

KERAGAMAN SECARA MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT PADA
ILEUM DAN SEKUM AYAM BROILER YANG DIBERI PERLAKUAN
PAKAN HASIL FERMENTASI *Chrysonilia crassa*

Husnul Khotimah, Siti Nur Jannah, Rejeki Siti Ferniah
Laboratorium Bioteknologi

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Semarang

Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275,

Email : ima.husnulhotimah@gmail.com

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are microflora in the digestive tract that has positive roles in poultry's health. The amount and diversity of LAB in the gastrointestinal tract are influenced by several factors, one of them is by the feeding factor. The study aims to analyze the LAB diversity in ileum and cecum after feeding of fermented *Chrysonilia crassa* molecularly. Analysis of LAB species diversity is needed to provide a baseline profile of microbial community database on the ileum and cecum digestive tract of broiler chicken between control (commercial feed) and treatment (feed by *Chrysonilia crassa* fermentation) by the method of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). The calculated values are the number of phylotypes, relative abundance, Shannon-Wiener (H') diversity index, evenness (E), and similarity. Group of LAB detected in the control were *Lactobacillus delbrueckii* (180 bp), *Lactobacillus* sp. (187 bp), *Lactobacillus plantarum* (572 bp), *uncultured bacterium* (87 bp) and *unidentified* (50 bp, 582 bp). The result of this study showed that by giving the fermented feed by *Chrysonilia crassa* had resulted in the decreasing of LAB diversity in ileum (0.66), cecum (0.48) compared with commercial feed (control) in ileum (0.84), cecum (1.05).

Keywords: broiler chicken, cecum, ileum, LAB, T-RFLP

ABSTRAK

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan mikroflora di dalam 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 menganalisis keragaman BAL pada ileum dan sekum setelah pemberian pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa* secara molekuler. Analisis keragaman BAL diperlukan untuk memberikan profil awal berupa *database* keragaman jenis BAL sebagai penyusun mikrobial (*microbial community*) pada saluran pencernaan ileum dan sekum ayam broiler antara kontrol (pakan komersial) dan perlakuan (pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa*) dengan metode *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP). Nilai yang dihitung yaitu jumlah filotipe, kelimpahan relatif, indeks keragaman Shannon-Wiener (H'), pemerataan (E'), dan kesamaan. Kelompok BAL yang terdeteksi pada kontrol yaitu *Lactobacillus delbrueckii* (180 bp), *Lactobacillus* sp. (187 bp), *Lactobacillus plantarum* (572 bp), *uncultured bacterium* (87 bp) dan *unidentified* (50 bp, 582 bp). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa* (perlakuan) menurunkan tingkat keragaman BAL yaitu ileum (0.66), sekum (0.48) dibandingkan dengan pemberian pakan komersial (kontrol) yaitu ileum (0.84), sekum (1.05).

Kata kunci: ayam broiler, BAL, ileum, sekum, T-RFLP

PENDAHULUAN

Salah satu sumber protein hewani yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat adalah daging ayam broiler karena pangan yang bergizi tinggi, selain itu harga daging ayam broiler juga terjangkau. Berdasarkan badan pusat statistik tahun 2016, konsumsi ayam broiler pada tahun 2015 mencapai 0,103 kg per kapita dalam seminggu. Daya tarik masyarakat terhadap konsumsi ayam broiler menjadi target bagi industri peternakan untuk berusaha meningkatkan produktivitas ternaknya. Salah satu upaya optimalisasi yang dilakukan adalah menjaga kondisi saluran pencernaan ayam tetap sehat.

Salah satu ciri yang dijadikan indikator ayam digolongkan sehat yaitu mempunyai saluran pencernaan yang sehat. Saluran pencernaan ayam yang sehat yaitu kondisinya stabil dan terbebas dari peradangan usus atau inflamasi yang diakibatkan oleh adanya populasi bakteri patogen, antigen pakan, dan racun dalam lumen usus halus (Liu, 2015). Bagian saluran pencernaan yang dijadikan sebagai indikator pencernaan sehat adalah ileum dan sekum. Ileum berperan penting untuk pencernaan dan penyerapan berbagai jenis makromineral dan nutrisi penting yang ada pada pakan (Svihus, 2014). Sekum atau seka merupakan fitur unik dari saluran pencernaan unggas. Bagian ini terdapat pada perbatasan antara usus halus dan usus besar, yang berfungsi sebagai tempat berlangsungnya absorpsi air, dan proses fermentasi yang dilakukan oleh mikroba yang menghasilkan beberapa vitamin B (Martin *et al.*, 2013).

Salah satu alternatif yang dilakukan untuk peningkatan mutu bahan pakan pada ayam adalah dengan teknik fermentasi secara substrat padat. Pemberian pakan fermentasi dinilai mampu memperbaiki mikroflora yang ada pada saluran pencernaan ayam terutama bakteri asam

laktat (BAL) (Widodo, 2015). Kapang *Chrysonilia crassa* adalah kapang yang digunakan untuk memfermentasi pakan yang berupa bekatul. Kapang *Chrysonilia crassa* merupakan kapang berfilamen yang memiliki potensi dan menunjukkan potensi terbaik sebagai probiotik *in vitro*. Probiotik yang berasal dari kapang diharapkan mampu mempertahankan ketahanan dan kestabilannya selama pembuatan pakan dan viabilitas selama transit melalui saluran gastrointestinal ayam (Yudiarti *et al.*, 2012).

