian asam tanat pada ransum dengan kadar protein 10 %, menyebabkan penambahan bobot badan lebih rendah dibandingkan dengan kadar protein 18 % meskipun total asupan ransum tidak berbeda. Hal ini erat hubungannya dengan ketersediaan asam amino. Asam tanat mempengaruhi daya cerna dan penyerapan zat gizi, dimana menurut Mueller-harvey (2006) zat gizi yang paling sensitif terhadap tanin adalah protein. Tanin dapat mengikat protein sehingga tidak dapat dicerna dan diserap usus. Selain itu tanin juga menghambat aktivitas enzim pencernaan dan memodifikasi protein membran *brush border* yang menyebabkan menurunnya penyerapan zat gizi sehingga menurunkan bobot badan. Sementara itu, adanya alkaloid yang ditambahkan pada ransum tidak berpengaruh terhadap konsumsi ransum, daya cerna protein ataupun efisiensi pertumbuhan (Zdunczyk dkk., 1998).

Jika dibandingkan antara ekstrak etil asetat dengan tepung biji teratai, keduanya sama-sama mengandung komponen fitokimia seperti tanin dan alkaloid. Meskipun demikian pada tepung biji teratai masih ada komponen lain yaitu asam amino yang tidak terdapat di dalam ekstrak. Biji teratai mengandung asam amino yang lengkap (Khairina dan Fitriani, 2002), dimana menurut Tannous dkk. (1968) penambahan asam amino pembatas ke ransum yang sumber proteinnya adalah lupin, *Lupinus termis* (jenis kacang-kacangan yang kandungan alkaloidnya tinggi) efektif meningkatkan pertumbuhan pada tikus percobaan.

Pengaruh Pemberian Tepung Biji Teratai dan Ekstrak Etil Asetat Biji Teratai pada Total Mikroba, *E.coli*, Bakteri Asam Laktat Anaerob dan Aerob Isi Sekum Tikus Percobaan

Pada Tabel 2 terlihat jumlah awal total mikroba adalah 8.5 log CFU/g isi sekum, setelah diberi perlakuan selama 2

Tabel 2. Total mikroba isi sekum (Log_{10} CFU/g) tikus percobaan

Perlakuan	Total mikroba isi sekum			
	Minggu ke-0	Sebelum intervensi <i>E.coli</i> (Minggu ke-2)	Setelah intervensi <i>E.coli</i> (Minggu ke-3)	Setelah intervensi <i>E.coli</i> dihentikan (Minggu ke-4)
Kontrol	8.57 ± 0.40	8.43 ± 0.30 ^{ab}	8.01 ± 0.06 ^a	8.77 ± 0.23 ^a
Tepung biji teratai		9.25 ± 0.53 ^b	8.54 ± 0.25 ^a	8.24 ± 0.59 ^a
Ekstrak biji teratai		8.22 ± 0.74 ^a	8.16 ± 0.53 ^a	7.53 ± 1.24 ^a
FOS		8.14 ± 0.14 ^a	8.53 ± 0.44 ^a	9.05 ± 0.80 ^a

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

minggu terjadi peningkatan total mikroba pada isi sekum dari grup tepung biji teratai ($P < 0.05$). Intervensi EPEC K1.1 tidak menyebabkan peningkatan terhadap total mikroba isi sekum, baik pada grup tepung biji teratai, FOS maupun ekstrak biji teratai ($P > 0.05$).

Pemberian tepung biji teratai, ekstrak etilasetat dan FOS selama dua minggu pada tikus percobaan tidak menyebabkan perbedaan terhadap total *E.coli* isi sekum tikus percobaan ($P > 0.05$) (Tabel 3). Akan tetapi setelah dilakukan intervensi EPEC K1.1, pada tikus percobaan yang diberi tepung biji teratai, total *E.coli* isi sekum lebih rendah hingga 2 unit log ($P < 0.05$). Setelah satu minggu intervensi EPEC dihentikan, pada tikus percobaan yang diberi ransum standar, total *E.coli* isi sekum terlihat lebih tinggi mencapai 1 unit log dibandingkan pada tikus percobaan yang diberi tepung biji teratai, ekstrak biji teratai dan FOS ($P < 0.05$). Hal ini menunjukkan tepung biji teratai dan ekstrak biji teratai dapat menghambat atau mencegah tumbuhnya *E.coli* patogen yang dicekakkan pada saluran pencernaan hewan percobaan.

