

## KERAGAMAN BAKTERI ASAM LAKTAT SECARA MOLEKULER PADA ILEUM DAN SEKUM AYAM BROILER YANG DIBERI PAKAN PREBIOTIK BEKATUL DAN BEKATUL HASIL FERMENTASI

**Laelatul Baniyah, Siti Nur Jannah, MG. Isworo Rukmi**

Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika,  
Universitas Diponegoro Tembalang, Jln Prof. Soedarto, SH, Semarang 50275  
Telepon (024)7474754; Fax. (024)76480690

### Abstract

Lactic Acid Bacteria (LAB) is a digestive tract microflora that play a positive role in poultry health. The number and diversity of LAB in the digestive tract affected by several factors, among them was the kind of feed. The purpose of this research was to know the molecular diversity of Lactic Acid Bacteria (LAB) in broiler's ileum and cecum after feeding with prebiotic bran and *Rhizopus oryzae* fermented bran which was added to commercial feed. The molecular analysis was done using T-RFLP method, *Hae* III and *Msp* I were used as restriction enzymes. The number of phylotype, relative abundance, Shannon diversity index ( $H'$ ), evenness ( $E$ ), and Dominance ( $D$ ) were examined. The results indicated that the addition of bran prebiotics on commercial feed showed a higher diversity of lactic acid bacteria on broiler's ileum and cecum, compared with the addition of *Rhizopus oryzae* fermented bran. The dominant BAL types are *Lactobacillus* spp, *L. delbrueckii* subs. *Bulgaricus*, *L. intermedius*, *L. amilovor*us, *uncultured bacteria* 87 bp, 280 bp, 331 bp and *unidentified bacteria* 74 bp, 82 bp, 131 bp.

*Keywords: Diversity, Lactic Acid Bacteria, Prebiotics, Bran, T-RFLP*

### Abstrak

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan mikroflora saluran pencernaan yang berperan positif dalam kesehatan unggas. Jumlah dan keragaman BAL di dalam saluran pencernaan dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah faktor pakan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keragaman BAL pada ileum dan sekum ayam broiler setelah pemberian prebiotik bekatul dan bekatul hasil fermentasi *Rhizopus oryzae*. Penelitian ini dilakukan secara molekuler, yaitu T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) dengan menggunakan enzim *Hae* III dan *Msp* I. Nilai yang dihitung yaitu jumlah filotipe, kelimpahan relatif, indeks keragaman Shannon ( $H'$ ), pemerataan ( $E$ ), dan dominansi ( $D$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan prebiotik bekatul meningkatkan keragaman bakteri asam laktat pada ileum dan sekum, dibandingkan dengan pemberian prebiotik bekatul hasil fermentasi *R.oryzae*. Jenis BAL yang dominan adalah *Lactobacillus* sp, *L. delbrueckii* subs *Bulgaricus*, *L. intermedius*, *L. amilovor*us, *uncultured bacteria* 87 bp, 280 bp, 331 bp dan *unidentified bacteria* 74 bp, 82 bp, 131 bp.

*Kata kunci: Keragaman, Bakteri Asam Laktat, Prebiotik, Bekatul, T-RFLP*

## PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu jenis mikroflora normal saluran pencernaan ayam, yang berpotensi sebagai probiotik dengan merangsang respons kekebalan tubuh, mencegah infeksi bakteri enteropatogen, mengobati dan mencegah diare (Reid, 1999). Mekanisme yang terjadi dalam saluran pencernaan cukup kompleks, melibatkan modulasi kekebalan, produksi peroksida, asam dan bakteriosin, serta protein yang mengubah permeabilitas epitel dan mengikat reseptor usus untuk patogen. Menurut Suarsana (2004) BAL di dalam saluran pencernaan dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah pakan. Keseimbangan BAL didalam saluran pencernaan berpengaruh baik terhadap performa dan kesehatan ayam (Yogaswara, 2016).

Prebiotik adalah bahan pangan non digestible yang mampu menstimulir pertumbuhan bakteri kolon dan aktivitas probiotik. Patterson dan Burkholder (2003) melaporkan bahwa prebiotik yang dominan digunakan saat ini adalah produk frukto-oligosakarida seperti inulin dan oligofruktosa. Prebiotik tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan manusia atau hewan, sehingga dapat berfungsi sebagai substrat bagi pertumbuhan bakteri yang menguntungkan, terutama yang berada pada usus bagian bawah. Penambahan prebiotik pada pakan juga dapat mengurangi jumlah *clostridia* dan meningkatkan resistensi kolonisasi terhadap patogen (Gibson *et.al.*, 2004).

Bekatul merupakan salah satu produk samping pertanian yang melimpah di Indonesia, hasil samping penggilingan padi berupa bekatul sekitar 2,5 juta ton dari 32 juta ton padi.

Bekatul memiliki potensi sebagai bahan pakan, namun pemanfaatannya terutama untuk hewan monogastrik masih terbatas. Keterbatasan ini disebabkan oleh kandungan serat yang tinggi, protein rendah, dan faktor antinutrisi seperti asam fitat (Supriyati *et.al.* 2015).

