

**KELIMPAHAN DAN RAGAM MIKROBA RUMEN
PADA SAPI PERANAKAN ONGOLE**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Magister



Oleh :

RIZKA MUIZZU APRILIA

NIM. 196050100111055

**PROGRAM STUDI ILMU TERNAK
MINAT NUTRISI DAN MAKANAN TERNAK**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PETERNAKAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

TESIS

LEMBAR PENGESAHAN

Judul : Kelimpahan Dan Ragam Mikroba Rumen Pada Sapi Peranakan Ongole

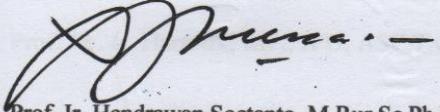
Nama : Rizka Muizzu Aprilia

NIM : 196050100111055

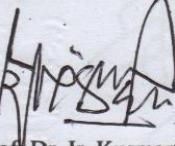
Menyetujui:

Komisi Pembimbing

Ketua


Prof. Ir. Hendrawan Soetanto, M.Rur.Sc.Ph.D.
NIP. 19530602 198003 1 003

Anggota


Prof. Dr. Ir. Kusmartono
NIP. 195904061985031005

Mengetahui:


Prof. Dr.Sc.Agr. Ir. Suyadi, MS, IPU., ASEAN Eng
NIP. 19620403 198701 1 001

Fakultas Peternakan
Program Studi Magister Ilmu Ternak
Ketua,


Dr.Ir.Tri Eko Susilorini,MP., IPM., ASEAN Eng
NIP. 19580711 198601 2 001

JUDUL TESIS

Kelimpahan dan Ragam Mikroba Rumen Pada Sapi Peranakan Ongole

Nama : Rizka Muizzu Aprilia

NIM : 196050100111055

Telah diuji dan dinyatakan lulus dalam sidang ujian pada 15 Juli 2021

Komisis Penguji:

Tanda Tangan

Prof. Ir. Hendrawan Soetanto, M.Rur.Sc., Ph.D

P. Orman

Prof. Dr. Ir. Kusmartono

Firings

Prof. Dr. Ir. Hartutik, MP., IPU, ASEAN Eng.



Dr. Ir. Kuswati, MS., IPM., ASEAN Eng.

[Signature]



KELIMPAHAN DAN RAGAM MIKROBA RUMEN

PADA SAPI PERANAKAN ONGOLE

Rizka Muizzu Aprilia, Hendrawan Soetanto, Kusmartono

ABSTRAK

Sapi Bali (SB), Madura (SM) dan Peranakan Ongole (SPO) merupakan sapi potong lokal Indonesia. Upaya meningkatkan performans ternak melalui pakan sudah banyak dilakukan namun informasi yang diberikan tidak menghubungkan kelimpahan dan keragaman microbiota didalam rumen yang memiliki peran penting dalam memfermentasi pakan, oleh karenanya untuk mengukur efisien penggunaan metabolit dapat diketahui di tingkat sel. Penelitian ini bertujuan untuk menggali informasi tentang kemampuan ternak dalam mencerna pakan secara *in vitro* dan hubungannya dengan kelimpahan dan keragaman mikroba rumen yang menunjukkan kemampuan dalam mencerna pakan. Penelitian ini menggunakan dua percobaan, pertama pakan lengkap yang terdiri dari hijauan dan konsentrat dengan proporsi 50:50 dievaluasi menggunakan teknik produksi gas *in vitro* dengan cairan rumen sebagai sumber inokulum mikroba yang diperoleh dari bangsa sapi lokal yang sudah di sembelih. Hasil penelitian menunjukkan kemampuan degradasi bahan kering dan bahan organik pakan dari cairan rumen SPO lebih tinggi dibandingkan dengan yang lain. Percobaan kedua meneliti kelimpahan dan keragaman microbiota rumen SPO dengan mengumpulkan cairan rumen dan digesta dari lokasi yang berbeda yaitu Loka Penelitian Sapi Potong (Lolit SaPot), Grati, Pasuruan, Rumah Potong Hewan (RPH) di Pegiran, Surabaya dan beberapa tempat di Kabupaten Malang selama hari raya Idul Adha 2020. Variasi kualitas pakan diketahui dengan perbedaan komponen serat digesta rumen. Sampel cairan rumen dianalisis dengan metode PCR-DGGE dengan primer universal 16SrRNA yang dilanjutkan dengan sekruensing DNA di laboratorium 1st Genetics science Indonesia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua digesta SPO mengandung serat tinggi (NDF > 60%) kecuali yang berasal dari Lolit SaPot, Grati Jawa Timur, hasil tersebut menunjukkan kualitas pakan yang diberikan rendah. Selain itu kelimpahan dan keragaman mikroba rumen menunjukkan bahwa *Bacteroidetes* (69%), *Proteobacteria* (24%), *Firmicutes* (4%) dan *Cyanobacteria* (3%) mendominasi microbiota rumen dengan genus dominan yang ditemukan adalah *Prevotella*, *Psycrobacter*, dan *Desulfotomaculum*. Analisis lebih lanjut berdasarkan hubungan filogenetik mengungkapkan bahwa ada dua kelompok genus dominan dalam rumen SPO yaitu *Psycrobacter* dan *Prevotella*.

Kata Kunci : PCR-DGGE, Kelimpahan dan Ragam Mikroba Rumen, 16SrRNA, Sapi Peranakan Ongole.

Abundance and Diversity of Rumen Microbes in Ongole Crossbred Cattle**Rizka Muizzu Aprilia, Hendrawan Soetanto, Kusmartono****ABSTRACT**

Bali, Madura and Ongole crossbred cattle (OCC) are considered as prominent indigenous beef cattle of Indonesia. Attempts for improving the performance through feeding is likely rendered by the incomplete information dealing with the abundance and diversity of rumen microbiota that play a significant role in feed fermentation and hence the efficient use of metabolites at the cellular levels. This study aimed at exploring information on the ability of those cattle to digest feed under in vitro condition and its relationship with the abundance and diversity of the rumen microbes of cattle that demonstrated the most capable to digest feed. Two experiments were carried out, first a complete feed consisting of roughage and concentrate at 50:50 proportion was evaluated using in vitro gas production technique of which the rumen fluid (RF) as microbial inoculum sources were obtained from slaughtered indigenous cattle breed. The results showed that dry matter and organic matter degradability of feed using RF from OCC were higher than those counterparts. The second experiment examined the abundance and diversity of rumen microbiota of OCC by collecting RF and rumen digesta from different sources, that is from the Beef Cattle Research Center (BCRC). Grati, Pasuruan, East Java; the abattoir at Pegiran, Surabaya City, East Java and some places in Malang regency during the Islamic festivals of Eid al Adha 2020. Variation in the quality of feed was assumed from the different in fibrous component of the rumen digesta. Samples of RF were analysed by PCR-DGGE methods with 16SrRNA as universal primers followed by DNA sequencing at the 1st Genetics science Indonesia laboratory. The results showed that all rumen digesta of OCC contained high fibrous materials ($NDF > 60\%$) except that from BCRC, Grati, East Java suggesting that the quality of feed given was low. In addition to that the abundance and diversity of rumen microbes showed that the Phylum of Bacteroidetes (69%), Proteobacteria (24%), Firmicutes (4%) and Cyanobacteria (3%) dominated the rumen microbiota with predominant genus found were Prevotella, Psycrobacter, and Desulfotomaculum. Further analysis on the basis of phylogenetic relationship revealed that there were two groups of dominant genera in the rumen of OCC, namely Psycrobacter and Prevotella.

Keyword : PCR-DGGE, Abundance, Diversity of Rumen of microbes, 16SrRNA, Ongole Crossbred Cattle.

RINGKASAN

Rizka Muizzu Aprilia, Program Pascasarjana, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya. Kelimpahan dan Ragam Mikroba Rumen Pada Sapi Peranakan Ongole. Komisi Pembimbing: Prof. Ir. Hendrawan Soetanto, M.Rur. Sc., Ph.D dan Prof. Dr. Ir. Kusmartono.

Sapi Bali (SB), Madura (SM) dan Peranakan Ongole (SPO) merupakan sapi potong lokal Indonesia. Upaya meningkatkan performans ternak melalui pakan sudah banyak dilakukan namun informasi yang diberikan tidak menghubungkan kelimpahan dan keragaman microbiota didalam rumen yang memiliki peran penting dalam memfermentasi pakan, oleh karena itu efisien penggunaan metabolit dapat diketahui di tingkat sel. Penelitian ini bertujuan untuk menggali informasi tentang kemampuan ternak dalam mencerna pakan secara *in vitro* dan hubungannya dengan kelimpahan dan keragaman mikroba rumen yang menunjukkan kemampuan dalam mencerna pakan.

Penelitian ini terdiri dari dua percobaan,yaitu pertama bertujuan untuk menguji kemampuan tiga bangsa sapi lokal tersebut di atas dalam mencerna pakan lengkap yang terdiri dari hijauan dan konsentrat dengan proporsi 50:50 menggunakan teknik produksi gas *in vitro* serta cairan rumen sebagai sumber inokulum mikroba dari bangsa sapi local tersebut yang di sembelih di Rumah Potong Hewan, Pegirian, Surabaya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa SPO memiliki kemampuan lebih tinggi dibandingkan dengan sapi Bali dan Madura untuk seluruh parameter yang diamati, yaitu kemampuan menghasilkan produksi gas total (ml/500 mg sampel), laju produksi gas (ml/jam), potensi produksi gas (ml/500 mg sampel), degradasi bahan kering (%) dan bahan organik pakan (%).

Percobaan kedua bertujuan untuk meneliti kelimpahan dan keragaman mikrobiota rumen SPO yang diambil dari cairan rumen dan digesta dari lokasi yang berbeda yaitu Loka Penelitian Sapi Potong (Lolit SaPot) , Grati, Pasuruan, Rumah Potong Hewan (RPH) di Pegirian, Surabaya dan beberapa tempat di Kabupaten Malang selama Hari Raya Idul Adha 2020. Keragaman kualitas pakan diduga melalui perbedaan kandungan NDF digesta rumen. Sampel cairan rumen dianalisis dengan PCR-DGGE yang diawali dengan isolasi DNA menggunakan TIANamp Genomic DNA KIT, amplifikasi dengan Primer Universal 16SrRNA Forward HDA-1 (5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCAGGGGGACTCCTACGGGAGG CAGCAG T-3') dan Reverse HDA-2 (5'- GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), yang kemudian di lanjutkan dengan sekruensing DNA di laboratorium 1st Genetics science Indonesia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua digesta SPO mengandung serat tinggi (NDF>X

60%) kecuali yang berasal dari Lolit-SaPot, Grati Jawa Timur, hasil tersebut menunjukkan kualitas pakan yang diberikan rendah. Selain itu kelimpahan dan keragaman mikroba rumen secara keseluruhan menunjukkan bahwa *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, dan *Cyanobacteria* mendominasi microbiota rumen dengan genus dominan secara berurutan yaitu *Prevotella*, *Psycrobacter*, dan *Desulfotomaculum*. Phylum *Bacteroidetes* ditemukan disemua lokasi dengan persentase urutan tertinggi dari Kabupaten Malang (98%) dan RPH (75%) dan Lolit-SaPot (33%). Temuan ini sejalan dengan hasil penelitian terdahulu yang telah banyak dilaporkan oleh berbagai peneliti bahwa melimpahnya Phylum *Bacteroidetes* umumnya berkaitan dengan pemberian pakan yang mengandung komponen serat kasar tinggi. Pada penelitian ini dapat dijelaskan bahwa umumnya ternak yang akan disembelih saat perayaan Hari Besar Idul Adha hanya diberi pakan berupa hijauan, terlihat dari nilai NDF digesta yang dihasilkan yaitu >60%, sedangkan pada Phylum *Proteobacteria* ditemukan di dua lokasi yaitu Lolit-SaPot (65%) dan RPH (9%). Melimpahnya Phylum *Proteobacteria* dapat dijelaskan sebagai akibat pemberian pakan konsentrat yang mengandung butiran sebagaimana dilaporkan oleh berbagai peneliti terdahulu . Dalam penelitian ini SPO yang dipelihara di Lolit-SaPot mendapat pakan campuran hijauan dan konsentrat dengan proporsi 50 : 50, sedangkan SPO yang berasal dari RPH Pegirian Surabaya umumnya juga diberi pakan tambahan berupa konsentrat atau dedak sebelum dipotong. Berbeda dengan SPO yang berasal dari pemotongan saat peringatan Idul Adha 2020, umumnya sapi-sapi tersebut hanya diberi pakan hijauan menjelang pemotongan, sehingga phylum *Proteobacteria* nyaris tidak ditemukan kelimpahannya. Berdasarkan uraian tersebut dapat disimpulkan bahwa perbedaan kelimpahan dan keragaman microbiota dari SPO yang diambil dari berbagai lokasi antara lain disebabkan oleh perbedaan pakan yang dikonsumsi sebelum dilakukan pengambilan cairan rumen.

SUMMARY

Rizka Muizzu Aprilia, Postgraduate Program in Faculty of Animal Science University of Brawijaya. Abundance and Diversity of Rumen Microbes in Ongole Crossbred Cattle.

Supervisor : Prof. Ir. Hendrawan Soetanto, M.Rur. Sc., Ph.D

Co-Supervisor: Prof. Dr. Ir. Kusmartono.

Bali, Madura and Ongole crossbred cattle (OCC) are considered as prominent indigenous beef cattle of Indonesia. Attempts for improving the performance through feeding is likely rendered by the incomplete information dealing with the abundance and diversity of rumen microbiota that play a significant role in feed fermentation and hence the efficient use of metabolites at the cellular levels. This study aimed at exploring information on the ability of those cattle to digest feed under in vitro condition and its relationship with the abundance and diversity of the rumen microbes of cattle that demonstrated the most capable to digest feed.

Two experiments were carried out, first a complete feed consisting of roughage and concentrate at 50:50 proportion was evaluated using in vitro gas production technique of which the rumen fluid (RF) as microbial inoculum sources were obtained from slaughtered indigenous cattle breed. The results showed that all parameters, namely, total gas production (ml/500 mg sample), rate of grass production (ml/h), potential gas production (ml/500 mg sample), dry matter and organic matter degradability of feed (%) using RF from OCC were higher than those two counterparts.

The second experiment examined the abundance and diversity of rumen microbiota of OCC by collecting RF and rumen digesta from different sources, that is from the Beef Cattle Research Center, Grati, Pasuruan, East Java (BCRC); the abattoir at Pegiran, Surabaya City, East Java and some places in Malang regency during the Islamic festivals of Eid al Adha 2020. Variation in the quality of feed was assumed from the different in fibrous component of the rumen digesta evaluated using Van Soest Method. Samples of RF were analysed by PCR-DGGE methods, first DNA extraction process using TIANamp Genomic DNA KIT with 16SrRNA as universal primers (Primary forward (5'-CGCCCGGGCGCGCCCCG GGCAGGGCGGGGCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') and Primary Reverse (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3')) followed by DNA sequencing at the 1st Genetics science Indonesia laboratory. The results showed that all rumen digesta of OCC contained high fibrous materials (NDF > 60 %) except that from BCRC, Grati, East Java suggesting that the quality of feed given was low. In addition to that the abundance and diversity



of rumen microbes showed that the *Phylum of Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes* and *Cyanobacteria* dominated the rumen microbiota with predominant genus found were *Prevotella, Psychrobacter*, and *Desulfotomaculum*. This finding supports the previous reported appeared in the literature. *Phylum Bacteroidetes* was found in all collection sources in different order of abundance that seems positively correlated with the NDF content of rumen digesta, namely Malang Regency (98%); abattoir (75%) and BCRC (33%). In contrast *Phylum Proteobacteria* was only found in the RF taken from two locations, that is BCRC (65%) and Pegiran, Surabaya (9%). The existence of this phylum in the rumen has been associated with feeding grain in the diet and it therefore is not surprising if the most abundance of *Phylum Proteobacteria* was more prominent in the RF taken from BCRC than the abattoir, as OCC at BCRC were fed with a diet composing 50 % forage: 50 % concentrate. Whilst the other counterparts may received negligible amount or no concentrate in the diets as demonstrated by the lower abundance and absence of phylum Proteobacteria in this study. Based on the findings from the first experiment it can be concluded that OCC capable to digest the complete feed better than Bali and Madura cattle. From the second experiment , it was found that the most dominance phylla in the rumen of COC were *Bacteriodetes, Proteobacteria, Firmicutes* and *Cyanobacteria* and their abundance and diversity correlated with the type of diets consumed.

DAFTAR ISI	
Judul Penelitian	ii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT	ix
RINGKASAN.....	x
SUMMARY	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Sapi Peranakan Ongole (SPO)	5
2.2 Mikroba Rumen	6
2.2.1 Bakteri	8
2.2.2. Protozoa	10
2.2.3. Fungi	15
2.2.4. Bakteriofaq atau Virus.....	17
2.2.5. Archea atau Metanogen	18
2.3. Perkembangan Teknologi Molekuler Untuk Mempelajari Microbiome	19
2.3.1 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	20
2.3.2 <i>Denaturing Gradient gel electophoresis</i> (DGGE).....	22
BAB III. KERANGKA PIKIR KONSEP PENELITIAN	24
3.1 Kerangka Pemikiran.....	24
3.3. Hipotesis	27
BAB IV MATERI DAN METODE.....	28
4.1 Penelitian Tahap Pertama	28
4.1.1. Lokasi Penelitian	28

4.1.2. Materi penelitian.....	28
4.1.3. Metode Penelitian.....	29
4.1.4. Parameter yang diukur.....	30
4.1.5 Analisis Data.....	31
4.2. Penelitian Tahap Kedua	31
4.2.1. Lokasi Penelitian	31
4.2.2. Materi Penelitian.....	31
4.2.3. Metode Penelitian.....	32
4.2.4. Parameter yang diukur.....	34
4.2. 5 Analisis Data	35
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
5.1. Hasil penelitian Tahap I	36
5.1.1. Karakteristik cairan rumen sapi lokal	36
5.1.2. Evaluasi kemampuan mikroba rumen dalam degradasi pakan lengkap	40
5.2. Hasil Penelitian Tahap II	42
5.2.1 Karakteristik Sampel Sapi Peranakan Ongole (SPO).....	42
5.2.2 Uji Kualitatif DNA	43
5.2.3 Uji Kuantitatif DNA	44
5.2.4 Amplifikasi dan Elektroforesis PCR dengan Primer 16SrRNA.....	45
5.2.5. Sekuensing DNA Bakteri	46
5.2.6. Identifikasi <i>Phylum</i> Bacteri di dalam kelompok SPO	47
5.2.7. Hasil Identifikasi Taxonomi Mikroba rumen SPO	48
5.2.8. Hasil Analisis DDGE.....	54
5.3. Hubungan antara kelimpahan dan keragaman <i>Phylum</i> terhadap strategi peningkatan produksi ternak.....	57
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	59
6.1 Kesimpulan	59
6.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	74
DOKUMENTASI.....	120

Tabel**DAFTAR TABEL**

1. Taxonomi Bakteri dominan di dalam rumen.....	Universitas Brawijaya	9
2. Morfologi Fungi anaerob di dalam rumen.....	Universitas Brawijaya	15
3. Sumber <i>lytic Bacteriofaq</i> di dalam rumen.....	Universitas Brawijaya	18
4. Kandungan Nutrisi Pakan Lengkap	Universitas Brawijaya	29
5. Karakteristik cairan rumen sapi lokal yang terkoleksi sebagai sumber inokulum.....	Universitas Brawijaya	36
6. Rangkuman hasil analisis menggunakan metode <i>In vitro</i> pada pakan lengkap	Universitas Brawijaya	40
7. Kandungan Serat pada sampel pakan dan digesta SPO.....	Universitas Brawijaya	42
8. Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil Isolasi.....	Universitas Brawijaya	43
9. Taxonomi dari Identifikasi bakteri yang ada di dalam rumen SPO.	Universitas Brawijaya	50
10. Hasil BLAST dengan hasil dendogram DGGE.....	Universitas Brawijaya	55

DAFTAR GAMBAR	
1. Sapi Peranakan Ongole (SPO).....	6
2. Ragam spesies protozoa kelompok Holotricha	12
3. Spesies kelompok oligotricha.....	14
4. Siklus Hidup Fungi di dalam rumen.....	16
5. Mini PCR (a) dan program running PCR dengan mini PCR (b).....	21
6. Ilustrasi Tahapan proses PCR.....	21
7. Hasil visualiasi DGGE dan alat DGGE	22
8. Diagram Alir Kerangka Pikir Penelitian	24
9. Diagram Kerangka Operasional Penelitian	26
10. Nanophotometer	35
11. Persentase <i>genus</i> protozoa didalam sapi lokal.....	38
12. <i>Genus</i> Protozoa didalam sapi lokal	39
13. Hasil Visualisasi DNA.....	44
14. Hasil Amplifikasi PCR DNA dengan primer 16s rRNA	45
15. % <i>Phylum</i> Bakteri di dalam rumen SPO pada masing-masing lokasi	47
16. Diagram <i>Phylum</i> Dominan Berdasarkan jenis Pakan	53
17. Profil Bakteri pada gel DGGE	54

DAFTAR LAMPIRAN	
1. Prosedur Pengukuran Kadar Bahan Kering dan Abu (AOAC, 1995)	74
2. Prosedur Analisis Kandungan <i>Acid Detergent Fiber</i> (ADF) (Goering and Van Soest, 1970)	75
3. Prosedur Analisis Kandungan <i>Neutral Detergent Fiber</i> (NDF) (Goering and Van Soest, 1970)	76
4. Prosedur pengambilan cairan rumen	77
5. Prosedur evaluasi pakan dengan metode <i>in vitro</i> gas production (Makkar <i>et al.</i> , 1995).....	78
6. Isolasi DNA (Sambrooh, 1989)	80
7. Prosedur Analisis <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	84
8. Tabel SPSS Nilai b dan c.....	85
9. Hasil Analisis Statistik Produksi Gas, Nilai b dan Nilai c.....	87
10. Hasil Analisis Statistik KcBK dan KcBO	94
11. Tabel hasil Metabolisme Energi (ME)	99
12. Hasil sekuensing gen amplifikasi 16SrRNA pada SPO	102

DAFTAR SINGKATAN	
BK	: Bahan Kering
BO	: Bahan Organik
PK	: Protein Kasar
SK	: Serat Kasar
LK	: Lemak Kasar
TDN	: <i>Total Digestable Nutrient</i>
RPH	: Rumah Potong Hewan
Lolit-SaPot	: Loka Penelitian sapi potong
SPO	: Sapi Peranakan Ongole
SM	: Sapi Madura
SB	: Sapi Bali
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
DGGE	: <i>Denaturing Gel Gradient Electrophoresis</i>
ADF	: <i>Acid Detergent Fiber</i>
NDF	: <i>Neutral Detergent Fiber</i>
DNA	: <i>Deoksiribonukleat Acid</i>
RNA	: <i>Ribonukleat Acid</i>
BLAST	: <i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
PBBH	: Pertambahan Bobot Badan Harian

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bangsa sapi potong lokal Indonesia awalnya terdiri dari tiga yaitu Sapi Bali (SB), Madura (SM) dan Peranakan Ongole (SPO) yang sudah beradaptasi dengan baik. Berkembangnya ternak eksotik menyebabkan penurunan populasi sapi lokal salah satunya SPO. SPO merupakan salah satu sapi lokal yang perlu dikembangkan dan dijaga kelestariannya karena memiliki toleransi tinggi terhadap iklim, kualitas pakan, dan ketahanan terhadap parasit di Indonesia (Sutarno dan Setyawan, 2015^a). Hal tersebut menjadi keunggulan tersendiri bagi SPO untuk dikembangkan di Indonesia karena kualitas pakan yang ada di Indonesia masih tergolong kualitas rendah dan umumnya pakan yang diberikan berupa hasil samping pertanian seperti jerami padi dan jerami jagung yang memiliki nilai kandungan PK berkisar antara 3,50% - 5,95% dan SK berkisar antara 26,77% -28,98 % (Huda, Mashudi, Kuswati, Susilawati, Wahyuniingsih, Isnaini, Puspita dan Satria, 2018). Cowlye, Syahniar, Ratnawati, Mayberry, Marsetyo, Pamungkas and Poppi (2020) melaporkan bahwa PBBH SPO di Jawa Timur dengan pemberian pakan rumput gajah sebanyak 7,3 kg BK menunjukkan PBBH 0,23 kg sedangkan pada pemberian pakan rumput gajah dan konsentrat memiliki PBBH 1 kg. Hasil lain yang dilaporkan oleh Lestari, Adiwinarti, Arifin and Purnomoadi (2011) di Jawa Tengah dengan bahan pakan berupa konsentrat (2,6% dari BB) dan Jerami padi secara *ad libitum* memberikan pertambahan bobot badan 0,78 kg/ekor/hari. Hal tersebut menunjukkan pertambahan bobot badan ternak sangat dipengaruhi oleh pakan.

Pakan yang diberikan pada ternak ruminansia tidak langsung dapat dimanfaatkan oleh ternak karena harus mengalami proses fermentasi di dalam rumen .Hasil fermentasi tersebut menghasilkan senyawa sederhana yang mampu dimanfaatkan oleh ternak untuk hidup dan berproduksi. Proses tersebut terjadi di dalam rumen dan dibantu oleh milliaran mikroba dengan peran masing-masing yang digunakan untuk mencerna dan melakukan proses metabolisme dalam tubuhnya. Mikroba yang hidup di dalam rumen terdiri dari bakteri, *archaea*, jamur dan protozoa. Idealnya dalam cairan rumen terdiri dari 10^{6-11} per mililiter adalah bakteri, 10^{5-6} per mililiter adalah protozoa dan 10^{3-5} per mililiter adalah jamur, sedangkan 10^{11} per mililiter adalah bakteriofag (Soetanto, 2019). Hasil utama dalam proses fermentasi pakan berupa *Volatile Fatty Acids* (VFAs) dan biomassa mikroba yang dapat dimanfaatkan ternak inang untuk hidup dan produksi (Gonzalez, Baraza, Viveros and Martinez, 2014). Hasil tersebut sangat tergantung pada pakan dan kelimpahan mikroba yang dapat mendegradasi pakan. Hal ini menunjukkan

bawa sebenarnya untuk mengoptimalkan fermentasi pakan harus memperhatikan kelimpahan mikroba yang ada didalam rumen.

Penelitian yang mengkaji tentang kelimpahan mikroba dan ragam mikroba dari tingkat *genus* di dalam rumen SPO belum pernah dilakukan. Penelitian yang umum dilakukan menunjukkan populasi atas kelompok mikroba di dalam rumen tersebut seperti yang dilaporkan oleh Purbowati, Rianto, Dilaga, Lestari dan Adiwinarti (2014) menggunakan sampel cairan rumen dari rumah potong hewan dengan jumlah 6 sampel cairan rumen SPO jantan dengan latar belakang pakan yang diberikan yaitu Jerami padi, rumput lapang tanpa pemberian konsentrat. Hasil yang didapat menunjukkan keberadaan jumlah bakteri yaitu 2.3×10^8 (cfu/g), jamur 1.0×10^3 (cfu/g) dan protozoa 76.33 µl cairan rumen. Informasi terkait kelimpahan bakteri di dalam rumen sangat penting untuk membuka wawasan baru dalam bidang ilmu peternakan serta mengetahui asupan pakan yang dibutuhkan bakteri untuk hidup dan meningkatkan degradasi pakan didalam rumen. Perkembangan ilmu teknologi molekuler dapat menjadi solusi untuk mempermudah mendapatkan informasi terkait kelimpahan dan ragam mikroba yang lebih spesifik.

Teknologi molekuler menjadi trobosan yang terbaik untuk membuka jendela baru tentang identifikasi bakteri yang dapat diakses secara online pada GenBank menggunakan perangkat bioinformatika yaitu BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*). Pendekatan dengan metode molekuler dianggap lebih unggul dibandingkan dengan metode kultur karena untuk identifikasi menggunakan urutan basa DNA tidak perlu dikultur dan sampel yang digunakan sangat sedikit. Beberapa teknik yang dapat dilakukan seperti 1). *Amplified ribosomal DNA restriction analysis* (ARDRA) dan *Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). 2) *Terminal-restriction fragment lenght polymorphsim* (T-RFLP). 3). *Quantitative real-time PCR*. 4). Sekuensing DNA berdasarkan gen 16S/18SrRNA dan *Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE).

ARDRA dan PCR-RFLP merupakan teknik fingerprinitng yang melibatkan pengamplifikasi komunitas DNA murni yang diikuti oleh elektroforesis gel. Penanda pada teknik ini menggunakan pola pita DNA untuk identifikasi mikroba atau perbandingan komunitas mikroba. Teknologi ini dapat menampilkan keragaman mikroba dari beberapa anggota saja, sehingga untuk mengetahui komunitas yang kompleks pada mikroba rumen sangat sulit dilakukan (Chaudhary, Sirohi, and Saxena, 2012). T-RFLP merupakan metode sensitif dan kualitas tinggi untuk mengetahui keragaman, struktur dan dinamika populasi mikroba, metode ini menggunakan primer yang spesifik pada setiap informasi yang ingin diketahui (Vasta, Ruiz, Mele, Serra, Luciano, Lanza, Biondi and Priolo, 2010). Quantitative

real-time PCR merupakan suatu teknik pengembangan PCR yang digunakan untuk memperbanyak copyan DNA dan menghitung jumlah target DNA hasil amplifikasi. Pada metode ini membutuhkan biaya yang tinggi dan keterbatasan dalam mendeteksi dua atau lebih dari target sampel (Sari., 2017), sedangkan untuk metode sekensing DNA 16S/18SrRNA adalah teknik yang digunakan untuk menganalisis kehadiran dan kelimpahan *genus/species* mikroba di dalam rumen dengan menggunakan sampel hasil amplifikasi serta dapat menganalisis filogenetik untuk melihat kekerabatan mikroba rumen (Guan, Nkrumah, Basarab, and Moore, 2008.) dan untuk DGGE merupakan metode yang paling baik dalam mempelajari struktur komunitas bakteri tanpa membutuhkan kultivasi. Hasil yang diberikan dapat memisahkan spesies/jenis untuk melihat keragamannya (Lingyu, Zhang, Liu and Yang, 2015).

Ekspresi gen yang dihasilkan dengan teknologi molekuler tersebut merupakan rangkaian proses terjemahan informasi genetik pada urutan basa DNA atau RNA yang menjadi protein. Ekspresi gen di dalam sel membutuhkan proses transkripsi. Transkripsi adalah proses penyalinan urutan nukleotida yang terdapat pada molekul DNA. Proses ini hanya memiliki satu untai DNA yang disalin menjadi urutan nukleotida RNA yang terjadi di nukleus (Prokariotik dan Eukariotik). Komponen utama yang dibutuhkan pada proses ini adalah enzim RNA polimerase atau disebut dengan primer. Primer dibedakan menjadi 2 yaitu primer 16SrRNA untuk kelompok sel prokariotik (tidak memiliki inti sel) (Das and Qin, 2012) dan 18SrRNA untuk kelompok sel eukariotik (memiliki inti sel) (Wang, Ma, Zhao, Jinghua, Guoqiang, Fenglai and Liu, 2014).

Gabungan dari teknik PCR-DGGE dengan menggunakan primer universal 16s RNA yang dilanjutkan pada tahap sekunsing DNA merupakan satu pilihan yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi kelimpahan dan keragaman mikroba rumen pada SPO. Teknik ini dapat memberikan informasi terkait struktur komunitas mikroba serta kelimpahan dan keberagamannya dari tingkat *genus*. Adapun hasil penelitian terdahulu yang sudah dilakukan oleh sha, Hu, Shi, Dingkao, Wang, Li, Zhang, Luo and Liu (2020) dengan menemukan *Phylum* dominan pada Yak (perkawinan silang antara Bos grunniens dan Bos Taurus) adalah *Firmicutes, Fibrobacteres, Euryarchaeota, Bacteroidetes, and Proteobacteria* dan dari tingkat spesies yang dominan di dalam rumen adalah *Ruminococcus spp, Fibrobacter succinogenes, Prevotella spp, Selenomonas ruminantium, Megasphaera elsdenii* dan *Streptococcus bovis* dengan persentase kelimpahannya tergantung pada jenis pakan yang diberikan (Petri, Schwaiger, Penner, Beauchemin, Forster, McKinnon and McAllister, 2013^a).

1.2. Rumusan Masalah

Sapi potong lokal yang ada di Indonesia perlu dilestarikan dan ditingkatkan produktifitasnya karena memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap kualitas pakan yang rendah. Upaya meningkatkan performansi ternak melalui manipulasi pakan sudah banyak dilakukan namun informasi yang diberikan tidak menghubungkan kelimpahan dan keragaman microbiota didalam rumen yang memiliki peranan dalam memfermentasi pakan, sehingga rumusan masalah yang diangkat dalam penelitian ini yaitu:

- 1.2.1. Bagaimana kemampuan mencerna pakan lengkap dengan cairan rumen dari SB, SM dan SPO secara *in vitro* ?
- 1.2.2. Bagaimana kelimpahan dan ragam mikroba rumen yang ada pada SPO dengan pendekatan PCR-DGGE dari primer universal 16SrRNA?
- 1.2.3. Bagaimana hubungan kelimpahan dan keragaman mikroba didalam rumen SPO dengan pakan yang dikonsumsi SPO ?
- 1.2.4. Bagaimana hubungan filogenetik dari *genus* dominan yang ada pada SPO?

1.3 Tujuan

- 1.3.1. Mendapatkan informasi kemampuan mencerna pakan lengkap pada SB,SM dan SPO secara *in vitro*.
- 1.3.2. Mendeteksi dan menganalisis kelimpahan dan keragaman mikroba rumen SPO yang teridentifikasi dari PCR-DGGE menggunakan primer universal 16SrRNA.
- 1.3.3. Mengetahui hubungan kelimpahan dan keragaman mikroba didalam rumen SPO dengan pakan yang dikonsumsi
- 1.3.4. Mengetahui hubungan filogenetik dari *genus* dominan pada SPO.

1.4 Manfaat

Dengan mengetahui kelimpahan dan keragaman mikroba rumen SPO dapat dijadikan sebagai landasan utama pada penentuan formulasi atau pemberian pakan agar dapat meningkatkan nilai efisiensi pakan dan produksi ternak, selain itu hasil penelitian ini menjadi awal tentang kajian studi nutrigenomik dan melengkapi hasil penelitian terdahulu dengan menemukan *genus* dominan yang ada di dalam rumen SPO.



2.1 Sapi Peranakan Ongole (SPO)

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Sejarah berkembangnya SPO di Indonesia berawal dari kedatangan sapi keturunan Zebu (Mysore, Ongole, Hissar, Gujarat dan Gir) tahun 1806 dan 1812 yang dibawa ke Jawa Timur untuk meningkatkan keturunan sapi Jawa. Tahun 1909 pemerintah melakukan impor dengan tiga keturunan Zebu yaitu Ongole, Gujarat dan Hissar dari India. Sapi impor tersebut didistribusikan di Jawa, Sumba dan Sumatera dan program pengembangan sapi tersebut berhasil. Tahun 1909 – 1911 sapi Ongole menjadi salah satu sapi yang ideal dikembangkan di Jawa sehingga, pemerintah mengimpor secara massal sapi Ongole yang kemudian di karantina di Sumba. Hasil yang ditunjukkan memberi kesan yang sangat baik sehingga terus dikembangkannya sapi persilangan jenis Sumba dan Ongole dan menghasilkan sapi jenis baru yaitu sapi Sumba Ongole (SO). Tahun 1915-1929 adanya program “*Ongolization*” yaitu distribusi sapi SO ke Jawa, Program ini mengebirir sapi jawa jantan dan sapi jawa betina dikawinkan dengan sapi SO jantan dan terjadi kepunahan pada sapi Jawa dan menghasilkan spesies sapi baru yaitu SPO. Tahun 1920-1940 SPO didistribusikan ke Jawa ke pulau Sumbawa, Sulawesi, Kalimantan Barat dan Sumatera (Sutarno dan Setyawan. 2016^b).