Keragaman BAL di dalam saluran pencernaan ayam, terutama pada ileum dan sekum, akan mempengaruhi kesehatan hewan tersebut. Analisis jenis BAL setelah diberi pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa* dilakukan untuk memberikan profil awal berupa *database* tentang keragaman jenis BAL sebagai penyusun komunitas mikroba (*microbial community*).

METODE

Pengambilan Sampel

Sampel isi lumen pada ileum dan sekum diperoleh dari Laboratorium Fisiologi dan Biokimia, Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Diponegoro. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isi lumen bagian ileum dan sekum ayam broiler yang diberi penambahan pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa* sebagai perlakuan dan pemberian pakan komersial Br1 yang merupakan produksi dari PT. Charoen Pokhpand Indonesia digunakan sebagai kontrol. Sampel diambil dengan cara dijadikan satu dari 5 kali ulangan per ayam.

Isolasi DNA Genom Langsung dari Sampel

Isolasi DNA genom langsung dari sampel dengan pendekatan metagenom berdasarkan Jannah (2014). Sebanyak 0,25 g isi lumen dari sampel bagian ileum dan sekum dicuci dengan 500 μ L buffer PBS (*Phosphate Buffer Saline*, pH 7.2) dengan sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 5 menit (Zhu *et al.*, 2002). DNA genom bakteri diekstraksi dengan menggunakan DNA Mini Kit dari MoBio sesuai dengan instruksi perusahaan. Setiap sampel dilakukan ekstraksi DNA genom bakteri, begitu pula pada isolat marker *Lactobacillus salivarius*. Kualitas dan kemurnian hasil isolasi DNA diukur dengan menggunakan DNA analyzer spektrofotometer.

Amplifikasi dan Purifikasi 16S rRNA

Proses amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer forward 7F FAM yang dilabel dengan 6-*carboxyfluorescein* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan primer *reverse* spesifik untuk bakteri asam laktat yaitu primer SG-Lab-0677 (5'CACCGCTACACATGGAG-3') yang tidak berlabel (Heilig *et al.*, 2002; Dicksved *et al.*, 2007). Campuran reaksi PCR terdiri atas 25 μ L GoTaq *GreenMaster Mix* (Promega, USA), 2 μ L dari masing masing primer (10 pMol), dan *destilated water* dan 100 ng DNA *template* dalam konsentrasi akhir sampai volume akhir 50 μ L. 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 (Dicksved *et al.*, 2007).

Sampel diamplifikasi dengan menggunakan Takara *PCR Thermal Cycler Dice* ®*Gradient* (TAKARA BIO

INC, Jepang). Produk PCR dikonfirmasi dengan elektroforesis menggunakan 1% gel agarose dalam 1x buffer TAE dan divisualisasi dengan pewarnaan etidium bromida (EtBr) dengan menggunakan *Gel Documentation System* (atto Corporation, Jepang). Produk PCR dimurnikan dengan GeneJet™ *PCR Purification Kit* (Fermentas, USA) sesuai dengan instruksi perusahaan. DNA yang diperoleh dari pemurnian ditambahkan 40 μ L nuklease-free water dan disimpan pada suhu -20°C sampai penggunaan lebih lanjut.

Restriksi/pemotongan produk PCR dengan Enzim Restriksi

Restriksi produk PCR dengan enzim restriksi dilakukan berdasarkan Jannah (2014), produk PCR yang telah dimurnikan dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII* dan *MspI* (Fermentas, USA). Setiap restriksi terdiri atas 15 unit enzim restriksi (1,5 μ L) dari 10x buffer restriksi (2 μ L, buffer R untuk enzim *HaeIII* dan buffer Tango untuk enzim *MspI*) dan 100 ng DNA sampel (10 μ L), ditambahkan *nuclease-free water* sampai volume akhir 20 μ L. Pemotongan DNA produk PCR dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII* dan *MspI* untuk mendeteksi polimorfisme sekuen gen 16S rRNA. Selanjutnya sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam, dan dinonaktifkan dengan suhu 80°C selama 20 menit dan segera didinginkan dalam *ice bath* sesuai dengan instruksi dari perusahaan. Produk restriksi dipresipitasi dengan presipitasi etanol dan ditambah 3 μ L *nuclease-free water*.

Analisis TRFLP

Produk hasil restriksi dilakukan analisis dengan dikirim ke perusahaan layanan *Fragment analysis 1st base* (<http://www.base-asia.com/fragment-analysis/>) Malaysia untuk dilakukan elektroforesis kapiler. Kondisi reaksi yang digunakan untuk

mengetahui panjang potongan produk PCR yang terlabel bahan *fluorescence* adalah sampel DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi yang telah dipurifikasi sebanyak 1 μ L ditambah dengan campuran 10 ml formamida dan standar internal (Gene Scan – 500 ROX, Applied Biosystems) (100:5, vol/vol). Potongan T-RF yang dilabel dianalisis dengan elektroforesis dengan *automatic sequence analyzer* (ABI PRISM 3100, Applied Biosystem) pada mode scan gen, dan panjang dari T-RF ditentukan dengan membandingkan *Peak ScannerTM software vl. 0* (Applied Biosystems). Hasil yang telah diperoleh selanjutnya dicocokkan dengan menggunakan basis data (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) (Dinoto *et al.*, 2006 dalam Jannah, 2014).