Menurut Hartemink (1997), enterobakter (seperti *E.coli*) mempunyai enzim yang dapat mendegradasi FOS. Meskipun *E.coli* dapat memfermentasi oligofruktosa pada kultur bersama dengan *B. infantis* secara *in vitro*, akan tetapi setelah 25 jam fermentasi terjadi penurunan jumlah *E.coli* dan setelah 35 jam sudah tidak ada pertumbuhan. Sebaliknya pada *B. infantis* yang jumlahnya stabil dari awal fermentasi hingga 60 jam fermentasi (Wang dan Gibson, 1993). Hal tersebut menunjukkan FOS secara tidak langsung dapat mencegah berkembangnya bakteri patogen dan mempertahankan kondisi tersebut setelah intervensi EPEC K1.1 dihentikan. Pemberian FOS sebelum hewan diinfeksi dengan patogen, mampu mencegah patogen berkembang pada inang melalui stimulasi bakteri asam laktat yang mampu memfermentasi gula/oligosakarida menjadi asam laktat, sehingga media tumbuh ber-pH rendah, dimana pada kondisi ini patogen tidak dapat tumbuh dan berkembang biak.

Setelah intervensi dihentikan terjadi penurunan total *E.coli* isi sekum pada grup FOS ($P < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian FOS setelah intervensi dihentikan mampu menurunkan jumlah patogen. Diketahui

bakteri asam laktat menghasilkan hidrogen peroksida yang memiliki efek bakterisidal (Surono, 2004). Oleh karena itu jumlah patogen semakin menurun setelah intervensi dihentikan.

Pada perlakuan tepung biji teratai, mekanisme penghambatan terhadap EPEC K1.1 ada dua yaitu penghambatan oleh komponen antimikroba yang diketahui dapat menghambat pertumbuhan EPEC K1.1 dan adanya komponen prebiotik yaitu oligosakarida rafinosa/stakiosa. Komponen prebiotik ini dapat difermentasi oleh bakteri asam laktat dan bifidobakteria sehingga menimbulkan kondisi yang asam. Pada kondisi asam, pertumbuhan *E.coli* dapat dihambat, sehingga diare pada inang dapat dicegah dan inang terlindungi dari patogen.

Adanya komponen fitokimia yang mempunyai aktivitas antibakteri pada biji teratai diduga juga berperan menghambat tumbuhnya *E.coli* pada saluran pencernaan hewan percobaan. 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. Hal yang sama diduga terjadi juga pada perlakuan ekstrak biji teratai sehingga diare pada tikus percobaan dapat dicegah.

Selain berperan sebagai antibakteri, komponen fitokimia juga berperan pada pertahanan mukosa usus, seperti halnya saponin diketahui memiliki aktivitas anti-ulcer melalui pembentukan perlindungan pada mucus permukaan mukosa usus (Aguwa dan Lawal, 1988). Tanin dan asam tanat mendenaturasi protein melalui pembentukan kompleks (protein-tanat), kompleks tersebut membentuk lapisan pada mukosa usus dan membuatnya lebih tahan sedangkan sekresi gastrik berkurang secara simultan (Aniagu dkk., 2005).

Flavonoid diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi (Otshudi dkk., 2000), antioksidan dan dapat memperkuat sistem pertahanan mukosa melalui stimulasi sekresi mukus gastrik (Aniagu dkk., 2005). Selain itu, flavonoid juga mempunyai aktivitas anti diare melalui penghambatan kontraksi pada ileum dengan menghambat influx Ca^{2+}

Tabel 3. Total *E. coli* isi sekum (Log_{10} CFU/g) tikus percobaan

Perlakuan	Total <i>E. coli</i> isi sekum			
	Minggu ke-0	Sebelum intervensi <i>E.coli</i> (Minggu ke-2)	Setelah intervensi <i>E.coli</i> (Minggu ke-3)	Setelah intervensi <i>E.coli</i> dihentikan (Minggu ke-4)
Kontrol	6.91 ± 0.49	6.16±0.57 ^a	6.84±0.38 ^b	6.94±0.13 ^c
Tepung biji teratai		6.42±0.60 ^a	4.66±0.66 ^a	5.13±0.52 ^a
Ekstrak biji teratai		6.87±0.60 ^a	6.32±0.10 ^b	5.89±0.33 ^b
FOS		6.68±0.38 ^a	6.66±0.91 ^b	4.75±0.32 ^a

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

ekstraseluler dan membebaskan Ca²⁺ intraseluler (Wang dkk., 2005). Flavonoid juga dapat menghambat produksi prostaglandin yang diketahui menyebabkan akumulasi cairan pada usus (*enteropooling*) dan motilitas saluran pencernaan (Agunu dkk., 2005; Gunakkunru dkk., 2005). Agunu dkk. (2005) menyimpulkan bahwa mekanisme antidiare suatu tanaman obat dapat melalui aktivitas antimikroba yang terkandung di dalam tanaman tersebut atau melalui penghambatan prostaglandin.