Berdasarkan keputusan menteri pertanian nomor 2907/Kpts/OT.140/6/2011 SPO saat ini sudah ditetapkan menjadi plasma nutfah atau *indigenous* Indonesia. Karakteristik dari SPO yaitu 1) Warna tubuh putih sampai abu-abu, ujung ekor dan bulu sekitar berwarna hitam; 2) Badan besar, bergelambir panjang menggantung dari leher sampai belakang kaki depan, punuk besar (jantan), punuk kecil (betina) dan leher pendek; 3) memiliki tanduk; 4) telinga kecil dan tegak kesamping. Gambar SPO disajikan pada Gambar 1.



Sumber : Dokumentasi milik pribadi dari Loka Penelitian Sapi Potong di Grati
Gambar 1. Sapi Peranakan Ongole (SPO)

Keunggulan dari sapi tersebut yaitu memiliki adaptasi lingkungan tinggi dan terkenal dengan tipe sapi pekerja, dapat bertahan hidup dengan pemberian pakan sederhana untuk menghasilkan karkas yang baik dan dapat dikembangkan di daerah tropis (Ngadiyono, Murdjito dan Supriyana, 2008). Populasi SPO murni saat ini jarang sekali dapat ditemukan di peternak rakyat, umumnya SPO yang dipelihara peternak sudah dikawinkan dengan sapi eksotik seperti sapi Brahman. SPO terkenal dengan sebutan sapi putih keabu abuan yang terkenal dengan sapi pedaging dan pekerja (Kementerian pertanian, 2013).

Populasi sapi yang ada di Indonesia terdiri dari 45% sapi Lokal dan 55% sapi eksotik. SPO sendiri menyumbang sekitar 5,16% dari total sapi lokal yang ada. Sapi Lokal tersebut tersebar di beberapa lokasi seperti Jawa (45% dengan 35% berada di Jawa Timur), Sumatera (22%), Nusa Tenggara (13%), Sulawesi (13%) dan tersebar di pulau lainnya (7%). Saat ini SPO sudah mengalami kepunahan karena banyaknya persilangan dengan sapi Simmental dan Limousin. Keturunan dari persilangan tersebut sangat disukai peternak karena memberikan kenaikan bobot badan yang tinggi. Untuk mempertahankan kemurnian genetik sapi lokal pemerintah telah melakukan sentra konservasi dan pemuliaan ternak seperti pusat pembibitan SM di pulau Sapudi, SB di Nusa Penida dan untuk sapi Aceh di Pulau Raya (Rayeuk), dan ada 18 kecamatan terpilih sebagai sentra budidaya/pengembangan pada SB dan SPO (Sutarno dkk., 2016^b)

2.2 Mikroba Rumen

Ternak ruminansia memiliki karakteristik utama dengan memiliki 4 lambung yang terdiri dari rumen, retikulum, omasum dan abomasum. Ukuran lambung ternak ruminansia akan berkembang dengan bertambahnya umur ternak ketika masih baru lahir ukuran lambung ternak ruminansia sama dengan ternak nonruminansia. Ukuran rumen lebih kecil dibandingkan dengan

abomasum, namun dengan bertambahnya umur dan pemberian pakan (pengenalan hijauan) yang diberikan sehingga rumen berkembang dan memiliki ukuran yang lebih besar. Saat dewasa ukuran rumen mencapai 70% dari rongga perut dan ukuran abomasum menjadi lebih kecil (Soetanto, 2019).

Fungsi rumen pada ternak ruminansia digunakan sebagai tempat berlangsungnya proses fermentasi pakan yang dibantu oleh miliaran mikroba. Fermentasi pakan ini dapat berlangsung ketika ternak sudah melewati masa lepas sapih, karena ketika ternak disapih asupan pakan berupa susu (colostrum) yang secara reflex proses penyerapan nutrisi dari *oesophagus* langsung menuju abomasum (Van Soest, 1994). Hal ini terjadi karena adanya *oesophageal groove* yang terbentuk oleh lapisan otot. *Reticula groove* ini berada di dua bagian yaitu pertama dinding antara rumen dan retikulum dan kedua di ujung posterior *oesophagus* hingga retikulum (berbentuk menyerupai bibir) (Soetanto, 2019).

Mikroba di dalam rumen dapat mengefisienkan pemanfaatan nutrisi tanaman atau mendegradasi pakan yang akan masuk kedalam rumen menjadi produk sederhana seperti VFA (*volatile fatty acid*) sebagai sumber energi, protein dan vitamin yang dapat dimanfaatkan oleh ternak inang (Creevey, Kelly, Henderson and Leahy, 2014; Sari, 2017). Proses pemanfaatan hasil fermentasi berupa VFA rantai pendek diawali dengan penyerapan di dinding rumen menuju ke hati. Proses sintesis yang terjadi di dalam hati mengubah propionate dan asam laktat serta asam amino menjadi glukosa, sedangkan pada butirat, di dalam hati dirubah menjadi senyawa keton (β -hydroxybutyrate), kemudian senyawa tersebut di edarkan ke seluruh tubuh melalui darah. Di dalam jaringan adiposa ternak SPOTong glukosa diubah menjadi gliserol, sehingga gliserol dan senyawa keton serta asetat menghasilkan lemak (*Triglycerida*), sedangkan glukosa, keton dan asetat di dalam otot dan jaringan lainnya menghasilkan protein di dalam otot (Wattiaux and Armentano, 1998).

Aktivitas dari mikroba sangat dipengaruhi oleh kondisi di dalam rumen serta tersedianya zat zat makanan yang berasal dari pakan (Gorka, Kowalski, Pietrzak, Kotunia, Jaguasiak and Zabielski, 2011). Mikroba yang ada di dalam rumen memberikan pengaruh yang signifikan terhadap efisiensi pakan pada ternak. Hasil penelitian yang dilaporkan Lima, Auffret, Stewart, Dewhurst, Duthie, Snelling, Walker and Freeman (2019) menyebutkan bahwa setiap set gen mikroba sangat berperan dalam identifikasi prediksi pemunculan suatu sifat ekonomis ternak seperti FCR, PBBH, dan Residual Feed Intake (RFI). Gen mikroba memiliki pengaruh yang tinggi dalam prediksi PBBH adalah *amiABC*, yang terlibat dalam pergantian petidoglikan melalui pemutusan ikatan glicosidik dan pelepasan asam amino dan resisten cAMP sehingga apabila menemukan gen mikroba yang berbeda dapat digunakan sebagai penyandi suatu sifat,

sedangkan apabila gen mikroba tumpang tindih lebih dari satu gen maka dapat digunakan sebagai interpretasi proses biologis yang menjelaskan korelasi antara sifat fenotip (Uejara dan Park, 2008; Uehera *et al.*, 2010; disitasi Lima, *et.al* 2019).

Kelompok utama mikroba yang berperan dalam proses fermentasi di dalam rumen yaitu bakteri, protozoa, dan jamur (Henderson, 2015) sedangkan menurut Soetanto (2019) mikroba yang ada di dalam rumen sudah teridentifikasi menjadi 4 golongan utama yaitu bakteri, protozoa, fungsi dan archaea.

2.2.1 Bakteri

Bakteri adalah mikroba yang jumlahnya paling banyak di dalam rumen (10^{10} - 10^{11}). Bakteri dalam rumen menjadi kunci utama dalam proses fermentasi pakan karena memiliki populasi tertinggi dibandingkan dengan jenis mikroba lainnya. Komunitas spesies bakteri di dalam rumen sangat beragam, secara keseluruhan terdapat 100 spesies yang berbeda dari kelompok bakteri, jika dikelompokkan pada Phylum yang dominan yaitu *Firmicutes* dan *Bacteroidetes* dan *Proteobacteria* (Weimer, 2015; Thoetkiattikul *et al.*, 2013). Phylum bakteri yang ada akan berkembang sejalan dengan bertambahnya umur ternak dan jenis pakan yang diberikan. Hasil penelitian dari Jami *et al* (2013) menunjukkan bahwa adanya peningkatan dan penurunan dari Phylum bakteri yang ada di dalam rumen seperti *Proteobacteria* perlahan lahan menurun menjadi *Bacteroidetes* dan *Firmicutes*, sedangkan pada taksonomi genus seperti *Bacteroides* perlahan lahan berubah menjadi keseluhan terdiri dari *Prevotella*.

Berdasarkan substratnya bakteri dikelompokkan menjadi 8 yaitu: 1). Bakteri Hemiselulolitik yang dapat mendegradasi hemiselulosa dengan menghasilkan enzim hemiselulase, contoh bakteri yaitu *Butyrivibrio fibrisolven*. 2). Bakteri Selulolitik yang mendegradasi selulosa dengan enzin selulase, contoh bakteri yaitu : *Ruminococcus albus* dan *Ruminococcus flavefaciens* dan *Fibrobacter succinogenes* (Zhao *et al.*, 2015). 3). Bakteri Proteolitik yang mendegradasi protein dengan enzim protease, contoh bakteri yaitu *Clostridium sporogenes* dan *Bacillus licheniformis*. 4). Bakteri Ureolitik adalah bakteri yang menunjukkan aktivitas ureolitik dengan alur hidrolisis urea menjadi CO_2 dan ammonia, Contoh bakteri ini yaitu: *Streptococcus* sp. 5). Bakteri amilolitik yang dapat memfermentasi amilum, contoh bakteri ini yaitu *Streptococcus bovis*. 6). Bakteri Lipolitik adalah bakteri yang menghidrolisi lemak, contoh bakteri ini yaitu : *Anaerovibrio lipolytica*. 7). Bakteri Pemakai gula (Sugar Utilizer Bacteria) adalah keseluruhan bakteri pemakai polisakarida mampu memfermentasi disakarida dan monosakarida. 8). Bakteri Pemakai Asam (Acid Utilizer Bacteria) adalah bakteri yang mampu merombak asam oksalat yang bersifat racun, dan beberapa bakteri menggunakan

asam suksinat, malat dan fumarate serta format dan asetat sebagai sumber energi utama. Contoh bakteri ini yaitu *Peptostreptococcus bacterium*, *Propioni bacterium* dan *Selenomonas lactilytica* (Soetanto, 2019). Keragaman bakteri di dalam rumen sebesar 1.098 ± 382 Operational Taxonomic Unit (OTU) yang dapat dikelompokkan menjadi 24 Phylum, 48 Class, 89 Ordo, 173 Family dan 397 Genus (Myer, Freetly, Wells, Smith and Kuehn, 2017), hal tersebut juga di perjelas oleh Durand and Ossa (2014) yang menghasilkan keragaman bakteri diperkirakan sebanyak 1.500 spesies dan 7.000 untuk *archaea*, urutan bakteri ditetapkan pada 5.271 unit taksonomi yang mewakili 16 Phylum. Phylum dominan tersebut terdiri dari *Firmicutes* (56%), *Bacteroidetes* (31%) dan *Proteobacteria* (4%). adapun turunan class dominan dari Phylum tersebut berturut turut adalah *Clostridia*, *Bacteriodia* dan *Proteobacteria* (Duran et al., 2014) Untuk memperjelas turunan tersebut informasi yang disajikan di Tabel 1.

Tabel 1. Taxonomi Bakteri dominan di dalam rumen.

Phylum	Class	Family	Genus
<i>Firmicutes</i>	~ <i>Clostridia</i>	~ <i>Lachnospiraceae</i>	~ <i>Butyrivibrio</i>
	~ <i>Bacilli</i>	~ <i>Ruminococcaceae</i>	~ <i>Acetivibrio</i>
	~ <i>Erysipelotrichia</i>	~ <i>Clostridia incertae sedis</i>	~ <i>Ruminococcus</i>
		XIII	~ <i>Succinilasticum</i>
		~ <i>Veillonellaceae</i>	~ <i>Pseudobutyryvibrio</i>
		~ <i>lactobillales</i>	~ <i>Mogibacterium</i>
<i>Bacteroidetes</i>	~ <i>Bacteroidia</i>	~ <i>Acidaminococcaceae</i>	~ <i>Streptococci</i>
	~ <i>Prevotella</i>	~ <i>prebotellaceae</i>	~ <i>Prevotella</i>
	~ <i>Sphingobacteria</i>		~ <i>ruminicola</i>
			~ <i>Prevotella brevis</i>
			~ <i>Prevotella bryantii</i>
			~ <i>Prevotella albensis</i>
			~ <i>Succinilasticum</i>

Proteobacteria ~ *Tolumonas*
Actinobacteria ~ *methylomonas*
~ *Butirovibrio-fibrisolvans*

Sumber : (Durand *et al.*, 2014); (Sha *et al.*,2020) dan (Auffret *et al.*, 2017). *Phylum Bacteroidetes* terlibat dalam jalur metabolisme nukleotida, metabolisme karbon, metabolisme karbohidrat dan lemak, serta metabolisme asam lipoit (*lipoic Acid*) yang selanjutnya dapat di pecah menjadi metabolisme asam lemak, degradasi valin, leusin, dan isoleusin, glikolisis, glukoneogenesis, siklus TCA dan metabolism piruvat. *Phylum Firmicutes* terlibat dalam jalur metabolism nukleotida, metabolisme karbon, dan karbohidrat serta metabolisme lemak yang selanjutnya di bagi menjadi metabolisme purin, metabolisme pirimidin, glikolisis, glukoneogenesis, jalur pentose fosfat, metabolisme fruktosa dan manosa, serta metabolisme nitrogen. *Phylum Proteobacteria* terlibat dalam proses metabolisme nukleotida, metabolisme karbon, dan karbohidrat serta metabolisme lemak, selanjutnya terbagi menjadi metabolisme pirimidin, glisin, serin, dan teronin serta metabolisme metana dan metabolisme nitrogen (Hart, Creevey, Hitch and Smith, 2018)

Genus bakteri yang menyumbang 60-70% dari total bakteri yang ada di dalam rumen yaitu *Prevotella* (Avgustin, Ramsak and Peterkan, 2001). Awalnya klasifikasi *Prevotella* terkenal dengan *Bacteroides* seperti *Bacteroides melaninogenicus* dan *Bacteroides oralis* yang saat ini sudah terklarifikasi sebagai *Prevotella melaninogenicus* dan *Prevotella oralis* (shah and Collins, 1990). Hasil yang dilaporkan oleh Bekele, Koike and Kobayashi (2010) menghasilkan adanya keterkaitan signifikan kelimpahan *Prevotella* di dalam rumen dengan pakan hay. Hasil lain menyatakan bahwa keberadaan *prevotella* sangat penting dalam mendegradasi protein dan pati di dalam rumen (Zeineldin *et al.*, 2018).

2.2.2. Protozoa

Populasi protozoa di dalam rumen menduduki posisi kedua setelah bakteri. Rataan populasi protozoa di dalam rumen yaitu 10^5 - 10^6 /gram digesta rumen (Soetanto, 2019). Protozoa yang banyak di dalam rumen adalah ciliate yang menyumbang 19-28% aktivitas selulase dari total aktivitas fibrolitik di dalam rumen seperti *Polyplastron multivesiculatum* tinggi pada aktivitas Carboxymethylcellulose (CMC) dan *xylan* sedangkan *Epidinium caudatum* tinggi pada aktivitas selulose (Takenaka, Tajima, Mitsumori and Kajikawa, 2004). Hasil dari fermentasi

metabolism protozoa di dalam rumen berupa gas methan and ammonia, sehingga dilakukan defaunasi untuk menekan keberadaannya di dalam rumen. Proses menghasilkan gas methane tidak langsung dilakukan oleh protozoa, namun keberadaan populasi bakteri yang lebih dominan, khususnya bakteri metanogenik dapat meningkatkan produksi metan di dalam rumen, namun keberadaan protozoa mampu menekan perubahan asam lemak jenuh di dalam rumen dengan menyimpannya dalam membrane fosfolipid (Patel and Ambalam, 2018), selain itu menurut Soetanto (2019) kehadiran protozoa di dalam rumen dapat mencegah terjadinya acidosis pada ternak yang tinggi akan pakan karbohidrat mudah terfermentasi, karena dapat menelan gula dalam jumlah yang besar sehingga terhindar dari proses fermentasi bakteri (Denton *et al.*, 2015). Protozoa juga menjadi sumber protein mikroba tertinggi karena tubuh protozoa mengandung asam glutamate, leusin, lisin dan isoleusin sebagai asam amino mudah tercerna dibandingkan dengan sumber protein dari mikroba lainnya (Harfoot and Hazlewood, 1997).

Klasifikasi protozoa dikelompokkan menjadi 2 yaitu *Holotricha* dan *Oligotricha* (entodinomorphs). *Holotricha* memiliki ukuran sel yang lebih besar dengan keberadaan cilia diseluruh tubuh sedangkan *Oligotricha* memiliki ukuran sel yang lebih kecil dengan keberadaan cilia berada disekitar mulut (prostoma) (Soetanto, 2019).

a. Holotricha

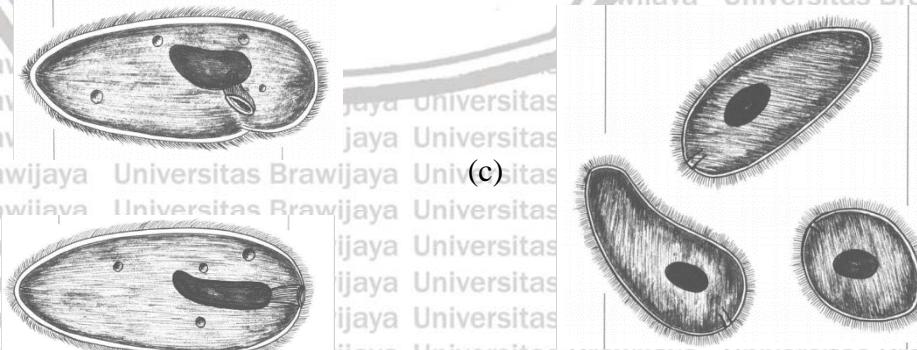
Protozoa kelompok *Holotricha* menggunakan glukosa, fruktosa, sukrosa dan pektin yang disimpan dalam bentuk polisakarida atau tepatnya amilopektin. Protozoa ini memiliki peranan penting dalam metabolism karbohidrat karena dapat mencerna gula dengan cepat dan menyimpannya dalam bentuk amilopektin, yang nantinya akan dilepas kembali apabila populasi *Holotricha* mengalami lisis pada fase pertumbuhannya. Proses ini memiliki dampak positif terhadap ketersediaan karbohidrat di dalam rumen saat ternak istirahat (Soetanto, 2019).

Protozoa holotricha mencerna sejumlah kecil bakteri rumen dan memiliki sedikit pengaruh pada aliran NAN (Non Amonia Nitrogen) duodenum dan metabolisme protein, serta tidak berpengaruh signifikan pada pencerna serat (Ivan, 2009), selain itu menurut Belanche *et al.*, (2015) menyatakan bahwa holotricha memiliki kontribusi untuk metanogenesis rumen, sehingga kehadiran didalam rumen memiliki peranan yang sedikit untuk produksi ternak, kecuali ternak diberi pakan tinggi akan karbohidrat. Kelompok mikroba yang memiliki peranan dalam akumulasi glikogen yaitu *Isotricha* dan *Dasytricha* (Denton *et al.*, 2015).

Genus protozoa holotricha yang dominan ialah *Isotricha*, *Dasytricha*, *Buetschlia* dan *Charonina* (Patel and Ambalam, 2018). Karakteristik *Isotricha* dan *Dasytricha* yaitu memiliki tubuh berbentuk elips dengan silia somatic seragam berada di seluruh tubuh, namun ukuran tubuhnya berbeda. Spesies yang umum dari *genus Isotricha* yaitu *Isotricha intestinalis* dan *Isotricha prostoma*. Karakteristik dari *Isotricha intestinalis* memiliki rataan panjang 110 µm dengan range 90-200 µm dan lebar 60 µm dengan range 45-150 µm, sedangkan pada *Isotricha prostoma* memiliki rataan panjang 135 µm dengan range 80-200 µm dan lebar 70 µm dengan range 50-120 µm. *Genus Dasytricha* umumnya memiliki spesies *Dasytricha ruminantium* yang memiliki ukuran rataan panjang tubuh 58 µm dengan range 46-100 µm dan lebar 27 µm dengan range 25-50 µm. (Dehority, 1993). Adapun gambar dari *genus Isotricha* dan *Dasytricha* disajikan pada Gambar 2.

Klasifikasi taxonomy dari kelompok holotricha yaitu

<i>Phylum</i>	: <i>Ciliophora</i>
<i>Class</i>	: <i>Kinetofragminophorea</i>
<i>Subclass</i>	: <i>Gymnostomatia</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Prostomatida</i>
<i>Subordo</i>	: <i>Archistomatina</i>
<i>Family</i>	: <i>Isotrichidae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Isotricha</i> <i>Dasytricha</i> <i>Oligoisotricha</i>



Keterangan : *Isotricha intestinalis* (a); *Isotricha prostoma* (b) dan *Dasytricha ruminantium* (c)

Gambar 2. Ragam spesies protozoa kelompok Holotricha

Sumber : Dehority, 1993.

b. *Oligotricha*

Kelompok protozoa Entodiniomorphid (*Oligotricha*) memiliki aktivitas predator lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok Holotricha (Newbold *et al.*, 2015). Keberadaan kelompok *genus oligotricha* sekitar 90% memiliki peranan dalam proses hidrolisis dan fermentasi selulosa (Yanez-Ruiz *et al.*, 2004). Hal ini juga dijelaskan oleh Soetanto (2019) yang menyatakan bahwa protozoa kelompok *Oligotricha* keberadaan di dalam rumen banyak melekat pada pakan berserat dan sedikit memakan gula. Kelompok ini dapat mencerna serat kasar tanaman dan selulosa.

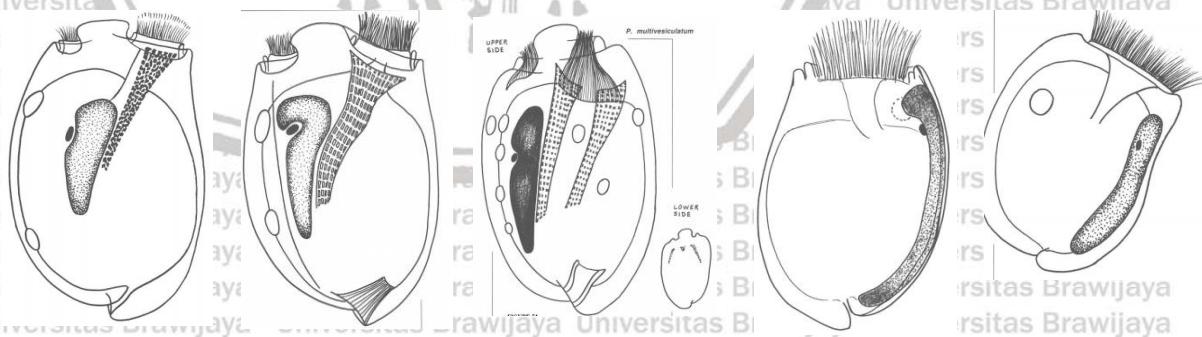
Genus protozoa *Oligotricha* yang dominan yaitu *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Elytroplastron*, *Metadinium*, *Ostracodinium*, *Epidinium* (Patel and Ambalam, 2018). Hasil Review yang dilakukan Gonzales *et al* (2014) menyatakan bahwa protozoa yang menghasilkan enzyme selulolitik yaitu *Enoploplastron triloricatum*, *Eudiplodinium maggii*, *Diploplastron affine*, *Epidinium ecaudatum*, *Diplodinium monacanthum*, *Diplodinium pentacanthum* dengan produk fermentasi berupa gula pereduksi, sedangkan protozoa yang menghasilkan enzyme proteolitik yaitu *Entodinium caudatum* dan *Eudiplodinium medium* dengan produk fermentasi berupa ammonia dan VFA. Hasil lain juga dilaporkan oleh Fondevila dan Dehority (2001) pada studi *in vitro* menunjukkan bahwa protozoa dari *genus Polyplastron* dan *Eudiplodinium* dapat mencerna selulosa kristal dan xilan, selain itu pada *Diploplastron affine* memiliki aktifitas amilolitik karena menghasilkan enzim amilase dan maltase sehingga menghasilkan maltosa dan maltotriosa serta glukosa (Wereszka dan Michalowski, 2012).

Karakteristik umum dari kelompok oligotricha yaitu memiliki cilia hanya disebagian tubuhnya dan memiliki bentuk oval. Klasifikasi taxonomy dari kelompok holotricha yaitu :

universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Phylum : *Ciliophora*
 Universitas Brawijaya Class : *Kinetofragminophorea*
 Universitas Brawijaya Subclass : *Vestibulifera*
 Universitas Brawijaya Ordo : *Entodiniomorphida*
 Universitas Brawijaya Family : *Ophryoscolecidae*
 Universitas Brawijaya Sub Family : *Entodininae*
 Universitas Brawijaya Genus : *Entodinium*
 Universitas Brawijaya Sub Family : *Diplodiniinae*
 Universitas Brawijaya Genus : *Diplodinium*
 Universitas Brawijaya *Eudiplodinium*
 Universitas Brawijaya *Ostracodinium*
 Universitas Brawijaya *Enoplastron*
 Universitas Brawijaya *Polyplastron*

Sumber : Dehority (1993)

Ukuran tubuh kelompok oligotricha sangat beragam tergantung pada spesies, seperti pada kelompok genus *Diplodinium* yaitu *Eudiplodinium bovis* memiliki rataan panjang 79 μm dengan range 52-100 μm dan lebar 47 μm dengan range 36-57 μm ; *Eudioplodinium magpii* memiliki rataan panjang 151 μm dengan range 115-212 μm dan lebar 100 μm dengan range 73-143 μm ; *Polyplastron multivesiculatum* memiliki rataan panjang 161 μm dengan range 120-190 dan lebar 95 μm dengan range 78-140 μm . Kelompok genus *Entodinium* dengan spesies *Entodinium longinucleatum* memiliki rataan panjang 54 μm dengan range 44-110 μm dan lebar 37 μm dengan range 27-87 μm ; *Entodinium bursa* memiliki rataan panjang 80 μm dengan range 80-115 μm dan lebar 52 μm dengan range 70-90 μm . adapun gambar beberapa spesies kelompok oligotricha tersaji pada Gambar 3.



Keterangan : *Eudiplodinium bovis* (a); *Eudioplodinium magpii* (b); *Polyplastron multivesiculatum* (c); *Entodinium longinucleatum* (d); *Entodinium bursa* (e)

Gambar 3. Spesies kelompok oligotricha

Sumber : Dehority (1993)

2.2.3. Fungi

Informasi terkait fungi/jamur di dalam rumen masih sangat terbatas. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa jamur anaerobic yang ada di dalam rumen memiliki kemampuan mencerna serat lebih baik dibandingkan dengan bakteri selulolitik karena secara fisik dapat membuka jaringan tanaman di bagian dalam dan mampu mendegradasi bahan lignoselulosa yang kompleks. Proses degradasi yang diawali dengan melakukan kolonisasi zoospore motil (diameter 5-10 mm) dengan waktu kolonisasi yaitu 15-20 menit di dalam rumen (Orpin & Joblin, 1997; Ho *et al.*, 1989 disitasi dalam Edward *et al.*, 2008).

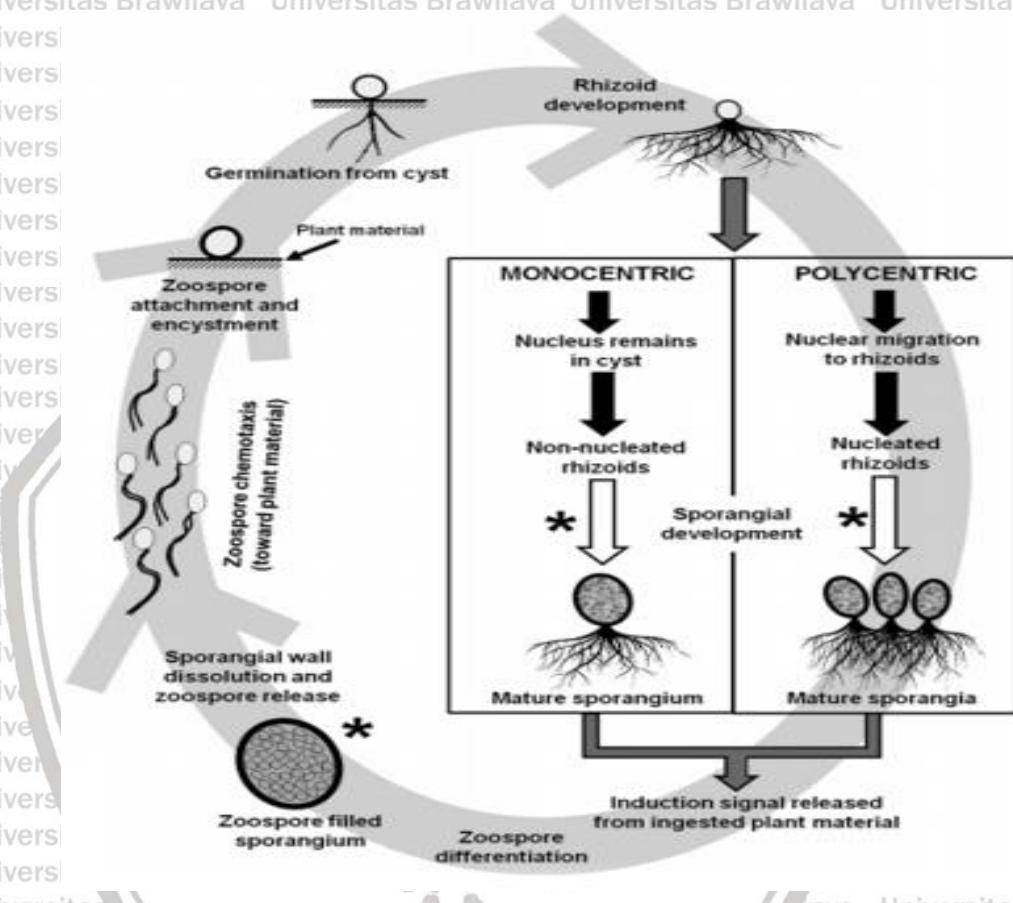
Fungi anaerob termasuk dalam *Phylum Neocallimastigomycota* yang berkerabat dekat dengan *Phylum Chytridiomycota*. Terdapat 6 genus *NeocallimastigomycotaI* yang dibedakan berdasarkan ciri-ciri morfologi seperti thallus, rhizoid dan zoospore. Adapun morfologi dari ke-6 genus tersebut disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Morfologi Fungi anaerob di dalam rumen

Genus	Thallus	Rhizoidq	Flagella per zoospora
<i>Neocallimastix</i>	Monocentric	Filamentous	Polyflagellate
<i>Piromyces</i>	Monocentric	Filamentous	Uniflagellate
<i>Caecomyces</i>	Monocentric	Bulbous	Uniflagellate
<i>Orpinomyces</i>	Polycentrik	Filamentous	Polyflagellate
<i>Anaeromyces</i>	Polycentrik	Filamentous	Uniflagellate
<i>Cyllamyces</i>	Polycentrik	Bulbous	Uniflagellate

Sumber : Gruninger *et al.*, (2014)

Proses berkembang biak fungi ini melalui proses aseksual zoospore flagel dari sporangium. Tahapan reproduksi seksual diawali dengan monoflagellata posterior. Poliflagellate dan berkembang biak menjadi monosentris (tunggal dengan satu sporangium) atau polosentrik (banyak sporangium dari satu zoospora). Di dalam rumen zoospore dilepas dari sporangium sebagai respon pakan (Gruninger *et al.*, 2014). Siklus hidup fungi di dalam rumen di ilustrasikan dalam Gambar 4.



Gambar 4. Siklus Hidup Fungi di dalam rumen.

Sumber : Gruninger *et al.*, (2014)

Zoospora bergerak mencari partikel pakan melalui mekanisme kemotaksis. Kemotaksis adalah Gerakan dari tubuh fungi terhadap respon pakan dengan bergerak menuju konsentrasi teringgi dari molekul pakan. Pada saat aktivitas kolonisasi yang dilakukan zoospora terjadi proses siste (ensismen) yang mengubah zoospore dalam bentuk pada pertumbuhan sporangium, thallus serta rhizoid. Dalam waktu 8-32 jam terjadi pembesaran pada sporangium dan berisi calon zoospore (50-80) yang selanjutnya terjadi proses differensiasi (pembelahan) sehingga sporangium pecah (terputusnya dinding sporangial) dan melepaskan zoospora ke cairan rumen untuk mencari partikel pakan, sedangkan sporangium yang telah kosong akan ikut bersama digesta keluar rumen. Siklus hidup mikroba ini berkisar antar 24-30 jam sehingga keberadaan

fungsi sangat erat pada pakan berserat (Soetanto, 2019; Gruninger *et al.*, 2014). Sumber energi untuk pertumbuhan fungi yaitu polisakarida, disakarida dan monosakarida seperti glukosa, fruktosa dan xilosa (Lowe *et al.*, 1987). Hasil dari fermentasi jamur anaerobic yaitu asam asetat, format, etanol, asalam laktat H₂ dan CO₂ (Cheng, Edwards, Allison, Zhu and Theodorou, 2009).

2.2.4. Bakteriofaq atau Virus

Informasi biologis mikroba rumen ini masih sangat terbatas karena kurangnya perhatian para peneliti dalam mendalami virus/bakteriofaq di dalam rumen. keberadaannya di dalam ternak ruminansia sangat merugikan karena dapat menurunkan efisiensi pakan, transfer gen toksin. Penelitian tentang Bakteriofaq dimulai sejak Tahun 1914 dengan penemuan oleh Twort di Inggris dan d'Herrelle di Prancis. Istilah Bakteriofaq diartikan sebagai pemakan bakteri karena dapat mengubah penampilan koloni bakteri yang terinfeksi. Kedatangan mikroskop electron dapat melakukan identifikasi bakteriofaq pada penularan penyakit dan Hoogenraad *et al* pada tahun 1967 menunjukkan cara berkembang biak virus di dalam rumen dengan menggunakan mikroba rumen sebagai inang sehingga disebut sebagai endemic di dalam rumen.

Keberadaan bakteriofag di dalam rumen dilaporkan oleh Ritchie *et al* (1970) dengan perkiraan populasi 1×10^9 /ml cairan rumen, namun hasil lain dilaporkan oleh Klieve and Bauchop (1998) dengan hasil populasi bakteriofaq yaitu $2 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ / ml cairan rumen dengan menggunakan mikroskop electron. Penyebaran virus di dalam rumen melalui siklus reproduksi lytic. Siklus ini bakteriofaq masuk kedalam bakteri inang dan mentranskrip dan mereplikasi komponen protein dan perakitan partikel lengkap virus yang akhirnya bakteri inang melisis dan melepaskan keturunan bakteriofaq kedalam cairan rumen (Gilbert and Klieve, 2015). Beberapa bakteri dilaporkan menjadi sumber lytic bakteriofaq seperti yang terasaji pada

Tabel 3.

Tabel 3. Sumber lytic Bakteriofaq di dalam rumen

Spesies Bakteri	Genus Bakteriofaq
<i>Bifidobacterium ruminale RU27</i>	<i>Siphoviridae</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens AR14</i>	<i>Inoviridae</i>
<i>Eubacterium sp. W416</i>	<i>Myoviridae</i>
<i>Eubacterium ruminantium AR35</i>	<i>Siphoviridae</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Myoviridae</i>
<i>Fusobacterium sp.</i>	<i>Myoviridae</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Myoviridae</i>
<i>Magnococcus eadii</i>	<i>Siphoviridae</i>
<i>Methanobrevibacter spp.</i>	<i>Caudovirales</i>
<i>Prevotella brevis</i>	<i>Siphoviridae</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Siphoviridae</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Siphoviridae</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Podoviridae</i>
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Inoviridae</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Siphoviridae</i>
<i>Streptococcus durans</i>	<i>Siphoviridae</i>
<i>Streptococcus intermedius AR36</i>	<i>Siphoviridae</i>

Sumber : Gilber and Klieve (2015)

2.2.5. Archea atau Metanogen

Keberadaan archea di dalam rumen sekitar 0,3-3,3 % dari total populasi mikroba. Archea yang ada di dalam rumen adalah metanogen anaerobic. Spesies metanogen dapat tumbuh dengan menggunakan H₂ sebagai sumber energi dan mereduksi CO₂ dan CH₄ dan beberapa spesies tumbuh dengan asetat sehingga secara efektof mengubah asetat menjadi CH₄ dan CO₂ (Janssen and Kirs., 2008). Awalnya mikroba penghasil gas metan digolongkan pada bakteri metanogenik, namun dengan perkembangannya ternyata metanogen tergolong kepada bakteri primitive atau disebut dengan archea (Soetanto, 2019).