T-RF yang mempunyai selisih ukuran basa kurang dari 0,5 pb pada sampel yang sama dipotong dengan menggunakan enzim yang sama dikelompokkan sebagai T-RF yang sama (Dunbar *et al.*, 2001). Ukuran T-RF kemudian dibulatkan ke puluhan terdekat. Selanjutnya, T-RF yang mempunyai luas area kurang dari 1% dari total area keseluruhan T-RF pada sampel yang sama dianggap sebagai pengotor sehingga tidak digunakan dalam analisis. Prediksi afiliasi filogenetik ukuran T-RF yang muncul dalam komunitas dilakukan dengan cara mencari padaannya dengan ukuran T-RF bakteri yang ada pada basis data *Ribosomal Database Project* (RDP) dengan menggunakan program dari *Microbial Community Analysis 3* (MiCA3) *Virtual Digest* (ISpaR) pada alamat (<http://mica.ibest.uidaho.edu/digest.php>). Ukuran T-RF yang sama dengan ukuran T-RF pada basis data diprediksi mempunyai hubungan filogenetik yang sama.

Pengolahan Data

Pengolahan data dengan menggunakan metode T-RFLP didasarkan

pada sinyal fluoresensi. Untuk membedakan sinyal fluoresensi dengan *noise* maka ditetapkan ambang batas (*threshold*) dimana hanya T-RF lebih besar dari atau sama dengan 50 bp dan presentase area *peak* (puncak) lebih besar atau sama dengan 1% digunakan untuk analisis lebih lanjut (Li *et al.*, 2007).

Hasil yang diperoleh dalam bentuk pecahan desimal dan dibulatkan ke nilai terdekat, dan menunjukkan nilai presentase. Kemudian dibuat tabel data biner (menunjukkan ada atau tidak adanya T-RF), dimana puncak dengan presentase dari total luas < 1% dikategorikan sebagai 0 (tidak ada) dan presentase dari total luas 1% dikategorikan sebagai 1 (ada) (Chen *et al.*, 2012). Nilai diversitas atau keragaman bakteri merupakan kekayaan/jumlah dan kelimpahan filotipe dari komunitas bakteri (Dicksved *et al.*, 2007). *Phylotype richness* (S) merupakan total puncak TRF berbeda/tipe restriksi yang berbeda yang ditemukan pada tiap sampel. Nilai biodiversitas ditentukan berdasarkan:

- Jumlah filotipe yang ditemukan dalam sampel (S)
- Indeks keragaman Shanon-Wiener (H') yang dihitung untuk menggambarkan keragaman komunitas pada instar berbeda dan nilai penting relatif dari tiap filotipe dalam keseluruhan komunitas dengan rumus sebagai berikut : $H' = - \sum p_i \ln(p_i)$, dimana p_i adalah ukuran sampel yang dimiliki filotipe ($p_i = n_i/n$) (Stiling, 1996).
- Indeks kemerataan (*evenness*) komunitas ditentukan berdasarkan tingkat sebaran T-RF dalam komunitasnya. Kemerataan (*evenness*) komunitas dihitung dengan menggunakan indek Pielous (J) sebagai berikut : $E' = H'/\ln(S)$
S adalah jumlah total T-RF (Stiling, 1996).
- Indeks kesamaan/similaritas pasangan Sorensen's (C_s) dihitung untuk setiap

pasangan komunitas dengan rumus sebagai berikut: $C_s = 2j / (a+b)$, dimana j adalah jumlah T-RF/filotipe setiap komunitas yang dibandingkan, a dan b adalah masing masing jumlah T-RF/filotipe setiap komunitas, nilai indeks berkisar mulai 0-1, yang artinya 0 tidak ada filotipe yang tumpang tindih antar komunitas, nilai 1 adalah terdapat filotipe persis sama ditemukan di kedua komunitas.

e. Penentuan jumlah filotipe spesifik yang ditemukan pada suatu komunitas.

Setiap satu T-RF dianggap sebagai satu filotipe (dapat pula dianggap sebagai spesies). Identifikasi filotipe-filotipe tersebut digunakan isolat bakteri *L. salivarius* CSP004 sebagai isolat marker yang dijadikan standar untuk analisis bakteri asam laktat (BAL) yang selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi yang sama dengan sampel dan diamati ukuran T-RF nya. Cara mengidentifikasi hasil T-RF digunakan program analisis T-RFLP ISPAR (*In silico* PCR and Restriction) dari MiCA3 (*Microbial Community Analysis*) dengan menggunakan database RDP (R10, U270) yang terdiri atas 1.519.356 referensi bakteri berdasarkan gen 16S rRNA. Hasil yang telah diperoleh selanjutnya akan dicocokkan menggunakan basis data dari MiCA3 (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>).

PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA dari Sampel Isi Lumen Ileum dan Sekum Ayam Broiler

Ekstraksi DNA dilakukan sebagai tahap awal dalam penelitian ini yaitu ekstraksi DNA pada isi lumen ileum dan sekum ayam broiler. DNA yang berasal dari lingkungan isi lumen ileum dan sekum ayam broiler dalam penelitian ini digunakan sebagai DNA cetakan dalam

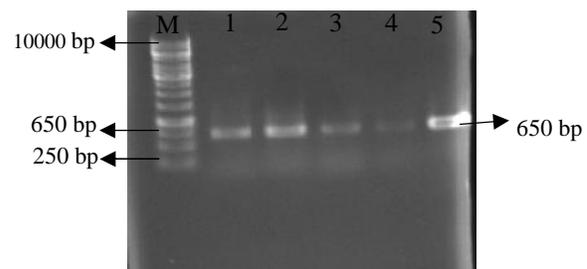
melakukan amplifikasi daerah gen 16S rRNA.