Fermentasi merupakan salah satu teknik untuk meningkatkan kualitas pakan, yaitu penguraian bahan organik kompleks menjadi bahan organik sederhana yang mudah diserap (Kurniati *et.al.*, 2017), sehingga meningkatkan asupan pakan, laju pertumbuhan, dan memperbaiki rasio konversi pakan (Ya ar *et.al.*, 2016). Menurut Oliveira *et.al.* (2010) Bekatul yang telah difermentasi oleh *R. oryzae* mengalami perubahan komposisi fisiko-kimia, sehingga memungkinkan untuk meningkatkan ketersediaan nutrisi dalam bahan baku (Pelizer *et.al.*, 2007).

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keragaman Bakteri Asam Laktat secara molekuler, pada ileum dan sekum ayam broiler setelah pemberian pakan prebiotik bekatul dan bekatul hasil fermentasi.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2017- April 2017. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang.

### Bahan dan Alat

Bahan digunakan meliputi sampel isi lumen ileum dan sekum hasil tiga perlakuan, yaitu perlakuan kontrol (P<sub>0</sub>), kontrol diberi prebiotik bekatul (P<sub>1</sub>), dan kontrol diberi prebiotik bekatul hasil fermentasi *R.oryzae* (P<sub>2</sub>); kontrol

positif dari *Lactobacillus salivarius*, larutan PBS (*Phosphat Buffer Salin*), DNA isolation KIT, *primer forward* 7F-FAM, *primer reverse* spesifik untuk Bakteri Asam Laktat SG-Lab-0677, *GoTaq GreenMaster Mix*, 1x buffer TAE, Etidium Bromida, agarose, Purifikasi KIT, enzim restriksi *HaeIII* dan *MspI*, buffer Tanggo, buffer R, *nuclease free water*, dan etanol.

Alat yang digunakan meliputi *autoclaf*, *Laminar Air flow*, mikropipet, tip, tabung eppendorf, *incubator*, *ice box*, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Elektroforesis, *Gel Documentation System*, vortex, sentrifugasi, termometer, *freezer*, *gloves*, layanan *Fragment Analysis 1<sup>st</sup> base* ([http://www.base-asia.com/fragment\\_analysis/](http://www.base-asia.com/fragment_analysis/)), *automatic sequence analyzer* (mode scan gen), Peak Sceaner™ software v1.0. dan program analisis *MiCAIII* secara online (*Microbial community analysis III*).

## Cara Kerja Penelitian

### a. Preparasi Sampel

Sampel diambil dari isi lumen ileum dan sekum ayam broiler hasil tiga perlakuan, yaitu kontrol pakan komersial (P<sub>0</sub>), pakan komersial diberi prebiotik bekatul (P<sub>1</sub>), dan pakan komersial diberi prebiotik bekatul hasil fermentasi *R.oryzae* (P<sub>2</sub>), yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi dan Biokimia, Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang. Sampel diambil secara aseptik, di masukan ke dalam tabung *eppendorf*, dibawa ke Laboratorium menggunakan *ice box* dan disimpan di bawah suhu -20°C sampai dilakukan isolasi DNA genom.

### b. Isolasi DNA Genom

Sampel diekstraksi dengan menggunakan PowerSoil<sup>R</sup> DNA Isolation Kit sesuai dengan instruksi perusahaan (Burbach *et.al.*, 2015).

Instruksi PowerSoil<sup>R</sup> DNA Isolation Kit meliputi tahap penghancuran, penghilangan RNA dan protein dan tahap pemurnian DNA.

### c. Amplifikasi Gen 16S rRNA

Amplifikasi dilakukan menggunakan *primer forward* 7F (5'-6FAM-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3') berlabel dan *primer reverse* spesifik untuk bakteri asam laktat SG-lab-0677 (5' CAC CGC TAC ACA TGG AG-3') yang tidak berlabel (Dicksved *et.al.*, 2007). Campuran reaksi PCR terdiri atas 25 µL *GoTaq GreenMaster Mix* (Promega, USA) 2 µL dari masing-masing primer (10 pMol) dan destilated water sampai akhir 50 ml dan 100 ng DNA Template dalam konsentrasi akhir. Kondisi PCR dilakukan dengan denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, diikuti dengan 30 siklus dari denaturasi pada suhu 95 °C selama 40 detik, suhu *annealing* 52 °C selama 40 detik dan suhu ekstensi/perpanjangan pada suhu 72 °C selama 1 menit, kemudian pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 7 menit. Sampel di amplifikasi dengan menggunakan takara PCR Thermal Cycler Dice<sup>R</sup> Gradien (TAKARA BIO INC, Jepang).

### d. Elektroforesis Hasil Amplifikasi

Produk PCR dikonfirmasi dengan elektroforesis dengan menggunakan 1% gel agarose dalam 1 x buffer TAE 100 ml. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada 100 volt. Setelah elektroforesis, DNA divisualisasi dibawah sinar ultraviolet dalam ruang gelap dan ambil gambarnya dengan menggunakan *Gel Documentation System* (Atto Corporation, Jepang).