Klasifikasi archea di dalam rumen terdiri dari 28 *genus* dengan 113 spesies, namun ditetapkan hanya ada 7 spesies yang diisolasi di dalam rumen menurut Janssen and Kirs (2008) yaitu :

1. *Methanobacterium formicum*
2. *Methanobacterium bryantii*
3. *Methanobrevibacter ruminantium*
4. *Methanobrevibacter millerae*
5. *Methanobrevibacter olleyae*
6. *Methanimicrobium mobile*
7. *Methanosaerina spp.*

2.3. Perkembangan Teknologi Molekuler Untuk Mempelajari Microbiome

Informasi keragaman mikroba rumen serta interaksi yang terjadi didalam rumen sangat terbatas. Hal tersebut disebabkan banyak faktor salah satunya yaitu sulitnya mengkultur mikroba rumen yang memiliki sifat anerobik. Identifikasi dan karakterisasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop hanya mampu membaca 15-20% dari total mikroba yang ada didalam rumen (Sari, 2017). Pendekatan konvensional dengan perhitungan bakteri melalui kultur dan menggunakan microskop electron membutuhkan waktu dan keahlian yang tinggi.

Perkembangan teknologi yang sangat pesat dalam mengkaji proses metabolism didalam tubuh ternak ruminansia menghasilkan pemahaman yang lebih rinci pada perkembangan ilmu ternak ruminansia. Beberapa decade terakhir dengan teknik isotop mampu merunut proses metabolism nutrisi di tingkat jaringan tubuh ternak, dan saat ini kemajuan teknologi di bidang molekuler memberikan pemahaman yang lebih rinci pada hasil analisis lintasan jalur metabolism suatu senyawa didalam tubuh ternak (Soetanto, 2019).

Pendekatan teknik molekuler mampu melakukan telaah peran mikroba didalam rumen pada tingkat DNA (gen). Teknik ini dirasa lebih unggul dalam mengidentifikasi mikroba karena teknologi molekuler memberikan informasi sekuensi genome pada berbagai spesies ternak sehingga dapat mempelajari lebih jauh tentang proses fisiologis ternak yang berkaitan dengan proses pencernaan di tingkat transkip gen (Connor, Baldwin and Li, 2009). Hasil tersebut dapat memberikan jawaban akan strategi formulasi pakan yang efisien sehingga dapat meningkatkan produktivitas ternak (Sari, 2017).

Beberapa hasil penelitian yang dilaporkan oleh Lima *et al* (2019) menunjukkan bahwa gen mikroba dalam rumen memberikan variasi substansial dalam penggunaan efisiensi pakan yang dihitung dengan RFI maupun FCR. Kategori FCR dan RFI dapat dicapai dengan

mengidentifikasi mikroba rumen agar mendapatkan tampilan sifat gen dari masing-masing mikroba. Penelitian menggunakan teknik DGGE dengan primer 16S rRNA pada 8 ekor sapi yang berikan perlakuan pakan hijauan hingga konsentrat tinggi dan terkena asidosis menunjukkan perbedaan pada populasi bakteri di dalam rumen. Pada perlakuan pakan dengan konsentrat tinggi dan terkena asidosis bakteri yang melimpah adalah *Atopobium*, *Desulfocurvus*, *Fervidicola*, *Lactobacillus* dan *Olsenella*, sedangkan pada saat transisi pakan normal spesies yang dominan adalah *Desulfocurvus*, *Lactobacillus* dan *Olsenella* kembali pada tingkat yang sama seperti pada ternak yang diberikan perlakuan biji-bijian, Namun *Sharpea* dan *Succinivibrio* kembali pada tingkat yang sama seperti pakan perlakuan hijauan. Hasil tersebut menunjukkan kelimpahan dan ragam bakteri di dalam rumen pada setiap individu dan pakan yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda (Petri *et al.*, 2013^a). Hal tersebut menunjukkan dengan adanya penggunaan teknologi molekuler peneliti memperoleh informasi yang lebih akurat dalam mengklarifikasi mikroba rumen.

2.3.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

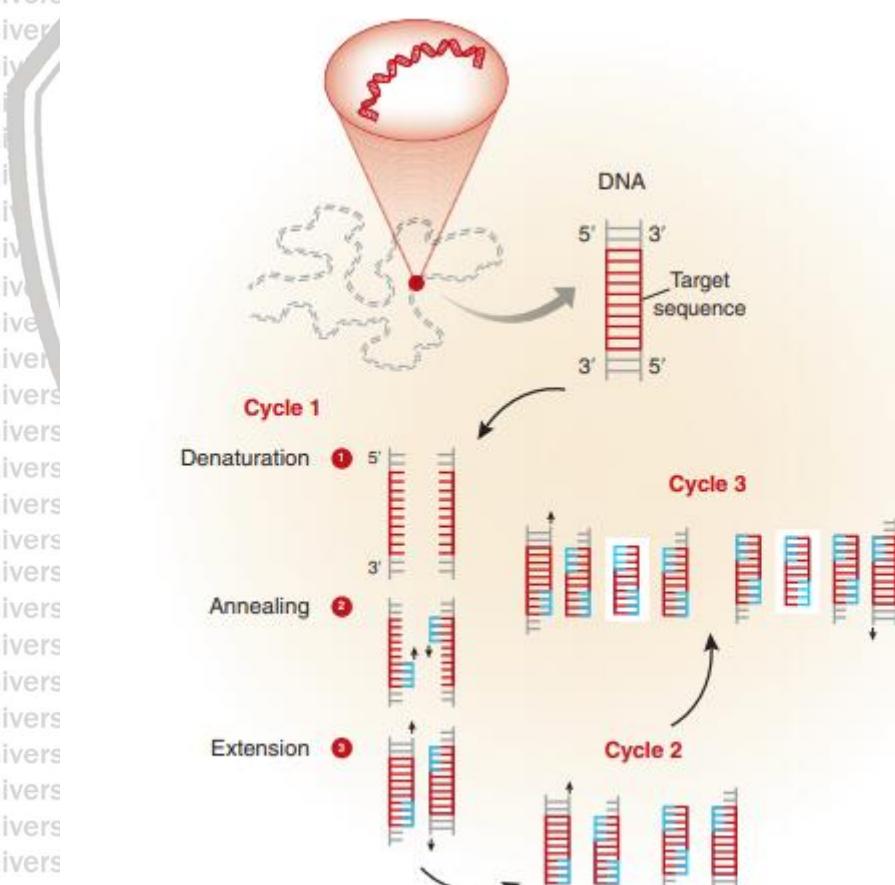
PCR adalah metode *in vitro* untuk amplifikasi (perbanyak) oligonukleotida (fragmen DNA spesifik) yang diarahkan secara enzimatik dengan primer (Fatchiyah dkk, 2009). Teknik ini mampu memperbanyak sebuah urutan 10^5 - 10^6 kali lipat (Seunguk, Valerie, Carl, Taewoo, Sung and Sungwoo, 2019). PCR melakukan amplifikasi secara cepat dari molekul DNA dan dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri, virus dan diagnosis gangguan genetik. Efisiensi PCR sangat tergantung pada integritas molekul DNanya. PCR dapat dilakukan dengan gabungan reaksi yang terdiri dari ekstrak DNA, Taq polimerase, primer dan Four deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) sebagai larutan buffer (Kadri, 2019). Dalam melakukan amplifikasi target gen yang diinginkan dipengaruhi oleh pemilihan primer. Primer yang dapat dipilih dalam melakukan identifikasi sel prokariotik adalah 16S rRNA (Wang *et al.*, 2008).

Tahapan untuk metode PCR yaitu denaturasi, annealing (penempelan) dan ektensi. Tahap denaturasi untai ganda DNA merupakan titik kritis pada proses PCR. Temperatur pada tahap ini berkisar antara 94°C selama 30 detik yang mengakibatkan pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal (single strand), kemudian tahap selanjutnya adalah annealing atau penempelan pada suhu 55°C selama 30 detik Penempelan ini merupakan penempelan oligonukleotida primer menempel pada cetakan DNA komplementer dengan sekuen primer (Fatchiyah dkk., 2009). Tahap terakhir adalah ektensi dengan suhu 72°C selama 1 menit adanya peningkatan suhu ini membentuk untai DNA baru yang disebut amplifikasi, waktu yang

dibutuhkan sangat tergantung ada panjang dan pendeknya ukuran DNA yang digunakan sebagai produk amplifikasi (Green and Sambrook, 2018). Adapun gambar dalam alat PCR dan proses PCR disajikan pada gambar 5 dan 6.



Sumber : dokumentasi pribadi di Institut Biosains UB
Gambar 5. Mini PCR (a) dan program running PCR dengan mini PCR (b)



Sumber: Garibyan and Avashia.2013

Gambar 6. Ilustrasi Tahapan proses PCR

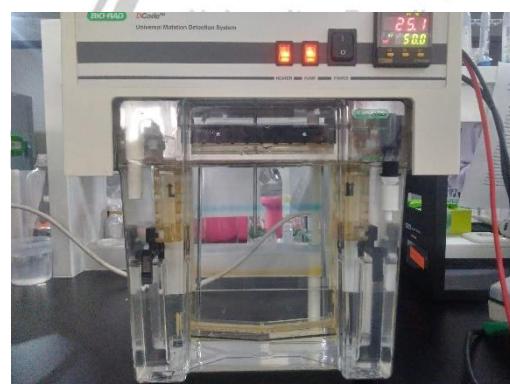
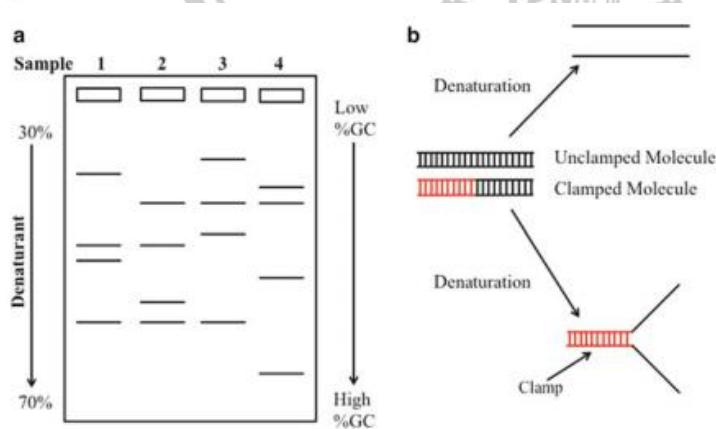
Keterangan : Proses amplifikasi mulai dari bentuk awal DNA

Produk PCR dapat dilihat menggunakan perwarnaan produk DNA yang diperkuat dengan bahan kimia seperti *ethidium bromide* (etbr) yang dilakukan gel agarose electrophoresis yang dapat menentukan keberadaan ukuran produk PCR (Garibyan *et al.*, 2013).

2.3.2 Denaturing Gradient gel electrophoresis (DGGE)

Denaturing gradient Electrophoresis (DGGE) adalah metode yang digunakan untuk mempelajari struktur komunitas bakteri tanpa membutuhkan proses kultivasi. Penggunaan metode ini untuk melihat keragaman dari mikroba dari hasil amplifikasi PCR (Lingyu *et al.*, 2015). Prinsip kerja dari DGGE adalah untuk memisahkan suatu fragmen DNA yang memiliki ukuran yang sama berdasarkan perbedaan konten GC ketika mengalami denaturasi. DGGE membutuhkan suatu denaturan bahan kimia seperti urea dan formamide. Metode ini mengandalkan gel poliakrylamide yang memiliki gradien linear denaturan untuk memisahkan fragmen DNA doublestranded berdasarkan urutan pasangan dasar DNA (Permata, Hirose dan Hidaka, 2008). DGGE dapat digunakan untuk mencirikan komunitas mikroba yang didapat dari gen fungsional meski dari lokasi terkontaminasi dari polutan lingkungan. DGGE dilakukan dengan kombinasi PCR untuk dapat menganalisis komunitas bakteri (Bharagava, Purchase, Sazena and Mulla, 2019).

Penggunaan primer dalam proses ini sangat penting, primer universal dapat dilakukan untuk mengetahui populasi dari bakteri (Wang *et al* 2008). Berdasarkan hasil yang dilakukan Fernando Purvis, Najar, Sukharikov, Krehbiel, Nagaraja, Roe and Desilva (2010) menyatakan bahwa terdapat perbedaan significant terhadap jenis bakteri yang diberikan pakan hijauan dan pakan sumber karbohidrat non serat (konsentrat).



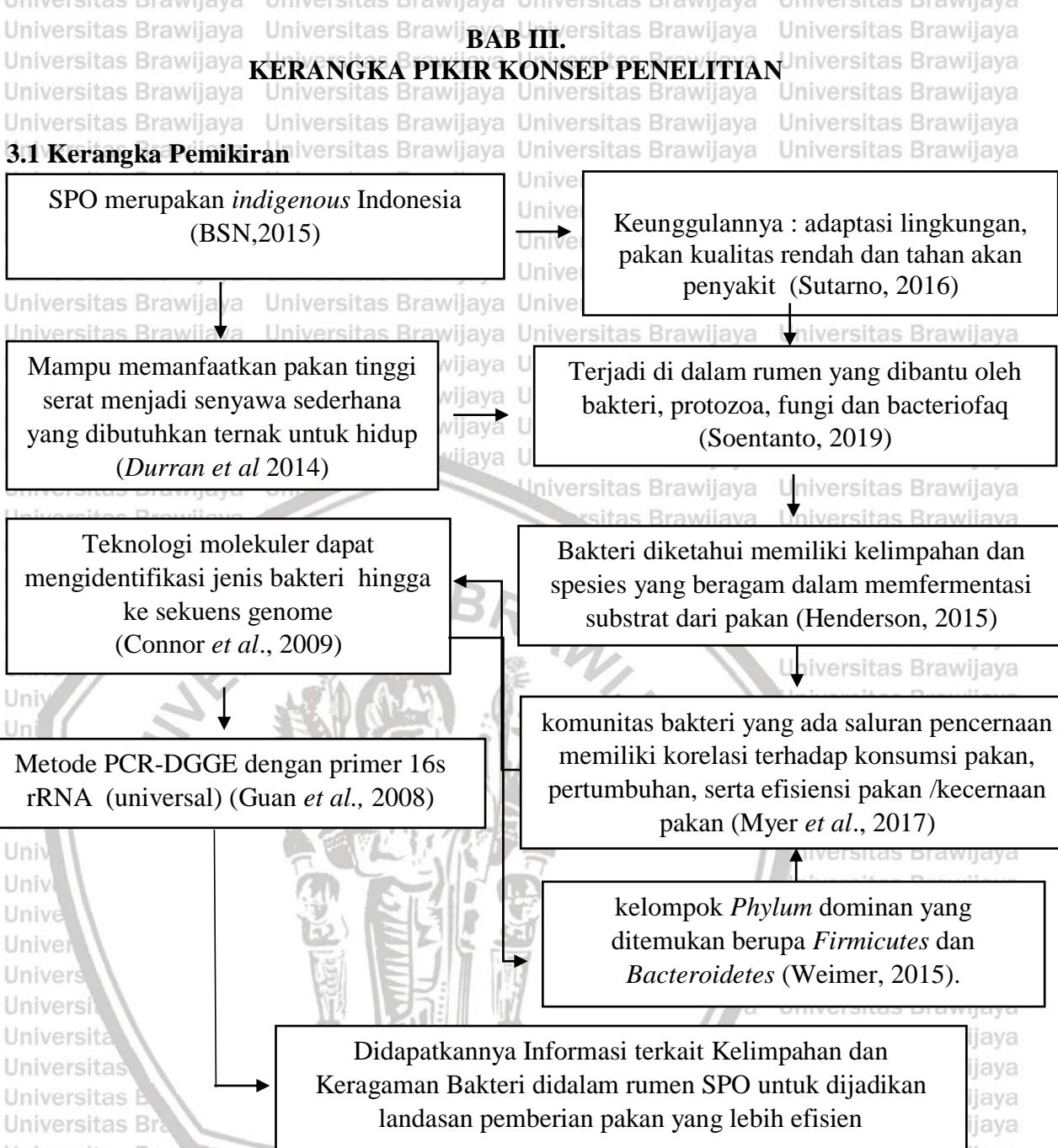
Sumber : Strathdee and free. 2013 dan dokumentasi pribadi di Institut Biosais-UB.

Gambar 7. Hasil visualiasi DGGE dan alat DGGE

Keterangan : a dan b adalah gambaran proses dari prinsip DGGE dan c adalah alat yang digunakan untuk DGGE

Pada gambar 7. Dijelaskan prinsip dari DGGE dengan gradient denaturan 30-70%. Suhu yang digunakan pada denaturasi (*melting point*) fragment DNA sangat dipengaruhi oleh perbandingan komponen GC dan AT. Apabila jumlah GC pada sekuen DNA tinggi maka semakin tinggi suhu yang dibutuhkan untuk mendenaturasi. Amplifikasi pada PCR-DGGE menggunakan primer yang mengandung GC rich sequence (GC-clamp) yang berfungsi sebagai clamp saat elektroforesis. Konsentrasi gradien denaturan sepanjang gel akrilamida berfungsi untuk menaikkan suhu denaturasi saat elektroforesis, ini yang akan menyebabkan amplikon hasil PCR-DGGE saat dielektroforesis pada gel bergradien denaturan akan berpisah berdasarkan urutan nukleotidanya. Teknik ini diharapkan mampu merepresentasikan komunitas bakteri (Strathdee *et al.*, 2013).





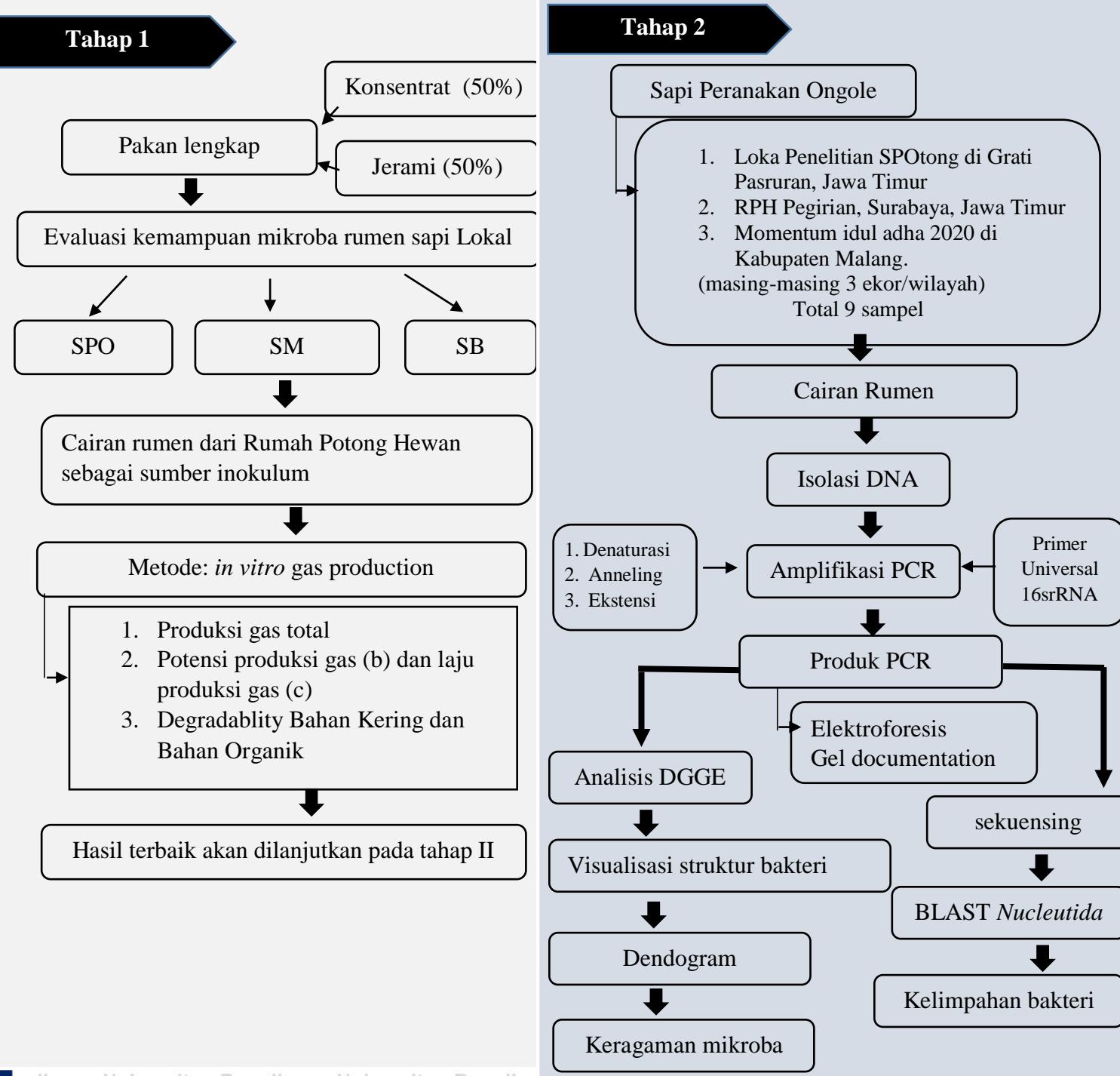
Gambar 8. Diagram Alir Kerangka Pikir Penelitian

Pentingnya menjaga sapi lokal agar tidak mengalami kepunahan menjadi prioritas utama salah satunya adalah SPO yang memiliki kemampuan dalam mengubah pakan berserat tinggi (kualitas rendah) menjadi senyawa yang dapat digunakan untuk hidup dan produksi. Hal tersebut sangat erat kaitannya dengan mikroba yang ada di dalam rumen (Durand *et al.*, 2014).

Mikroba tersebut terdiri dari bakteri, protozoa, fungi dan bacteriofaq, dan populasi tertinggi didominasi oleh bakteri (Soetanto, 2019). Kelimpahan dan keberagaman spesies bakteri sangat penting diketahui untuk mengefisiensikan pakan untuk produksi. Informasi terkait spesies bakteri pada SPO belum pernah dilakukan karena terbatasnya teknologi yang ada. Kemajuan

teknologi molekuler dalam bidang peternakan memberikan gambaran terhadap identifikasi mikroba hingga ke skuens genome (Connor *et al.*, 2009). Analisis keragaman bakteri dapat dilakukan dengan metode PCR-DGGE dengan menggunakan primer universal 16srRNA (Guan *et al.*, 2008). Analisis PCR-DGGE pada rumen SPO akan memberikan gambaran terkait kelimpahan dan keberagaman spesies sehingga dapat digunakan sebagai landasan pemberian pakan yang lebih efisien.





Gambar 9. Diagram Kerangka Operasional Penelitian

3.3. Hipotesis

Berdasarkan uraian kerangka pikir diatas maka hipotesis penelitian ini yaitu SPO memiliki kemampuan memfermentasi pakan lebih baik dibandingkan dengan SB dan SM serta kelimpahan dan keragaman mikroba rumen SPO yang dikoleksi dari berbagai lokasi akan menghasilkan *phylum* dominan yang berbeda.



BAB IV MATERI DAN METODE

Penelitian tentang kelimpahan dan keragaman mikroba didalam rumen SPO dilakukan melalui 2 tahap. Tahap pertama untuk mengetahui kemampuan mikroba rumen dalam mendegradasi pakan pada 3 bangsa sapi yaitu SPO, SM dan SB dengan perlakuan pakan lengkap. Penelitian ini dilakukan bersama dengan Mahasiswa S1 (Sarjana) yang bernama Shavira Putri Kushnerawety (165050107111144) dengan judul penelitian yaitu “Nilai Kecernaan dan Produksi Gas Pakan Lengkap dengan Menggunakan Cairan Rumen Sebagai Inokulum Dari Tiga Bangsa Sapi Lokal”. Hasil terbaik pada penelitian ini akan dilanjutkan pada tahap kedua. Tahap kedua dilakukan untuk mengetahui hubungan kelimpahan dan keragaman mikroba rumen SPO pada kemampuan mencerna pakan.

4.1 Penelitian Tahap Pertama

4.1.1. Lokasi Penelitian.

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 20 Januari hingga 7 Februari 2020. Pengambilan sampel cairan rumen dilakukan di Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian, Kota Surabaya. Uji kemampuan mencerna pakan dilakukan secara *in vitro* (produksi gas) dilaksanakan di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak UB, Malang. Identifikasi dan populasi protozoa dilakukan di LSIH dan Laboratorium Epidemiologi Fapet, UB Malang.

4.1.2. Materi penelitian

Materi penelitian ini terdiri dari pakan lengkap dan cairan rumen sebagai sumber inokulum dari SB, SM dan SPO yang dikoleksi dari Rumah Potong Hewan (RPH), Pegirian Kota Surabaya. Prosedur pengambilan cairan rumen disajikan pada Lampiran 4. Pakan lengkap berasal dari Lolit-SaPot di Jalan Pahlawan No. 2, Desa Klandungan, Kecamatan Grati, Kabupaten Pasuruan. Formulasi pakan yang diberikan terdiri dari jerami padi dan konsentrat dengan rasio (50:50). Kandungan nutrisi dari pakan lengkap disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Kandungan Nutrisi Pakan Lengkap

Kandungan Nutrisi	%
BK	90,09
BO	90,07
PK	13,36
SK	24,96
LK	5,40
TDN	52,09
NDF	55,05

Keterangan : Hasil analisis proksimat di Laboratorium Nutrisi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya (2020).

4.1.3. Metode Penelitian

1. Populasi Protozoa

Sampel yang digunakan berupa cairan rumen yang didapat dari RPH pegirian kota Surabaya. Sampel cairan rumen yang dikoleksi masing-masing diberikan larutan formalsaline 10% dengan perbandigan (1:6). Larutan formalsaline 1 liter diperoleh dari campuran 9 gram NaCl dengan penambahan larutan formaline 100 ml dan ditambahkan aquadest sehingga mencapai 1000 ml/1 liter.

Perhitungan populasi protozoa didalam rumen sapi lokal dilakukan di laboratorium Epidemiologi Fapet-UB. Jumlah sampel yang dianalisis yaitu 3 sampel terdiri dari SPO, SM dan SB. Peralatan yang digunakan berupa mikroskop cahaya (Nikon) dan Counting chamber. Counting chamber yang digunakan yaitu Sedgewick Rafter Counting chamber S52 dengan volume 1 ml. Ukuran chamber yang digunakan 50 mm x 20 mm x 1 mm dan didalamnya terdapat kotak-kotak berukuran 100 x 1mm. Alat ini dilengkapi penutup dengan ukuran 60 mm x 30 mm x 1 mm yang berfungsi untuk membatasi volume hingga tepat sebanyak 1 ml. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 10 x 20.

Dokumentasi jenis protozoa dominan dilakukan dengan bantuan mikroskop cahaya merek Nikon dengan bantuan aplikasi NIS elements D.440.000 64-bit. Identifikasi *genus* dominan dilakukan dengan mengamati kemiripan (kesamaan) gambar yang di peroleh dengan hasil Dehority, 1993.

2. Evaluasi kecernan pakan

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen karena melakukan percobaan dengan perlakuan yang dilakukan di Laboratorium. Evaluasi kemampuan mikroba dilakukan dengan metode Produksi Gas Secara *In Vitro*. Prosedur yang dilakukan sesuai dengan metode dari Makkar, Blummel and Becker (1995). Prosedur analisis disajikan pada Lampiran 5.

4.1.4. Parameter yang diukur

Parameter yang diukur dalam penelitian ini yaitu:

1. Total produksi gas, Nilai b (potensi produksi gas) dan nilai c (Laju produksi gas)

Total produksi gas diukur pada inkubasi selama 48 jam dengan pengamatan jam ke-0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 dan 48 jam. Pengukuran nilai b dan c menggunakan rumus (Orskov and McDonald, 1970) sebagai berikut:

$$Y = b(1 - e^{-ct})$$

Keterangan :

- Y = Produksi gas pada saat t (ml/500 mg BK)
- b = Potensi produksi gas (ml/500 mg BK) pada t
- c = Laju produksi gas (ml/jam)
- t = Waktu inkubasi (jam)
- e = Eksponensial

2. Nilai Energi Metabolis (ME)

Estimasi nilai ME mengikuti perhitungan dari Getachew *et al* (2002) dengan rumus :

$$ME = 1,06 + (0,157*GV) + (0,084*CP) + (0,22*CF) - 0,081*CA$$

Keterangan:

- Gas Volume (GV) = Produksi Gas selama 48 jam (ml/200 mg BK)
- Crude Protein (CP) = Protein kasar (% BK)
- Crude Fiber (CF) = Serat kasar (% BK)
- Crude Ash (CA) = Kandungan abu (% BK)

3. Degradasi Bahan Kering (DBK) dan Bahan Organik (DBO)

DBK dan DBO dianalisis menggunakan residu sampel setelah inkubasi 48 jam. Hasil residu dihitung dengan menggunakan rumus (Blummel, Steingass, dan Beaker, 1997) berikut:

$$\text{DBK} = \frac{\text{BK sampel} - (\text{BK Residu} - \text{BK Blangko})}{\text{BK sampel}} \times 100\%$$
$$\text{DBO} = \frac{\text{BO sampel} - (\text{BO Residu} - \text{BO Blangko})}{\text{BO sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

- DBK (%) = Degradasi Bahan Kering
- DBO (%) = Degradasi Bahan Organik
- BK sampel (g) = Berat sampel x %BK (g)
- BO sampel (g) = BK sampel x %BO (g)
- BK Residu (g) = Berat crucible dan residu (g) – berat crucible (g)
- BO residu (g) = BK residu (g) – berat crucible dan abu (g)
- BK blangko (g) = Berat crucible dan residu blangko (g) – berat crucible (g)
- BO blangko (g) = BK residu blangko (g) – berat crucible dan abu (g)

4. Jumlah Protozoa pada sapi lokal (/ml cairan ruman)

4.1.5 Analisis Data

Hasil data penelitian dihitung menggunakan program *Microsoft Excel* dan SPSS versi 16. Perhitungan statistic menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang apabila ada perbedaan secara signifikan maka dilanjutkan pada uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

4.2. Penelitian Tahap Kedua

4.2.1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 hingga Januari 2021. Koleksi sampel dilakukan di 3 lokasi yaitu Lolit SaPot Grati, Pasuruan, Rumah Potong Hewan (RPH) Pegiran, Surabaya dan beberapa tempat di Kabupaten Malang saat Idul adha 2020. Analisis kandungan serat digesta dilakukan di Laboratorium NMT Fapet-UB Malang. Analisis keragaman mikroba dilakukan di Institut Biosains UB, Malang.

4.2.2. Materi Penelitian

a. Analisi kandungan serat

Sampel yang digunakan untuk analisis kandungan serat disesuaikan dengan pengambilan sampel. Sampel yang dikoleksi dari ternak hidup berupa pakan yang diberikan pada ternak SPO

sebanyak 1 kg, sedangkan sampel yang diperoleh dari ternak yang sudah disembelih dilakukan pengambilan pada digesta yang diambil dari rumen sebanyak ± 800 gram. Keseluruhan sampel untuk analisis kandungan serat dimasukkan dalam oven 60°C dan dibiarkan selama 24 - 48 jam hingga kering, selanjutnya sampel ditimbang kembali untuk mengetahui nilai penyusutan setelah di oven selama 24 - 48 jam kemudian sampel di grinding untuk dengan ukuran 1 mm sehingga lebih homogen dan mengurangi ukuran partikel dan selanjutnya dianalisis sesuai prosedur pada Lampiran 2 dan 3.

b. Analisis DNA mikroba

Materi ini menggunakan DNA bakteri yang diperoleh dari proses ekstraksi/isolasi DNA cairan rumen SPO. Bahan yang digunakan untuk isolasi DNA adalah TIANamp Genomic DNA KIT produsen TIANGEN. Peralatan yang digunakan meliputi Termos, pH meter, Gelas ukur, plastik clip, sentrifuge, Waterbath, mesin PCR, Mikropipet (ukuran 10 µL, 100 µL dan 1000 µL), Vortex, Elektroforesis, Timbangan analitik, Tube PCR, *microtube* dan Tips berbagai ukuran serta seperangkat peralatan DDGE.

4.2.3. Metode Penelitian

Pemilihan lokasi pada pengambilan sampel dilakukan dengan sengaja (*purposive sampling*) dengan pertimbangan keberadaan SPO. Lokasi yang terpilih sebagai tempat koleksi sampel yaitu sebagai berikut :

1. Loka Penelitian Sapi Potong di Grati, Pasuruan Jawa Timur

Metode koleksi sampel menggunakan *stomach tube* yang dilakukan dengan memasukkan selang pada mulut sapi hingga rumen yang ditarik dengan sputit. Jumlah sampel yang dikoleksi yaitu 3 ekor. Penyaringan cairan rumen dilakukan dengan 2 lapis kain yang kemudian dimasukkan kedalam tube dengan ukuran 1,5 ml. Sampel yang telah dikoleksi segera dibekukan dengan penyiraman nitrogen cair, kemudian disimpan kedalam ice box dan segera dikirimkan ke Institut Biosains UB.

2. Rumah Potong Hewan di Pegirian, Surabaya Jawa Timur

Koleksi sampel diawali dengan melakukan seleksi karakteristik ternak meliputi : warna putih sedikit keabu-abuan, berpunuk dengan warna putih keabu-abuan, bergelambir dan wajah sedikit lebih pendek Koleksi sampel dilakukan pada ternak yang baru disembelih dengan merobek bagian rumen dengan Panjang ± 15-30 cm. Koleksi

sampel dilakukan dengan mengambil cairan rumen dan digesta sebanyak 1 termos (\pm 2 liter). Sampel tersebut segera dikirimkan ke Lab NMT dan dilakukan penyaringan dengan 2 lapisan kain. Sampel cairan rumen dimasukkan kedalam tube berukuran 1,5 ml dan disimpan dalam freezer dan dikirimkan ke Institut Biosains UB. Jumlah sampel yang dikoleksi yaitu 3 ekor.

3. Kabupaten/Kota Malang Jawa Timur saat Idul Adha 2020

Koleksi sampel dilakukan di 2 tempat yang berbeda. Koleksi 1 ekor SPO berasal dari Masjid Taqwallah, Junrejo, Pandesari Kec. Pujon Malang, sedangkan 2 ekor dikoleksi dari pondok pesantren Sabilurrosyad di dusun Gasek, Desa Karang Besuki, Kec. Sukun, Kab. Malang. Koleksi sampel dilakukan sama dengan pengambilan di RPH.

Total sampel yang dikoleksi yaitu 9 ekor. Sampel yang telah dikoleksi dan berlabel disimpan dalam suhu -20°C (Guan *et al.*, 2008), selanjutnya dianalisis pada tahapan isoalasi/ekstraksi DNA. Prosedur isolasi DNA disajikan pada Lampiran 6.

A. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA cairan rumen SPO menggunakan DNA KIT untuk mendapatkan sampel DNA dan mengikuti prosedur dari DNA kit (TIANamp Genomic produsen TIANGEN). Adapun prosedur yang dilakukan yaitu sampel di thawing dan dipindahkan sebanyak 500 μl atau 0,5 ml dan ditambahkan 100 μl larutan buffer lysis, divortek dan diinkubasi selama 1 jam (37°C) dan disentrifugasi 8.900 g (25°C selama 10 menit), selanjutnya supernatan ditambahkan larutan Phenol, Chlorofom dan Isoamyl alcohol (25: 24:1) dan di sentrifugasi 8.900 g (25°C selama 10 menit). DNA ditambahkan ethanol dingin dan di sentrifugasi 8.900 g (4°C selama 10 menit), ditambahkan 70% ethanol dan di sentrifugasi 8.900 g (4°C selama 10 menit) dan dikeringkan disuhu ruang kemudian ditambahkan buffer pH 6,7 sebanyak 50 μl . Untuk melihat kualitas dan kuantitas DNA dilakukan dengan Spectrophotometri UV-Vis (NanoDrop Technologis) dan elektroforesis dengan gel agarose 1,5%.

B. Amplifikasi DNA dengan Metode PCR-DGGE

Total DNA ekstraksi dari cairan rumen diencerkan hingga konsentrasi 50 ng/mL digunakan sebagai templat dalam semua reaksi PCR. Analisis PCR-DGGE dari total bakteri dilakukan dengan menggunakan Primer Universal 16SrRNA Forward HDA 1 (5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGG CAGCAG T-3') dan Reverse HDA 2 (5'- GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') (Guan *et al.*, 2008). Hasil PCR (sekitar 250 bp) diamplifikasi dengan kondisi *Pre-Denaturation* 94°C

selama 4 menit dan diulangi dengan 30 siklus dari *Denaturation* 94°C selama 30 detik, *Anneling* 56°C selama 30 detik, *Extention* 68°C selama 1 menit dan *Post Extention* 68°C selama 7 menit (Walter, 2000). Selanjutnya dilakukan identifikasi target dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5% dengan gel pewarna *Etidium Bromia* (EtBr) menggunakan tekanan 100 Volt selama 30 menit, dilihat dengan transiluminasi UV dengan alat gel documentation (Bio-Rad) dan di foto, selanjutnya produk PCR dilanjutkan dengan proses DGGE pada gel larutan 8% acrylamide dengan gel gradient 35-60% pada alat BIO-Rad Dcode Universal Mutation Detection system dengan tekanan 120 Volt selama 6 jam (Piwat and Teanpaisan, 2013). Pewarnaan menggunakan *Etidium Bromia* (etBr) yang selanjutnya divisualisasi dengan gel documentation (Bio-Rad). Hasil amplifikasi PCR dilanjutkan pada tahaoan pengurutan bsa DNA (sekuens) di laboratorium 1st Genetika Science Indonesia.

C. Analisis Kandungan Serat

Analisis kandungan serat kasar yang digunakan adalah *Acid Detergent Fiber* (ADF) dan *Neutral Detergent Fiber* (NDF) (Goering and Van Soest, 1970). Adapun prosedur disajikan pada Lampiran 2 dan 3.

4.2.4. Parameter yang diukur

Parameter yang diukur dalam penelitian ini yaitu :

1. Kuantitaif dan kualitatif DNA

Uji kuantitatif dan kualitatif isolasi DNA dilakukan dengan alat implem nanophotometer dan elektroforesis gel agarosa. nanophotometer merupakan salah satu alat yang mempunyai teknologi nano untuk melihat kemurnian DNA. DNA murni akan meyerap cahaya ultraviolet karena mengandung basa purin dan pirimidin. Pita ganda DNA akan meyerap cahaya UV pada 260 nm, sedangkan untuk kontaminan protein atau phenol akan meyerap cahaya UV pada 280 nm, sehingga nilai kemurnian DNA dapat diukur dengan membangi nilai penyerapan 260 nm dengan nilai penyerapan 280 nm. Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1.8-2.0. Adapun gambar alat nanophotometer disajikan pada gambar 10.



Sumber : Dokumentasi pribadi dari Institut Biosains -UB
Gambar 10. Nanophotometer

2. Hasil Amplifikasi dan Elektroforesis PCR dengan Primer 16SrRNA

Hasil amplifikasi gen DNA dengan primer 16srRNA dengan proses PCR yang dapat dilihat dari hasil visualisasi dari hasil elektroforesis dengan media gel agarosa 1% yang dilanjutkan dengan pewarnaan dengan *Ethidium Bomide* (EtBr). Pewarnaan ini digunakan untuk alat identifikasi dan mengukur semi-kualitatif fragmen DNA yang terseparasi dalam gel. EtBr ini akan terikat diantara dua untai ganda DNA sehingga pita DNA dalam sel agarosa akan berpendar, karena mengandung zat fluorescence.

3. Identifikasi kelimpahan mikroba 16SrRNA

Identifikasi kelimpahan mikroba yang dihasilkan dari hasil skuensing DNA yang dilanjutkan dengan di BLAST *nucleotida* secara online yang dapat diakses melalui (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

4. Keragaman Mikroba 16 sRNA

Keragaman profil Mikroba dilakukan dengan software PyElph versi 1.4 dengan tampilan filogenetik pada hasil Gel DGGE. Program ini menghitung berat molekul atau fragmen yang dianalisis, membandingkan pola DNA yang dihasilkan dari eksperimen dengan penanda genetic molekuler dan menghasilkan pohon filogeni yang dihitung dengan 5 metode pengelompokan.

4.2.5 Analisis Data

Analisis data hasil kandungan serat menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang dikelompokkan berdasarkan lokasi pengambilan sampel. Jika ada perbedaan signifikan dilanjutkan pada uji berjarak Duncan. Analisis pembacaan sekuen DNA menggunakan *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (*Nucleotide BLAST*) dan untuk menampilkan keragaman hasil profil DGGE dilakukan pembentukan filogenetik dengan software PyElph 1.4 dengan metode pengelompokan menggunakan Neighbor-Joining (NJ) dengan parameter Distance 2%.

5.1. Hasil penelitian Tahap I

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1.1. Karakteristik cairan rumen sapi lokal

Teknik *in vitro* produksi gas rutin digunakan untuk evaluasi nilai nutrisi pakan ternak ruminansia. Prasarat penggunaan cairan rumen dari ternak fistula saat ini dilarang oleh organisasi kesejahteraan ternak, sehingga alternatif yang digunakan oleh para ilmuwan menggunakan cairan rumen yang berasal dari rumah potong hewan. Lutakome *et al* (2017) menyatakan bahwa hasil yang diperoleh didukung publikasi terdahulu, menunjukkan data produksi gas untuk beberapa bahan pakan yang diinkubasi dengan cairan rumen dari rumah potong hewan juga merupakan pilihan yang layak untuk digunakan, sehingga peneliti menggunakan cairan rumen asal rumah potong hewan.

Karakteristik cairan rumen yang dikoleksi dari RPH pada ketiga sapi lokal disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Karakteristik cairan dan digesta rumen sapi lokal yang digunakan sebagai sumber inokulum

Parameter	SPO	SM	SB
Jumlah gigi tanggal (Buah)	4	6	6
Estimasi Umur ternak (Tahun)	2-3	3-4	3-4
Kandungan serat digesta (%)			
BK	25,05	16,44	18,44
NDF	$68,95 \pm 0,203$	$72,06 \pm 1,498$	$65,92 \pm 0,069$
ADF	$51,27 \pm 0,682$	$44,91 \pm 3,127$	$41,99 \pm 0,950$
Keadaan dalam rumen			
Suhu (°C)	40	39	39
pH	6,9	7,2	7,0
Protozoa (/ml cairan rumen)	$1,7 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
SD	4,86	5,25	2,63

Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 5, menunjukkan bahwa umur ternak yang dikoleksi berkisar antara 2-4 tahun. Umur ternak menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi proses degradasi didalam rumen karena terkait dengan keberadaan mikroba dominan. Guo *et al.*,

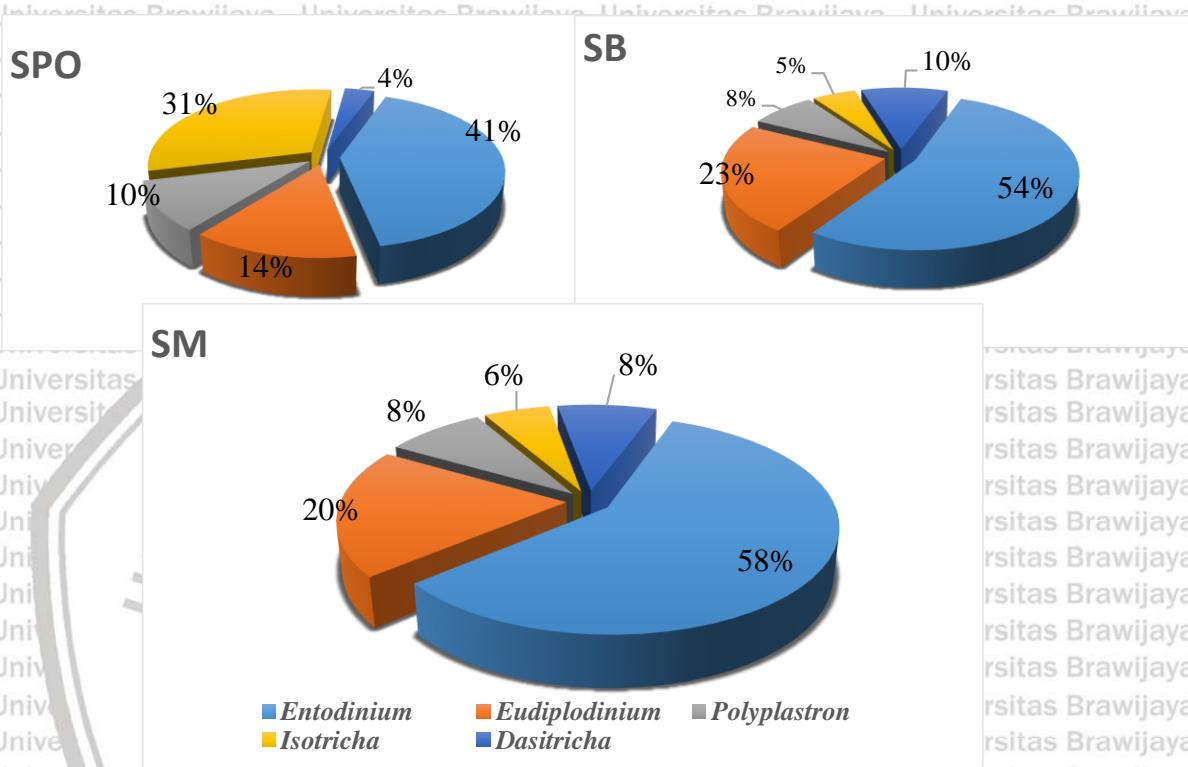
(2020) melaporkan bahwa kelompok mikroba bakteri dan *archaea* memiliki perubahan yang lebih sensitive pada perubahan umur ternak. Kelompok *archaea* akan stabil ketika ternak berumur 5 tahun, sedangkan pada kelompok bakteri, protozoa dan fungi akan stabil ketika ternak berumur 8 tahun. Hal tersebut juga dilaporkan oleh Rey *et al* (2013) menyatakan bahwa perubahan *Phylum* dominan didalam rumen sangat cepat mengalami perubahan, saat ternak baru lahir tidak akan menghasilkan amplicon, namun pada hari kedua komunitas bakteri yang dominan yaitu *Proteobacteria* (70%) dan *Bacteroidetes* (14%), sedangkan pada hari ke 12 gen dominan mengalami perubahan seperti *Bacteroides* (21%); *Prevotella* (11%), *Fusobacterium* (5%) dan *Streptococcus* (4%). Pada saat ternak lepas sapih tepatnya pada umur 83 hari *genus Prevotella* menjadi dominan dan banyak *genus* yang tidak terdeteksi lagi. Berdasarkan uraian diatas menunjukkan bahwa keadaan mikroba didalam rumen sangat dipengaruhi oleh umur dan pakan.

Jenis pakan yang dikonsumsi SPO tidak dapat teridentifikasi berdasarkan bahan baku karena pengambilan cairan rumen dilakukan di RPH dan momentum Idul Adha Tahun 2020. Berdasarkan permasalahan tersebut maka dilakukannya pendugaan kualitas pakan berdasarkan kandungan NDF dan ADF pada digesta. Pendugaan ini dilakukan untuk mengetahui pakan basal yang diberikan peternak. Hasil yang diperoleh pada Tabel 5. menunjukkan bahwa rataan nilai NDF yaitu $68,97 \pm 3,070$ % dan ADF $46,05 \pm 4,745$ % pada SPO. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pakan basal yang dominan diberikan berupa hijauan yang mengandung kandungan serat yang sangat tinggi dibandingkan dengan konsentrat. Pernyataan tersebut didukung oleh hasil (Ransa dkk, 2020) yang melaporkan kandungan NDF dan ADF dari jenis pakan basal seperti tebon jagung yaitu 69,81 dan 40,20%, Rumput raja yaitu 73,52 dan 44,49%, sedangkan untuk konsentrat yaitu 27,23 dan 14,39%. Pendugaan pakan basal hijauan juga didukung oleh hasil pH yang didapat. Berdasarkan nilai pH yang ditampilkan didalam rumen plasma nutfah memiliki kondisi yang ideal yaitu berkisar antara 6,9-7,2 sehingga tidak terjadinya proses acidosis didalam rumen. Asidosis terjadi karena pemberian konsentrat yang sangat tinggi didalam rumen sehingga dapat menurunkan pH rumen, ternak mengalami acidosis sub akut ditandai dengan pH didalam rumen 6,0 dan apabila asidosis akut pH didalam rumen dibawah 5,0 (Desnoyes *et al.*, 2008).

Keberadaan mikroba didalam rumen memiliki peran untuk memfermentasi pakan, selain bakteri protozoa juga berperan dalam mencerna serat dan menghidrolisis sel protein mikroba, hal tersebut tergantung pada *genus* tertentu didalam rumen. Populasi protozoa yang ditampilkan pada Tabel 5. Berkisar antara $1,2 - 1,7 \times 10^4$ / ml cairan rumen, hasil tersebut tidak berbeda

jauh dari hasil Purbowati (2016) populasi protozoa SPO yang di laporkan sebesar $7,8 \times 10^4$ ml cairan rumen, sedangkan untuk SB yang diberi pakan rumput gajah (15%), jerami padi (20%), gamal (25%), kaliandra (10%) dan konsentrat (30%) memiliki populasi sebesar $4,84 \times 10^4$ ml cairan rumen (Suryani, Mahardikas, Putra da Sujaya, 2015).

Identifikasi *genus* dominan pada sapi lokal disajikan pada Gambar 11.

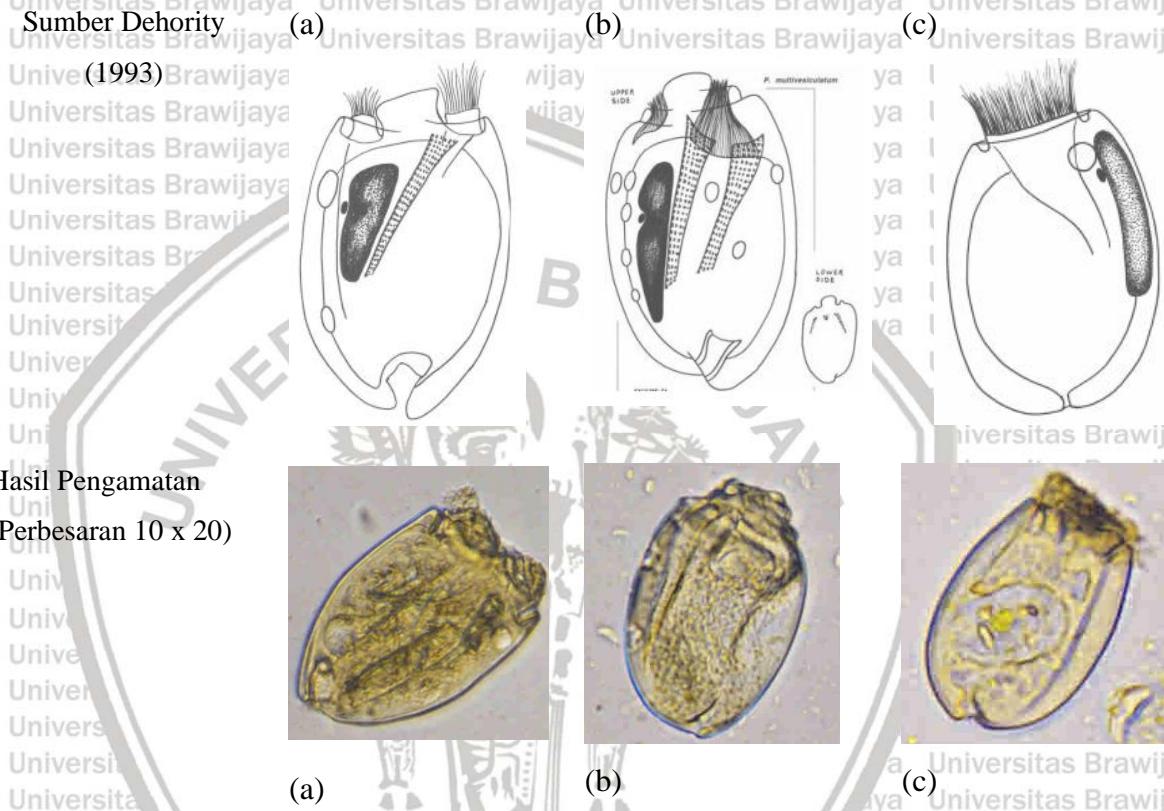


Gambar 11. Persentase *genus* protozoa didalam sapi lokal

Berdasarkan Gambar 11. Protozoa ditemukan dari kelompok Oligotricha yaitu *genus Eudiplodinium*, *Polyplastron* dan *Entodinium*. Populasi kelompok Oligotricha secara berurut dari tertinggi yaitu SM (86%); SB (85%) dan SPO (65%). Kelompok Oligotricha ini memiliki peran menghidrolisis dan fermentasi selulosa (Yanez-Ruiz *et al.*, 2004). Fondevila dan Dehority (2001) melaporkan bahwa *genus Polyplastron* dan *Eudiplodinium* berperan dalam mencerna selulosa dan xilan, namun keberadaanya merugikan ternak karena mendegradasi sel protein bakteri (*turnover*) dan menurunkan penyerapan protein oleh ternak inang (Newbold *et al.*, 2015). Ivan *et al* (2000) melaporkan bahwa keberadaan *Entodinium* dalam rumen dapat menurunkan suplementasi protein bypass sebesar 18%. Populasi *genus Entodinium* tertinggi didapat dari SM sebesar 58% dan SB 54% sehingga akan berpengaruh pada populasi bakteri dan kemampuan memfermentasi pakan dalam rumen.

Kelompok Holotricha yang teridentifikasi yaitu *Dasytricha* dan *Isotricha* dengan urutan populasi tertinggi yaitu dari SPO (35%; SB (15%) dan SM (14%). Keberadaannya *Genus Isotricha* mampu menekan degradasi protein didalam rumen sehingga dapat meningkatkan suplementasi by pass kedalam abomasum (Ivan *et al*, 2000), sedangkan keberadaan *genus Dasytricha* merupakan protozoa yang tidak memiliki aktifitas degradasi serat kasar dan keberadaannya sangat sedikit (diabaikan) (Newbold, 2015). Adapun hasil pengamatan terhadap *genus* protozoa disajikan pada Gambar 12.

Sumber Dehority



Hasil Pengamatan
(Perbesaran 10 x 20)

Keterangan : *Eudiplodinium* (a); *Polyplaston* (b); *Entodinium* (c)

Gambar 12. *Genus* Protozoa didalam sapi lokal

Ukuran tubuh kelompok *genus* Oligotricha yang ada pada Gambar 12. sangat beragam yaitu *Genus Eudiplodinium* memiliki rataan panjang $122,72 \pm 11.657 \mu\text{m}$ dengan lebar $76.61 \pm 4.380 \mu\text{m}$, *Genus Entodinium* memiliki rataan panjang $64,82 \pm 19,1983 \mu\text{m}$ dengan lebar $40,86 \pm 10,547 \mu\text{m}$, dan *Genus Polyplastron* memiliki rataan panjang $96,03 \pm 3,648 \mu\text{m}$ dengan lebar $60,04 \pm 1,919 \mu\text{m}$. Berdasarkan informasi *genus* diatas menunjukkan hasil ukuran yang dihasilkan sesuai dengan range yang dilaporkan oleh Dehority (1993; 2003) yang melaporkan bahwa *Eudiplodinium maggi* memiliki range panjang 115-212 μm dengan lebar 73-143 μm (Dehority, 1993), sedangkan pada *Genus Entodinium* memiliki range panjang 55-114 μm

dengan lebar 37-78 μm dan untuk *Genus Polyplastron* memiliki range panjang 120-190 μm dengan lebar 78-140 μm .

5.1.2. Evaluasi kemampuan mikroba rumen dalam degradasi pakan lengkap

Evaluasi kemampuan mikroba rumen bangsa sapi lokal dalam mendegradasi pakan lengkap dapat dilihat dari hasil analisis dengan metode produksi gas secara *in vitro*. Hasil analisis produksi gas secara *in vitro* pada pakan lengkap dengan sumber inokulum dari 3 bangsa sapi lokal disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Rangkuman hasil analisis menggunakan metode *In vitro* pada pakan lengkap.

Parameter	SPO	SM	SB
Rataan total produksi gas (ml/500 mgBK)	116,79 \pm 7,828	99,35 \pm 2,531	100,74 \pm 0,916
Nilai b (ml/500mgBK)	115,85 \pm 6,577	105,98 \pm 4,839	110,97 \pm 0,167
Nilai c (ml/Jam)	0,10 \pm 0,010 ^b	0,05 \pm 0,001 ^a	0,05 \pm 0,001 ^a
ME (MJ/Kg BK)	12,60 \pm 0,570 ^b	10,48 \pm 0,342 ^a	10,83 \pm 0,095 ^a
Degradasi BK (%)	50,80 \pm 3,396	33,46 \pm 5,488	42,85 \pm 0,806
Degradasi BO (%)	55,58 \pm 2,346 ^b	40,32 \pm 4,336 ^a	41,46 \pm 0,965 ^a

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$) ; Nilai b (Potensi gas) dan nilai c (laju produksi gas).

Hasil yang tampilan pada Tabel 6. pada nilai c, estimasi nilai ME dan Degradasi BO pada perbedaan sumber inokulum menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0,05$). Berdasarkan parameter hasil analisis secara *in vitro* menunjukkan sumber inokulum SPO memiliki nilai tertinggi yang disusul oleh SM dan SB.

Produksi gas nilai b dan nilai c yang ditampilkan dalam Tabel 6. Menggambarkan bahwa SPO memiliki kemampuan mendegradasi bahan organik dalam pakan lengkap yang lebih baik dibandingkan dengan sapi lainnya. Nilai ME menunjukkan kandungan energi dalam pakan yang dapat dimanfaatkan oleh ternak (Getachew *et al.*, 2002). Degradasi BK dan BO yang dihasilkan menunjukkan kemampuan mikroba dalam mencerna BK dan BO. Produk degradasi pakan di dalam rumen akan menghasilkan sumber energi, protein dan vitamin yang dapat dimanfaatkan oleh ternak inang (Creevey *et al.*, 2011). Hasil degradasi didalam rumen dapat ditunjukkan dengan VFA, namun dalam penelitian ini tidak dapat ditampilkan sehingga menggunakan studi literatur. VFA sebagian besar terdiri dari asam asetat, asam butirat dan asam propionat yang mempengaruhi tinggi rendahnya produksi ternak. Hasil penelitian yang

dilakukan Umar, Arifin dan Purnomoadi (2011) dengan pemberian pakan rumput napier dan konsentrat (30:70) pada SM menghasilkan rataan 54,61 mmol asam asetat; 29,49 mmol asam propionat dan 18,30 mmol asam butirat, sedangkan pada SPO menghasilkan rataan 60,17 mmol asam asetat; 35,54 mmol asam propionat dan 20,00 mmol asam butirat, sedangkan SB yang diberikan pakan berupa king grass dan konsentrat (58,2 : 41,8) menghasilkan 73,29 mmol asam asetat; 16,01 mmol asam propionat dan 10,70 mmol Asam Butirat (Suryani, Suarna, Mahardika dan Sarini, 2020). Hasil tersebut menunjukkan bahwa dari pemberian pakan yang sama menunjukkan SPO memiliki hasil fermentasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan SM, sedangkan pada pemberian pakan yang berbeda menunjukkan SB memiliki nilai tertinggi pada asam asetat namun pada asam propionate dan asam butirat nilai tertinggi berasal dari SPO. Asam propionat pada sapi perah menjadi prekursor produksi susu (Urrutia and Harvanyine, 2017), sedangkan pada SPO menjadi precursor pembentukan jaringan adiposa dan otot sehingga menentukan tinggi rendahnya PBB ternak (Wattiaux and Armentano, 1998). Pernyataan diatas menunjukkan bahwa SPO selain memiliki kemampuan mendegradasi pakan dan menghasilkan produk fermentasi berupa propionat yang lebih tinggi dibandingkan dengan sapi lokal lainnya. Pernyataan tersebut juga dapat dilihat dari studi literatur tentang efisiensi pakan yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya.

Respon pertumbuhan yang dilaporkan dari beberapa peneliti terhadap konversi pakan pada sapi lokal menunjukkan bahwa SPO memiliki konversi pakan yang rendah. Aditia, Priyanto, Baihaqi, Putra dan Ismail (2013) menambahkan bahwa SPO memiliki respon pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan SB pada pemberian pakan berbasis silase sorgum dan konsentrat (73:23). Hal tersebut berdasarkan pada nilai konversi pakan yaitu $14,587 \pm 0,78$ pada SB dan $9,064 \pm 0,81$ pada SPO. Nusi, utomo dan Soeparno (2011) juga menambahkan nilai konversi pakan SPO yang diberikan pakan basal rumput gajah dengan penambahan konsentrat (P1) dan pemberian pakan basal tongkol jagung dalam bentuk pakan lengkap (P2) dan Pakan lengkap displementasi UDP (P3) menghasilkan nilai konversi pakan secara urut yaitu 11,79; 9,58 dan 9,62, sedangkan pada SM yang diberikan pakan basal berupa rumput gajah, rumput lapang dan Jerami kacang tanah (P1) dan pakan basal + bungkil kelapa (P2) memiliki konversi pakan secara berurutan yaitu 10,41 dan 8,88. Hasil yang tersebut menggambarkan bahwa SPO memiliki konversi pakan yang rendah dan efisiensi pakan yang lebih baik dibandingkan dengan sapi lokal lainnya, hal tersebut di jelaskan oleh Sutarno *et al* (2016^b) yang menyatakan bahwa SPO memiliki toleransi yang baik dalam kualitas pakan di Indonesia.

5.2. Hasil Penelitian Tahap II

5.2.1 Karakteristik Sampel Sapi Peranakan Ongole (SPO)

SPO yang digunakan memiliki kisaran umur antara ≥ 1 Tahun hingga 3 tahun yang diamati dari gigi tanggal ternak dan catatan recording oleh peternak. Kelompok SPO yang dari Lolit-SaPot berkisar antara 14-22 bulan (berdasarkan cacatan recording), kelompok dari RPH berkisar antara 1-2 tahun yang dilihat dari gigi tanggal ternak dengan rataan gigi tanggal berjumlah 2 buah, sedangkan kelompok SPO di Kabupaten Malang berkisar antara 1-3 tahun yang dilihat dari jumlah gigi tanggal yaitu 2-4 buah. Jenis kelamin SPO yang dikoleksi adalah jantan.

Pakan yang diberikan pada kelompok SPO dari Lolit-SaPot berupa jerami padi dan konsentrat dengan formulasi 50:50. Adapun bahan penyusun konsentrat adalah DDGS, Pollard, Bungkil kelapa, Bungkil sawit, Urea dan Tepung gapplek, sedangkan untuk pakan yang diberikan pada kedua kelompok lainnya tidak dapat diidentifikasi, namun kualitas pakan dapat diduga dengan analisis kandungan serat seperti ADF dan NDF pada digesta didalam rumen. Adapun hasil identifikasi kandungan serat pada sampel yang dikoleksi disajikan dalam Tabel 7.

Tabel 7. Kandungan Serat pada sampel pakan dan digesta SPO.

Keterangan Sampel	NDF (%)	ADF (%)
Lolit Grati di Pasuruan	$55,05 \pm 0,675^a$	$41,46 \pm 0,938$
RPH di Pegiran	$68,95 \pm 0,203^b$	$51,27 \pm 0,682$
Kabupaten Malang	$68,34 \pm 3,416^b$	$49,02 \pm 6,749$
Rataan	$61,84 \pm 6,650$	$41,18 \pm 7,979$

a-b menunjukkan berbeda sangat nyata ($P<0,01$)

keterangan : Hasil yang disajikan adalah nilai rataan dari setiap kelompok lokasi.

Hasil analisis kandungan serat yang ditampilkan pada Tabel 7. menunjukkan bahwa pakan yang diberikan memiliki kandungan serat yang tinggi ($NDF >60\%$). Kandungan serat pada pakan yang didapat dari Lolit memiliki kandungan NDF dan ADF terendah yaitu 55,05% dan 41,46%, sedangkan dikedua lokasi lainnya memiliki nilai kandungan NDF dan ADF yang tinggi yaitu 68,34% dan 49,02% di Kabupaten Malang, dan di RPH pegiran memiliki nilai 68,95% dan 51,27%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa koleksi sampel dari lokasi berbeda memiliki pengaruh yang sangat nyata ($P<0,01$) pada kandungan NDF. NDF merupakan nutrisi pakan yang tidak larut dalam detergent netral dan mengandung hemiselulosa, selulosa dan lignin

(Jaemes, Giraldo and Correa, 2019). NDF merupakan senyawa penyusun dinding sel tanaman. Berdasarkan uraian tersebut sampel digesta yang dikoleksi dari RPH dan Kabupaten Malang saat Idul Adha menunjukkan pemberian pakan basal berupa hijauan, hal tersebut sangat umum terjadi dilapang, karena saat ternak akan disembelih peternak akan memberikan sedikit atau tidak sama sekali pakan konsentrat. Pemberian jenis pakan akan berpengaruh pada keberadaan microbiota didalam rumen. Menurut Petri, Shwaiger, Penner *et al* (2013^b) dengan pemetaan microbiome didalam rumen berdasarkan jenis pakan, apabila pakan yang diberikan tinggi akan hijauan maka *phylum* yang melimpah adalah *Bacteroidetes* dan *Firmicutes*, sedangkan apabila tinggi biji-bijian maka *Phylum Proteobacteria* akan melimpah.

5.2.2 Uji Kualitatif DNA

Tahap awal sebelum melakukan PCR adalah isolasi DNA. Tahapan ini memberikan penilaian terhadap kualitas DNA dan berperan dalam keberhasilan dari program PCR. Tahapan dalam isolasi ini terdiri dari pembuatan sel lisis bakteri, pengikatan DNA bakteri dan Elusi DNA. Pada pembuatan sel lisis adanya penambahan Proteinase K yang berfungsi untuk melisikkan sel atau jaringan, sedangkan R Nase berfungsi untuk mendegradasi keberadaan DNA dalam sampel dan meminimalkan kontaminan, selanjutnya adalah tahapan mengikat DNA, DNA akan berikatan dengan silika dan elusi DNA yang merupakan proses ekstraksi DNA dari keadaan padat dan penambahan buffer elusi. Hasil analisis kemurnian DNA ditampilkan pada Tabel 8.

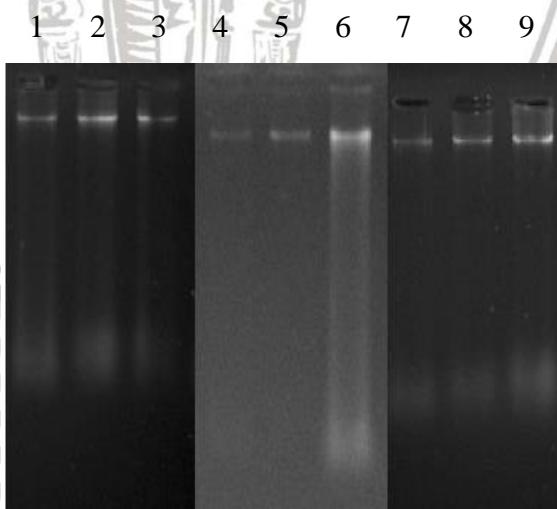
Tabel 8. Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil Isolasi

Lokasi sampel	Kode Ternak	Kemurnian DNA
Lolit Penelitian SPOtong di Grati, Pasuruan	Sapi 1	1,81
RPH Pegirian, Surabaya	Sapi 2	1,68
Idul Adha 2020, di Kabupaten Malang.	Sapi 3	1,76
	Sapi 4	1,84
	Sapi 5	1,80
	Sapi 6	1,91
	Sapi 7	1,87
	Sapi 8	1,86
	Sapi 9	1,85

Nilai Kemurnian DNA yang baik berkisar antara 1,8 – 2,00 (Fatchiyah dkk., 2009). Nilai rataan kemurnian DNA yang didapatkan yaitu $1,82 \pm 0,068$ hal ini menunjukkan bahwa hasil isolasi tersebut secara keseluruhan sudah masuk dalam kriteria kemurnian DNA yang baik, meskipun ada satu sampel dari Lolit Penelitian SPOtong dari Grati, Pasuruan yang memiliki kemurnian DNA dibawah kriteria yang baik. Beberapa faktor yang mempengaruhi kemurnian DNA yaitu kualitas sampel dan kontaminan saat melakukan ekstraksi DNA. Kualitas sampel pada sapi 2 kemungkinan terjadi kontaminasi dengan cairan saliva didalam rumen yang disebabkan oleh metode koleksi sampel, hal lain disebabkan karena adanya kontaminan berupa fenol dan pelarut isolasi DNA. Hal tersebut di jelaskan oleh Matlocl (2005) yang menyatakan bahwa apabila nilai kurang dari 1,8 maka DNA tersebut masih mengandung Fenol Guanidin dan Reagen lainnya dalam pelarut isolasi DNA, serta dapat disebabkan oleh nilai rasio yang tidak akurat karena konsentrasi dari asam nukleat rendah (<10 ng/ μ l) sedangkan apabila nilai kemurniannya diatas 2,00 maka isolat DNA masih mengandung kontaminan seperti protein dan komponen lainnya yang diakibatkan dari proses lisis yang tidak sempurna.

5.2.3 Uji Kuantitatif DNA

Kualitas DNA dari 9 sampel cairan rumen SPO dapat diketahui dengan melakukan uji kualitatif dengan elektroforesis gel agarose 1%. Hasil yang diperoleh dari 9 sampel DNA disajikan pada Gambar 13.



Gambar 13. Hasil Visualisasi DNA

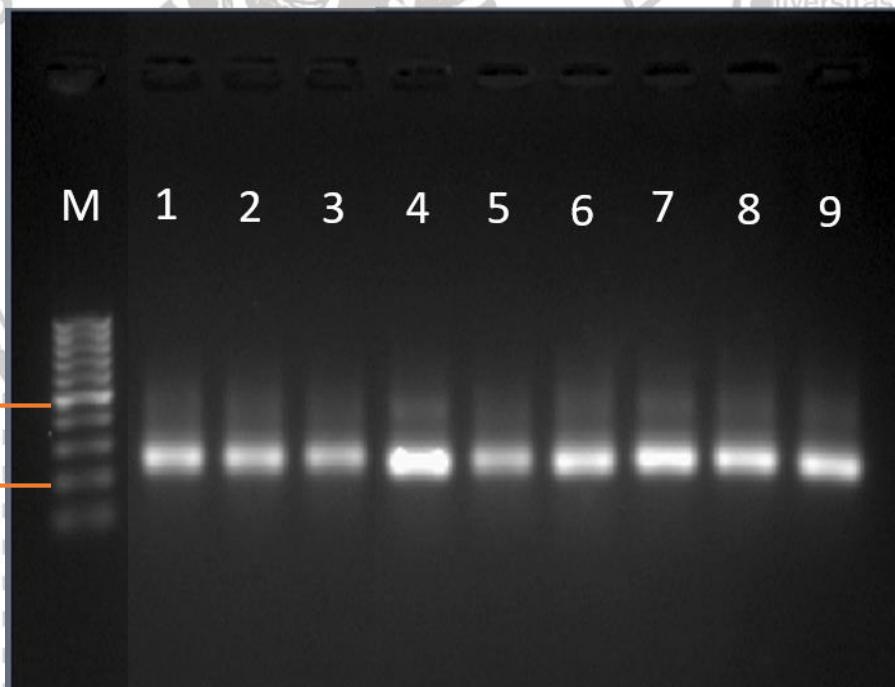
Ket: Sampel berasal dari Loka Penelitian di Grati (1-3); Rumah Potong Hewan, Pegiran (4-6) dan Kab. Kota Malang (7-9).