Tabel 1. Nilai konsentrasi dan kemurnian Hasil Ekstraksi DNA Sampel

No. Sampel	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	Kemurnian DNA (A260/280)
1 Kontrol ileum	7.3	2.15
2 Kontrol sekum	14.4	2
3 Perlakuan ileum	22.4	1.9
4 Perlakuan sekum	15.1	1.81

Nilai kemurnian DNA menunjukkan nilai semua sampel baik. Nilai ini mendekati nilai kualitas DNA yang ditetapkan sebesar 1.8-2.0. Hal ini sesuai dengan pendapat Fatchiyah *et al.* (2011) nilai kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 (A260/A280), dan nilai kemurnian DNA berkisar 1.8-2.0. Kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler. Konsentrasi dan kemurnian mempunyai kualitas yang baik untuk dilanjutkan dalam proses digesti.

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



Gambar 1. Elektroforesis Hasil Amplifikasi DNA dari sampel isi lumen bagian ileum dan sekum ayam broiler dalam Gel agarose 1%

dengan marker 1 kb (1 = kontrol ileum, 2 = kontrol sekum, 3 = perlakuan ileum, 4 = perlakuan sekum, 5 = *L. salivarius*)

Purifikasi dan Restriksi Fragmen DNA

Konsentrasi DNA hasil dari purifikasi komunitas mikroba yang diperoleh dari kontrol dan perlakuan yaitu diperoleh berkisar 36-68 ng/μl dan A260/A280 yang diperoleh berkisar antara 1.74-1.89.

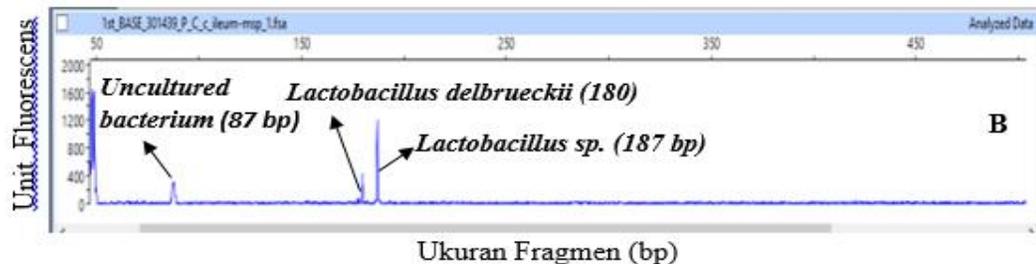
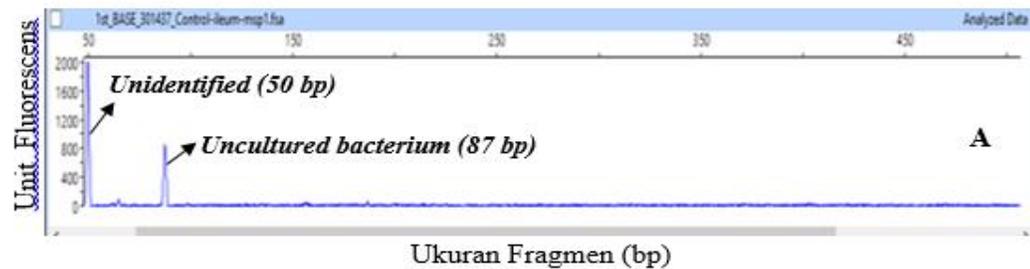
Tabel 2. Nilai konsentrasi dan kemurnian hasil purifikasi DNA

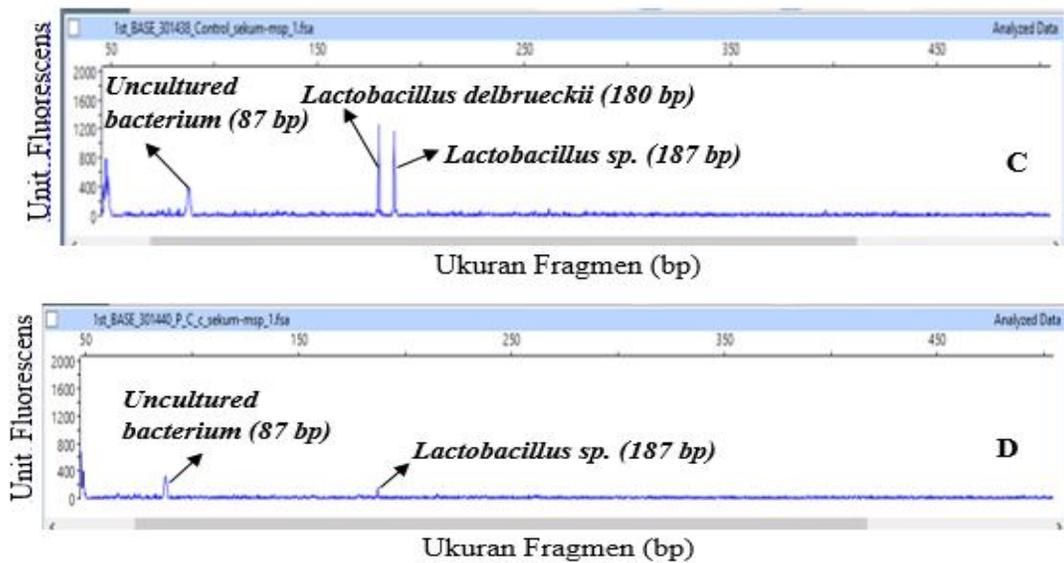
No. Sampel	Konsentrasi DNA (ng/μl)	Kemurnian DNA (A260/280)
1 Kontrol ileum	51.3	1.79
2 Kontrol sekum	68.9	1.89
3 Perlakuan ileum	36.6	1.77
4 Perlakuan sekum	42.4	1.74