### e. Purifikasi DNA Hasil Amplifikasi

Produk PCR dimurnikan dengan GeneJet™ PCR purification Kit (Fermentas, USA) sesuai dengan

intruksi perusahaan. DNA yang diperoleh dari pemurnian ditambahkan 40  $\mu\text{L}$  *elution buffer* dan disimpan pada suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai penggunaan selanjutnya (Dinoto *et.al.*, 2006).

#### **f. Restriksi Produk Purifikasi dengan Enzim Restriksi**

Pemotongan dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII* dan *MspI* (Fermentas, USA) (Dicksved *et.al.*, 2007). Setiap reaksi terdiri atas 15 unit enzim restriksi (1,5  $\mu\text{L}$ ) dari, 10 x buffer restriksi (2  $\mu\text{L}$ , buffer R untuk enzim *HaeIII* dan bufer Tango untuk bufer *MspI*) dan <100 ng DNA sampel (10  $\mu\text{L}$ ), *nuclease-free water* sampai volume akhir 20  $\mu\text{L}$ . Sampel diinkubasi pada suhu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 16 jam, dan di non aktifkan pada suhu  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit, dan segera didinginkan dalam *ice bath* sesuai dengan instruksi dari perusahaan. Produk restriksi dipresipitasi dengan presipitasi etanol dan dikeringkan.

#### **g. Analisis T-RFLP**

Analisis fragmen/potongan PCR dilakukan pada jasa layanan *Fragment analysis 1<sup>st</sup> base* ([http://www.base-asia.com/fragment\\_analysis/](http://www.base-asia.com/fragment_analysis/)). Kondisi reaksi yang digunakan untuk mengetahui panjang potongan produk PCR yang berlabel bahan *fluorescence* adalah sampel DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi yang telah dipurifikasi (1  $\mu\text{L}$ ) ditambah dengan campuran 10 ml formamida dan standar internal (GeneScan- 500 ROX, Applied Biosystems) (100:5, vol/vol). Potongan T-RF yang dilabel dianalisa dengan elektroforesis dengan *automatic sequence analyzer* (ABI PRISM 3100. Applied Biosystems) pada mode Scan gen, dan panjang dari T-RF ditentukan dengan membandingkan ukuran standar menggunakan Peak Scanner<sup>TM</sup> software

v1.0 (Applied Biosystems) (Dinoto *et al.* 2006).

#### **h. Pengolahan data**

Pengolahan data dilakukan hanya pada T-RF lebih besar dari atau sama dengan 50 bp dan persentase area puncak/*peak area* lebih besar dari atau sama dengan 1 % digunakan untuk analisis lebih lanjut. Diversitas/keragaman bakteri merupakan kekayaan/ jumlah dan kelimpahan filotipe dari komunitas bakteri. Nilai biodiversitas ditentukan berdasarkan jumlah filotipe (S), Kelimpahan relatif (%) dihitung berdasarkan luas wilayah puncak (area puncak) dibagi total luas area puncak seluruh ukuran T-RF dikali 100%, Indeks keragaman Shannon-Wiener ( $H'$ )=  $-\sum p_i \ln(p_i)$ , Indeks kemerataan Pielous ( $E$ )=  $H'/\ln(S)$  dan Indeks dominansi  $D = [\sum n_i N^{-1}]^2$ . Identifikasi T-RF digunakan program dari *MiCAIII(Microbial Community Analysis III)* dengan menggunakan database RDP (R10, U27) yang terdiri atas 1.519.356 bakteri 16S rRNA (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>).

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Analisis komunitas mikroba dalam ekosistem yang kompleks, seperti isi saluran pencernaan, memerlukan kualitas dan kuantitas DNA yang memadai. DNA genom bakteri sampel berhasil diekstrak menggunakan PowerSoil<sup>R</sup> DNA isolation Kit. Hasil ekstraksi diperoleh konsentrasi DNA berkisar antara 6,5-14,9 ng/ $\mu\text{L}$ , sedangkan nilai rasio panjang gelombang 260/280 nm berkisar antara 1,32-2,15 nm (Tabel 1). Nilai tersebut menunjukkan kualitas DNA yang baik dan kurang baik. Nilai kualitas DNA yang baik, yaitu 1,8-2,0 nm, sedangkan

kualitas yang kurang baik memiliki nilai kurang atau lebih dari kualitas DNA yang baik. Kurangnya nilai tersebut, disebabkan karena kontaminasi oleh

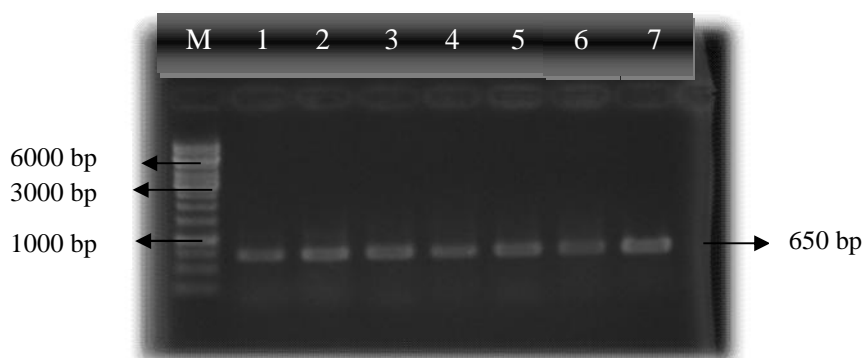
fenol dan pelarut, sedangkan lebih dari nilai tersebut, disebabkan karena kontaminasi oleh protein (Sambrook *et.al.*, 1998).