Selain itu, dari dalam tubuh hewan coba itu sendiri mempunyai pertahanan untuk melawan adanya patogen yang masuk ke dalam tubuh. Viabilitas bakteri dalam saluran pencernaan dipengaruhi oleh sekresi sel seperti mucus, lisozim dan fosfolipase yang dapat memberi dampak negatif maupun positif. Selain itu, sel epitel usus hewan coba juga dapat mengeksresikan antimikroba berupa peptida/protein yang dapat membuat membran sel bakteri menjadi permeabel dan mengalami kebocoran (Wilson, 2005).

Pengaruh intervensi EPEC K1.1 terhadap pertumbuhan BAL anaerob pada hewan coba menyebabkan jumlah BAL anaerob pada kontrol lebih dari 1 unit log lebih rendah dibandingkan substitusi tepung biji teratai (P<0.05) (Tabel 4). Hal ini diduga berkaitan dengan terjadinya persaingan nutrisi dan sisi penempelan pada mukosa antara *E.coli* dengan BAL. Sementara pemberian ekstrak etil asetat biji teratai dapat mencegah terjadinya diare akan tetapi mengakibatkan pertumbuhan BAL anaerob lebih rendah 0.84 unit log dibandingkan tepung biji teratai (P<0.05). Intervensi EPEC K1.1 pada hewan coba tidak berpengaruh terhadap total BAL

anaerob, baik pada grup yang disubstitusi tepung biji teratai dan FOS (P<0.05).

Pertumbuhan BAL aerob tidak terpengaruh dengan adanya intervensi EPEC K1.1 terutama pada grup tikus yang diberi ransum yang disubstitusi tepung biji teratai dan FOS (P<0.05) (Tabel 5). Meskipun terjadi sedikit penurunan jumlah BAL aerob jika dibandingkan dengan kondisi sehat (tidak diintervensi EPEC K1.1), jumlahnya masih lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (>1 unit log) dan ekstrak biji teratai. 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. Demikian pula pada FOS, pertumbuhan BAL aerobnya tidak terpengaruh dengan adanya intervensi EPEC K1.1 dan jumlahnya tidak berbeda dengan jumlah pada kondisi sehat (tanpa intervensi). Perlakuan substitusi biji teratai dan FOS mampu mempertahankan jumlah BAL aerob isi sekum pada kondisi intervensi EPEC K1.1 dihentikan.

Pengaruh pemberian tepung biji teratai selama 2 minggu mampu menstimulasi pertumbuhan bakteri asam laktat yang ditunjukkan dengan meningkatnya jumlah BAL anaerob dan aerob mencapai 1 unit log. Kondisi ini dapat dipertahankan setelah intervensi patogen dan setelah intervensi patogen dihentikan yang ditunjukkan dengan total BAL anaerob dan aerob yang tidak berbeda dengan FOS yang sudah diketahui

Tabel 4. Total BAL anaerob isi sekum (Log₁₀ CFU/g) tikus percobaan

Perlakuan	Total BAL anaerob isi sekum			
	Minggu ke-0	Sebelum intervensi <i>E.coli</i> (Minggu ke-2)	Setelah intervensi <i>E.coli</i> (Minggu ke-3)	Setelah intervensi <i>E.coli</i> dihentikan (Minggu ke-4)
Kontrol	8.341±0.472	8.56±0.60 ^a	7.56±0.35 ^a	8.20±0.35 ^{ab}
Tepung biji teratai		9.60±0.08 ^a	8.85±0.47 ^b	8.90±0.58 ^b
Ekstrak biji teratai		8.34±1.47 ^a	8.01±0.33 ^a	7.39±1.34 ^a
FOS		8.63±0.57 ^a	8.88±0.47 ^b	8.98±0.13 ^b