Berdasarkan hasil yang diperoleh setelah dilakukan purifikasi bahwa konsentrasi DNA diketahui lebih tinggi dari hasil ekstraksi DNA, hal ini disebabkan karena pada tahapan purifikasi, DNA dimurnikan dan dipisahkan dari komponen kontaminan (seperti RNA, protein dan komponen lain yang masih tersisa) sehingga didapatkan hasil konsentrasi DNA yang lebih tinggi. Konsentrasi dan kemurnian yang dihasilkan memiliki kualitas baik untuk dilanjutkan proses digesti dengan menggunakan enzim restriksi.

Komunitas Bakteri dan Profil T-RF

Hasil analisis T-RFLP berupa data T-RF komunitas BAL ditampilkan dalam bentuk elektroferogram. Pembacaan data pada tampilan elektroferogram dengan menggunakan *Peak Scanner* hasil BAL pada ileum dan sekum ayam broiler baik kontrol maupun perlakuan dengan menggunakan enzim restriksi *Msp1*.





Gambar 2. Pola elektroferogram T-RF komunitas BAL pada relung ileum dan sekum ayam broiler dengan menggunakan enzim restriksi *Msp*I: (A) Kontrol ileum (B) Perlakuan pakan *Chrysonilia crassa* ileum (C) Kontrol sekum (D) Perlakuan pakan *Chrysonilia crassa* sekum.

Gambar 2. menunjukkan pola dinamika populasi BAL berdasarkan hasil analisis setiap relung pada sampel setelah dibandingkan antara kontrol dan perlakuan dengan menggunakan enzim restriksi *Msp*I. Di ileum terdapat perbedaan pada kontrol yaitu muncul *unidentified bacterium* (50 bp), sedangkan pada perlakuan terdapat spesies *Lactobacillus delbrueckii* (180 bp) dan *Lactobacillus sp.* (187 bp). Spesies sama yang dapat ditemukan pada kontrol dan perlakuan adalah *uncultured bacterium* (87 bp). Sementara di sekum terdapat perbedaan pada kontrol yaitu muncul spesies *Lactobacillus delbrueckii* (180 bp) dan pada perlakuan tidak terdapat. Spesies sama yang dapat ditemukan pada kontrol dan perlakuan adalah *uncultured bacterium* (87 bp) dan *Lactobacillus sp.* (187 bp). Hal ini disebabkan karena bakteri yang paling dominan adalah yang sifatnya *unculturable* (tidak dapat dikulturkan). Hal ini sesuai dengan Jannah (2014) filotipe BAL 41 % tidak dapat diidentifikasi (*unidentified*) dan 36%

diidentifikasi sebagai bakteri yang belum dapat dikulturkan (*unculturable*). Menurut Walter (2008), *Lactobacillus* merupakan bakteri penghuni saluran pencernaan yang dominan karena sifatnya mudah tumbuh, memiliki toleransi yang tinggi terhadap oksigen maupun tanpa oksigen (fakultatif anaerob). *Lactobacillus sp.* di dalam sekum dapat membantu mencerna serat kasar dengan cara fermentasi oleh bakteri selulolitik (Krismiyanto, 2015).

Dinamika populasi BAL tersebut salah satunya disebabkan oleh kualitas pakan yang mempengaruhi keberadaan komunitas bakteri saluran pencernaan. BAL memerlukan nutrisi untuk dapat tumbuh di antaranya karbohidrat, asam amino dan vitamin. 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*). Pencernaan secara enzimatik dilakukan oleh dinding usus, yaitu menghasilkan enzim pemecah protein (erepsin), lemak

(lipase), dan karbohidrat (maltase dan sacrase) (Yuwanta, 2004).

Bekatul yang digunakan sebagai bahan yang difermentasi mengandung karbohidrat yang sulit tercerna karena kandungan seratnya yang tinggi. Selain itu bekatul mudah tengik dan memiliki ikatan asam lemak tidak jenuh dan kandungan protein kasar yang rendah karena adanya zat anti nutrisi asam phytat yang sulit larut dalam air dan tahan panas, sehingga sulit dicerna (Supartini, 2011). Daya cerna serat kasar pada unggas dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kadar serat dalam pakan, komposisi penyusun serat kasar dan aktivitas mikroba.

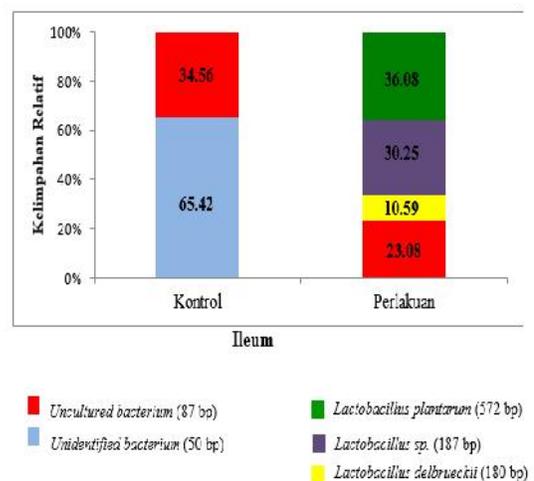
Pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa* yang diberikan sebagai perlakuan, kapang ini diyakini memiliki potensi sebagai probiotik tetapi penggunaannya membutuhkan mikroba jenis lain. Setiap jenis probiotik memiliki fungsi khusus dan jika lebih dari satu probiotik dicampur maka dapat bekerja secara sinergis. Kapang menyediakan substrat untuk kehidupan bakteri karena pada kapang mempunyai rhizoid dan enzim yang dapat memecah fraksi-fraksi makanan yang kualitasnya rendah sehingga dapat meningkatkan nilai gizinya. Penguraian serat kasar kebanyakan dilakukan dengan teknik fermentasi. Enzim-enzim yang dihasilkan dari golongan kapang diproduksi melalui proses fermentasi media padat (Darwis *et al.* 1990).