Tabel 1. Konsentrasi dan kemurnian DNA genom

Perlakuan	Konsentrasi (ng/μl)		260/280 nm	
	Ileum	Sekum	Ileum	Sekum
P <sub>0</sub>	7,3	14,4	2,15	2
P <sub>1</sub>	6,5	13,5	1,66	1,98
P <sub>2</sub>	11,8	14,9	1,83	1,32

Keterangan: P<sub>0</sub>= kontrol pakan komersial; P<sub>1</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul; P<sub>2</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul hasil fermentasi *R. oryzae*

Visualisasi hasil amplifikasi Gen 16S rRNA (Gambar 1) diperoleh pita DNA berukuran 650bp pada setiap sampel. Hal ini menginformasikan bahwa hasil amplifikasi sesuai dengan kontrol positif *Lactobacillus salivarius* (Jannah, 2014).



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA

Keterangan: M=Marker 1kb; 1= P<sub>0</sub>i; 2= P<sub>0</sub>s; 3= P<sub>1</sub>i; 4= P<sub>1</sub>s; 5= T<sub>2</sub>i; 6= P<sub>2</sub>s; 7=Kontrol positif (*Lactobacillus salivarius*). P<sub>0</sub>= kontrol pakan komersial; P<sub>1</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul; P<sub>2</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul hasil fermentasi *R. oryzae*. I = ileum; S = sekum

Hasil amplifikasi kemudian dimurnikan dengan menggunakan GeneJet™ PCR purification Kit (Fermentas, USA). Hasil pengukuran konsentrasi DNA berkisar antara 44,3-72,3 ng/μL, sedangkan nilai rasio panjang gelombang 260/280 yang diperoleh berkisar antara 1,66-1,89 nm (Tabel 2).

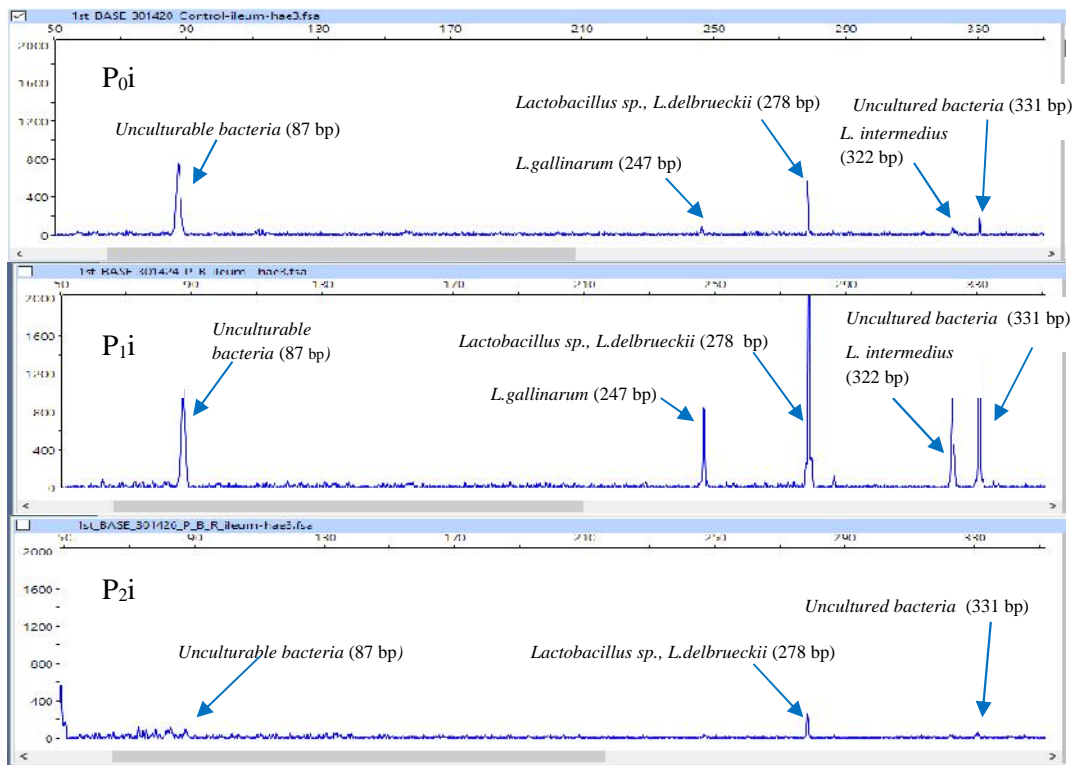
Tabel 2. Konsentrasi dan kemurnian hasil purifikasi

Perlakuan	Konsentrasi (ng/μl)		260/280 nm	
	Ileum	Sekum	Ileum	Sekum
P <sub>0</sub>	51,3	68,9	1,79	1,89
P <sub>1</sub>	72,3	65,2	1,77	1,76
P <sub>2</sub>	44,3	54,4	1,69	1,66