Hasil visualisasi menunjukkan isolasi DNA yang dilakukan telah berhasil, hal tersebut terlihat pada fragmen DNA yang tampak pada gel. Fragmen DNA yang memiliki pita terang

dan tebal terdapat pada aksesi pohon nomor 2, 3, 6, 8 dan 9 sedangkan yang menunjukkan pita terang dan tipis nomor 1, 4, 5, dan 7. Pita DNA yang tebal dan mengumpul menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung (Harahap, 2017). Penyebab putusnya ikatan tersebut dari gerakan fisik yang berlebihan saat pemipatan, spindwon saat di ependorf, disentrifus dan juga arena temperatur yang tinggi.

5.2.4 Amplifikasi dan Elektroforesis PCR dengan Primer 16SrRNA

Hasil amplifikasi DNA dapat dilihat dari tampilan visualisasi dengan melakukan elektroforesis dengan gel agarosa dalam buffer sodium asam borat dan pewarna etidium bromida. Ukuran panjang DNA hasil PCR dibandingkan dengan penanda (*marker/ladder*) untuk mengetahui panjang DNA sampel. Hasil amplifikasi lokus 16SrRNA yang berhasil di amplifikasi pada 9 sampel dari cairan rumen SPO dengan menggunakan marker/ladder dengan panjang DNA berkisar antara 100-1000 bp disajikan pada Gambar 14. Hasil amplifikasi ini merupakan pita DNA.



Gambar 14. Hasil Amplifikasi PCR DNA dengan primer 16s rRNA

Keterangan : M =Marker (100bp)

Sampel berasal dari Loka Penelitian di Grati (1-3); Rumah Potong Hewan, Pegiran (4-6) dan Kab. Kota Malang (7-9).

Hasil yang ditunjukkan pada Gambar 14. menunjukkan bahwa proses amplifikasi DNA dari proses PCR berhasil, hal ini ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang muncul saat visualisasi.

Hasil produk PCR ini memiliki panjang pita DNA yang berkisar antara 200 bp-300 bp, hasil ini sesuai dengan pernyataan Guan *et al.*, (2008) yang menyatakan bahwa produk PCR dari metode PCR-DGGE yang dilakukan pada sampel cairan rumen dengan marker 16SrRNA adalah 200bp.

Hasil visualisasi yang di tampilkan dari Gambar 14. menunjukkan adanya perbedaan ketebalan dari DNA yang dihasilkan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya perbedaan konsentrasi DNA dan hasil amplifikasi seperti yang dilaporkan oleh Sambrook dan Russel (2001) dalam penelitiannya yang menyimpulkan bahwa perbedaan ketebalan di dalam hasil visualisasi PCR disebabkan karena adanya perbedaan konsentrasi DNA hasil ekstraksi dan hasil amplifikasi. Hasil amplifikasi sangat tergantung pada proses *anneling* (penempelan). Menurut Fatciyah dkk (2009) Program proses PCR yang umum dilakukan pada tahap *anneling* membutuhkan suhu antara 55-56⁰ C dengan waktu 30 detik, Program tersebut sesuai dengan program PCR yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu tahap *Anneling* menggunakan suhu 56⁰C selama 30 detik. Adanya perbedaan kisaran suhu ini sangat mempengaruhi hasil amplifikasi DNA, karena menurut Pertiri, Mahardika dan Watiniyah (2015) mengatakan bahwa temperatur dalam *anneling* tidak boleh terlalu tinggi atau terlalu rendah karena apabila terlalu tinggi primer tidak dapat menempel dengan sempurna pada DNA template namun apabila terlalu rendah maka primer akan menempel pada situs penempelan yang tidak spesifik sehingga adanya penempelan lokus yang tidak sesuai target. Dengan demikian penentuan program PCR yang dilakukan harus disesuaikan dengan metode dan primer yang digunakan.

5.2.5. Sekuensing DNA Bakteri

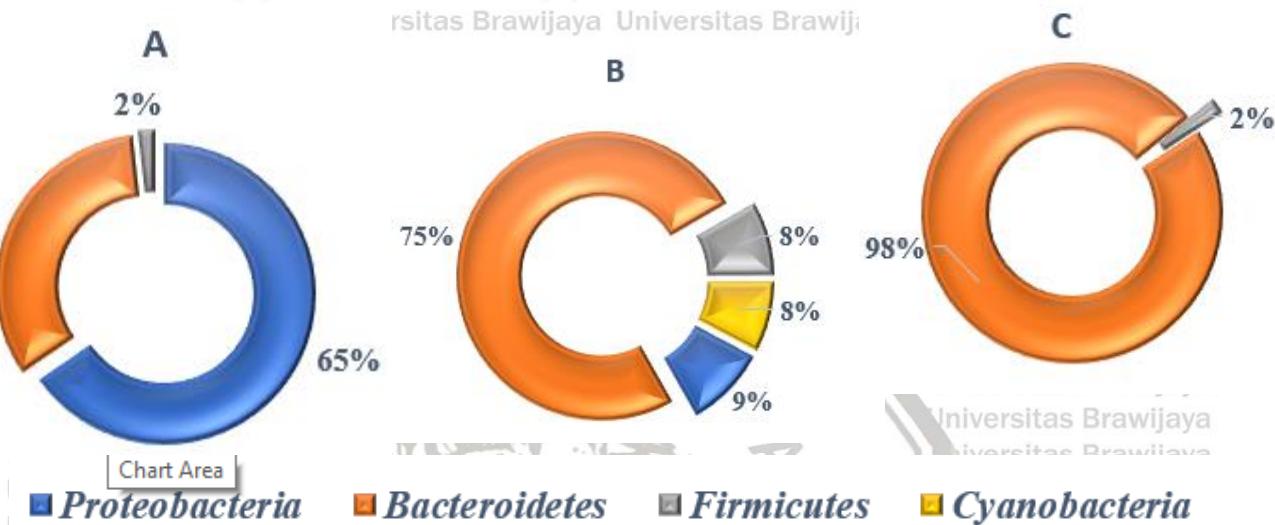
Sekuensing DNA adalah metode untuk menentukan urutan nukleotida basa Adenin (A), Guanin (G), Sitosin (C) dan Timin (T) didalam molekul DNA. Metode ini pertama kali ditemukan pada tahun 1970 dengan menggunakan 2 dimensi kromatografi. Sekuensing DNA merupakan teknik yang akurat untuk kemajuan ilmiah dalam mendiagnosa medis, forensik, sistematika dan genomic (Munshi, 2012). Perbedaan hasil sekuensing DNA pada beberapa peneliti dipengaruhi oleh primer. Penggunaan primer sangat penting dalam mengimplementasikan hasil sekuensing DNA, karena sekuensing DNA didapat dari produk PCR. Primer digunakan untuk membatasi gen sehingga mendapatkan gen target yang diinginkan. Penelitian ini menggunakan primer 16 S RNA yang artinya sifatnya tidak spesifik, namun melingkupi seluruh gen prokariotik (Bakteri). Hasil sekuensing DNA bakteri didalam rumen SPO disajikan pada lampiran 12.



5.2.6. Identifikasi Phylum Bakteri di dalam kelompok SPO.

Informasi hubungan pakan dengan kelimpahan dan keragaman mikroba rumen sangat pentin untuk dikaji. Kelimpaha dan keragaman bakteri menjadi focus utama yang diteliti oleh para ilmuwan karena keberadaanya tertinggi dibandingkan dengan mikroba lainnya (Weimer, 2015).

Hasil Identifikasi dari kelimpahan dan keragaman dari masing-masing kelompok SPO disajikan pada Gambar 15.



Gambar 15. % Phylum Bakteri di dalam rumen SPO pada masing-masing lokasi

Keterangan : A : Lokasi pengambilan sampel di Lolit SaPot, Grati, Pasuruan

B : Lokasi pengambilan sampel di RPH, Pegiran, Surabaya

C : Lokasi pengambilan sampel di Kabupaten Malang

Hasil yang di sajikan pada Gambar 15 menunjukkan bahwa keragaman Phylum yang teridentifikasi di dalam rumen SPO memiliki persentase yang berbeda beda disetiap lokasi.

Lokasi Lolit-Sapot menunjukkan Phylum dominan utama ialah *Proteobacteria* yang diikuti dengan *Bacteroidetes* dan *Firmicutes*. Melimpahnya Phylum *Proteobacteria* di dalam saluran pencernaan sering dikaitkan dengan tingginya pemberian konsentrat. Hasil yang dilaporkan Fernando *et al* (2010) pada rasio pemberian pakan konsentrat berkisar antara 60-80% menunjukkan keberadaan Phylum *Proteobacteria* meningkat. Hal tersebut juga dijelaskan oleh Shin, Whon and Bae (2015) yang melaporkan bahwa Phylum *Proteobacteria* dapat mempertahankan keseimbangan mikroba di dalam saluran pencernaan akibat perubahan pakan, atau setres, Phylum *Proteobacteria* ini disebut dengan dysbiosis atau bakteri yang dapat menjaga atau mengontrol kestabilan mikroba di dalam rumen. Pernyataan ini sesuai dengan hasil yang dilapang tepatnya di Lolit Sapot, Grati Pasuruan yang memberikan pakan dengan

bentuk mash yang terdiri dari konsentrat dan Jerami padi (rasio 50:50). *Phylum Proteobacteria* memiliki peranan dalam metabolism nukleotida, metabolism pirimidin, glisin, serin dan treonin, metabolisme metana dan metabolism nitrogen serta lemak (Hart *et al.*, 2018).

Kelompok SPO yang dikoleksi di RPH, Pegirian, Surabaya, Jawa Timur menunjukkan *Phylum* dominan utama ialah *Bacteroidetes* yang disusul dengan *Proteobacteria*, *Firmicutes* dan *Cyanobacteria*, sedangkan pada kelompok SPO dari Kabupaten Malang *Phylum* dominan yaitu *Bacteroidetes* dengan sedikit *Firmicutes*. *Phylum* ini memiliki peran dalam pendegradasi ikatan lignoselulosa dan proses metabolisme polisakarida (Naas, Mackenzie, Mravec, Schuckel, Willats, Eijsink and Pope, 2014). Lignoselulosa memiliki komponen utama berupa hemiselulosa, selulosa dan lignin yang berasal dari tanaman. Susunan lignoselulosa terdiri dari 20-35% hemiselulosa, 35-50% selulosa dan 10-25% adalah lignin (Lynd, Weimer, Zyl and Pretorius, 2002). Berdasarkan uraian diatas menunjukkan bahwa SPO yang dikoleksi dari Kabupaten Malang dan RPH mengkonsumsi pakan basa berupa hijauan, hal tersebut terlihat dari kandungan NDF digesta >60%, selain itu selama pengamatan di lapang umumnya pemeliharaan ternak qurban yang akan disembelih H-2 hanya diberikan pakan berupa hijauan, sedangkan yang didapat dari RPH, Pegirian kemungkinan diberikan sedikit konsentrasi dikarenakan terdapat *Phylum Proteobacteria* meskipun keberadaanya hanya 8%.

Berdasarkan hasil dan uraian diatas menunjukkan adanya hubungan antara pakan yang dikonsumsi dengan kelimpahan dan keragaman mikroba rumen. Hasil tersebut lebih dijelaskan secara mendetail hingga ketingkat *genus* pada sub bab berikut ini.

5.2.7. Hasil Identifikasi Taxonomi Mikroba rumen SPO

Identifikasi bakteri pada rumen ternak SPO diperoleh dari DNA total yang dihasilkan dalam proses amplifikasi 16Sr RNA yang selanjutnya di sekuensing. Total keseluruhan data yaitu 1.835 urutan DNA yang di sekuensing pada 9 ekor SPO jantan dengan rataan panjang DNA pada setiap sampel adalah 204 urutan DNA. Adapun kumpulan data sekuensing dirangkum pada Tabel 9. Berdasarkan hasil menunjukkan terdapat 4 kelompok *Phylum* dominan di dalam rumen SPO dengan urutan tertinggi yaitu *Bacteroidetes* (69%), *Proteobacteria* (24%), dalam jumlah lebih sedikit yaitu *Firmicutes* (4%) dan *Cyanobacteria* (3%). Hasil tersebut sejalan dengan hasil terdahulu yang telah dilaporkan oleh Durand *et al* (2014) yang menyatakan bahwa *Phylum* dominan didalam rumen yaitu *Firmicutes* (56%), *Bacteroidetes* (31%) dan *Proteobacteria* (4%) dan 19% lainnya adalah *Phylum* predominat, sedangkan hasil yang laporan oleh Kim, Morrison and Yu (2014) menunjukan keberadaan *Phylum* dominan yaitu

Firmicutes (57,8%), *Bacteroidetes* (26,7%) dan *Proteobacteria* (6,9%). Perbedaan persentase *Phylum* dominan didalam rumen sangat dipengaruhi oleh faktor genetik, umur, spesies ternak dan pakan yang diberikan (LeiWang *et al*, 2019 and Sha *et al*, 2020).

Kelimpahan utama yang ada didalam SPO ialah *Phylum Bacteroidetes*. Turunan taxonomi dari *Phylum Bacteroidetes* yang dominan yaitu *Bacteriodia*, *Bacteriodales*, *Prevotellaceace* dengan *genus* dominan adalah *Prevotella* sp. *Phylum Bacteroidetes* dengan *Family Prevotellaceae* memiliki peran sebagai kelompok bakteri proteolitik dan Hemiselulolitik (Hart *et al.*, 2018). Hal tersebut juga dijelaskan oleh Deusch, Silva, Conrad, Beifuss, Rodehutscord and Seifert (2017) yang menyatakan bahwa fermentasi yang dilakukan oleh *family Prevotellaceace* dengan *genus* *Prevotella* sebagian besar menghasilkan enzim yang terlibat dalam pembentukan asetat dan propionate. Hasil *Genus* dari *Phylum Bacteroidetes* ialah *Prevotella* (80%) dan bacteroides sp (18%). Hasil tersebut sesuai dengan yang dilaporkan Avgustin, Ramsak and Peterkan (2001) yang menyebutkan *genus* *Prevotella* merupakan populasi bakteri yang paling melimpah di dalam rumen. Hal tersebut juga sesuai dengan hasil yang diberikan oleh jose *et al.*, (2020) yang menambahkan bahwa *genus* *Prevotella* adalah *genus* yang paling berlimpah di dalam rumen dengan spesies *Prevotella brevis* dan *Prevotella ruminicola*. *Prevotella* merupakan Bakteri Hemiselulolitik dan Proteolitik yang sangat aktif di dalam rumen dan terlibat dalam proses fermentasi pati, xylan dan pektin (Thoetkattikul, Mhuantong, Laothanachareon, Tangphatsornruang, Pattarajinda, Euwilaichitr and Champreda, 2013). Bakteri hemiselulolitik adalah bakteri yang dapat mendegradasi hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan struktur dari polisakarida yang ada di dalam dinding sel tanaman (Soetanto, 2019). Kelimpahan selanjutnya diikuti oleh *genus* *Bacteroides* sp. yang merupakan kelompok *Family Porphyromonadaceae* baru dalam *Phylum Bacteroidetes*. Awalnya *genus* ini merupakan merupakan *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* atau *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB). *Genus Bacteroides* merupakan kelompok bakteri gram negatif anaerob yang tidak memiliki spora. Bakteri ini menggunakan karbohidrat sebagai sumber energi dan vitamik K untuk tumbuh dan berkembangbiak (Salyers and Shoemaker, 2009; Patrick, 2015). Bakteri tersebut berperan dalam degradasi Polisakarida termasuk selulosa dan hemislulosa, selain itu juga mendegradasi amilosa. Berdasarkan uraian diatas dan pembahasan di sub bab (5.2.6 dan Tabel 7.) hasil yang diperoleh sejalan dengan hasil identifikasi pakan yang dikonsumsi SPO dimana pakan yang dikonsumsi memiliki kandungan serat yang tinggi >60% kecuali di Lolit-SaPot karena pemberian pakan berupa konsentrat dan jerami padi.

Tabel 9. Rangkuman Taxonomi Bakteri yang ada didalam SPO

Phylum	Class	Ordo	Family	Genus
Bacteroidetes (69%)	Bacteroidia	Bacteroidales	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i> sp. (80%)
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	<i>Porphyromonadaceae</i> <i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Alloprevotella</i> sp. (1%) <i>Bacteroides</i> sp. (18%) <i>Sphingobacterium</i> sp. (1%)
Proteobacteria (24%)	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Psychrobacter</i> sp. (43%)
		Oceanospirillales	<i>Halomonadaceace</i>	<i>Halomonas</i> sp. (4%)
		Enterobacteriales	<i>Erwiniaceae</i>	<i>Pantoea</i> sp. (23%)
			<i>Yersiniaceae</i>	<i>Serratia</i> sp. (3%)
			<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i> sp. (2%)
				<i>Enterobacter</i> sp. (11%)
			<i>Morganellaceae</i>	<i>Providencia</i> sp. (5%)
			<i>Pectobacteriaceae</i>	<i>Pectobacterium</i> sp. (5%)
		Alteromonadales	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> sp (3%).
		Enterobacteriales	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter</i> sp. (2%)
Firmicutes (4%)	Bacilli	Bacillales	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> sp. (14%)
		Lactobacillales	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> sp. (14%)
	Clostridia	Clostridiales	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfotomaculum</i> sp. (72%)
			-	-
Cyanobacteria (3%)				

Phylum dominan kedua yaitu *Proteobacteria* dengan karakteristik sebagian besar adalah bakteri anaerob fakultatif, *Phylum* memiliki spesies bakteri yang sangat banyak sekitar 1.000 spesies (Shin, *et al* 2015). Bakteri anaerob fakultatif adalah bakteri yang melakukan proses metabolismenya tidak membutuhkan oksigen, namun jika terdapat oksigen proses metabolismenya tetap akan berlangsung karena kelompok bakteri ini mempunyai dua jalur metabolisme fermentative dan non fermentative (Freitas, Almeida, Duarte, Abrao, Careli and Geraseev, 2014). *Phylum Proteobacteria* ini akan melimpah pada ternak yang mengkonsumi pakan konsentrat (Auffret *et al.*, 2017). *Genus* yang teridentifikasi dari turunan *Phylum Proteobacteria* didominasi oleh *Psychrobacter sp.* yang kemudian di susul oleh *Pantoea sp* dan *Enterobacter sp.* Hal ini sesuai dengan hasil yang diperoleh dari Creevey *et al.* (2014) yang menemukan *Phylum Proteobacteria* dengan turunan *genus Psychrobacter* meski dalam identifikasi di dalam metagenomik termasuk dalam bakteri yang tidak dibudidayakan namun termasuk dalam gen bakteri di dalam rumen. *Psychrobacter* merupakan keluarga dari *Moraxellaceae* dengan karakteristik *genus* termasuk gram negatif, dan morfologinya berbentuk batang oksidase positif atau *coccobacilli* yang bersifat psikofilik, psikotoleransi, halotolerant (Lopez, Santos, Otero and Calleja, 2014).

Phylum Firmicutes memiliki kelimpahan 4% dalam rumen SPO, turunan *genus* yang dominan yaitu *Clostridia*, *Clostridiales*, *Peptococcaee* dengan *genus Desulfotomaculum*. Keberadaan *Phylum* tersebut terdapat di ketiga lokasi koleksi sampel, meskipun persentase di setiap kelompok sampel berbeda (lihat. Gambar 15). Hal ini menunjukkan *Phylum Firmicutes* merupakan kelompok *phylum* yang dominan didalam rumen ternak, hasil tersebut juga dilaporkan oleh Petri *et al* (2013^b) yang melaporkan bahwa keberadaan *Phylum Firmicutes* dengan turunan *Clostridia* dan *Clostridiales* merupakan gen dominan yang ada pada ternak dengan pemberian pakan hijauan dan konsentrat (lihat. Gambar 16). *Genus* yang dihasilkan dari turunan ini yaitu *Desulfotomaculum* dengan persentase 72%. Peran *genus* ini dijelaskan oleh Spring, Visser, Lu, Copeland, Lapidus *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa *Desulfotomaculum* merupakan *genus* yang mengandung 30 spesies dan berada di dalam *family Peptococcaceace*. *Genus* ini termasuk dalam gram negative dan hidup di suhu 37°C - 40°C dan termasuk dalam kelompok anaerob obligat dengan hasil fermentasi berupa asetat dengan CO₂ dan berbagai bahan organic lainnya. Salah satu strain yang sudah diisolasi adalah *Desulfotomaculum ruminis* yang membutuhkan alanin dan asam amino sebagai substratnya.

Substrat ini didapat dari proses deaminasi asam amino yang dikatalis oleh *alaninen dehydrogenase*. Deaminasi adalah suatu reaksi kiamawi pada proses metabolisme yang

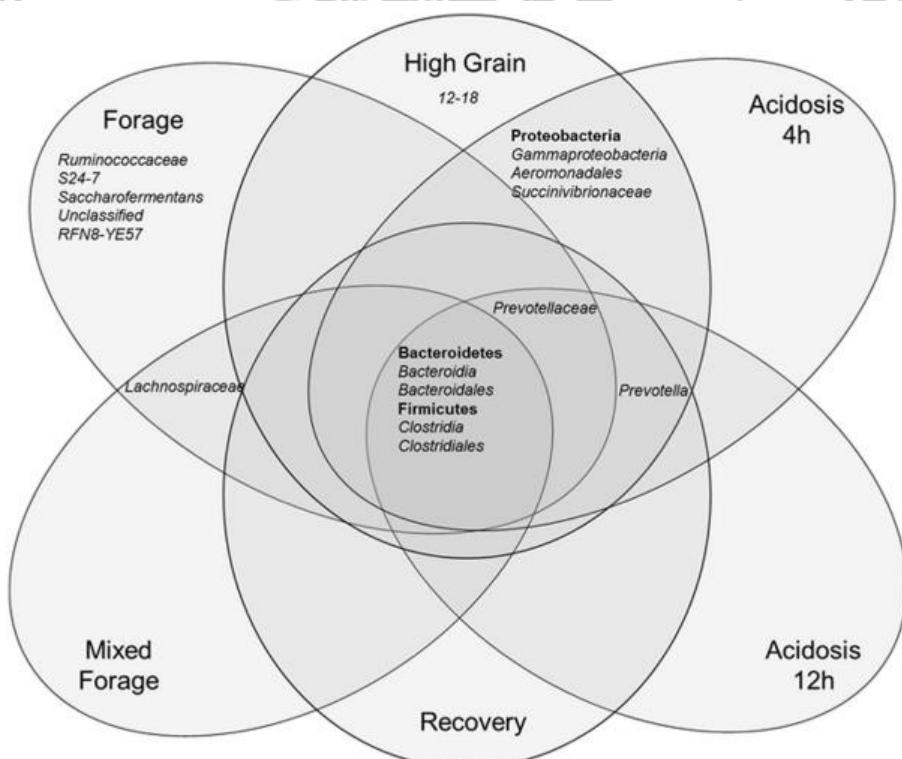
melepaskan gugus amina dari molekul senyawa asam amino. Spring *et al* (2012) menyatakan bahwa *Desulfotomaculum* merupakan *genus* yang menghasilkan asetat dan CO₂ dari proses fermentasi, Hal tersebut didukung oleh pernyataan Gonzales *et al.*, (2014) yang menyatakan bahwa bakteri yang mendegradasi serat akan banyak menghasilkan asam asetat, Formate dan ethanol sebagai produk hasil fermentasi.

Phylum Cyanobacteria yang teridentifikasi di dalam rumen SPO memiliki persentase yang sangat sedikit yaitu 3% dari total keseluruhan *Phylum* bakteri di dalam rumen. Kelimpahan *Phylum Cyanobacteria* di dalam ternak ruminansia memang sangat sedikit, dan hanya ditemukan pada kelompok SPO dari RPH,Pegiran,Surabaya Jawa Timur. hal ini sesuai dengan hasil yang dilaporkan oleh Neves, Ghoshal, Allister and Guan (2017) yang menyatakan bahwa keberadaan *Phylum Cyanobacteria* hanya 1% dalam hasil metatranscriptomic. *Cyanobacteria* adalah bakteri aerob yang dapat melakukan fermentasi karbohidrat pada konsentrasi N₂ yang kurang (heterocystous). Hal yang menarik disini adalah keadaan di dalam rumen secara keseluruhan adalah anaerob. Penelitian lain yang melaporkan bahwa *Cyanobacteria* berada di dalam saluran pencernaan ternak ruminansia yang berada memiliki *Class Melainabacteria*. Anggota dari *Melainabacteria* mempunyai kemampuan untuk memfermentasi gula seperti glukosa, fruktosa dan sorbitol yang menghasilkan produk fermentasi berupa asetat dan butirat di dalam saluran pencernaan ternak ruminansia (Rienzi, Sharon, Wrighton, Koren, Hug, Thomas, Goodrich, Bell, Spector, Banfield and Ley., 2013).

Keseluruhan hasil identifikasi kelimpahan dan keberagaman dari *Phylum* hingga *genus* yang teridentifikasi di dalam rumen SPO menunjukkan kelompok bakteri yang menghasilkan produk fermentasi berupa asam asetat, dan butirat serta sedikit propionat. Produk hasil fermentasi yang dihasilkan oleh mikroba dengan banyaknya bakteri yang menghasilkan asam asetat ini menunjukkan bahwa sebagian besar pakan yang diberikan pada ternak SPO di ketiga lokasi mengkonsumsi pakan basal berupa hijauan dengan jumlah yang berbeda, hal ini juga terlihat pada Tabel. 7 dengan kandungan NDF yang tinggi >60% kecuali di Lolit-SaPot. Pernyataan tersebut juga diperjelas oleh hasil dari Penner, Taniguchi, Guan, Beauchemin and Oba (2009) yang membandingkan konsentrasi VFA dengan pakan tinggi serat dan tinggi konsentrat. Hasil yang disajikan menunjukkan bahwa pakan dengan tinggi serat akan menghasilkan asam asetat, sedangkan asam propionate tinggi dengan pakan biji bijian, namun hasil VFA dari semua sampel tidak dapat dilaporkan.

Hasil identifikasi *Phylum* hingga *genus* dominan didalam rumen SPO menunjukkan adanya hubungan atau interaksi antara pakan yang dikonsumsi dengan kelimpahan dan keragaman mikroba. Pada kelompok Lolit-Sapot yang diberikan pakan konsentrat dan hijauan

menunjukkan kelimpahan *Phylum* dominan *Proteobacteria* (65%) dengan *Class* dominan adalah *Gammaproteobacteria*. Pernyataan tersebut sesuai dengan hasil yang dilaporkan Petri *et al* (2013^b) yang menunjukkan bahwa *Phylum Proteobacteria* dengan *class* *Gammaproteobacteria* akan melimpah dengan pemberian pakan tinggi biji-bijian (konsentrasi). Hasil tersebut sejalan dengan kondisi pakan yang dikonsumsi dimana pemberian pakan berupa jerami dan konsentrasi (50:50). Sedangkan *Phylum Bacteroidetes* dengan turunan *Class Bacteroidia* dan *Ordo Bacteriodales, Family Prevotellaceae* dengan *Genus Prevotella* melimpah di kelompok SPO yang didapat dari Momentum Idul Adha 2020 di Kabupaten Malang (98%) dan RPH, Pegiran, Surabaya (75%) dan Lolit-Sapot, Grati, Pasuruan (33%). Hal ini menunjukkan bahwa SPO mengkonsumsi pakan hijauan dengan persentase tertinggi dari Kabupaten Malang dan RPH, Ini terlihat dari Tabel 7. yang melaporkan kandungan NDF digesta >60%. Kelimpahan *phylum* lainnya yaitu *Firmicutes* dengan turunan *Clostridia*, *Clostridiales*, *Perptococcaceace* dan *Desulfotomaculum* melimpah di kelompok SPO dari RPH, Pegiran, Surabaya (8%) dan sedikit di Kabupaten Malang dan Lolit-SaPot (2%). Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan *Phylum Firmicutes* ada pada pemberian pakan hijauan maupun konsentrasi. Hal Tersebut sesuai dengan bagan yang dilaporkan Petri pada Gambar 16 dibawah ini.

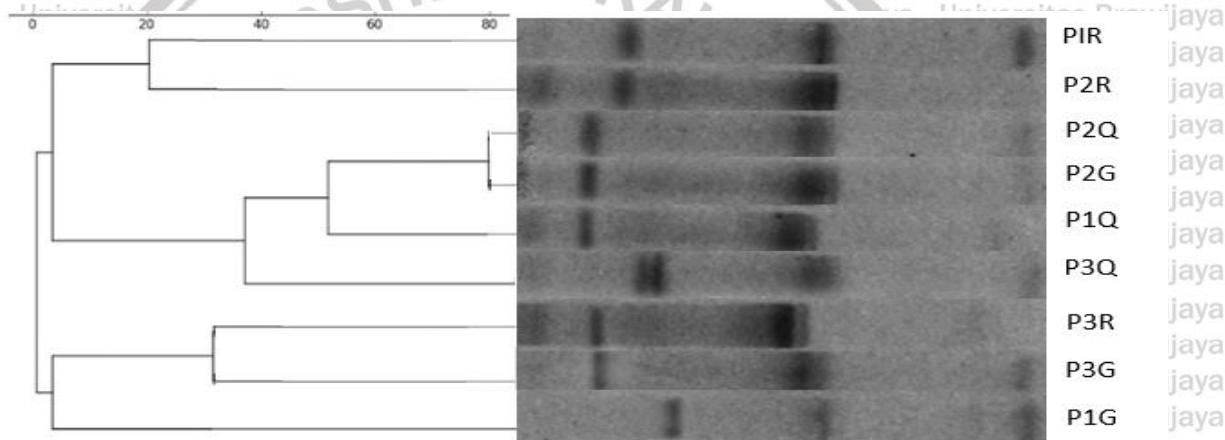


Gambar 16. Diagram *Phylum* Dominan Berdasarkan jenis Pakan
Sumber : Petri *et al* (2013).

5.2.8. Hasil Analisis DDGE

Mikrobiologi molekuler dalam bidang penelitian saat ini mengalami perkembangan yang sangat pesat. Salah satu cabang dalam bidang mikrobiologi adalah pengembangan metode untuk mengidentifikasi struktur mikroorganisme di dalam ekosistem alam, seperti ekosistem mikroba di dalam rumen ternak ruminansia. Identifikasi bakteri menggunakan metode molekuler khususnya pada gen 16SrRNA menjadi alat yang penting untuk mempelajari komunitas bakteri pada sampel di dalam rumen. Teknik fingerprinting dapat memberikan tampilan profil keragaman genetic dari komunitas bakteri yang lebih spesifik. DGGE menjadi salah satu metode pilihan yang dapat dilakukan dengan pemisahan amplicon PCR.

Hasil profil keragaman genetic pada komunitas bakteri di dalam rumen SPO yang didapat dari lokasi berbeda memberikan gambaran profil yang berbeda. Profil DGGE dari sembilan sampel cairan rumen SPO di sajikan pada Gambar 17.



Gambar 17. Profil Bakteri pada gel DGGE

Keterangan : P₁₂₃R : Sampel dari RPH, Surabaya; P₁₂₃G : Sampel dari Grati, Pasuruan dan P₁₂₃Q : Sampel dari Peternak di Malang.

Hasil dari Gambar 17. Menunjukkan keragaman profil mikroba di dalam rumen SPO pada masing-masing ternak berbeda, hal ini terlihat dari band pita DNA yang ada. Hasil ini dilanjutkan dengan pembuatan dendrogram atau pohon filogeni berdasarkan band pita DNA yang disesuaikan dengan kekerabatan suatu organisme yang ada. Pohon filogeni terdiri dari dua kata yang dimana pohon memiliki arti sebagai data terstruktur untuk memberikan gambaran dari sebuah data yang dapat diimplementasikan secara hierarki yang berhubungan dan ditunjukkan dengan adanya percabangan dalam pohon, sedangkan untuk filogene menunjukkan suku, ras serta genetika yang mengartikan kekerabatan (Lubis, 2014).

Filogeni yang ada di Gambar 17. menunjukkan terdapat 2 kelompok utama bakteri yang ada di dalam rumen SPO. Identifikasi kelompok bakteri tersebut dapat diketahui dari hasil BLAST pada Genbank NCBI dari hasil PCR. Adapun hasil identifikasi kemiripan dengan data yang ada di GenBank di sajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil BLAST dengan hasil dendogram DGGE

Sampel	Hasil Blast	Kode	% Similarity
P1G	<i>Psychrobacter sp. Strain 976</i>	<u>MT585843.1</u>	88.40
P2G	<i>Uncultured Prevotella sp.</i>	<u>LT009156.1</u>	86.71
P3G	<i>Klebsiella aerogenes strain N20</i>	<u>MF682271.1</u>	95.82
P1R	<i>Uncultured Prevotella sp. Clone 7</i>	<u>MK685190.1</u>	90.18
P2R	<i>Uncultured Prevotella sp. Clone denovo28815</i>	<u>KY665680.1</u>	84.24
P3R	<i>Pantoea sp. 39D.5</i>	<u>KU362623.1</u>	89.93
P1Q	<i>Prevotella sp. S7-23-39</i>	<u>KC311753.1</u>	85.86
P2Q	<i>Uncultured Prevotella sp.</i>	<u>LT008252.1</u>	92.45
P3Q	<i>Prevotella sp. Strain Rep29</i>	<u>MN540723.1</u>	91.54

Hasil yang didapat dari GenBank menunjukkan setiap sampel yang dikoleksi memiliki hasil identifikasi yang beragam (Tabel 10). Hasil yang ditunjukkan berdasarkan nilai %Similarity yang didapat dari nilai per-Ident dari hasil BLAST. %Similarity menunjukkan kemiripan DNA dengan kumpulan DNA yang ada di dalam GenBank sehingga memunculkan sebuah nama dari masing-masing bakteri. Di dalam hasil BLAST tidak ada batas kemiripan dari 16SrRNA yang tepat untuk mendekripsikan taksa tertentu. Hasil identifikasi bakteri yang didapat memiliki kemiripan pada *genus* tertentu (similarity <97%). Menurut Vandamme *et al* (1996) mengidentifikasi spesies harus memiliki nilai kemiripan/similarity >97% dan apabila similarity sekitar 70-95% mengidentifikasikan kesamaan pada *genus* tertentu (Moraru, Varsani dan Kropinski., 2020).