Fermentasi berhubungan dengan kerja enzim yang diproduksi oleh mikroba. Kapang *Chrysonilia crassa* mampu secara spesifik menghasilkan enzim selulase yang potensial untuk mendegradasi bahan lignoselulotik yaitu terjadi pemecahan oligosakarida menjadi glukosa dan enzim protease

yang mampu memecah senyawa protein pada pakan agar dapat lebih mudah diserap sehingga meningkatkan kandungan protein di dalam biomassa (Yudiarti *et al.*, 2012).

Kelimpahan Relatif, Indeks Keragaman, Kemerataan dan Kesamaan Bakteri Asam Laktat

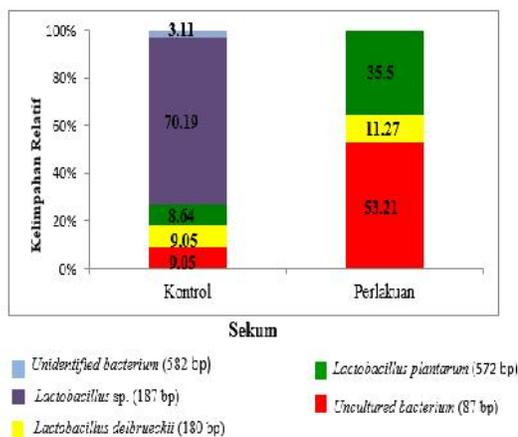
Kelimpahan spesies akan lebih cocok ditentukan dengan analisis T-RFLP metagenom, selain itu analisis T-RFLP metagenom dapat mendeteksi struktur dan komposisi komunitas mikroba dalam kondisi yang sebenarnya sebagai kelimpahan relatif yang dapat dibandingkan antara sampel (Dicksved *et al.*, 2007).



Gambar 3. Distribusi kelimpahan relatif setiap ukuran T-RF yang muncul dari komunitas BAL pada kontrol dan perlakuan ileum

Gambar 3. menunjukkan bahwa kehadiran *unidentified bacterium* (50 bp) ditemukan dalam jumlah yang melimpah yaitu 65.42% pada relung ileum kontrol. Hal ini disebabkan karena kekurangan referensi dari *database* MiCA3 untuk mengidentifikasi hasil seluruh potongan T-RF BAL sehingga terdapat hasil potongan yang belum teridentifikasi. Hal

ini sesuai dengan Jannah (2014) filotipe BAL 41 % tidak dapat diidentifikasi (*unidentified*) dan 36% diidentifikasi sebagai bakteri yang belum dapat dikulturkan (*unculturable*). Perlakuan pada relung ileum yang ditemukan paling banyak yaitu *Lactobacillus plantarum* (572 bp) sebanyak 36.08%. *Lactobacillus plantarum* ini merupakan mikroba yang banyak ditemukan pada materi yang berasal dari tumbuhan yang mengandung lignoselulosa. Hal ini disebabkan karena pada perlakuan kandungan serat bekatul lebih tinggi daripada pakan komersial. Hal ini sesuai dengan Li *et al.* (2010) bahwa *Lactobacillus plantarum* banyak ditemukan pada pakan dengan kandungan serat tinggi. Pertumbuhan BAL dapat dipengaruhi beberapa faktor antara lain kondisi lingkungan, populasi bakteri patogen, jenis pakan dan ketersediaan substrat. Menurut Yuwanta (2004) penggunaan serat kasar sebesar 5-20% memberikan variasi terhadap perkembangan, jumlah bakteri, dan dinamika bakteri selulolitik pada usus halus, sekum dan kolon pada unggas dengan berbagai level serat kasar.

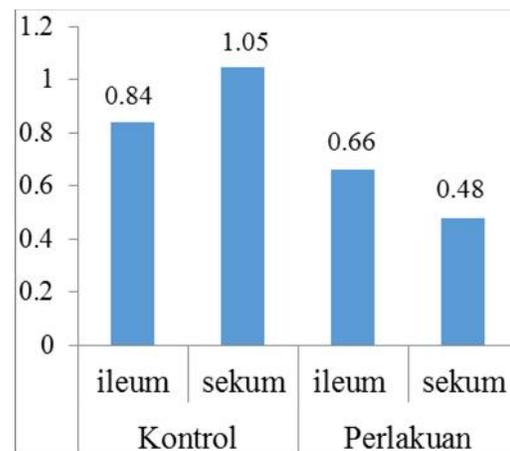


Gambar 4. Distribusi kelimpahan relatif setiap ukuran T-RF yang muncul dari komunitas BAL pada kontrol dan perlakuan sekum

Gambar 4. menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. (187 bp) ditemukan dalam jumlah yang cukup melimpah pada

kontrol yaitu banyak ditemukan pada bagian sekum sebanyak 70.19%. Kecenderungan peningkatan ini disebabkan karena sekum merupakan tempat yang sangat penting untuk fermentasi bahan makanan, sehingga banyak ditemukan *Lactobacillus* sp. dalam pendekatan metagenom sampel isi lumen dari sekum tersebut. *Lactobacillus* sp. dapat menurunkan pH, sehingga suasana di dalam sekum menjadi asam sehingga mampu memfermentasi bahan makanan yang berakibat pada penurunan jumlah dan aktivitas bakteri gram negatif (Santoso, 1999).