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Tabel 5. Total BAL aerob isi sekum (Log₁₀ CFU/g) tikus percobaan

Perlakuan	Total BAL aerob isi sekum			
	Minggu ke-0	Sebelum intervensi <i>E.coli</i> (Minggu ke-2)	Setelah intervensi <i>E.coli</i> (Minggu ke-3)	Setelah intervensi <i>E.coli</i> dihentikan (Minggu ke-4)
Kontrol	8.66±0.48	8.73±0.55 ^{ab}	7.89±0.41 ^a	8.57±0.21 ^{ab}
Tepung biji teratai		9.54±0.06 ^b	8.68±0.29 ^a	8.95±0.32 ^b
Ekstrak biji teratai		7.61±0.85 ^a	7.79±0.33 ^a	7.42±1.30 ^a
FOS		8.61±0.60 ^{ab}	8.60±0.47 ^a	8.86±0.07 ^b

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

memiliki aktivitas prebiotik. Selain itu, adanya komponen fitokimia pada biji teratai dapat menurunkan daya cerna protein menyebabkan sejumlah besar protein mencapai sekum, yang dapat menstimulasi pertumbuhan mikroflora proteolitik seperti *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* dan *Lactobacillus* (Barszcz dkk., 2011; Hughes dkk., 2000).

Histologi Tebal Mukosa Usus Halus Tikus Percobaan

Pengamatan terhadap histologi tebal mukosa usus ditujukan untuk mengetahui pengaruh intervensi *E.coli* terhadap kerusakan mukosa usus. Berdasarkan hasil penelitian dari Budiarti dan Mubarik (2007), EPEC K1.1 menghasilkan enzim protease ekstraseluler yang dapat mendegradasi mucin sehingga dapat melekat pada sel epitel usus dan menimbulkan diare pada inang. Hasil pengamatan secara kuantitatif terhadap tebal mukosa usus halus tikus percobaan dapat dilihat pada Tabel 6. Setelah intervensi EPEC K1.1, ketebalan mukosa usus pada kontrol terlihat mengalami penurunan hingga 45 % ($P < 0.05$) dibandingkan kondisi sebelum intervensi EPEC, yang menunjukkan terjadinya kerusakan/hilangnya mikrovili usus akibat intervensi EPEC K1.1. Mikrovili yang rusak berpengaruh terhadap ketebalan mukosa, menyebabkan vili-vili usus menjadi pendek dan jarang.

Tabel 6. Tebal mukosa (μm) usus halus tikus percobaan kelompok yang diintervensi EPEC

Perlakuan	Duodenum (μm)	Jejunum (μm)
Minggu ke-0	663.26 \pm 53.63	563.08 \pm 42.83
Minggu ke-2 (Sebelum intervensi)		
Kontrol	597.88 \pm 54.33 ^{ab}	477.48 \pm 79.91 ^a
Tepung biji teratai	779.39 \pm 31.93 ^c	567.67 \pm 46.22 ^a
Ekstrak etil asetat biji	554.40 \pm 54.31 ^a	497.24 \pm 70.89 ^a
FOS	678.58 \pm 76.22 ^{bc}	500.82 \pm 22.44 ^a
Minggu ke-3 (setelah intervensi)		
Kontrol	366.49 \pm 122.96 ^a	399.44 \pm 5.36 ^a
Tepung biji teratai	667.44 \pm 28.54 ^b	511.69 \pm 30.43 ^b
Ekstrak etil asetat biji	656.74 \pm 77.11 ^b	628.43 \pm 11.85 ^c
FOS	610.29 \pm 12.10 ^b	629.11 \pm 56.06 ^c
Minggu ke-4 (1 minggu setelah intervensi dihentikan)		
Kontrol	179.69 \pm 21.30 ^a	171.77 \pm 24.19 ^a
Tepung biji teratai	756.29 \pm 22.16 ^b	680.23 \pm 113.01 ^b
Ekstrak etil asetat biji	774.84 \pm 20.80 ^b	574.61 \pm 61.75 ^b
FOS	801.09 \pm 33.03 ^b	557.38 \pm 109.28 ^b