Keterangan: P<sub>0</sub>= kontrol pakan komersial; P<sub>1</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul; P<sub>2</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul hasil fermentasi *R. oryzae*

Hasil purifikasi selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII* (*Thermo Scientific*) dan *MspI* (*Thermo Scientific*) dengan waktu inkubasi 16 jam. Enzim restriksi *HaeIII* dan *MspI* telah banyak digunakan untuk analisis T-RFLP karena hasil T-RF sesuai target (Dinoto *et al.* 2006). Gambar 2 menunjukkan pola dinamika populasi BAL hasil pemotongan enzim restriksi *HaeIII* pada ileum. Penambahan prebiotik bekatul cenderung meningkatkan populasi *uncultured bacteria* (87 bp), *Lactobacillus sp* (278 bp), *L. gallinarum* (247 bp),

*L. delbrueckii subs. Bulgaricus* (278 bp), *L. intermedius* (322 bp) dan *uncultured bacteria* (331 bp) pada ileum dibandingkan dengan kontrol, sedangkan penambahan prebiotik bekatul hasil fermentasi *R.oryzae* cenderung menurunkan populasi *uncultured bacteria* (87 bp), *Lactobacillus sp* (278 bp), *L. delbrueckii subs. bulgaricus* (278 bp), dan *uncultured bacteria* (331 bp), serta menghilangkan populasi dari *L. gallinarum* (247 bp) dan *L. intermedius* (322 bp).



Gambar 2. Profil T-RFLP gen 16S rRNA BAL ileum ayam broiler yang dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII*

Keterangan: P<sub>0</sub>= kontrol pakan komersial; P<sub>1</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul; P<sub>2</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul hasil fermentasi *R. oryzae*; I = ileum

Kecenderungan peningkatan bakteri pada ileum akibat penambahan prebiotik bekatul dan penurunan akibat penambahan prebiotik bekatul hasil fermentasi *R.oryzae*, dapat disebabkan

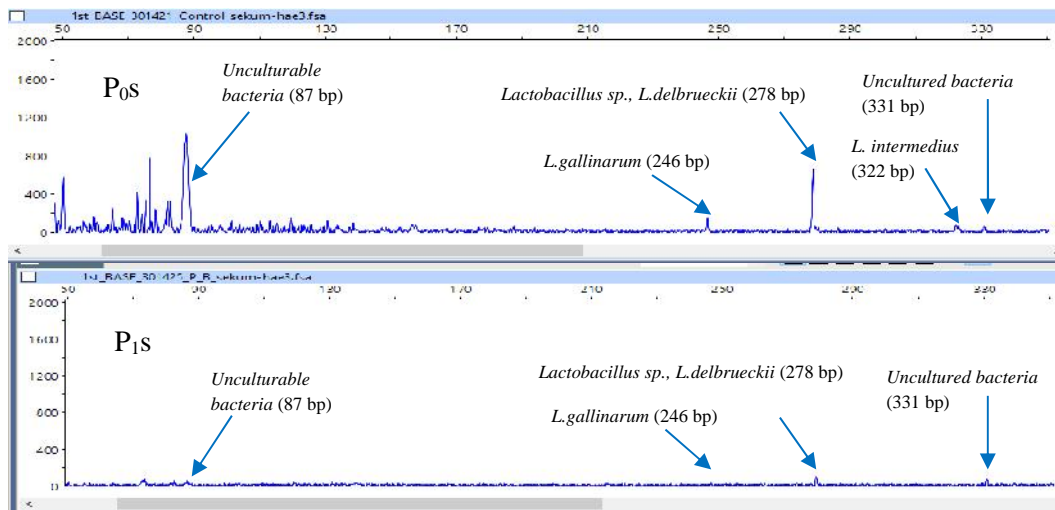
karena kualitas pakan serta viskositas isi ileum akibat pakan. Fermentasi akan meningkatkan kualitas pakan, karena bahan organik kompleks diurai menjadi bahan organik sederhana, sehingga

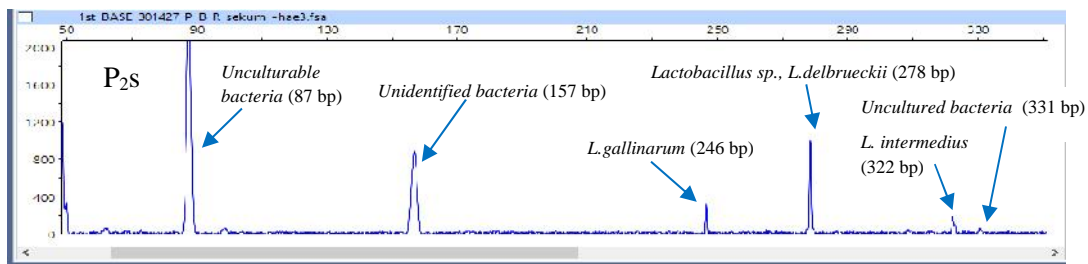
mudah diserap (Kurniati *et. al.*, 2017). Hasil fermentasi mampu meningkatkan asupan pakan, laju pertumbuhan, dan memperbaiki rasio konversi pakan pada ayam (Ya ar *et.al.*, 2016). Kualitas bahan baku, kandungan nutrisi, kontaminasi mikotoksin, dan kualitas fisik pakan (ukuran partikel) dapat mempercepat atau memperlambat laju pergerakan di dalam saluran pencernaan (*feed passage*) (tef *et.al.*, 2009).