Kelimpahan relatif tersebut menunjukkan komunitas BAL pada ileum dan sekum ayam broiler sebelum dan setelah diberi perlakuan pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa*. Komunitas BAL yang terdeteksi pada pendekatan metagenom yaitu *Lactobacillus delbrueckii* (180 bp), *Lactobacillus* sp. (187 bp), *Lactobacillus plantarum* (572 bp), *uncultured bacterium* (87 bp, 582 bp) dan *unidentified bacterium* (50 bp).



Gambar 5. Indeks Keragaman Shannon-Wiener (H') komunitas BAL pada kontrol dan perlakuan

Gambar 5. menunjukkan indeks keragaman Shannon-Wiener BAL antara dua relung saluran pencernaan ayam broiler yaitu di ileum dan sekum. Indeks

keragaman kontrol pada ileum yaitu (0.84), sedangkan sekum (1.05). Ini menunjukkan bahwa pada kontrol komunitas BAL dalam sekum cenderung lebih beragam daripada komunitas di ileum. Hal ini didasarkan pada nilai indeks Shannon antara 1.0 dan 6.0 (Stiling, 1996). Perlakuan dengan pemberian pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa* di ileum menunjukkan indeks keragaman 0.66, sedangkan pada bagian sekum 0.48. Ini menunjukkan bahwa pada perlakuan komunitas BAL dalam ileum memiliki keragaman yang rendah. Hasil perhitungan pada setiap relung memperlihatkan bahwa nilai indeks keragaman (H') BAL termasuk dalam kategori rendah hingga tinggi, sebagaimana kategori yang dikemukakan oleh Hardjosuwarno (1990) yaitu, $H' > 3,0$ menunjukkan keragaman sangat tinggi, $1,6 < H' < 3,0$ menunjukkan keragaman tinggi, $1,0 < H' < 1,5$ menunjukkan keragaman sedang, dan $H' < 1,0$ menunjukkan keragaman rendah. Nilai indeks keragaman yang diperoleh berkisar antara 0.48–1.05. Berdasarkan hasil indeks keragaman, menunjukkan kategori sedang $H' = 1.05$ terdapat pada relung sekum kontrol. Hal ini menggambarkan bahwa perlakuan pemberian pakan komersial, menyebabkan keragaman komunitas BAL lebih tinggi pada relung sekum dibandingkan ileum, karena jenis filotipe BAL yang ditemukan lebih banyak disekum.

Kestabilan suatu jenis juga dipengaruhi oleh tingkat kemerataannya, semakin tinggi nilai H' , maka keanekaragaman jenis dalam komunitas tersebut semakin stabil. Sebaliknya semakin rendah nilai H' , maka tingkat kestabilan keanekaragaman jenis dalam komunitas semakin rendah (Odum, 1993).

Nilai indeks kemerataan jenis ini berkisar antara 0-1 dengan deskripsi kondisi sebagai berikut $E = 0$, kemerataan spesies rendah, artinya kekayaan individu yang dimiliki masing-masing spesies sangat jauh berbeda $E = 1$, kemerataan spesies relatif merata atau jumlah individu masing-masing spesies relatif sama. Indeks kemerataan pada kontrol ileum yaitu 0.67, perlakuan ileum 0.48. Artinya pada relung ileum kemerataan spesiesnya rendah. Di kontrol sekum indeks kemerataannya yaitu 0.70 dan di perlakuan sekum 0.69. Artinya relung sekum kemerataan spesiesnya rendah. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan mempunyai indeks kemerataan yang rendah daripada kontrol. Jenis yang memiliki tingkat kestabilan yang tinggi mempunyai peluang yang lebih besar untuk mempertahankan kelestarian jenisnya. Untuk menilai kemantapan atau kestabilan jenis dalam suatu komunitas dapat digunakan nilai indeks kemerataan jenis (E'). Semakin tinggi nilai E' , maka keanekaragaman jenis dalam komunitas semakin stabil dan semakin rendah nilai E' , maka kestabilan keanekaragaman jenis dalam komunitas tersebut semakin rendah (Odum, 1993).

Tabel 1. Indeks Kesamaan Komunitas BAL Hasil Analisis T-RFLP

Enzim	Kontrol-Perlakuan		Kontrol	Perlakuan
	Ileum-Ileum	Sekum-Sekum	Ileum-Sekum	Ileum-Sekum
<i>HaeIII</i>	0	0	0.44	0
<i>MspI</i>	0	0.5	0	0.29
Rerata	0	0.25	0.22	0.15

Indeks kesamaan pasangan (*pairwise similarity*) Sorensen adalah nilai yang menunjukkan adanya kesamaan filotipe di dua komunitas. Nilai 0 menunjukkan bahwa 2 komunitas benar-benar berbeda, sedang nilai 1 berarti bahwa 2 komunitas tersebut identik. Dalam studi ini Tabel 1 menunjukkan indeks kesamaan komunitas tertinggi (0.25) adalah antara komunitas sekum yang terdapat pada kontrol dan perlakuan artinya kesamaan komposisi BAL tertinggi pada saluran gastrointestinal di ayam broiler adalah antara komunitas sekum. Sedangkan pada 2 komunitas yang berbeda tetapi pada lingkungan yang sama (kontrol) mempunyai nilai kesamaan (0.22).