Hasil dari Gambar 17. pada dendrogram atau filogeni yang dihasilkan menunjukkan terdapat 2 kelompok utama yang ada di dalam rumen SPO. Jika melihat pada Tabel 9 dengan hasil identifikasi bakteri yang ada menunjukkan kedua kelompok ini memiliki perbedaan dari tingkat *Phylum* yang dimana pada kelompok 1 yaitu pada sampel P3R, P3G dan P1G teridentifikasi pada tingkat *genus* memiliki kemiripan dengan *Pantoea*, *Klebsiella aerogenes* dan *Psychrobacter*. Secara keseluruhan bakteri ini memiliki *Phylum* yang sama yaitu *Proteobacteria* (Tabel 9). Pada kelompok ini terlihat ada percabangan lagi pada sampel P3G dan P1G dan menunjukkan terdapat kekerabatan yang dekat dibandingkan dengan sampel P1G.

hal ini terjadi karena *genus Pantoea, Klebsiella aerogenes* merupakan turunan dari *ordo* yang sama yaitu *Enterobacteriales* namun memiliki kelompok *family* yang berbeda yaitu *Erwiniaceae* dan *Enterobacteriaceae* sedangkan pada *genus Psychrobacter* memiliki turunan *ordo* yaitu *Pseudomonadales*. Kelompok kedua yaitu P1R, P2R, P2Q, P2G, P1Q dan P3Q teridentifikasi pada tingkat *genus* memiliki kemiripan dengan *Prevotella sp.* yang merupakan turunan dari taksa *Phylum Bacteroidetes*. Dalam kelompok ini terdapat 2 percabangan lagi pada 2 kelompok yaitu P1R dan P2R (kelompok a) dan P2Q, P2G, P1Q dan P3Q (kelompok b), dan di dalam kelompok b memiliki percabangan lagi pada kelompok P2Q, P2G dan P1Q. banyaknya percangan di dalam kelompok kedua ini menunjukkan perbedaan karakteristik pada setiap *genus Prevotella* pada masing-masing sampel yang ada. *Genus Prevotella* memiliki keragaman yang sangat melimpah dan fleksibilitas fungsi yang luas (Romagnoli, Kmit, Chiaramonte *et al.*, 2017) seperti hasil filogeni yang dihasilkan oleh Ruan, Shen, Zou, Qi, Yin, Jiang, Guo, He, Chen, Tang and Qin (2015) yaitu *Prevotella ruminicola*, *Prevotella bryanti*, *prevotella tannerae* dan sebagainya.

Hasil identifikasi pada masing-masing sampel yang di peroleh berdasarkan Tabel. 10 menunjukkan bahwa didalam rumen SPO memiliki keberagaman *phylum* dan keragaman *genus* yang berbeda. Kelompok sampel di Lolit-SaPot memiliki *Phylum* dominan *Proteobacteria* dan *Bacteroidetes* dengan keberagaman *genus* dominan yaitu *Psychrobacter sp.* Strain 976, *Klebsiella aerogenes* strain N20 dan *uncultured Prevotella sp.* Kelompok sampel dari RPH memiliki *Phylum* dominan *Bacteroidetes* dan *Proteobacteria* dengan keberagaman *genus* dominan yaitu *uncultured Prevotella sp.* Clone 7 dan Clone denovo28815. Sedangkan pada kelompok di Kabupaten Malang memiliki *Phylum* dominan *Bacteroidetes* dengan keragaman *genus* yaitu *Prevotella sp.* S7-23-39; *Uncultured Prevotella sp* dan *Prevotella sp.* Strain Rep29. Berdasarkan uraian ini menunjukkan bahwa masing-masing pada kelompok Lolit-SaPot meski diberikan pakan yang sama menunjukkan *genus* dominan yang berbeda hal ini dapat disebabkan oleh kemampuan ternak dalam seleksi pakan dan perbedaan umur ternak. Umur ternak SPO ini berkisar antara 14-22 bulan, hal ini sesuai dengan hasil yang dilaporkan oleh Jami *et al* (2013) menunjukkan bahwa adanya peningkatan dan penurunan dari *Phylum* baktteri yang ada di dalam rumen seperti *Proteobacteria* perlahan lahan menurun menjadi *Bacteroidetes* dan *Firmicutes* dengan bertambahnya umur ternak, Sedangkan pada lokasi lainnya dengan pemberian pakan dengan tinggi serat (NDF >60%) menunjukkan *genus* dominan yang teridentifikasi adalah *Prevotella*, yang ini sejalan dengan peran *genus* tersebut dalam mendegradasi polisakarida structural β -glikosida (Romagnoli, Kmit, Chiaramonte *et al.*, 2017)

5.3. Hubungan antara kelimpahan dan keragaman *Phylum* terhadap strategi peningkatan produksi ternak.

Peningkatan produksi ternak pedaging dapat diukur dengan pertambahan bobot badan. Peningkatan PBB dipengaruhi oleh pakan dan hasil perombakan pakan didalam rumen. Proses perombakan didalam rumen menjadi kata kunci dalam strategi ini, karena apabila proses perombakan pakan dirumen efisien maka akan menghasilkan sumber energy yang optimal bagi ternak untuk hidup dan berproduksi. Strategi yang dapat dilakukan yaitu mengetahui kelompok *phylum* dominan didalam rumen dan peningkatan sintesis protein mikroba (SPM).

Korelasi *Phylum* dominan pada PBB ternak telah dilaporkan oleh Min, Gurung, Shange and Solaiman (2019) dengan pemberian pakan basal hijauan menunjukkan bahwa keberadaan

Phylum Firmicutes memiliki korelasi terhadap PBB kambing dengan *genus* dominan yaitu *Acidaminococcus*, *Dialister* dan *Anaerovibrio* (Paz *et al.*, 2018), sedangkan hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok *phylum* dominan yang didapat dari SPO terdiri dari *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* dan *Cyanobacteria* dengan *genus* dominan yaitu *Prevotella*, *Psychrobacter* dan *Desulfotomaculum*. Perbedaan hasil ini menunjukkan bahwa perlu adanya strategi modifikasi keberadaan *phylum* dan *genus* dominan pada SPO sehingga akan memberikan produksi yang optimal. Kelompok *phylum Firmicutes* dapat memanfaatkan karbohidrat seperti xilan, selulosa, hemiselulosa dan galactomannan sebagai sumber energi (Dassa *et al.*, 2014), sedangkan pada kelompok *Bacteroidetes* memanfaatkan pati, xilan, pectin, galaktomanan dan arabinogalactan (Martens *et al.*, 2011). Berdasarkan hal tersebut pemberian pakan SPO dapat menggunakan pakan basal berupa hijauan.

Strategi peningkatan PBB pada SPO juga dapat dilakukan dengan melakukan optimalisasi sintesis protein mikroba. Nilai efisiensi sintesis protein mikroba yaitu 10-50 g N/Kg BO terfermentasi didalam rumen (Stern *et al.*, 2006). Hasil yang dilakukan oleh Soetanto (2020) terhadap SPO yang diberi pakan lengkap (50:50) berbahan dasar jerami dan konsentrat menunjukkan nilai sintesis protein mikroba yaitu 49.06 ± 5.54 g N/Kg BO terfermentasi didalam rumen. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa mikroba didalam rumen SPO efisien sebagai sumber nutrisi bagi ternak inang untuk berproduksi. Hasil yang dilaporkan oleh Partama, Cakra dan Trisnadewi (2014) melaporkan adanya korelasi antara sintesis protein mikroba dengan PBB ternak. Nilai regresi menunjukkan $Y = 0,002X - 0,002$, $R^2 = 0,73$, dimana X adalah sintesis protein mikroba dan Y adalah PBB. Pernyataan tersebut menunjukkan bahwa protein mikroba memiliki korelasi positif terhadap produktivitas ternak.

Berdasarkan pembahasan diatas menunjukkan bahwa strategi yang utama dalam meningkatkan PBB SPO pada peningkatan kelimpahan *phylum Firmicutes* utamanya pada genus *Acidaminococcus*, *Dialister* dan *Anaerovibrio*. Peningkatan *phylum Firmicutes* menurut Pitta *et al.* (2010) dengan pemberian pakan berupa hijauan dengan umur panen pada fase vegetative karena apabila diberikan pakan hijauan pada fase generatif maka *phylum* dominan adalah *Bacteroidetes* (Weimer *et al.*, 2017). Berdasarkan hal tersebut sebaiknya dalam pemberian pakan pada SPO untuk meningkatkan produksi (PBB) tidak harus memberikan tinggi akan pakan konsentrat, namun mengoptimalkan pemberian pakan hijauan dengan memperhatikan masa panen.



6.2 Saran

Penelitian ini merupakan hasil pertama yang mengkaji kelimpahan dan keragaman mikroba didalam rumen SPO. Hasil ini menunjukkan adanya hubungan atau interaksi dari konsumsi pakan dengan kelimpahan dan keragaman mikroba SPO, namun belum mampu menemukan interaksi gen tertentu yang dapat meningkatkan performansi ternak. Sehingga perlu dilakukannya kajian lebih lanjut pada SPO dengan pemberian pakan yang sama dan mengukur efisiensi pakan dan interaksi pakan dengan kelimpahan gen dominan hingga ke tingkat spesies melalui teknik molekuler NGS dengan *Pyrosequencing DNA*.

6.1 Kesimpulan

- Hasil pengamatan kemampuan mencerna pakan lengkap dengan menggunakan sumber inoculum dari cairan rumen SB, SM dan SPO secara *in vitro* menunjukkan SPO memiliki kemampuan mencerna pakan lebih baik dibandingkan dengan ternak lainnya.
- Hasil pengamatan tentang kelimpahan dan keragaman bakteri pada rumen SPO diperoleh 4 *Phylum* dominan yaitu *Phylum Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* dan *Cyanobactria* dengan *genus* dominan yaitu *Prevotella* sp., *Psychrobacter* sp. dan *Desulfotomaculum* sp.
- Adanya hubungan kelimpahan dan keragaman mikroba rumen dengan pakan yang dikonsumsi. Kelompok sampel dari Lolit-SaPot dengan pemberian pakan konsentrat dan jerami menunjukkan *Phylum* dominan *Proteobacteria* dengan *genus* dominan *Psychrobacter*, sedangkan kedua kelompok lainnya dengan pendugaan pakan tinggi serat (NDF >60%) menunjukkan *Phylum* dominan *Bacteroidetes* dengan *genus* dominan *Prevotella*.
- Hubungan Filogenetik mengungkapkan terdapat dua kelompok *genus* dominan didalam rumen SPO yaitu *genus Pscyhrobacter* dan *genus Prevotella*.

BAB VI.

KESIMPULAN DAN SARAN

DAFTAR PUSTAKA

- Aditia, E.L., R. Priyanto, M. Baihaqi, B.W. Putra and M. Ismail. 2013. Performa produksi SB dan Peranakan Ongole yang digemukkan dengan pakan berbasis sorghum. Jurnal ilmu produksi dan teknologi hasil peternakan. 01(3) : 155-159. Diakses pada tanggal 29 Maret 2021 pukul 08.00 wib.
- Anandan, R., D. Dharumadurai and G.P. Manogaran. 2016. An Introduction to Actinobacteria. Chapter 1, 1-37 : <http://dx.doi.org/10.5772/62329>. Diakses pada tanggal 08 Januari 2021 pukul 12.01 WIB.
- Auffret M.D., J. R.J. Dewhurst, C. A. Duthie, J. A. Rooke, R.J. Wallace, T.C. Freeman, R.Stewart, M. Watson and R. Roehe. 2017. The rumen microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance and pathogenicity genes is directly affected by diet in beef cattle. Microbiome. 5 : 159. DOI 10.1186/s40168-017-0378-z. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 17.04 WIB.
- Avgustin, G., A. Ramsak and M. Peterka. 2001. Systematics and Evolution of Ruminal Species of the Genus *Prevotella*. Folia Microbiol. 46 (1) : 40-44. <http://www.Biomed.cas.cz/rabu/foJ>. Diakses pada tanggal 29 Desember 2020 pukul 13.10 WIB.
- Bachmann, M., C. Kuhnitzsch, P. Okon, S. D. Martens, J. M. Greef, O. Steinhofel and A. Zeyner. 2019. Ruminal In Vitro Protein Degradation and Apparent Digestibility of Energy and Nutrients in Sheep Fed Native or Ensiled + Toasted Pea (*Pisum sativum*) Grains. Animals. 9 (401) : 1-12. doi:10.3390/ani9070401. Diakses pada tanggal 08 Januari 2021 pukul 12.27 WIB.
- Bharagava, R. N., D. Purchase, G. Sazena and S. I. Mulla. 2019. Applications of metagenomics in microbial bioremediation of pollutants: from genomics to environmental cleanup. 459-477. : <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00026-5>. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 20.46 WIB.
- Bansi, H., R. Risitanto and R. A. Indriawaty. Use Of Microbes To Improve Nutritional Value Of Rice Straw. International Conference on Livestock Production and Veterinary Technology. 99-103. https://www.researchgate.net/publication/305286632_USE_OF_MICROBES_TO_IMPROVE_NUTRITIONAL_VALUE_OF_RICE_STRAW. Diakses pada tanggal 09 Januari 2021 Pukul 10.26 WIB.
- Belanche, A., de la Fuente, G., and Newbold, C. J. (2015). Effect of progressive inoculation of fauna-free sheep with holotrich protozoa and total-fauna on rumen fermentation, microbial diversity and methane emissions. FEMS Microbiol. Ecol. 362 : 1-10. doi: 10.1093/femsec/fiu026. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 12.58 WIB.
- Berry.D.P and J.J. Crowley. 2013. Cell biology symposium: genetics of feed efficiency in dairy and beef cattle. American society of animal science. Journal of animal science. 91: 60

- 2020 pukul 14.00 WIB.

Bekele, A. Z., S. Koike and Y. Kobayashi. 2010. Genetic diversity and diet specificity of ruminal Prevotella revealed by 16S rRNA gene-based analysis. FEMS Microbiol Lett. 305 : 49-57. DOI:10.1111/j.1574-6968.2010.01911.x. Diakses pada tanggal 19 April 2021 pukul 09.52 WIB.

BSN. 2015. Bibit SPOTong-Bagian 5 : Peranakan Ongole. Badan Standarisasi Nasional. SNI 7651.5: 2015. BSN Jakarta. Microsoft Word - SNI 7651-5-2015.docx (pertanian.go.id). Diakses pada tanggal 12 Oktober 2020 pukul 13.00 WIB.

Chaudhary PP, Sirohi SK, Saxena J. 2012. Diversity analysis of methanogens in rumen of Bubalus bubalis by 16S riboprinting and sequence analysis. Gene 493 (1) :13–17. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.041>. Diakses pada tanggal 20 Desember 2020 pukul 20.46 WIB.

Cheng, Y. F., J. E. Edwards., G. G. Allison, W. Y. Zhu and M. K. Theodorou. 2009. Diversity and activity on enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. Bioresource Technology. 100 : 4821-4828. Doi:10.1016/j.biortech.2009.04.031. Diakses pada tanggal 18 April 2021 pukul 18.37 WIB.

Cowlye, F. C., T. M. Syahniar, D. Ratnawati, D. E. Mayberry, Marsetyo, D. Pamungkas and D. P. Poppi. 2020. Greater farmer investment in well-formulated diets can increase liveweight gain and smallholder gross margins from cattle fattening. Livestock Science. 242 : 104297. doi:10.1016/j.livsci.2020.104297. Diakses pada tanggal 13 Februari 2021 pukul 11.11 WIB.

Creevey.C. J., W. J. Kelly, G. Henderson and S. C. Leahy. 2014. Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. Microbial biotechonlogy. 7 (5) : 467- 479. doi:10.1111/1751-7915.12141. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 10.38 WIB.

Connor, E.E., Li, R.W., Baldwin VI, R.L. and Li, C., 2009. Gene expression in the digestive tissue of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes. Animal. 4 (7): 993-1007. DOI: 10.1017/S1751731109991285. Diakses pada tanggal 14 Oktober 2020 pukul 15.00 WIB.

Dagar SS, Kumar S, Mudgil P, Singh R, Puniya AK .2011. D1/D2 domain of large subunit ribosomal DNA for differentiation of orpinomyces spp. appl environ microbiol 77:6722– 6725. doi: 10.1128/AEM.05441-11. Diakses pada tanggal 11 November 2020 pukul 08.00 WIB.

Das, K. C. And W. Qin. 2012. Isolation and characterization of superior rumen bacteria of cattle (*Bos taurus*) and potential application in animal feedstuff. Open Journal of Animal Sciences 2 :224-228. DOI: 10.4236/ojas.2012.24031 . Diakses tanggal 21 Desember 2020 pukul 08.48 WIB.

- Desnoyers, M., C. D.Ponter, K. Rigalma, S. Roussel, O. Martin and S. Giger-Reverdin. 2008. Effect of concentrate percentage on ruminal pH and time-budget in dairy goats. Animal. 2 (12) : 1802-1808. doi:10.1017/S1751731108003157. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 20.43 WIB.
- Dehority, B. A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. CRC Press Taylor & Francis group. Boca Raton London New York. ISBN : 0-8493-4875-7. Diakes pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 13.48 WIB.
- Dentol, B. L., L. E. Diese, J. L. Firkins and T. J. Hackmann. 2015. Accumulation of reverse carbohydrate by rumen protozoa and bacteria in competition for glucose. Appl Environ Microbiol. 81 (5) : 1832-1838. doi: 10.1128/AEM.03736-14. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 14.14 WIB.
- Deusch, S., A. C. Silva, J. Conrad, U. Beifuss, M. Rodehutscord and J. Seifert. 2017. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. Frontiers in Microbiology. 8 (1605) : 1-21. doi: 10.3389/fmicb.2017.01605. Diakes pada tanggal 08 Januari 2020 pukul 13.21 WIB.
- Duarte, E. R., F. O. Abaro, A. C. Oliveira *et al*. 2018. Rumen protozoa of different ages of beef cattle raised in tropical pastures during the dry season. Journal of applied animal research. 46 (1) : 145701461. DOI: 10.1080/09712119.2018.1530676. Diakses pada tanggal 08 Juli 2021 pukul 11.20 WIB.
- Durand, F. C. dan F. Ossa. 2014. Review: the rumen microbiome: composition, abundance, diversity, and next investigative tools. The professional animal scientist. 30 : 1-12. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30076-0](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30076-0). Diakses pada tanggal 10 Oktober 2020 pukul 15.00 WIB.
- Edwards., J.E., A. H. Kingstone-Smith, H.R. Jimenez, S.A. Huws, K. P. Skot., G. W. Griffith, N. R. McEwan and M. K. Theodorou. 2009. Dynamic of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. FEMS Microbiol Ecol. Vol 66 : 537-545. DOI:10.1111/j.1574-6941.2008.00563.x. Diakses pada tanggal 18 April 2021 pukul 18.15 WIB.
- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widjarti dan S. Rahayu. 2011. Biologi molekuler- prinsip dasar analisis. Jakarta :Penerbit Erlangga.
- Fatchiyah. 2015. Prinsip dasar Bioinformatika. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang. ISBN : 978-602-203-735-4.
- Fatchiyah., E.L. Arumingtyas, S.Widyarti dan S. Rahayu. 2009. Dasar-dasar analisa biologi molekuler. Lembaga penerbit Fakultas Pertanian. Malang. ISBN : 979-508-244-2.
- Fernando, S.C., H.T. Purvis, F.Z. Najar., L.O Sukharikov, C.R. krehbiel., T.G. Nagaraja, B. A. Roe and U. Desilva. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. Applied and environmental microbiology. 7 (22) : 7482-7490. DOI: 10.1128/AEM.00388-10. Diakses pada tanggal 11 November 2020 pukul 08.00 WIB.

- Fondevila M, BA Dehorty. 2001. In vitro growth and starch digestion by *Entodinium exiguum* as influenced by the presence or absence of live bacteria. doi: 10.2527/2001.7992465x. *J Anim Sci* 79, 2465-2471. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 15.30 WIB.
- Freitas, C.E.S. P.N.M. Almeida, E.R. Duarte, F.O. Abroa, R. Careli and L.C. Geraseev. 2014. Aerobe and anaerobe facultative Gram-negative bacteria rod-shaped in the ruminal fluid of dairy cattle fed with different diets containing tropical forages. *Arch. Med. Vet.* 46 : 457-467. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v46n3/art17.pdf>. Diakes pada tanggal 08 Januari 2021 pukul 10.51 WIB.
- Garibyan, L And N. Avashia. 2013. Polymerase chain reaction. *Journal of investigative dermatology*. 133 (3): 1-6. doi:10.1038/jid.2013.1. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 18.39 WIB.
- Gilbert, R. and A. V. Klieve. 2015. Ruminal Viruses (Bacteriphages, Archaeaphages). From A.K. Puniya *et al* (eds). *Rumen microbiology: From Evolution to revolution*. DOI 10.1007/978-81-322-2401-3_9. Diakes pada tanggal 18 April 2021 pukul 22.18 WIB.
- Guan, L.L., J. D. Nkrumah, J. A. Basarab and S.S.Moore. 2008. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiol Lett.* 288 (1) : 85-91. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01343.x>. Diakses pada tanggal 19 November 2020 pukul 10.00 WIB.
- Gorka P, Kowalski ZM, Pietrzak P, Kotunia A, Jagusiak W, Zabielski R. 2011. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development?. *J. dairy Sci.* 2011;94:3002–13. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3499>. Diakses pada tanggal 11 November 2020 pukul 08.00 WIB.
- Goering, H. K. and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agriculture Handbook No. 379.
- Gonzales.A.R.C., M.E. B. Barraza., J. D. Viveroz and A.C. Martinez. 2014. Rumen microorganism and fermentation. *Arch Med Vet* 46 : 349-361. DOI: 10.4067/S0301-732X2014000300003. Diakses tanggal 20 Desember 2020 pukul 19.16 WIB.
- Green, M. and R. Sambroll. 2018. The basic polymerase chain reaction (PCR). *Cold spring harbor protocols*. 5 : 338-345. doi:10.1101/pdb.prot095117. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 18.48 WIB.
- Gruninger, R.J., A. K. Puniya, T. M. Callaghan, J. E. Edwards, N. Youssef, S.S. Dagar, K. Flieferova, G. W. Griffith, R. Forster, A. Tsang, T. McAllister and M. S. Elshahed. 2014. Anaerobic fungi (*Phylum Neocallimastigomycota*): Advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology. Role and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol* 90 : 1-17. DOI: 10.1111/1574-6941.12383. Diakses pada tanggal 18 April 2021 pukul 19.40 WIB.

- Guo, W., M Zhou, T. Ma, S. Bi, W. Wang, Y. Zhang, Z. Huang, L.L.Guan and R. Long. 2020. Survey of rumen microbiota of domestic grazing yak during different growth stages revealed novel maturation patterns of four key microbial groups and their dynamic interactions. *Animal Microbiome*. 2 (23): 1-20. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00042-8>. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 17.59 WIB.
- Harahap, A. S. 2017. Uji kualitas dan kuantitas DNA beberapa populasi pohon kapur Sumatera. *Journal of animal science and agronomy panca budi*. 2 (2): 1-6. <http://jurnal.pancabudi.ac.id/index.php/jasapadi/article/view/96>. Diakses pada tanggal 27 Desember 2020 pukul 19.31 WIB.
- Harfoot, G. C. and G.P Hazlewood.1997. Lipid metabolism in the rumen : Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Hart, E.C., C. J. Creevey, T. Hitch and A.H. K.Smith. 2018. Meta-Proteomics of rumen microbiota indicates niche compartmentalization and functional dominance in a limited number of metabolic pathways between abundant bacteria. *Scientific Reports*. 8 : 10504. DOI:10.1038/s41598-018-28827-7. Diakes pada tanggal 11 Februari 2021 pada pukul 10.59 WIB.
- Hartatik, Sumadi dan T. Hartatik. 2009. Identifikasi karakteristik genetik sapi peranakan ongole di peternak rakyat. *Buletin peternakan*. 33 (2): 64-73. <https://doi.org/10.21059/buletinperternak.v33i2.118>. Diakses pada tanggal 11 November 2020 pukul 10.00 WIB.
- Hanke, R.L., J. P. M. Kolthoff, M. G. Lopez, S. Mukherjee, M. Huntemann, N. N. Ivanova, T. Woyke, N. C. Kyrpides, H. P. Klenk and M. Goker. 2016. Genome-based taxonomic classification of *Bacteroidetes*. *Front.Microbiol.* 7 (2003) :1-37. doi: 10.3389/fmicb.2016.02003. Diakes pada tanggal 10 Januari 2021 pukul 6.34 WIB.
- Henderson, G. Cox F., Ganesh S. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*. 5 : 14567. DOI: 10.1038/srep14567. Diakses pada tanggal 11 November 2020 pukul 11.00 WIB.
- Herd, R.M dan P.F. Arthur. 2009. Physiological basis for residual feed intake. *Journal of animal Science*. 87 (14) : 64-71. DOI: 10.2527/jas.2008-1345. Diakses pada tanggal 11 November 2020 pukul 12.00 WIB.
- Huda, A.N., Mashudi, Kuswati, T. Susilawati, S. Wahyuningsing, N. Isnaini, A. Puspita, A.Y dan A. T. Satria. 2018. Evaluasi kecukupan nutrisi induk SPOTong di desa leran wetan dan leran kulon, Kecamatan Palang, Kabupaten Tuban. *Jurnal ternak tropika*. 19 (2): 111-119. DOI <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2018.019.02.6>. Diakses pada tanggal 13 November 2020 pukul 13.00 WIB.

- Ivan, M., Neill, L., Forster, R., Alimon, R., Rode, *et al.* 2000. Effects of Isotricha, Dasytricha, Entodinium, and total fauna on ruminal fermentation and duodenal flow in wethers fed different diets. *Journal of Dairy Science*. 83(4): 776–787. doi:10.3168/jds.s0022-0302(00)74940-x. Diakses pada tanggal 09 Juli 2021 pukul 08.00 WIB.
- Ivan, M. 2009. Comparison of duodenal flow and digestibility in fauna-free sheep inoculated with Holotrich protozoa, Entodinium monofauna or total mixed protozoa population. *Br. J. Nutr.* 101 : 34–40. doi:10.1017/S0007114508984245. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 12.48 WIB.
- Jaimes, L.J.C., A.M.Giraldo and H. J. Correa. 2019. What is the Acid Detergent Fiber (ADF) made of? Livestock research for rural development. 31(3) : 42-51. <http://www.lrd.org/lrd31/3/jcfc31042.html>. Diakses pada tanggal 07 Januari 2021 pukul 19.24 WIB.
- Jami, E., A. Israel, A. Kotser dan I. Mirzrahi. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME journal*. 7 : 1069-1079. DOI: 10.1038/ismej.2013.2. Diakses pada tanggal 12 November 2020 pukul 09.00 WIB.
- Janssen, P. H. and M. Kirs. 2008. Minireviews: Structure of the arvhaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiologi*. 74 (12) : 3619-3625. doi:10.1128/AEM.02812-07. Diakses pada tanggal 18 April 2021 pukul 22.50 WIB.
- Jose, L. V., R. P. More, P. K. Malik, A. P. Kalte, S. Trivedi, S. Arun, G. Thirumalaisamy and R. Bhatta .2020. Exploring the metabolically active rumen microbiota and its fibrolytic potential in crossbred cattle fed on fibrous diet through metatranscriptomics. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 10 (2) :182-189. doi: 10.15414/jmbfs.2020.10.2.182-189. Diakses pada tanggal 08 Januari 2021 pukul 08.33 WIB.
- Kadri, K. 2019. *Polymerase chain reaction (PCR) : Principle and Applications*. DOI: 10.5772/intechopen.86491. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 18.07 WIB.
- Kenny, D.A., C. Fitzsimons, S. M. Waters and M. McGee. 2018. Invited review : improving feed efficiency of beef cattle-the current state of the art and future challenges. 12 (8): 1815-1826. DOI: 10.1017/S1751731118000976. Diakses pada tanggal 10 November 2020 pukul 07.00 WIB.
- Kim, M., M Morrison and Z. Yu. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiome. *FEMS Microbiology Ecology*. 1: 49-63. DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x Editor: Diakses pada tanggal 26 Mei 2021 pukul 12.47 WIB.

- Lestari. C.M.S., R. Adiwinarti, M. Arifin dan A. Purnomadi. 2011. The performance of java and ongole crossbred bull under intensive feeding management. *Journal of the indonesian tropical animal agriculture.* 36 (02) : 109-113. *DOI:* <https://doi.org/10.14710/jitaa.36.2.109-113>. Diakses pada tanggal 15 November 2020 pukul 10.00 WIB.
- Lima, J., M.D. Auffret, R.D. Stewart, R.J. Dewhusrt, C.A.Duthie, T. J. Snelling, A.W. Walker, T.C. Freeman., M.Eatson and R. Roehe. 2019. Identification of rumen microbial genes involved in pathways linked to appetite, growth, and feed conversion efficiency in cattle. *Frontiers in genetics.* *DOI:* [10.3389/fgene.2019.00701](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00701). Diakses pada tanggal 11 November 2020 pukul 08.00 WIB.
- Lingyu Yu, W. Zhang, L. Liu and J. Yang. 2015. Determining microukaryotic plankton community around xiamen island, southeast china, usinga illimina miseq and pcr-dgge techniques. *PLOS ONE.* 10 (5) : 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127721>. Diakses pada tanggal 15 November 2020 pukul 08.00 WIB.
- Lopez, M.L. G., J.A. Santos, A. Otero and J.M. R. Calleja. *Psychrobacter. Encyclopedia of food microbiology.* 3 : 261-268. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00285-8>. Diakes pada tanggal 08 Januari 2021 Pukul 09.52 WIB.
- Lowe, S. E., M. K. Theodorou and A.P. Trinci. 1987. Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. *Appl Environ Microbiol.* 53 (6) : 1210-1215. PMC203843. Diakses pada tanggal 18 April 2021 pukul 19.15 WIB.
- Lubis, K. 2014. Cara pembuatan pohon filogeni. *Jurnal pengabdian kepada masyarakat.* 20 (75): 66-69. <https://jurnal.unimed.ac.id/2012/index.php/jpkm/article/downloadSuppFile/4812/290>. Diakes pada tanggal 09 Januari 2020 pukul 13.16 WIB.
- Lutakome, P., Fred. K., Francis. T., Germana. H. L., Abiliza. K., Cyprian. E. 2017. Rumen Liquor From Slaughtered Cattle as Inoculum For Feed Evaluation. *Animal Nutrition.* Vol 3: 300-308. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.010>. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 15.32 WIB
- Lynd, L.R., P.J. Weimer, W. H. V. Zyn and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization : Fundamentals and Biotechonolgy. *Microbiology and Molecular Biologu Review.* 66 (3): 506-577. *DOI:* [10.1128/MMBR.66.3.506-577](https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577). Diakes pada tanggal 11 Februari 2021 pukul 12.57 WIB.
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., and Becker, K. 1995. Formation of Complexes between Polyvinyl Pyrrolidones or Polyethylenen Glycols and Tannin, and Their Implication In Gas Productionand True Digestibility In In Vitro Techniques. *British Journal of Nutrition.* (73) : 897-913. *DOI:* <https://doi.org/10.1079/BJN19950095>. Diakses pada tanggal 30 Maret 2021 pukul 09.35 WIB.

- Matlock, B. 2015. Assessment of nucleic acid purity. Thermo scientific. Technical note 52646. *Assessment of Nucleic Acid Purity (thermofisher.com)*. Diakses pada tanggal 27 Desember 2020 pukul 19.25 WIB.
- Moraru, C., A. Varsani and A. M. Kropinski. 2020. VIRIDIC-A novel tool calculate the intergenomics similarities of prokaryote-infecting viruses. *Viruses*. 12 :1268. doi:10.3390/v12111268. Diakses pada tanggal 12 Februari 2021 pukul 12.40 WIB.
- Munshi, A. 2012. DNA sequencing methods and applications. InTech. Croatia. ISBN : 978-953-51-0564-0
- Myer, P.R., Freetly, H.C., Wells, J.E., Smith, T.P.L. and Kuehn, L.A., 2017. Analysis of the gut bacterial communities in beef cattle and their association with feed intake, growth, and efficiency. *J. Anim. Sci.* 95: 3215.-322. DOI: 10.2527/jas.2016.1059. Diakses pada tanggal 20 November 2020 pukul 08.00 WIB.
- Naas, A.E., A.K. Mackenzie, J. Mravec, J. Schuckel, W.G.T. Willats, V.G.H. Eijssink and P.B.Pope. 2014. Do rumen *Bacterioedetes* utilize an alternative mechanism for cellulose degradation?. *Mbio*. 5(4): 1-14. doi:10.1128/mBio.01401-14. Diakses pada tanggal 29 Desember 2020 pukul 15.13 WIB.
- Neves, A. L. A., F. Li, B. Ghoshal, T. M.C. Allister and L.L. Guan. 2017. Enhancing the resolution of rumen microbial classification from metatranscriptomic data using kraken and mothur. *Frontiers in Microbiology*. 8 : 2445. doi: 10.3389/fmicb.2017.02445. Diakses pada tanggal 08 Februari 2021 pukul 08.05 WIB.
- Newbold, C.J., G. D. L. Fuente, A. Belanche, E. R. Morales and N. R. McEwan. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1313. doi: 10.3389/fmicb.2015.01313. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 14.56 WIB.
- Nielsen, M. K., MacNeil, M. D., Dekkers, J. C. M., Crews, D. H., Jr., Rathje, T. A., Enns, R. M., et al. (2013). Review: life-cycle, total-industry genetic improvement of feed efficiency in beef cattle: blueprint for the beef improvement federation. *Prof. Anim. Sci.* 29, 559–565. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30285-0](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30285-0). Diakses pada tanggal 17 November 2020 pukul 12.00 WIB.
- Ngadiyono, N., Murdjito, G., Agus A., dan Supriyan, U. 2008. Kinerja produksi sapi peranakan ongole jantan dengan pemberian dua jenis konsentrasi yang berbeda. *J. Indon Trop Anim Agric.* 33 (4) : 282-289. D:07. *JPPT-Management*# *HIBAH* (undip.ac.id). Diakses pada tanggal 17 November 2020 pukul 09.00 WIB.
- Nusi, M., R. Utomo dan Soeparno. 2011. Pengaruh penggunaan tongkol jagung dalam kompleed feed san suplementasi undegraded protein terhadap pertambahan bobot badan dan kualitas daging pada sapi Pernakan Ongole. *Buletin Peternakan* 35 (3) : 173-181. <https://journal.ugm.ac.id/bulletinpertanian/article/view/1090/917>. Diakses pada tanggal 29 Maret 2021 pukul 10.31 WIB.

- Orskov, E.R and I. McDonald. 1970. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric.Sci.Comb.* 92 (2) : 499-503. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>. Diakses pada tanggal 5 Juli 2021 pukul 10.54 WIB.
- Osorio, J.S., Vailati-Riboni, M., Palladino, A., Luo, J., and Loor, J.J. 2017. Application of nutrigenomics in small ruminants: lactation, growth, and beyond. *Small Ruminant Research*. 154 : 29-44. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.06.021>. Diakses pada tanggal 20 juli pukul 00.35 WIB.
- Partama, I.B.G., I.G.L.O. Cakra and A.A.A. Trisnadewi. 2014. Optimizing microbial protein synthesis in the rumen through supplementation with vitamin and mineral in ration based on king gradaa to increasing bali cattle productivity. *J. Biol. Chem.research*. 31 (2) : 822-840.
- Patrick, S. 2015. Bacteroides. Molecular Medical Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00051-2>. Diakses pada tanggal 9 Februari 2021 pukul 11.50 WIB.
- Patel, S. and P. Ambalam. 2018. Role of rumen protozoa : Metabolic and Fibrolytic. *Advances in Biotechnology & Microbiology*. 10 (4) : 001-006. DOI: [10.19080/AIBM.2018.10.555793](https://doi.org/10.19080/AIBM.2018.10.555793). Diakses pada tanggal 16 April 2021 pukul 10.56 WIB.
- Permata, D. W., M. Hirose dan M. Hidaka. 2008. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) methods on parent-offspring relationship of the coral pocillopora damicornis. *Ilmu kelautan*. 13 (3) : 139-146. eprints.undip.ac.id/1425/1/04_#0908#_Diah_Per mata139_-146.pdf. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 19.46 WIB.
- Penner, G.B., M. Taniguchi, L.L. Guan, K.A. Beauchemin and M. Oba. 2009. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. *J. Dairy Sci.* 92 : 2767-2781. doi:[10.3168/jds.2008-1716](https://doi.org/10.3168/jds.2008-1716). Diakes pada tanggal 09 Januari 2021 Pukul 08.50 WIB.
- Pertiwi, N.P.D., I.G.N.K. Mahardika dan N.L. Watiniyah.2015. Optimasi amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada ikan karang anggota famili *Pseudochromidae* (DOTTYBACK) untuk identifikasi spesies secara molekuler. *Jurnal Biologi*. 19(2): 1-5. e16cb70c516d768f86e4d3a3fcc8a6a4.pdf (unud.ac.id). Diakses pada tanggal 27 Desember 2020 pukul 20.21 WIB.
- Petri, R.M., T. Schwaiger, G.B. Penner, K.A. Beauchemin, R.J. Forster, J.J. McKinnon dan T.A. McAllister. 2013^a. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and environmental microbiology*. 79 (12) : 3744-3755. doi: [10.1128/AEM.03983-12](https://doi.org/10.1128/AEM.03983-12). Diakses pada tanggal 11 November 2020 pukul 13. 00 WIB.