Peningkatan viskositas isi lumen usus mampu mengurangi pencernaan, kinerja usus, serta menghambat pergerakan partikel dan zat terlarut di lumen usus, sehingga mendukung pertumbuhan bakteri usus (Annett *et.al.*, 2002). Analisis kandungan bekatul dan bekatul hasil fermentasi *R.oryzae* berdasarkan hasil penelitian Oliveira *et.al.* (2010) (Tabel 3).

Tabel 3. Kandungan bekatul dan bekatul fermentasi *R.oryzae*

	Bekatul (%)	Fermentasi bekatul oleh <i>R.oryzae</i> (4 hari) (%)
Kelembapan	11,8	40,4
Abu	10,4	14,1
Serat	8,5	14,5
Lemak	18,9	11,0
Protein	14,7	23,4
Gula reduksi	2,1	0,77
Asam fitat	1,0	0,4
Cernaan Asam amino medium	1,1	1,98
Cernaan Asam amino protein	7,49	8,47





Gambar 3. Profil T-RFLP gen 16S rDNA BAL sekum ayam broiler yang dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII*

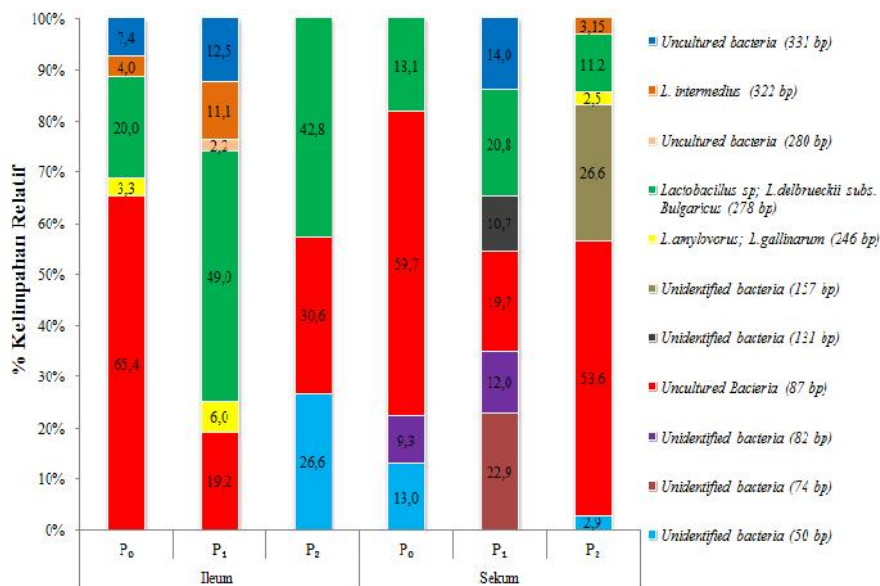
Keterangan: P<sub>0</sub>= kontrol pakan komersial; P<sub>1</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul; P<sub>2</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul hasil fermentasi *R. oryzae*; S = sekum

Pola dinamika populasi BAL hasil pemotongan enzim restriksi *HaeIII* pada sekum ayam broiler dengan perlakuan kontrol, penambahan prebiotik bekatul, dan bekatul hasil fermentasi *R.oryzae* (Gambar 3). Penambahan prebiotik bekatul cenderung menurunkan populasi *uncultured bacteria* (87 bp), *Lactobacillus sp* (278 bp), *L. gallinarum* (247 bp), *L. delbrueckii subs. bulgaricus* (278 bp), dan *uncultured bacteria* (331 bp) pada sekum dibandingkan dengan kontrol, sedangkan penambahan prebiotik bekatul fermentasi *R.oryzae* cenderung meningkatkan populasi *uncultured bacteria* (87 bp), *Lactobacillus sp* (278 bp), *L. gallinarum* (247 bp), *L. delbrueckii subs. bulgaricus* (278 bp), dan *L. intermedius* (322 bp), serta

memunculkan populasi baru yaitu *unidentified bacteria* (157 bp).

Kecenderungan peningkatan populasi bakteri pada sekum akibat penambahan prebiotik bekatul hasil fermentasi *R.oryzae* dan penurunan akibat penambahan prebiotik bekatul, dapat disebabkan karena perbedaan kandungan serat yang terkandung dalam pakan. Bekatul hasil fermentasi *R.oryzae* mengandung serat sebesar 14,5 %, sedangkan pada bekatul sebesar 8,5 % (Oliveira *et.al.*, 2010). Menurut Yuwanta (2004) penggunaan serat kasar 5-20% memberikan variasi terhadap perkembangan, jumlah bakteri, dan dinamika bakteri selulolitik pada usus halus, sekum dan kolon itik dengan berbagai level serat kasar.