Ini artinya bahwa 2 komunitas pada kontrol berbeda karena nilainya mendekati 0. Hal ini didasarkan pada Stiling (1996) bahwa nilai indeks kesamaan berkisar 0-1, yang artinya 0 tidak ada filotipe yang tumpang tindih dalam komunitas, nilai 1 berarti filotipe sama persis di kedua komunitas. Kesamaan yang tinggi pada sekum diasumsikan bahwa viabilitas BAL tinggi pada sekum, sedangkan kesamaan yang tinggi pada pengaruh pakan (kontrol) dikarenakan bahwa tidak adanya perubahan susunan kandungan pada pakan komersial akibat adanya proses enzimatik seperti pada pakan fermentasi yang dapat mempengaruhi komunitas BAL pada ileum dan sekum.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis T-RFLP dengan melihat profil T-RF. Terdapat perbedaan keragaman komunitas bakteri asam laktat (BAL) pada ileum dan sekum ayam broiler setelah diberi pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa*. Pemberian pakan hasil fermentasi *Chrysonilia crassa* (perlakuan) menurunkan tingkat

keragaman BAL dibandingkan dengan pemberian pakan komersial (kontrol).

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik Indonesia. 2016. Rata-Rata Konsumsi per Kapita Seminggu Beberapa Macam Bahan Makanan Penting, 2007-2015. <https://www.bps.go.id/linkTabelStatis/view/id/950.4 Agustus 2017>
- Chen L, Teasdale MT, Kaczmarczyk MM, Freund GG, Miller MJ. 2012. Development of a *Lactobacillus* specific T-RFLP method to determine lactobacilli diversity in complex samples. *J. of Microbiological Methods*, 91: 262-268.
- Darwis, A.A., E. Sukara, D.E. Amiroenas, M. Syahbana, dan R. Purnawati. 1990. Produksi Enzim Selulase dan Biomassa untuk Pakan Ternak dari Biokonversi Pod Coklat Oleh *Trichoderma viride*. *Med Pet* 8 (4): 13.
- 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. *Appl Environ Microbiol.* 73: 2284–2289.
- Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 67:190-197.

- Fatchiyah, E. Laras Arumingtyas, S. Widyarti, S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga, Jakarta.
- Heilig, R., et al. 2002. The DNA Sequence and Analysis of Human Chromosome 14. *J. Nature*, 421(6923):601-607.
- 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.
- Krismiyo, L., Nyoman Suthama dan Hanny Indrat Wahyuni. 2015. Keberadaan Bakteri dan Perkembangan Caecum Akibat Penambahan Inulin dari Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*) pada Ayam Kampung Persilangan Periode Starter. *J. Ilmu-Ilmu Peternakan* 24 (3) : 54 -60
- Li, F., Hullar MAJ, Lampe JW. 2007. Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (T-RFLP) analysis of human gut microbiota. *J. of Microbiol Methods*, 68: 303–311.
- Li, J., Y. Shen and Y.Cai. 2010. Improvement of Fermentation Quality of Rice Straw Silage by Application of a Bacterial Inoculant and Glucose. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 23(7):901- 906.
- Liu, Y. 2015. Fatty acids, Inflammation and Intestinal Health in Pigs. *J. of Animal Science and Biotechnol.* 6(1): 41.
- Matin, H.R.H., Dashtbin, F and Salari, J., 2013. Absorption and macromineral interactions in broiler production. *Global Veterinaria* 11 (1): 49-54.
- Odum, E.P. 1993. *Dasar-dasar Ekologi*. Alih bahasa: Tjahyono Samingan. Gadjah mada University Press, Yogyakarta.
- Santoso, U.S. Ohtani, K., Tanaka dan Sakaida. 1999. Dried *Bacillus subtilis* Culture reduced ammonia gass release in poultry house. *Asian Australian Journal of Animal Sciences (AJAS)* Vol. 12. No. 5. 677-842.
- Stiling, P. D. 1996. *Ecology: Theories and Applications*. Second Edition. Prentice Hall International, Inc., United State of America.
- Supartini, N. dan Eka Fitasari. 2011. Penggunaan Bekatul Fermentasi *Aspergillus niger* dalam Pakan Terhadap Karakteristik Organ Dalam Ayam Pedaging. *J. Buana sains*, vol. 11 No. 2: 127-136.
- Svihus, B. 2014. Function of The Digestive System. *J. Poultry Science Association*, Inc.
- Walter, J. 2008. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Applied and Environmental Microbiology* 74(16): 4985-4996.
- Widodo, T., Bambang Sulistiyanto dan Cahya Setya Utama. 2015. Jumlah Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam Digesta Usus Halus dan Sekum Ayam Broiler yang Diberi Pakan Ceceran Pabrik Pakan yang Difermentasi. *J. Agripet* : Vol (15) No.2 : 98-103.
- Yudiarti, T., V. D.Yunianto B., R. Murwani, E. Kusdiyantini. 2012. The Effect of *Chrysonilia crassa* Additive on Duodenal & Caecal Morphology, Bacterial & Fungal Number, and Productivity of Ayam Kampung. *Internat. J. of Sci. and Eng.* Vol. 3(2):26-29.

Yuwanta, T. 2004. *Dasar Ternak Unggas*.
Kanisius, Yogyakarta.