- , 2013^b. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well during and after an acidotic challenge. *PLoS One* 8 (12) : e83424. doi:10.1371/journal.pone.0083424. Diakses pada tanggal 11 September 2021 pukul 21.00 WIB.
- Purbowati, E., E. Rianto, W. S. Dilaga, C. M. S. Lestari dan R. Adiwinarti. Karakteristik cairan rumen, jenis, dan jumlah mikroba dalam rumen sapi jawa dan Peranakan Ongole. *Buletin Peternakan*. 38(1) : 21-26. <https://jurnal.ugm.ac.id/buletinperternakan/article/view/4609/3875>. Diakses pada tanggal 11 Januari 2020 pukul 7.00 WIB.
- Ransa, C. P., R.A.V. Tuturoong, A.F. Pendong dan M.R. Waani. Kecernaan NDF dan ADF Pakan lengkap berbasis tebon jagung pada sapi FH. *Zootec*. 40 (2) : 542-551. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 20.31 WIB.
- Rey, M., F. Enjalbert, S. Combes, L. Cauquil, O. Bouchez and V. Monteils. 2013. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *Journal of Applied Microbiology*, 166 : 245-257. doi:10.1111/jam.12405. Diakses pada tanggal 26 Juni pukul 19.50 WIB.
- Rienzi, S.C.D., I. Sharon, K. C. Wrighton, O.K., L.A Hug, B.C. Thomas, J. K. Goodrich, J. T. Bell, T. D. Spector, J. F. Banfield and R. E. Ley. 2013. The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate Phylum sibling to *Cyanobacteria*. *eLife*. 2. doi: 10.7554/eLife.01102. Diakes pada tanggal 08 Februari 2021 pukul 08.17 WIB.
- Ruan, Y., L. Shen, Y. Zou, Z. Qi, J. Yin, J. Jiang, l. Guo, L. He, Z. Chen, Z. Tang and S. Qin. 2015. Comparative genome analysis of prevotella intermedia strain isolated from infected root canal reveals features related to pathogenicity and adaptation. *BMC Genomic*. 16: 122. DOI 10.1186/s12864-015-1272-3. Diakes pada tanggal 12 Februari 2021 pukul 13.50 WIB.
- Russell, J.B and R.B. Hespell. 1981. Microbial rumen fermentation. *Journal of dairy science*. 64 (6): 1153-1169. doi:10.3168/jds.s0022-0302(81)82694-x. Diakes pada tanggal 08 Januari 2020 pukul 17.32 WIB.
- Romagnoli, E.M., M.C.P. Kmit, J.B. Chiaramonte, M. Rossmann and R. Mendes. 2017. Ecological aspect on rumen microbiome. Springer International Publishing, Brazil.
- Sambrook, J.F and D.W Russel. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. ISBN: 978-0-87969-577-4.
- Sari, N.F. 2017. Mengenal keragaman mikroba rumen pada perut sapi secara molekuler. *Bio Trends*. 8 (1): 5-9. (pdf) mengenal keragaman mikroba rumen pada perut sapi secara molekuler (researchgate.net). Diakses pada tanggal 10 November 2020 pukul 08.00 WIB.

- Seunguk, L., Valerie S.L.K., Carl A. D. M., Taewoo, L., Sung. Y., Sungwoo, B. 2019. Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple dna DNA extraction and porTabel. s loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods. *Water Research.* 160 : 371-379. doi: 10.1016/j.watres.2019.05.049. Diakses pada tanggal 20 November 2020 pukul 10.00 WIB.
- Sha, Y., J. Hu, B. Shi, R. Dingkao, J. Wang, S. Li, W. Zhang, Y. Luo and X. Liu. 2020. Characteristics and Functions of the Rumen Microbial Community of Cattle-Yak at Different Ages. *Biomed Research Internatonal.* <https://doi.org/10.1155/2020/3482692>. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 09.03 WIB.
- Shin, N.R., T.W. Whon, and J. W. Bae. 2015. *Proteobacteria* : microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology.* 8 : 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011> . Diakes pada tanggal 08 Januari 2021 Pukul 10.33 WIB.
- Soetanto, H. 2019. Pengantar ilmu nutrisi ruminansia. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang. ISBN : 978-602-432-746-0.
- Spring,S., M. Visser, M. Lu., A. Coleland., A. Lapidus, S. Lucas, J. F. Cheng, C. Han, R. Tapia, L.A. Goodwin, S. Pitluck, N. Ivanova, M. Land, L. Hauser, F. Larimer, M. Rohde, M. Goker, J.C. Detter, N. Krypides, T. Woyke, P.K. Schaap, C.M. Plugge, G. Muyzer, J. Kuever, I.A.C, Pereira, S.N. Parshina, R. Bernier-latmani, A.J.M. Stams and H.P. Klenk. 2012. Complete genome sequence of the sulfater-reducing firmicute *Desulfotomaculum ruminis* type strain (DLT). *Standards in Genomic Sciences* 7 : 304-319. <https://doi.org/10.4056/sigs.3226659> . Diakses pada tanggal 12 Februari 2021 pukul 14.20 WIB.
- Stevenson, D. M and P. J. Weimer. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75 : 165-174. DOI 10.1007/s00253-006-0802-y. Diakses pada tanggal 07 Januari 2021 pukul 16.24 WIB.
- Strathdee, F. And A. Free. 2013. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). 1054 : 145-157. Springer Science+Business Media New York. DOI 10.1007/978-1-62703-565-1_9. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 21.53 WIB.
- Suryani, N.N., I.W. Suarna, I.G. Mahardika and N.P. Sarini. 2020. Rumen fermentation and microbial protein synthesis of Bali cattle heifers (*Bos sondaicus*) fed ratio containing different energy protein level. *Jurnal sains peternakan Indonesia.* 15 (2) : 187-194. DOI: <https://doi.org/10.31186/jspi.id.15.2.187-194>. Diakses pada tanggal 29 Maret 2021 pukul 12.06 WIB.
- Suryani, N.N., I.G. Mahardika, S. Putra dan N. Sujaya. 2015. Pemberian gamal tamnahaan dalam ransum meningkatkan neraca nitrogen dan populasi mikrob proteolotik rumen SB. *Jurnal veteriner.* 16 (1) : 117-123.

- Sutarno dan A.D. Setyawan. 2015a. Review: genetic diversity of local and exotic cattle and their crossbreeding impact on the quality of indonesia cattle. *Biodiversitas.* 16 (2) : 327-354. DOI: 10.13057/biodiv/d160230. Diakses pada tanggal 21 November 2020 pukul 08.00 WIB.
- Sutarno dan A.D. Setyawan. 2016b. Review: the diversity of local cattle in indonesia and the efforts to develop superior indegenous cattle breeds. *Biodiversitas.* 17 (1) : 275-295. DOI: 10.13057/biodiv/d170139. Diakses pada tanggal 17 November 2020 pukul 08.00 WIB.
- Thoetkiattikul, H., W. Mhuantong, T. Laothanachareon, S. Tangphatsornruang, V. Pattarajinda, L. Eurwilaichitr and V. Champreda. 2013. Compatative Analysis of Microbial Profiles in Cow Rumen Fed with Different Dietary Fiber by Tagged 16SrRNA gene Pyrosequencing. *Curr Microbiol.* 67 : 130-137. DOI 10.1007/s00284-013-0336-3. Diakses pada tanggal 29 Desember 2020 pukul 13.19 WIB.
- Umar, M., M. Arifin and A. Purnomoadi. 2011. Ruminal condition between Madura cattle and Ongole cattle raised under intensive feeding. *J. Indonesian Trop. Anim Agric.* 36 (3) : 213-128. 7502-16336-1-SM.pdf. Diakses pada tanggal 28 Maret 2021.
- Urrutia, N. and K. J. Harvatine. 2017. Acetate dose-dependently stimulates milk fat synthesis in lactating dairy cows. *The journal of nutrition.* Doi: 10.3945/jn.116.245001. Diakses pada tanggal 30 Maret 2021 pukul 11.15 WIB.
- Van Soest PJ, 1994. Nutritional ecology of the ruminant, second edn. Cornell University Press: New York. USA.
- Vasta V., D.R Yanez-Ruiz, M. Mele, A. Serra, G. Luciano, M. Lanza, L. Biondi, and A. Priolo. 2010. Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumen of sheep fed a diet containing added tannins. *Appl Environ Microbiol* 76:2549–2555. DOI: 10.1128/AEM.02583-09. Diatggkses pada tanggal 20 Desember 2020 pukul 21.04 WIB.
- Vandamme, P., B. POT, M. Gillis, P. D. Vos, K. Kerters and J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiological reviews.* 60 (2) : 407-438. 0146-0749/96/\$04.0010. Diakes pada tanggal 12 Februari 2021 pukul 13.14 WIB.
- Wang, J., T. Ma, L. Zhao, Jinghua Lv., Guoqiang L., Fenglai L and R. Liu. 2008. PCR-DGGE method for analyzing teh bacterial in a hight temperature pertroleum reservoir. *World J. Microbiol biotechnol.* 24 : 1981-1987. DOI: 10.1007/s11274-008-9694-6. Diakses pada tanggal 19 November 2020 pukul 15.00 WIB.
- Wang, Y., R. M. Tian., Z. M. Gao., S. Bougouffa and P.Y. Qian. 2014. Optimal eukaryotic 18 S and Universal 16S/18S Ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis. *Plos One.* 9 (3): 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0090053. Diakses pada tanggal 21 Desember 2020 pukul 08.39 WIB.

- Wattiaux, M. A. and L. E. Armentano. 1998. Carbohydrate metabolism in Dairy Cows. *Babcock Institute for International Dairy Research and Development University of Wisconsin-Madison. Dairy Essential.* 240 Agriculture Hall, 1450 Linden Dr., Madison, WI 53706 USA, phone: 608-265-4169, babcock@calshp.cals.wisc.edu. Diakses pada tanggal 28 Maret 2021 pukul 10.30 WIB
- Whitehead, T. R. and R. B. Hespell. 1990. The genes for three xylan-degrading Activities from Bacteroides ovatus Are Clustured in a 3.8-kilobase region. *Journal of Bacteriology.* 172 (5) : 2408-2412. <https://jb.asm.org/content/jb/172/5/2408.full.pdf>. Diakses pada tanggal 9 Februari 2021 pukul 12.19 WIB.
- LieWang, K. Zhang, C. Zhang, Y. Feng, X. Zhang, X. Wang and G. Wu. 2019. Dynamic and stabilization of the rumen microbiome in yearling Tibetan sheep. *Scientific Report.* 9 :19620. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56206-3>. Diakses pada tanggal 07 Januari 2021 pukul 15.47 WIB.
- Weimer, P.J. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in Microbiology.* 6 : 1-16. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00296 . Diakses pada tanggal 19 November 2020 pukul 16.00 WIB.
- Wereszka K, T Michalowski. 2012. The ability of the rumen ciliate protozoan Diploplastron affine to digest and ferment starch. *Folia Microbiol* 57: 375-377. doi: 10.1007/s12223-012-0146-1. Diakses pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 15.45 WIB.
- Yáñez-Ruiz DR, A Moumen, AI Martín García, E Molina Alcaide. 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J Anim Sci* 82, 2023-2032. Diakes pada tanggal 26 Juni 2021 pukul 15.06 WIB.
- Yanuarto, H. Purnamaningsih, S. Indarjulianto dan A. Nururrozi. 2017. Potensi jerami sebagai pakan ternak ruminansia. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan.* 27(1) : 40-62. DOI : 10.21776/ub.jiip.2017.027.01.05. Diakses pada tanggal 07 Januari 2021 Pukul 19.07 WIB.
- Zeineldin, M., R. Barakat, A. Elolimy, A. Z. M. Salem, M. M. Y. Elghandour and J. C. Monroy. 2018. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microbial Pathogenesis.* 124 : 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.038>. Diakses pada tanggal 19 April 2021 pukul 10.20 WIB.
- Zhang, Y., F. Li, Y. Chen, H. Wu, Q. Meng and L.L.Guan. 2020. Metatranscriptomic profiling reevals the effect of breed on active rumen eukaryotic composition in beef cattle with varied feed efficiency. *Frontiers in microbiology.* 11: 367. doi: 10.3389/fmicb.2020.00367. Diakses pada tanggal 08 Juli 2021 pukul 10.00 WIB.
- Zhao, L., Q. Meng, L. Ren, W. Liu, X. Zhang, Y. Huo and Z. Zhou. 2015. Effect of Nitrate Addition on Rumen Fermentation Bacterial Biodiversity and Abundance, *Asian*

australas. J. Anim. Sci. 28 (10): 1433-1441. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.15.0091>.
Diakses pada tanggal 15 April 2021 pukul 11.27 WIB.



LAMPIRAN**lampiran 1. Prosedur Pengukuran Kadar Bahan Kering dan Abu (AOAC, 1995).****Prosedur :**

1. Dimasukkan cawan porselin yang tahan pada panas tinggi dalam oven 105°C (1 jam)
2. Diambil cawan dan dimasukkan eksikator dengan tang penjepit (1 jam)
3. Dimasukkan sampel 5 gram dalam cawan dan ditimbang kembali (berat B) g
4. Dimasukkan oven 105°C (4 jam)
5. Diambil cawan dan dimasukkan eksikator (1 jam) Ditimbang beratnya (berat C) g dengan tang penjepit
6. Dimasukkan cawan yang telah ditimbang ke dalam tanur ($550\text{-}60^{\circ}\text{C}$) selama 4 jam.
7. Diambil cawan dan dimasukkan eksikator (1 jam) Ditimbang beratnya (berat D) gram dengan tang penjepit
8. Dihitung kadar BK =
$$\frac{C - A}{B - A} \times 100\%$$
9. Dihitung kadar ABU =
$$\frac{D - A}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan

A g = berat cawan sebelum dioven

B g = berat cawan + sampel sebelum dioven

C g = berat cawan + sampel setelah dioven

D g = berat cawan + sampel setelah di Tanur

Lampiran 2. Prosedur Analisis Kandungan Acid Detergent Fiber (ADF) (Goering and Van Soest, 1970)

Prosedur :

1. Ditimbang cawan (Berat A)
2. Ditimbang sampel sebanyak $0.5 \pm 0,0040$ g (Berat B)
3. Dimasukkan ke dalam gelas *beaker* 500 mL
4. Ditambahkan sebanyak 100 mL larutan ADF
5. Dipanaskan selama 5 sampai 6 menit sampai mulai panas kemudian dihitung waktu pemanasannya selama 60 menit sambil di *reflux* dengan aliran air.
6. Setelah 60 menit pendidihan, bahan larutan disaring secara pelan-pelan menggunakan cawan
7. Sampel dibilas dengan aquades panas 150 ml dan dengan aseton 40 ml kemudian dapat dikeringkan.
8. Cawan dikeringkan minimal selama delapan jam pada oven suhu 105 °C.
9. Cawan diletakkan dalam eksikator selama 1 jam.
10. Cawan di timbang (Berat C)

$$\text{Dihitung kadar ADF} = \frac{C - A}{B} \times 100\%$$

Keterangan

A g = berat cawan

B g = berat sampel

C g = berat cawan + sampel setelah dioven

lampiran 3. Prosedur Analisis Kandungan Neutral Detergent Fiber (NDF) (Goering and Van Soest, 1970)

Prosedur :

1. Ditimbang cawan (Berat A)
2. Ditimbang sampel sebanyak $0.5 \pm 0,0040$ g (Berat B)
3. Dimasukkan ke dalam gelas beaker 500 mL
4. Ditambahkan sebanyak 100 mL larutan ADF
5. Dipanaskan selama 5 sampai 6 menit sampai mulai panas kemudian dihitung waktu pemanasannya selama 60 menit sambil di reflux dengan aliran air.
6. Setelah 60 menit pendidihan, bahan larutan disaring secara pelan-pelan menggunakan cawan
7. Sampel dibilas dengan aquades panas 150 ml dan dengan aseton 40 ml kemudian dapat dikeringkan.
8. Cawan dikeringkan minimal selama delapan jam pada oven suhu 105°C .
9. Cawan diletakkan dalam eksikator selama 1 jam.
10. Cawan di timbang (Berat C)

$$\text{Dihitung kadar NDF} = \frac{C - A}{B} \times 100\%$$

Keterangan

A g = berat cawan

B g = berat sampel

C g = berat cawan + sampel setelah dioven

- Alat:**
1. Termos berukuran 2 liter
 2. Termometer
 3. pH meter
 4. Sarung Tangan (gloves)
 5. Kain Saring
- Bahan:**
1. Air hangat (suhu 40°C)
 2. Cairan rumen
- Prosedur:**
1. Disiapkan termos berukuran 2 liter yang telah berisi air hangat
 2. Dilakukan seleksi pada ternak lokal yaitu SPO, SB dan SM.
 3. Dilakukan pembuangan air hangat di dalam termos untuk wadah cairan rumen.
 4. Dilakukan sobekan ± 10 cm pada rumen ternak yang terpilih.
 5. Pengambilan cairan rumen pertama dimasukkan kedalam termos dan dikocok setelah itu dibuang.
 6. Pengambilan cairan rumen dilakukan di beberapa titik sehingga harapannya sampel yang diambil homogen
 7. Dilakukan penampungan cairan rumen dan digesta hingga termos penuh
 8. Setelah termos terisi semua, cairan rumen dengan segera dibawa ke laboratorium nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya untuk digunakan sebagai sumber inokulum dan dianalisis pada tahap selanjutnya.

lampiran 5. Prosedur evaluasi pakan dengan metode in vitro gas production (Makkar et.al., 1995)

Bahan:

1. Aquades
2. Larutan buffer (NaHCO_3 35g/liter dan NH_4HCO_3 4 g/liter),
3. Makro mineral ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5,7 g, KH_2PO_4 6,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g dan NaCl 2,22 g/liter),
4. Mikro mineral ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13,2 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,8 g, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,8 g/liter)
5. Larutan rezasurin
6. Reduktor ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g, NaOH 1 N 3,7 ml)
7. Gas CO_2
8. Vaselin

Alat:

1. Timbangan analitik
2. Syringe dengan kalibrasi 100 ml
3. Selang plastik (panjang 4-5 cm) yang ditutup dengan klep besi
4. Tabung erlenmeyer 2500 ml
5. Inkubator
6. Termos tabung CO_2
7. Termometer
8. Stirrer

Prosedur:

1. Sampel digiling dengan ukuran 1 mm dan ditimbang sebanyak 500 mg BK dengan masing-masing perlakuan dibuat duplo, dimasukkan dalam dasar *syringe* dan ditutup dengan piston yang telah diolesi vaselin tetapi tidak sampai menyentuh sampel.
2. Ujung *syringe* dihubungkan dengan selang karet silikon yang panjangnya sampai 5 cm dan ditutup dengan klip plastik.
3. Cairan rumen disaring terlebih dahulu lalu dicampur dengan larutan *buffer* (perbandingan 1:3:41) pembuatan larutan *buffer* terdiri dari campuran $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5,7 g, KH_2PO_4 6,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g dan NaCl 2,22 g, Larutan mikrominerale terdiri dari (dalam 10 ml aquadest) yaitu $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13,2 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,8 g.
4. Larutan rezasurin dibuat dari campuran rezasurin dengan 100 ml aquadest
5. Reductor solvent terdiri dari 0,6 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ dicampur dengan NaOH 1 N sebanyak 3,7 ml yang dibuat sesaat sebelum mengambil cairan rumen.
6. Larutan buffer terdiri dari aquadest: 1095 ml, buffer: 730 ml, makro mineral: 0,23 ml, rezasurin: 1 ml dan reduktor 60 ml.
7. Larutan *buffer* campuran ini dimasukkan ke dalam labu, dicampur dan dipanaskan pada suhu 39°C dalam *magnetic stirrer*. Gas CO_2 dialirkan, sementara itu ditambahkan

- larutan reduktor. Larutan yang berwarna kebiru-biruan akan menjadi agak merah kemudian menjadi tidak berwarna.
8. Cairan rumen yang telah disaring dengan kain nilon dimasukkan ke dalam labu apabila indikator sudah berubah menjadi tidak berwarna. Penambahan CO₂ diteruskan setelah cairan rumen dimasukkan dalam labu.
9. Campuran larutan *buffer* dan cairan rumen sebanyak 50 ml dimasukkan ke dalam setiap *syringe* yang berisi sampel dengan menggunakan dispenser. Diusahakan pada saat memasukkan larutan campuran ke dalam *syringe* tidak ada gelembung-gelembung udara di dalamnya.
10. Klip plastik pada selang silicon ditutup dan dicatat volumenya (V₀), kemudian *syringe* ditempatkan dalam *waterbath* pada suhu 39°C.
11. Volume gas dicatat setelah inkubasi 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 jam.
- Produksi gas (ml/500 mg BK) = {(V_t - V₀) - V_b} * FK
- Keterangan:
- V_t = Volume gas pada t jam (ml)
- V₀ = Volume gas blanko pada saat t jam—blanko pada saat 0 jam (ml)
- V_b = Volume blanko (ml)
- FK = Faktor koreksi (500 mg/sampel yang digunakan)

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 lampiran 6. Isolasi DNA (Sambrooh, 1989)

1. Preparasi Sampel

➤ Sampel cairan rumen

Di ambil dari freezer – 20 °C.

Di thawing dengan cara di gosok-gosok hingga encer

Dipindahkan pada micrortube baru sebanyak 500 µl atau 0,5 ml

Dimasukkan pada freezer -20 °C (untuk sisa sampel)

2. Pembuatan Larutan Buffer lysis dan PCI

➤ Bahan pembuatan Larutan Buffer Lysis (disesuaikan dengan jumlah sampel @500 - 1000 µl)

Contoh perhitungan dengan 9.000 µl atau 9 ml

1. EDTA

$$\begin{aligned} 0,5 \text{ M} \cdot X &= 0,025 \times 9.000 \mu\text{l} \\ &= 225/0,5 \\ &= 450 \mu\text{l} \end{aligned}$$

2. Tris cl

$$\begin{aligned} 1 \text{ M} \cdot X &= 0,01 \times 9.000 \mu\text{l} \\ &= 90/1 \\ &= 90 \mu\text{l} \end{aligned}$$

3. Nacl

$$\begin{aligned} 5 \text{ M} \cdot X &= 100\text{mM} \times 9.000 \mu\text{l} \\ &= 0,1/5 \times 9000 \\ &= 180 \mu\text{l} \end{aligned}$$

4. SDS

10% . X	= 1% x 9 ml
	= 0,1/9 = 0,9 ml
	= 900 µl

5. Proteinase- K

100mg/ml . X	= 0,01 mg/ml x 9.000 µl
	= 900/100
	= 9 µl

Larutan Buffer Lysis

EDTA = 450 µl

Tris Cl = 90 µl

NaCl = 180 µl

SDS = 900 µl

Proteinase -K = 10 µl

Aquadest = jumlah larutan yang

dibutuhkan – jumlah larutan

selain aquadest

= 9.000 µl – 1.630 µl

= 7.3.30 µl

Larutan PCI (Phenol Choloform dan Isoamil Alkohol (25:24:1) (sesuaikan dengan kebutuhan) ex 7.500 µl

1. Phenol (25%)

= 25/50 * 7500 µl

= 3.750 µl

2. Chloroform

= 24/50 * 7500 µl

= 3.600 µl

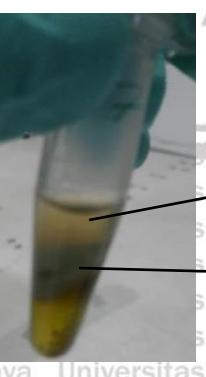
3. Isoamil Alkohol

= 1/50 * 7500 µl

= 150 µl

3. Isolasi DNA

1. Sampel di dalam microtube ditambahkan larutan buffer lysis (500 µl)
2. divortex selama 5 menit (Hingga homogen)
3. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 Jam (@10 Menit di gentle)
4. Disentrifugasi 10.000 rpm; 25 °C selama 10 menit (8.900 g)
5. Disiapkan microtube 1,5 ml sebanyak sampel atau 2 x sampel untuk memindahkan supernatan dan pellet.



Supernatan

Pellet

6. Ditambahkan 1 x Volume PCI (500 µl) dibolak-balik
7. Disentrifugasi 10.000 rpm, 25 °C, 10 menit
8. Supernataan di tambahkan 2,5 x volume ethanol absolut dingin
9. Diinkubasi selama 5 menit pada – 20 °C

10. Disentrifugasi 10.000 rpm, 4 °C, 10 menit
 11. Supernatan dibuang
 12. Hasil endapan warnanya coklat atau putih
 13. Ditambahkan 2 x Volume ethanol 70% % (endapan berwarna Putih dan Coklat)
 14. Disentrifugasi 10.000 rpm, 4°C, 10 menit
 15. Supernatan dibuang
 16. Dikering anginkan selama 1 jam hingga tidak berbau ethanol
 17. Ditambahkan buffer pH 7,6 (50 µl)
 18. Disimpan di Suhu -20 C
- Uji Kuantitatif**
- Hasil Ekstraksi DNA di Nanodrop (LSIH UB) (harus menggunakan Box yang berisi es batu) untuk melihat kemurnian dan konsentrasi DNA.

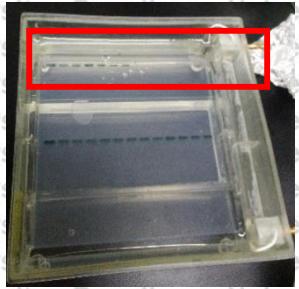
Uji Kualitatif

4. Elektrroforesis Gel Agarose 1,5 %

1. Agarose 1,5 % dengan (TBE 70 ml untuk 2 gel dan 35 ml untuk 1 gel (12 sampel))
 $= 1,5\% * 70 = 1,05$ gram agarose + TBE 70 ml
2. Didihkan pada hot plate
3. Didinginkan sebentar dan ditambahkan ETBR 0,5 µl (dihomogenkan)
4. Dituang pada cetakan (bila ada gelembung udara di tusuk dengan tip agar tidak ada gelembung udara di cetakan). Didiamkan selama 30 menit



5. Dipindahkan pada sumuran elektroforesis dengan posisi seperti dibawah ini



6. Ditambahkan TBE khusus Running hingga gel tenggelam (TBE running hanya digunakan untuk 5x)
7. Dimasukkan sampel dengan urutan sumur 1 (Marker 1kb jenis untuk sampel hasil ekstraksi DNA dan 100 bp untuk sampel yang sudah di PCR) sebanyak 3 µl, selanjutnya dimasukkan sesuai urutan sampel
8. Di atur tekanan 100 Volt selama 30 menit.
9. Dilihat hasil dengan sinar UV di LSIH UB. (harus dibawa dengan box yang berisi TBE running dan di bawa dengan Box berisi es Batu)

- Lampiran 7. Prosedur Analisis Polymerase Chain Reaction (PCR)**
- Prosedur :**
1. Disiapkan sampel (menggunakan wadah es) di Thawing
 2. Disipkan larutan PCR Mix yang terdiri dari DDH₂O, primer, gotagreen dan DNA bakteri
 3. Pencampuran dilakukan dengan penambahan larutan PCR Mix kemudian DNA Menggunakan *mini microtube* (dilakukan dengan sampel diletakkan di wadah es).
 4. Selanjutnya dilakukan program PCR yaitu *Pre-Denaturation* 94 °C selama 4 menit, *Denaturation* 94 °C selama 30 detik, *Anneling* 56 °C selama 30 detik, *Extention* 68°C selama 1 menit dan *Post Extention* 68 °C selama 7 menit, keseluruhan program menggunakan 30 siklus (Walter, 2000).
 5. Dilihat hasil PCR dengan elektroforesis dengan gel agarose 1,5% dan marker 100 bp.



lampiran 8. Tabel SPSS Nilai b dan c
SPO (syringe 17-18)

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b	111.195	2.140	105.695	116.695
c	.092	.004	.080	.103

SPO (syringe 19-20)

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b	111.195	2.140	105.695	116.695
c	.092	.004	.080	.103

SM (syringe 27)

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b	109.401	6.864	91.756	127.047
c	.051	.006	.035	.067

SM (syringe 28)

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b	102.558	7.809	82.484	122.633
c	.052	.008	.032	.073

SB (syringe 17)

universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b	111.084	3.743	101.462	120.706
c	.049	.003	.041	.057

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

SB (syringe 18)

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b	110.848	2.067	105.534	116.162
c	.048	.002	.043	.052

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

lampiran 9. Hasil Analisis Statistik Produksi Gas, Nilai b dan Nilai c

Perlakuan	Kelompok	Total	Rata-rata	SD
	1	2		
SPO	111,263	122,3338	233,5968	116,7984
SM	101,1494	97,5699	198,7193	99,35965
SB	101,3854	100,0897	201,4751	100,7376
Total	313,7978	319,9934	633,7912	
Rata-rata	104,5993	106,66447		
SD	5,772169	13,628402		

$$\begin{aligned} \text{SD (SPO)} &= \sqrt{\frac{\sum(X_i^2) - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}} \\ &= \sqrt{\frac{\sum(111,263^2 + 122,3338^2) - \frac{(233,5968^2)}{2}}{1}} \\ &= 7,828238 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{FK} &= (\sum Y_{ij}^2) / (t \times r) \\ &= (633,7912)^2 / (3 \times 2) \\ &= 66948,55 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= \sum(Y_{ij}^2) - \text{FK} \\ &= (111,263^2 + 122,3338^2 + 101,1494^2 + 97,5699^2 + 101,3854^2 + 100,0897^2) - 66948,55 \\ &= 444,5001 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= ((\sum Y_i^2) / r) - \text{FK} \\ &= ((233,5968^2 + 198,7193^2 + 201,4751^2) / 2) - 66948,55 \end{aligned}$$

$$= 375,973$$

$$\begin{aligned} \text{JK Kelompok} &= ((\sum Y_j^2) / t) - \text{FK} \\ &= ((313,7978^2 + 319,9934^2) / 2) - 66948,55 \\ &= 6,397577 \end{aligned}$$

$$\text{JK Galat} = \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} - \text{JK Kelompok}$$

$$= 444,5001 - 375,973 - 6,397577$$

$$= 62,12956$$

	SK	db	JK	KT	Fhitung	Ftabel
Perlakuan		1	375,97301	375,973	12,10287	18,51282
Kelompok		2	6,3975766	3,198788	0,102972	19
Galat		2	62,129559	31,06478		99
Total		5	444,50014			

Keterangan: Perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap nilai produksi gas.

	Nilai b (Potensi produksi gas)	Kelompok	Total	Rata-rata	SD
SPO	111,195	120,497	231,692	115,846	6,57750728
SM	109,401	102,558	211,959	105,9795	4,8387317
SB	111,084	110,848	221,932	110,966	0,1668772
Total	331,68	333,903	665,583		
Rata-rata	110,56	111,301			
SD	1,00525668	8,97807535			

$$\text{SD (SPO)} = \sqrt{\frac{\sum(X_i^2) - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{\sum(111,195^2 + 120,497^2) - \frac{(231,692^2)}{2}}{1}}$$

$$= 6,57750728$$

$$\text{FK} = (\sum Y_{ij})^2 / (t \times r)$$

$$= (665,583)^2 / (3 \times 2)$$

$$= 73833,455$$

$$\text{JK Total} = \sum(Y_{ij})^2 - \text{FK}$$

$$= (111,195^2 + 120,497^2 + 109,401^2 + 102,558^2 + 111,084^2 + 110,848^2) - 73833,455$$

$$= 164,056377$$

$$\text{JK Perlakuan} = ((\sum Y_i^2) / r) - \text{FK}$$

$$= ((231,692^2 + 211,959^2 + 221,932^2) / 2) - 73833,455$$

$$\text{JK Kelompok} = ((\sum Y_j^2) / t) - \text{FK}$$

$$= ((331,68^2 + 333,903^2) / 3) - 73833,455$$

$$= 0,8236215$$

$$= 0,8236215$$

$$= 0,8236215$$

$$= 0,8236215$$

$$= 0,8236215$$

		JK Galat			KT Kelompok			KT Perlakuan			Fhitung Kelompok			Fhitung Perlakuan			ANOVA					
		db	JK	KT	Ftersitas	B	Fhitung	db	JK	KT	Ftersitas	B	Fhitung	db	JK	KT	Ftersitas	B	Fhitung	Ftabel	0,05	0,01
Perlakuan		1	97,351603	97,351603	2,95537035		18,5128205		98,5025126													
Kelompok		2	0,8236215	0,41181075	0,01250163		19		99													
Galat		2	65,881153	32,9405765																		
Total		5	164,056377																			

Kesimpulan: Perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap nilai b.

Nilai c (Laju produksi gas)	Perlakuan		Total	Rata-rata	SD
	1	2			
SPO	0,092	0,106	0,198	0,099	0,00989949
SM	0,051	0,052	0,103	0,0515	0,00070711
SB	0,049	0,048	0,097	0,0485	0,00070711
Total	0,192	0,206	0,398		
Rata-rata	0,064	0,068666667			
SD	0,024269322	0,032393415			

$$\text{SD (SPO)} = \sqrt{\frac{\sum(X_i^2) - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{\sum(0,092^2 + 0,106^2) - \frac{(0,198^2)}{2}}{1}}$$

$$= 0,00989949$$

$$\text{FK} = (\sum Y_{ij})^2 / (t \times r)$$

$$= (0,398)^2 / (3 \times 2)$$

$$= 0,026400667$$

$$\text{JK Total} = \sum(Y_{ij}^2) - \text{FK}$$

$$= (0,092^2 + 0,106^2 + 0,051^2 + 0,052^2 + 0,049^2 + 0,048^2) - 0,026400667$$

$$= 0,003309333$$

$$\text{JK Perlakuan} = ((\sum Y_i^2) / r) - \text{FK}$$

$$= ((0,198^2 + 0,103^2 + 0,097^2) / 2) - 0,026400667$$

$$= 0,003210333$$

$$\text{JK Kelompok} = ((\sum Y_j^2) / t) - \text{FK}$$

$$= ((0,192^2 + 0,206^2) / 3) - 0,026400667$$

$$= 3,26667$$

$$\text{JK Galat} = \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} - \text{JK Kelompok}$$

$$= 0,003309333 - 0,003210333 - 3,26667$$

$$= 6,63333$$

	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya
	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
KT Kelompok	= JK Kelompok / db Kelompok				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
	= 3,26667 / 2				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
KT Perlakuan	= JK Perlakuan / db Perlakuan				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
	= 0,00321033 / 1				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
KT Galat	= JK Galat / db Galat				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
	= 0,00321033				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Fhitung Kelompok	= KT Kelompok / KT Galat				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
	= 1,6333 / 3,3167				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
	= 0,49246231				Universitas Brawijaya
Fhitung Perlakuan	= KT Perlakuan / KT Galat				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
	= 0,00321033 / 3,3167				Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya		Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
	= 96,7939698				Universitas Brawijaya

ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	Ftabel
Perlakuan	1	0,00321033	0,00321033	96,7939698	18,5128205
Kelompok	2	3,26667	1,6333	0,49246231	19
Galat	2	6,63333	3,3167		99
Total	5	0,003309333			

Fhitung > Ftabel (0,05)

Keterangan: Cairan rumen dari tiga jenis bangsa sapi lokal yang diberikan perlakuan pakan lengkap berbeda sangat nyata terhadap nilai c (Laju produksi gas), maka dilanjutkan dengan uji BNT.

$$SE = \sqrt{\frac{KT_{galat} x^2}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{3,3167 x 2}{2}}$$

$$= 0,005759051$$

$$Uji BNT 5\% = 0,024779196$$

Hasil Uji BNT

Perlakuan	Rata-rata	notasi
SB	0,0485	a
SM	0,0515	a
SPO	0,099	b

Keterangan: a-b yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P>0,01$)



lampiran 10.Hasil Analisis Statistik KcBK dan KcBO
 Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya
KcBK

Perlakuan	Kelompok	Total	Rata-rata	SD
	1	2		
SPO	53,1975	48,395	101,5925	50,79625
SM	29,5818	37,3427	66,9245	33,46225
SB	42,2818	43,4219	85,7037	42,85185
Total	125,0611	129,1596	254,2207	0,806172
Rata-rata	41,68703	43,0532		
SD	11,81908	5,5353671		

$$SD (SPO) = \sqrt{\frac{\sum(X_i^2) - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{\sum(53,1975^2 + 48,395^2 + 29,5818^2 + 37,3427^2 + 42,2818^2 + 43,4219^2) - \frac{(101,5925^2)}{2}}{1}}$$

$$= 3,39588$$

$$FK = (\sum Y_{ij}^2) / (t \times r)$$

$$= (254,2207)^2 / (3 \times 2)$$

$$= 10771,36$$

$$JK Total = \sum(Y_{ij}^2) - FK$$

$$= (53,1975^2 + 48,395^2 + 29,5818^2 + 37,3427^2 + 42,2818^2 + 43,4219^2) - 10771,36$$

$$= 343,4615$$

$$JK Perlakuan = ((\sum Y_i^2) / r) - FK$$

$$= ((101,5925^2 + 66,9245^2 + 85,7037^2) / 2) - 10771,36$$

$$JK Kelompok = ((\sum Y_j^2) / t) - FK$$

$$= ((125,0611^2 + 129,1596^2) / 3) - 10771,36$$

$$= 2,799617$$

	JK Galat	JK Total	JK Perlakuan	JK Kelompok	Fhitung	Ftabel
JK Galat		= JK Total – JK Perlakuan – JK Kelompok				
JK Total		= 343,4615 – 301,1638 – 2,799617				
JK Perlakuan		= 39,49808				
JK Kelompok		= 39,49808 / 2				
KT Kelompok		= 19,74904				
KT Galat		= 19,74904 / 2				
KT Galat		= 9,74904				
Fhitung Kelompok		= 9,74904 / 19,74904				
KT Galat		= 0,07088				
KT Galat		= KT Kelompok / KT Galat				
KT Perlakuan		= KT Perlakuan / KT Galat				
Fhitung Perlakuan		= KT Perlakuan / KT Galat				
ANOVA						
SK	db	JK	KT	Fhitung	0,05	0,01
Perlakuan	1	301,16376	301,1638	15,24954	18,51282	98,50251
Kelompok	2	2,799617	1,399809	0,07088	19	99
Galat	2	39,498084	19,74904			
Total	5	343,46146				

Keterangan: Perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap nilai KcBK.