Gambar 4. Kelimpahan relatif filotipe BAL ileum dan sekum ayam broiler

Keterangan: P<sub>0</sub>= kontrol pakan komersial; P<sub>1</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul; P<sub>2</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul hasil fermentasi *R. oryzae*

Kelimpahan relatif filotipe BAL pada ileum dan sekum ayam broiler, dengan tiga perlakuan memiliki nilai yang berbeda (Gambar 4). Analisis kelimpahan relatif menggunakan data T-RF *HaeIII*, karena jumlah T-RF yang lebih banyak dibandingkan dengan *MspI*. Hal ini sesuai Pangastuti (2008) bahwa untuk analisis kelimpahan relatif profil T-RF digunakan data yang menghasilkan lebih banyak T-RF.

Jenis BAL yang ditemukan hampir pada semua sampel adalah, *unidentified bacteria* (50bp; 74bp; 82bp; 131bp; dan 157bp), *uncultured bacteria* (87bp; 280bp; dan 331bp), *Lactobacillus sp*, *L. delbrueckii subs. Bulgaricus*, *L. intermedius*, dan *L. gallinarum*. Jenis *Lactobacillus sp*, *L. delbrueckii subs. Bulgaricus* dan *uncultured bacteria* 87bp memiliki kelimpahan relatif yang lebih tinggi dibandingkan dengan jenis lainnya. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Ranjitkar *et al.* (2016) yang melaporkan populasi *L. salivarius* lebih dominan pada sekum dan ileum pada usia 36 hari, dan pada mukosa ileum pada usia

35 hari (Wang *et al.*, 2016). Hal ini dapat disebabkan karena beberapa faktor yang mempengaruhi seperti, umur, pola makan, jenis serabut, transfer gen horisontal, jenis ayam, geografi, iklim, dan lingkungan. Mikroflora sekum ayam setelah menetas serupa dengan mikroflora ileum, setelah masa tersebut ileum dan sekum memiliki komposisi mikroflora yang sangat berbeda, masing-masing mengembangkan komunitas bakteri yang unik (Lu *et.al.*, 2003).

Hasil analisis dari data setiap sampel ileum dan sekum ayam broiler dengan tiga perlakuan (Tabel 4) menggambarkan, bahwa nilai indeks keragaman (*H*) BAL ileum dan sekum termasuk dalam kategori rendah hingga tinggi. Tinggi rendahnya indeks keragaman dipengaruhi oleh jumlah spesies, pemerataan, dan indeks dominansi pada setiap lingkungan. Menurut Estradivari dkk. (2009) semakin banyak jumlah jenis, maka semakin beragam komunitasnya dan jika semakin banyak individu dari setiap

jenis, semakin besar peran jenis tersebut dalam komunitas.

Tabel 4. Jumlah Filotipe, Indeks Keragaman, Kemerataan, dan Dominansi

	Ileum			Sekum		
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
Jumlah Filotipe (S)	3,5	5	3,5	4,5	5,5	4,5
Indeks keragaman Shannon (H')	0,838	1,343	1,044	1,053	1,566	1,103
Indeks kemerataan Pielous (E)	0,786	0,853	0,709	0,700	0,918	0,786
Indeks Dominansi (D)	0,512	0,312	0,406	0,466	0,235	0,399

Keterangan: P<sub>0</sub>= kontrol pakan komersial; P<sub>1</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul; P<sub>2</sub>= pakan komersial + prebiotik bekatul hasil fermentasi *R. oryzae*

Sampel pada sekum hasil perlakuan prebiotik bekatul memiliki indeks keragaman tertinggi ( $H'=1,566$ ) dibandingkan dengan sampel lainnya. Jenis filotipe BAL yang ditemukan lebih banyak, indeks kemerataan (*E*) mempunyai nilai 0,918 yang berarti komunitas dilingkungan tersebut merata dan stabil, serta indeks dominansi (0,235) menunjukkan tidak terdapat spesies yang mendominasi komunitas tersebut. Hal ini dapat diakibatkan karena faktor pakan dan lingkungan dalam sekum. Ileum dan sekum ayam memiliki komposisi mikroflora yang sangat berbeda, masing-masing mengembangkan komunitas bakteri yang unik (Lu *et.al.*, 2003).

Pemberian prebiotik bekatul dan bekatul fermentasi mampu meningkatkan nilai indeks keragaman pada ileum dan sekum, dibandingkan kontrol. Hal ini sesuai penelitian Cummings dan MacFarlane (2002) prebiotik mampu merangsang secara selektif pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme yang menguntungkan di usus, seperti *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* sehingga bermanfaat bagi kesehatan.

## KESIMPULAN

Berdasarkan analisis T-RF, terdapat perbedaan keragaman komunitas bakteri asam laktat (BAL) pada ileum dan sekum ayam broiler setelah diberi prebiotik bekatul dan prebiotik bekatul hasil fermentasi *R.oryzae*. Penambahan prebiotik bekatul meningkatkan keragaman bakteri asam laktat pada ileum dan sekum, dibandingkan dengan pemberian prebiotik bekatul hasil fermentasi *R.oryzae*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Annett, C. B., J. R. Viste, M. Chirino-Trejo, H. L. Classen, D. M. Middleton and E. Simko. 2002. Necrotic enteritis: Effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Journal Avian Pathology*. 31(6): 598-601.
- Burbach, K., J. Seifert, D. H. Pieper, and A. Camarinha-Silva. 2016. Evaluation of DNA Extraction Kits and Phylogenetic Diversity of the Porcine Gastrointestinal Tract Based on Illumina Sequencing of Two Hypervariable Regions. *Microbiology open* 5(1): 70–82.
- Cummings, J.H. and G.T. MacFarlane. 2002. Gastrointestinal Effects of Prebiotics. *British Journal Nutrition.*, 87(2): 145-151.