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada satu kolom untuk masing-masing minggu pengamatan menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Setelah satu minggu intervensi EPEC K1.1 dihentikan (perlakuan ransum yang sama tetap diberikan), terlihat tebal mukosa usus (baik duodenum maupun jejunum) mengalami

penurunan mencapai 73 % dari kondisi sebelum intervensi ($P < 0.05$). Hal ini menunjukkan walaupun intervensi EPEC sudah dihentikan kerusakan pada mukosa usus terus berlanjut. Kerusakan vili usus tersebut akibat serangan EPEC K1.1 dan menimbulkan diare. Sebaliknya pada mukosa usus tikus percobaan yang diberi tepung biji teratai, ekstrak biji teratai dan FOS, tebal mukosanya tidak berbeda dengan kondisi sebelum diintervensi EPEC dan tidak terjadi kerusakan pada mikrovili. Hal ini menunjukkan perlakuan substitusi biji teratai, FOS dan ekstrak biji teratai dapat mencegah dan mempertahankan mukosa usus dari serangan mikroba patogen

Biji teratai dan ekstrak etil asetat biji teratai mengandung komponen antimikroba yang dapat mencegah melekat dan berkembangnya *E.coli* patogenik pada mukosa usus. Adanya tanin pada tepung dan ekstrak biji teratai yang diketahui dapat mengendapkan protein (Scalbert, 1991), dapat menghambat aktivitas protease ekstraseluler yang diproduksi oleh EPEC K1.1 untuk mendegradasi mucin. Akibatnya, EPEC K1.1 tidak dapat melekat pada epitel usus dan diare pada tikus percobaan dapat dicegah. Selain itu, tanin yang terkandung di dalam biji teratai diketahui bekerja mengendapkan protein sehingga terjadi penurunan sekresi yang membuat mukosa usus lebih resisten (Adzu dkk., 2004).

Pada grup FOS dimana komposisi oligofruktosanya $\geq 93.2\%$ yang merupakan serat pangan yang dapat difermentasi menjadi asam lemak rantai pendek dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon oleh sel-sel epitel usus sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan mukosa usus. Selain itu, FOS dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri asam laktat dan *Bifidobacterium*, sehingga dapat menghambat pertumbuhan patogen (*E.coli*) (Manning dan Gibson 2004). Hal ini diduga juga terjadi pada perlakuan biji teratai.