- Dicksved J, Floistrup H, Bergstrom A, Rosenquist M, Pershagen G, Scheynius A, Roos S, Johan S, Engstrand L, Fahrlander CB, Mutius EV. 2007. Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 2284–2289.
- Dinoto A, Suksomcheep A, Ishizuka S, Kimura H, Hanada S, Kamagata Y, Asano K, Tomita F, Yokota A. 2006. Modulation of Rat Cecal Microbiota by Administration of Raffinose and Encapsulated Bifidobacterium Breve. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1):784-792.
- Estradivari, E. Setyawan, dan S. Yusri. 2009. Terumbu Karang Jakarta: Pengamatan Jangka Panjang Terumbu Karang Kepulauan Seribu (2003-2007). Yayasan Terumbu Karang Indonesia, Jakarta.
- Gibson, G.R., H.M. Probert, J. Van Loo, R.A. Rastall And M.B. Roberfroid. 2004. Dietary Modulation of Human Colonic Microbiota: Updating The Concept of Prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 17(2): 259 – 275.
- Jannah, S.N. 2014. Analisis Keragaman Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Ayam Cemani berdasarkan Gen 16S rRNA dan Potensi Penggunaannya sebagai Probiotik. *Disertasi*. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kurniati, T., L. Nurlaila, and Iim. 2017. Effect of Inoculum Dosage *Aspergillus niger* and *Rhizopusoryzae* mixture with Fermentation Time of Oil Seed Cake (*Jatropha curcas* L) to the content of Protein and Crude Fiber. *Journal of Physics* 824(1):1-8.
- Lu, J., U. Idris<sup>1</sup>, B. Harmon, C. Hofacre<sup>1</sup>, J. J. Maurer and M. D. Lee. 2003. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Applied*

- and Environmental Microbiology* 69(11): 6816-6824.
- Odum, E. P. 1993. *Dasar-dasar Ekologi*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press.
- Oliveira, M. S., V. Feddern, L. Kupski, E. P. Cipolatti, E. B. Furlong, And L. A. S. Soares. 2010. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. *Caracterización físico-química de la biomasa del salvado de arroz fermentado. Journal of Food*. 8(3): 229-236.
- Pangastuti, A. 2008. Analisis Komunitas Bakteri selama Tahapan Perkembangan Larva Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*). *Disertasi*. IPB Press, Bogor.
- Patterson, J.A. and K.M. Burkholder. 2003. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. *Poultry Science*, 82(4): 627-631.
- Pelizer, H.L., H.M. Pontieri, and O.I. Moraes. 2007. Utilização de Resíduos Agroindustriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. *Journal of Technology Management and Innovation* (2):118–127.
- Ranjitkar, S., B. Lawley, G. Tannock, R. M. Engberg. 2016. Bacterial Succession in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(8):2399-2410.
- Reid, G. 1999. The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9): 3763-3766.
- Sambrook J, E. Fritsch, T. Maniatis. 1998. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- tef, L., D. Drinceanu, N. Corcionivoschi, C. Julean, D. tef, D. Mo , E. Simiz. 2009. The Effect of Dietary Non-starch Polysaccharides on the Intestinal Viscosity and on the Cecal Microflora of Broiler Fed with Various Protein Sources. *Archiva Zootechnica* 12(3):22-29.
- Suarsana, N.I., A.G. Suarini, and H.I. Utama, 2004. Pengaruh Yoghurt terhadap Kadar Kolesterol Total dan Profil Lipoprotein Serum Kelinci. *Journal Veteriner*, 5(1) : 12-14.
- Supriyati, Haryati, T., T. Susanti, and I.W.R. Susana. 2015. Nutritional Value of Rice Bran Fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and Humic Substances and Its Utilization as a Feed Ingredient for Broiler Chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 28(2): 231–238.
- Svihus B., M. Choct, and H. L. Classen. 2013. Function and Nutritional Roles of the Avian Caeca: A review. *World's Poultry Science Journal*, 69(249- 263).
- Wang, L., Lilburn, M., and Yu, Z. 2016. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. *Front. Microbiol.* 7:593.
- Ya ar, S., M. S. Gök, Y. Gürbüz. 2016. Performance of Broilers Fed Raw or Fermented and Redried Wheat, Barley, and Oat Grains. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 40: 313-322.
- Yogaswara, R.S. 2016. Pemanfaatan Protein dan Kalsium Ransum yang diberi Aditif Inulin dari Umbi Dahlia dan *Lactobacillus sp.* pada Ayam Kedu Periode *Grower*. *Skripsi*. UNDIP Press, Semarang.
- Yuwanta, T. 2004. *Dasar Ternak Unggas*. Kanisius, Yogyakarta.