KESIMPULAN

Biji teratai mengandung komponen fitokimia alkaloid, flavonoid, steroid, glikosida, tanin, terpenoid dan saponin. Sementara ekstrak etil asetat biji teratai mengandung alkaloid, tannin, glikosida, triterpenoid, flavonoid dan saponin. Biji teratai dan ekstrak etil asetat biji teratai dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab diare (EPEC K.1.1) pada tikus percobaan dengan kadar 1,87 g tepung biji teratai atau $\approx 13,23$ mg/g bobot badan tikus percobaan atau $\approx 17,8$ mg/ml ekstrak etil asetat. Pada kondisi diintervensi EPEC K.1.1, efisiensi ransum yang disubstitusi dengan biji teratai lebih tinggi dibandingkan ekstrak biji teratai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Ditjen Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia atas dana penelitian yang diberikan melalui Program Hibah Bersaing XIV (2006-2007). Terima kasih kepada Dr. dr. Sri Budiarti dari Laboratorium Bioteknologi Hewan dan Biomedis, Pusat Sumber Daya Hayati dan Bioteknologi LPPM IPB, yang telah memberikan koleksi isolat *E.coli* K.1.1 sebagai bakteri uji pada penelitian ini. Terima kasih juga disampaikan kepada PT. Foodtech Indonesia atas bantuan FOS yang digunakan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adzu, B., Tarfa, F., Amos, S. dan Gamaniel, K.S. (2004). The efficacy of *Sphaeranthus senegalensis* Vaill extract against diarrhea in rats. *J. Ethnopharmacology* **95**:173-176.
- Agunu, A., Yusuf, S., Andrew, G.O., Zezi, A.U. dan Abdurahman, E.M. (2005). Evaluation of five medicinal plants used in diarrhea treatment in Nigeria. *J. Ethnopharmacology* **101**:27-30.
- Aguwa, C.N. dan Lawal, A.M. (1988). Pharmacologic studies on the active principles of *Calliandra portoricensis* leaf extracts. *J. Ethnopharmacology* **22**:63-71.
- Ahmad, I. dan Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against muliti-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacology*, **74**:113-123.
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis*. Assosiation of Official Agricultural Chemists, Washington DC.
- Aniagu, S.O., Binda, L.G., Nwinyi, F.C. dan Orisadipe, A. (2005). Anti-diarrhoeal and ulcer-protective effects of the aqueous root extract of *Guiera senegalensis* in rodents. *J. Ethnopharmacology* **97**: 549-554.
- Barszcz, M., Taciak, M. dan Skomial, J. (2011). A dose-response effects of tannic acid and protein on growth performance, caecal fermentation, colon morphology, and glucuronidase activity of rats. *J. Animal and Feed Science* **20**:613-625.
- Budiarti, S. dan Mubarik, N.R. (2007). Extracellular protease activity of Enteropathogenic *Escherichia coli* on mucin substrate. Short Communication. *HAYATI J. Biosciences*, **14**(1): 36-38.
- Cowan, M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*: 564-582.
- Departemen Kesehatan (1995). *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Departemen Kesehatan (1997). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* (IV). Depkes Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.
- Fitrial, Y., Astawan, M., Soekarto, S.S., Wiryawan, K.G., Wresdiyati, T. dan Khairina, R. (2008). Aktivitas antibakteri ekstrak biji teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) terhadap bakteri patogen penyebab diare. *J. Teknol. dan Industri Pangan* **19**(2): 158-164.
- Grieve, M. (2004). Monograph-A Modern Herbal. www.herbdatan2.com. [15 Januari 2004].
- Gunakkundru, A., Padmanaban, K., Thirumal, P., Pritila, J., Parimal, G., Vengatesan, N., Gnanasekar, N., Perianayagama, J.B., Sharma, S.K. dan Pillai, K.K. (2005). Anti-diarrhoeal activity of *Butea monosperma* in experimental animals. *J. Ethnopharmacology* **98**:241-244.
- Hartemink, R., Van Laere, K.M.J. dan Rombouts, F.M. (1997). Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* **83**:367-374.
- Hughes (2004). Lily, White Pond. www.botanical.com. [4 Maret 2004].
- Hughes, R., Magee, E.A.M. dan Bingham, S. (2000). Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr. Issue Intest. Microbia*, **12**: 1-58.
- Khairina, R. dan Fitrial, Y. (2002). Produksi dan kandungan gizi biji teratai (*Nymphaea pubescens* Wild) tanaman air yang terdapat di hulu sungai utara. *Jurnal Ilmiah Fakultas Pertanian UNLAM* **2**:77-88.
- Kiernan, J.A. (1990). *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. Pergamon Press, London.
- Le Blay, G., Michel, C., Blottiere, H.M. dan 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. *J. Nutrition* **129**: 2231-2235.
- Manning, T.S. dan Gibson, G.R. (2004). Prebiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* **18**(2): 287-298.
- Mariato, L.A. (2001). *Tanaman Air*. Penerbit PT Agro Media Pustaka, Jakarta.

- Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agriculture* **86**: 010-2037.
- Nakamura Y., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S. dan Tonogai, Y. (2001). Effects of oral administration of green tea polyphenol and tannic acid on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in rats. *J. Health Sci.* **47**:107-117.
- Otshudi, L.A, Vercruysse, A. dan Foriers, A. (2000). Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *J. Ethnopharmacology* **71**: 411-423.
- Sastrapradja dan Bimantoro. (1981). *Tumbuhan Air*. Lembaga Biologi Nasional-LIPI, Bogor.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tanins. Review Article Number 63. *Phytochemistry* **30**(12): 3875-3883.
- Surono, I.S. (2004). *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. YAPMMI, Jakarta.
- Tannous, RI., Shadarevian, S. dan Cowan, J.W. (1968). Rat studies of protein and growth-inhibiting action of alkaloids of lupine (*Lupinus termis*). *J. Nutrition* **94**:161-165.
- Wang, X. dan Gibson, G.R. (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Applied Bacteriology* **75**:373-380.
- Wang, H, Tan, C., Bai, X., Du, Y. dan Lin, B. (2005). Pharmacological studies of anti-diarrhoeal activity of *Gentianopsis padulosa*. *J. Ethnopharmacology* **105**(1-2):114-117.
- Wilson, M. (2005). *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and disease*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Zdunczyk, Z, Juskiewicz, J., Frejnagel, S. dan Gulewicz, K. (1998). Influence of alkaloids and oligosaccharides from white lupin seeds on utilization of diets by rats and absorption of nutrients in the small intestine. *Animal Food Science Technology* **72**:143-154.
- Zopf, D. dan Roth, S. (1996). Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* **347**:1017-21.