KcBO	Perlakuan	Kelompok	Total	Rata-rata	SD
	1	2			
SPO	57,2406	53,9227	111,1633	55,58165	2,34611
SM	37,2499	43,3813	80,6312	40,3156	4,335555
SB	40,7758	42,1401	82,9159	41,45795	0,964706
Total	135,2663	139,4441	274,7104		
Rata-rata	45,088767	46,481367			
SD	10,67044	6,4741969			
SD (SPO)			$\sqrt{\frac{\sum(X_i^2) - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}}$		
			$\sqrt{\frac{(57,2406^2 + 53,9227^2) - \frac{(111,1633^2)}{2}}{1}}$		
			= 2,34611		
JK Total			$= (\sum Y_{ij})^2 / (t \times r)$		
			$= (274,7104)^2 / (3 \times 2)$		
			= 12577,634		
JK Perlakuan			$= \sum(Y_{ij})^2 - FK$		
			$= (57,2406^2 + 53,9227^2 + 37,2499^2 + 43,3813^2 + 40,7758^2 + 42,1401^2)$		
			- 12577,634		
			= 314,456019		
JK Kelompok			$= ((\sum Y_i^2) / r) - FK$		
			$= ((111,1633^2 + 80,6312^2 + 82,9159^2) / 2) - 12577,634$		
			= 289,224099		
JK Galat			$= ((\sum Y_j^2) / t) - FK$		
			$= ((135,2663^2 + 139,4441^2) / 3) - 12577,634$		
			= 2,90900214		
			$= JK Total - JK Perlakuan - JK Kelompok$		
			$= 314,456019 - 289,224099 - 2,90900214$		
			= 22,3229183		

KT Kelompok	= JK Kelompok / db Kelompok
	= 2,90900214 / 2
	= 1,4545011
KT Perlakuan	= JK Perlakuan / db Perlakuan
	= 289,224099 / 1
	= 289,224099
KT Galat	= JK Galat / db Galat
	= 22,3229183 / 2
	= 11,161459
Fhitung Kelompok	= KT Kelompok / KT Galat
	= 1,4545011 / 11,161459
	= 0,1303146
Fhitung Perlakuan	= KT Perlakuan / KT Galat
	= 289,2241 / 11,161459
	= 25,91275

ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	Ftabel 0,05	Ftabel 0,01
Perlakuan	1	289,2241	289,2241	25,91275	18,51282	98,50251
Kelompok	2	2,9090021	1,454501	0,130315	19	99
Galat	2	22,322918	11,16146			
Total	5	314,45602				

Fhitung > Ftabel (0,05)

Keterangan: Cairan rumen dari tiga jenis bangsa sapi lokal yang diberikan perlakuan pakan lengkap berbeda sangat nyata terhadap KcBO, maka dilanjutkan dengan uji BNT.

$\frac{KT_{galat} \times 2}{r}$	$\frac{311,16146 \times 2}{2}$	$= 3,340877$	$BNT\ 5\% = 14,3746336$
Perlakuan	Rata-rata	Notasi	
SM	40,3156	a	
SB	41,45795	ab	
SPO	55,58165	b	

Keterangan: superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$)



lampiran 11. Tabel hasil Metabolisme Energi (ME)

Perlakuan	Kelompok	Total	Rata-rata	SD
SPO	12,1964	13,0026	25,199	12,5995
SM	10,7202	10,2364	20,9566	10,4783
SB	10,8977	10,7638	21,6615	10,83075
Total	33,8143	34,0028	67,8171	
Rata-rata	11,27143	11,3342667		
SD	0,805946	1,46868641		

$$\begin{aligned}
 SD (SPO) &= \sqrt{\frac{\sum(X_i^2) - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{\sum(12,1964^2 + 13,0026^2) - \frac{(25,199^2)}{2}}{1}} \\
 &= 0,57006949 \\
 FK &= (\sum Y_{ij}^2) / (t \times r) \\
 &= (67,8171)^2 / (3 \times 2) \\
 &= 766,52651 \\
 JK Total &= \sum(Y_{ij}^2) - FK \\
 &= (12,1964^2 + 13,0026^2 + 10,7202^2 + 10,2364^2 + 10,8977^2 + 10,7638^2) - \\
 &\quad 766,52651 \\
 &= 5,6190997 \\
 JK Perlakuan &= ((\sum Y_i^2) / r) - FK \\
 &= ((25,199^2 + 20,9566^2 + 21,6615^2) / 2) - 766,52651 \\
 &= 5,1681247 \\
 JK Kelompok &= ((\sum Y_j^2) / t) - FK \\
 &= ((33,8143^2 + 34,0028^2) / 3) - 766,52651 \\
 &= 0,005922
 \end{aligned}$$

JK Galat	$= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan} - JK \text{ Kelompok}$ $= 5,6190997 - 5,1681247 - 0,005922$ $= 0,445053$	JK Kelompok / db Kelompok $= 0,005922 / 2$ $= 0,002961$	KT Perlakuan $= JK \text{ Perlakuan} / db \text{ Perlakuan}$ $= 5,168125 / 1$ $= 5,168125$	KT Galat $= JK \text{ Galat} / db \text{ Galat}$ $= 0,445053 / 2$ $= 0,222527$	Fhitung Kelompok $= KT \text{ Kelompok} / KT \text{ Galat}$ $= 0,002961 / 0,222527$ $= 0,0133064$	Fhitung Perlakuan $= KT \text{ Perlakuan} / KT \text{ Galat}$ $= 5,168125 / 0,222527$ $= 23,22476$
----------	---	---	---	---	--	---

ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	1	5,168125	5,16812	23,22476	18,5128205	98,5025126
Kelompok	2	0,005922	0,00296	0,013306	19	99
Galat	2	0,445053	0,22253			
Total	5	5,6191				

Fhitung > Ftabel (0,05)

Keterangan: Cairan rumen dari tiga jenis bangsa sapi lokal yang diberikan perlakuan pakan lengkap berbeda sangat nyata terhadap ME, maka dilanjutkan dengan uji BNT.

$$\begin{aligned} SE &= \sqrt{\frac{KT_{galat} \times 2}{r}} \\ &= \sqrt{\frac{0,22253 \times 2}{2}} \\ &= 0,4717271 \end{aligned}$$

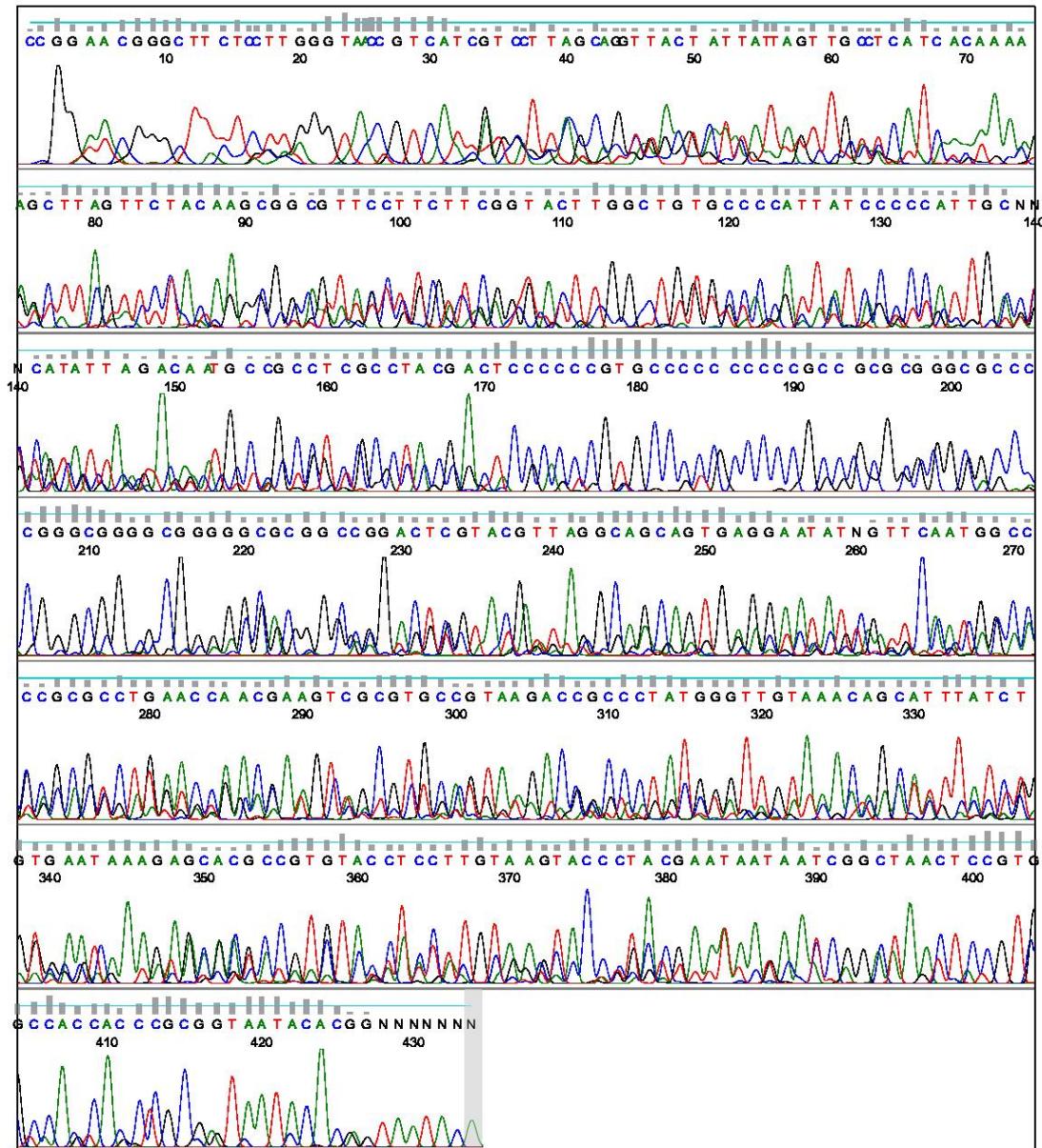
$$BNT\ 5\% = 2,0296781$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
SM	10,4783	a
SB	10,83075	ab
SPO	12,5995	b

Keterangan: superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$)

Sample Name: 3994063_P5G_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.27
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 592, C = 837, G = 636, T = 603
Lane/Cap#: 64
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Feb 13, 2021 2:28PM

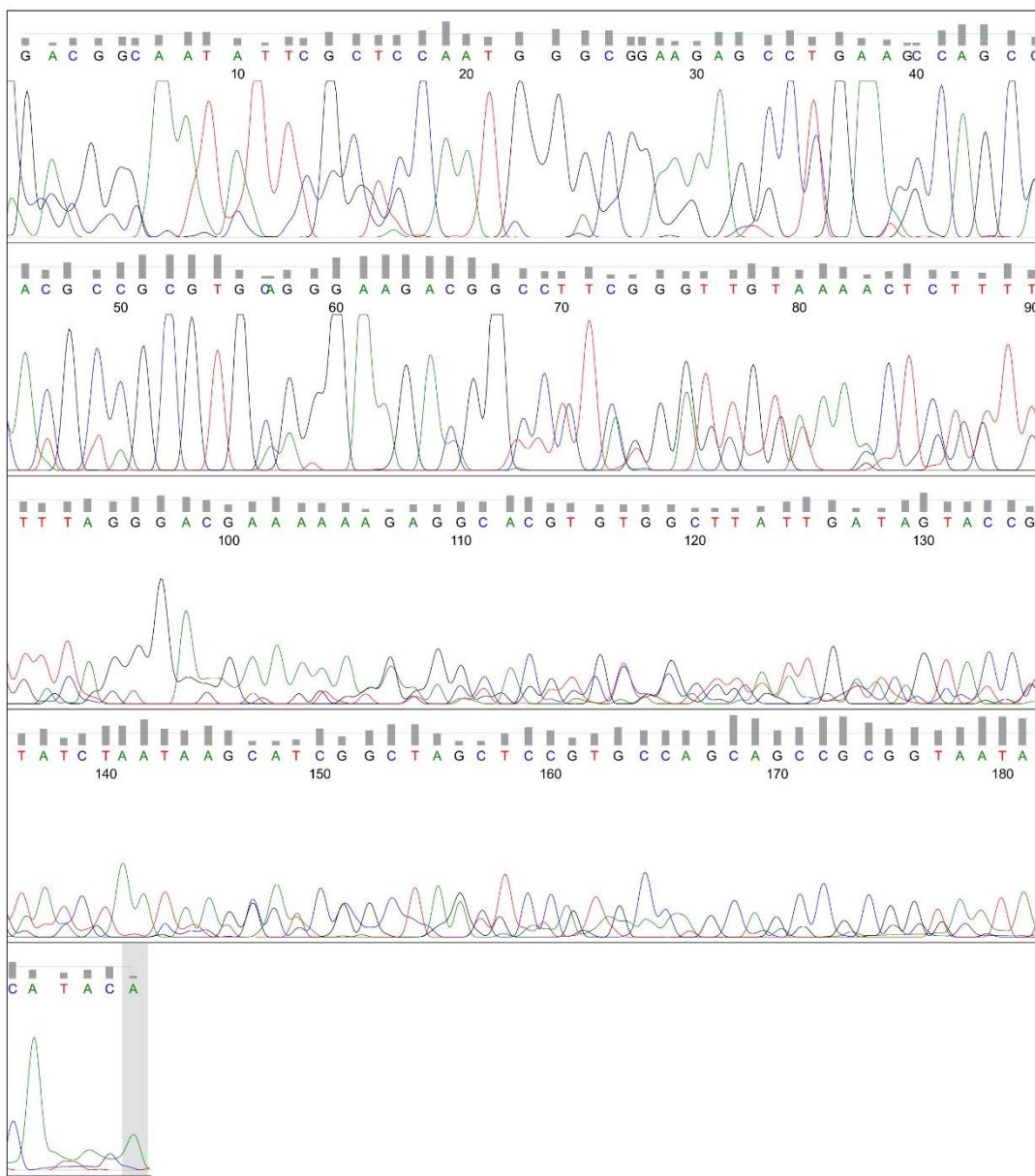
 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994062_P5G_HDA1.ab1

Sample Name: 3994062_P5G_HDA1
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.4483
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 503, C = 369, G = 452, T = 287
Lane/Cap#: 49
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Okt 1, 2020 1:21PM

 FinchTV v.1.4.0

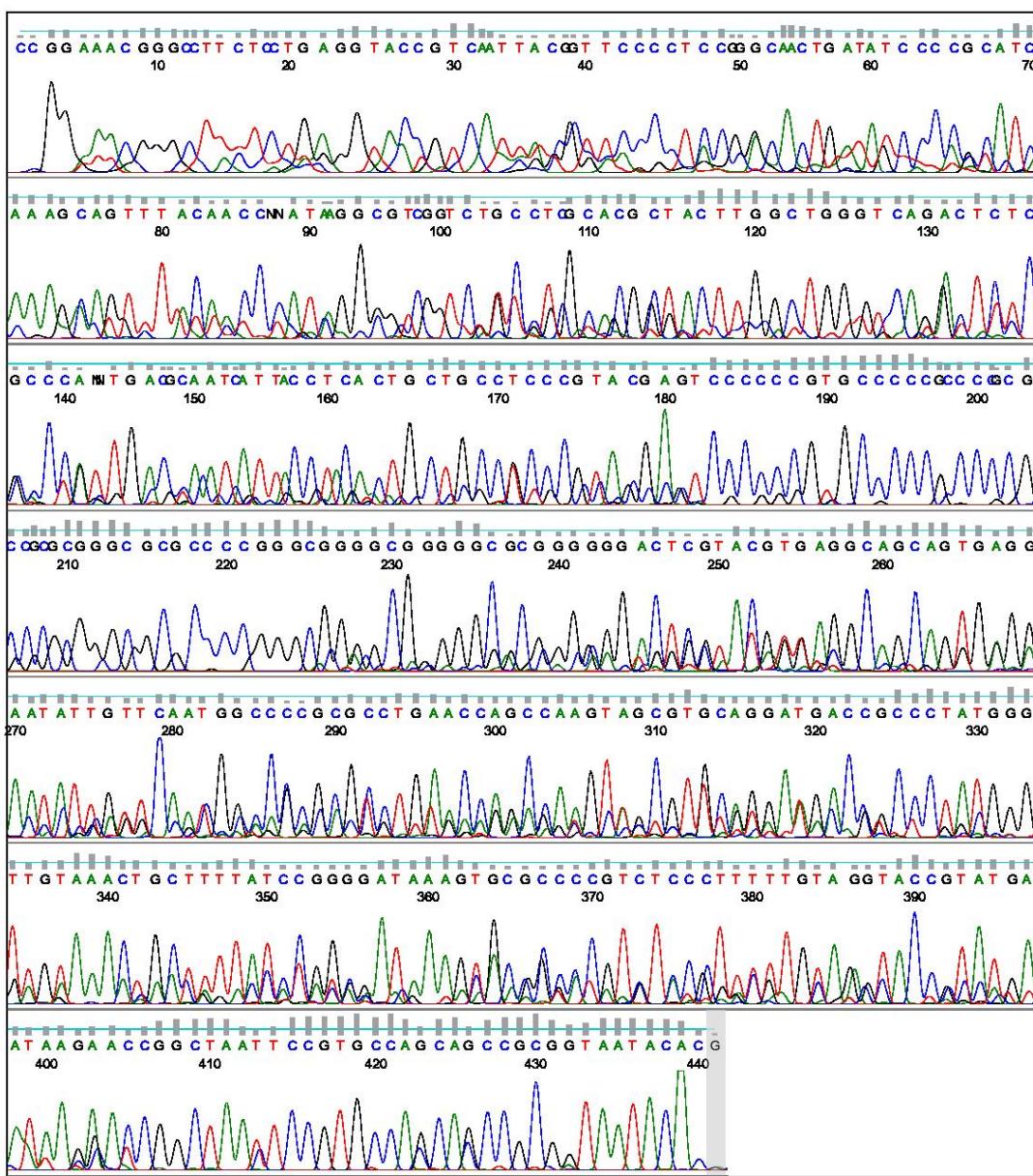
Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994061_P4G_HDA2.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3994061_P4G_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.3311
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 559, C = 717, G = 573, T = 570
Lane/Cap#: 51
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Feb 13, 2021 2:27PM

FinchTV v.1.4.0

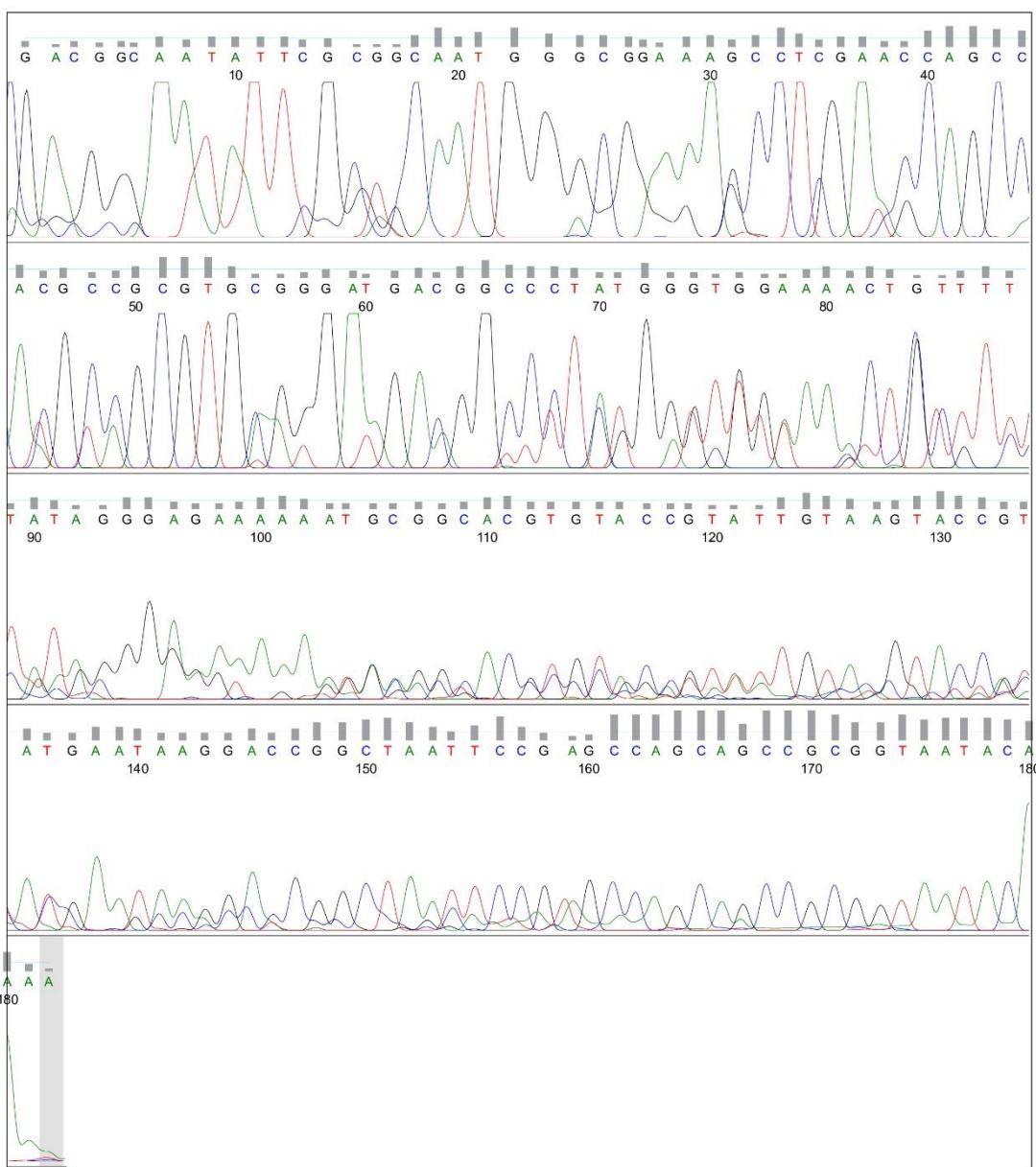
Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994060_P4G_HDA1.ab1

 Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3994060_P4G_HDA1
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: -16.1631
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1101, C = 799, G = 1005, T = 560
Lane/Cap#: 53
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Okt 1, 2020 12:12PM



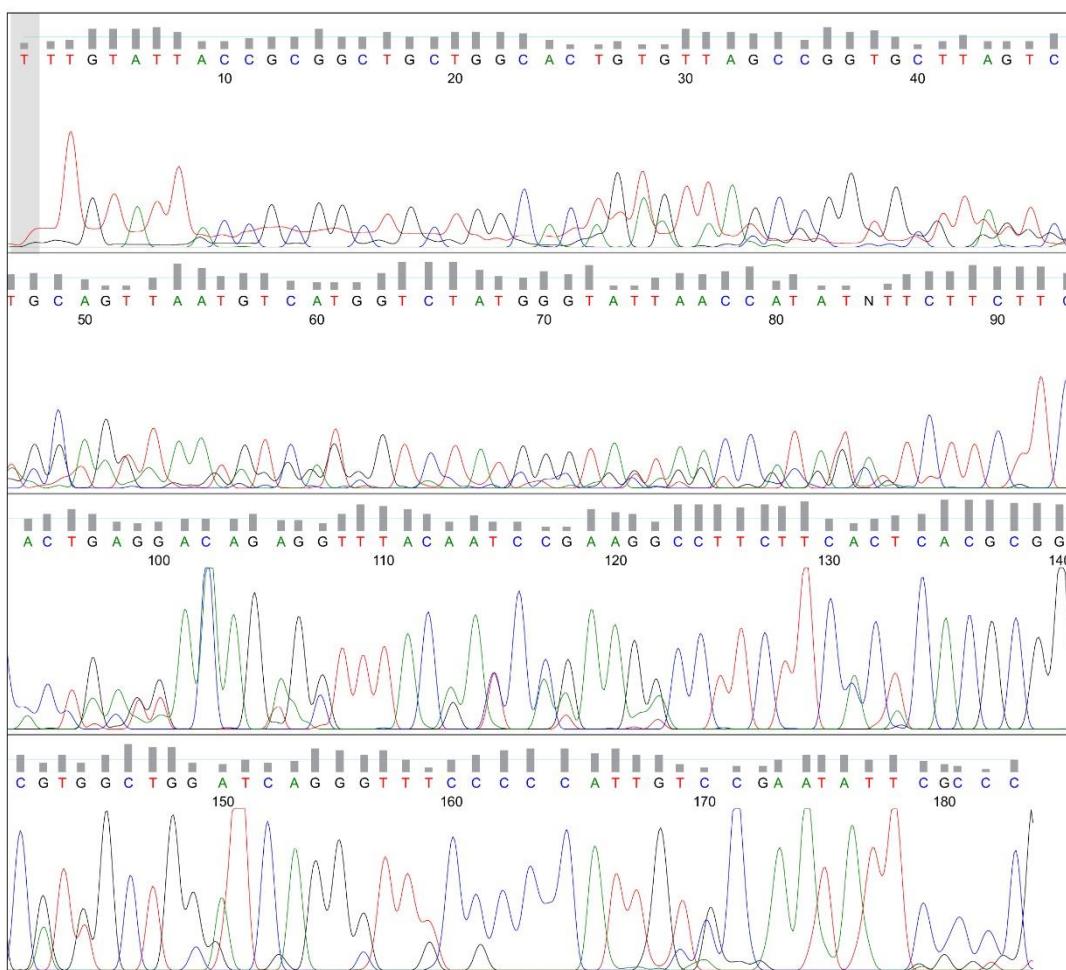
Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994058_P3G_HDA1.ab1

 Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3994058_P3G_HDA1
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: -16.1631
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1123, C = 836, G = 940, T = 630
Lane/Cap#: 57
Matrix: n/a
Direction: Reverse Complement



Printed: Okt 1, 2020 12:00PM



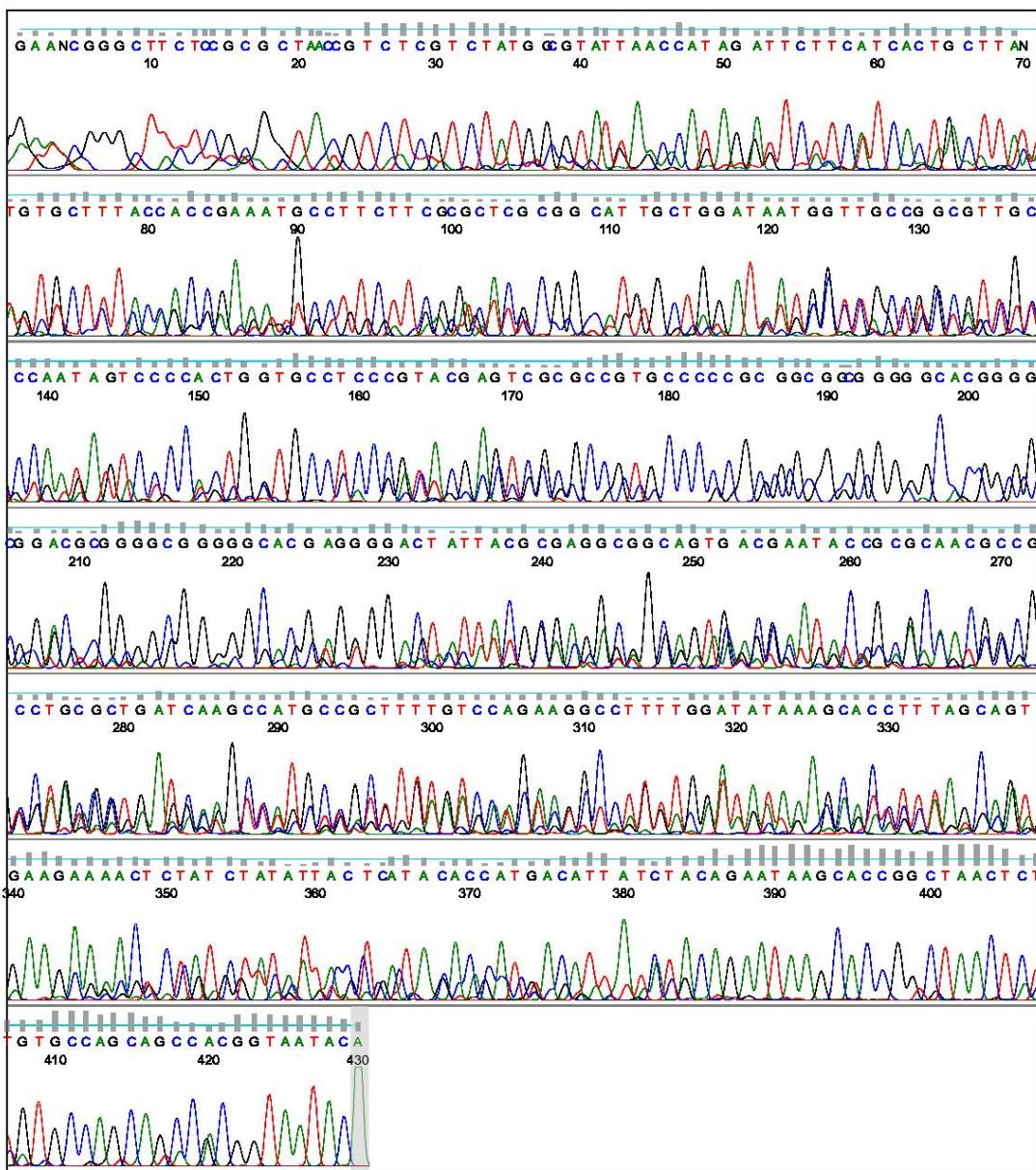
Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994059_P3G_HDA2.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3994059_P3G_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.0236
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 546, C = 720, G = 575, T = 518
Lane/Cap#: 55
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Feb 13, 2021 2:34PM



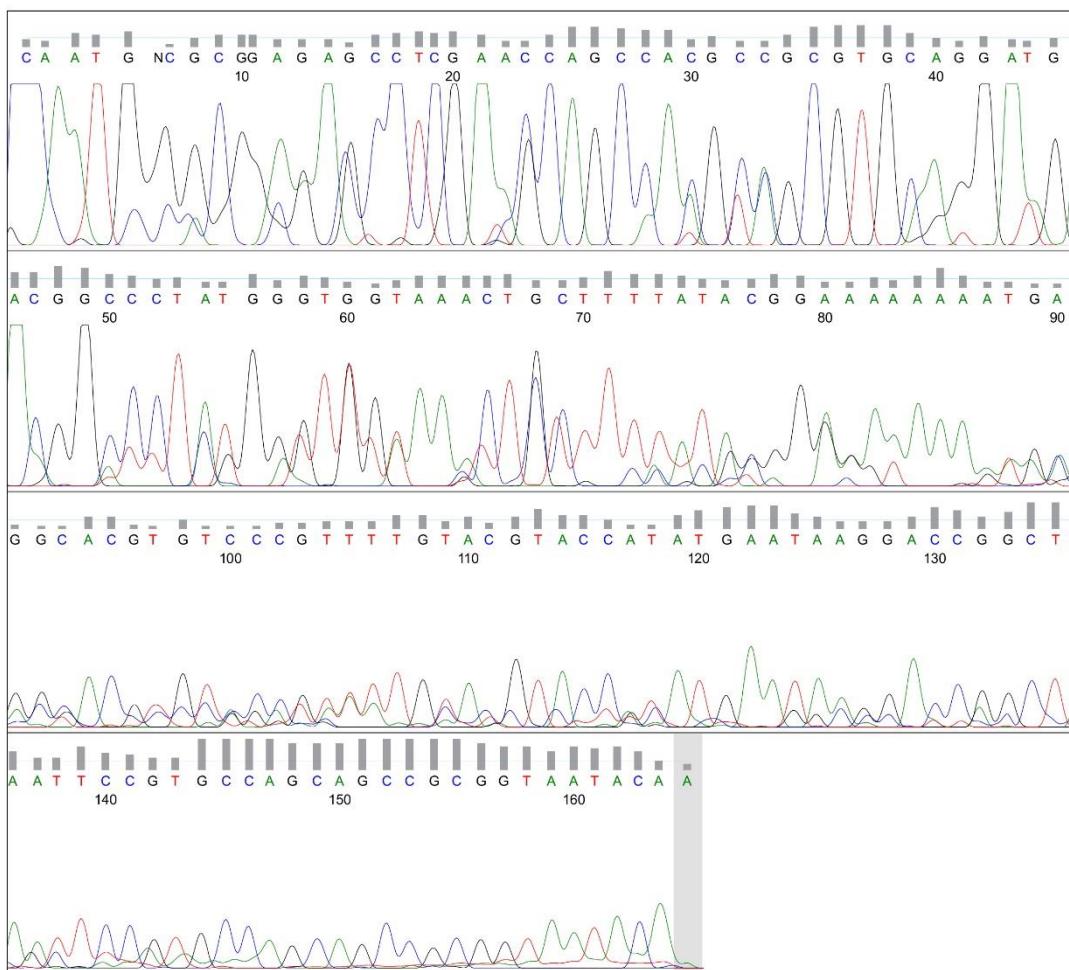
Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994064_P1R_HDA1.ab1

Sample Name: 3994064_P1R_HDA1
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: -16.1631
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 376, C = 325, G = 426, T = 218
Lane/Cap#: 62
Matrix: n/a
Direction: Native

 Geospiza
www.geospiza.com



Printed: Okt 1, 2020 1:22PM



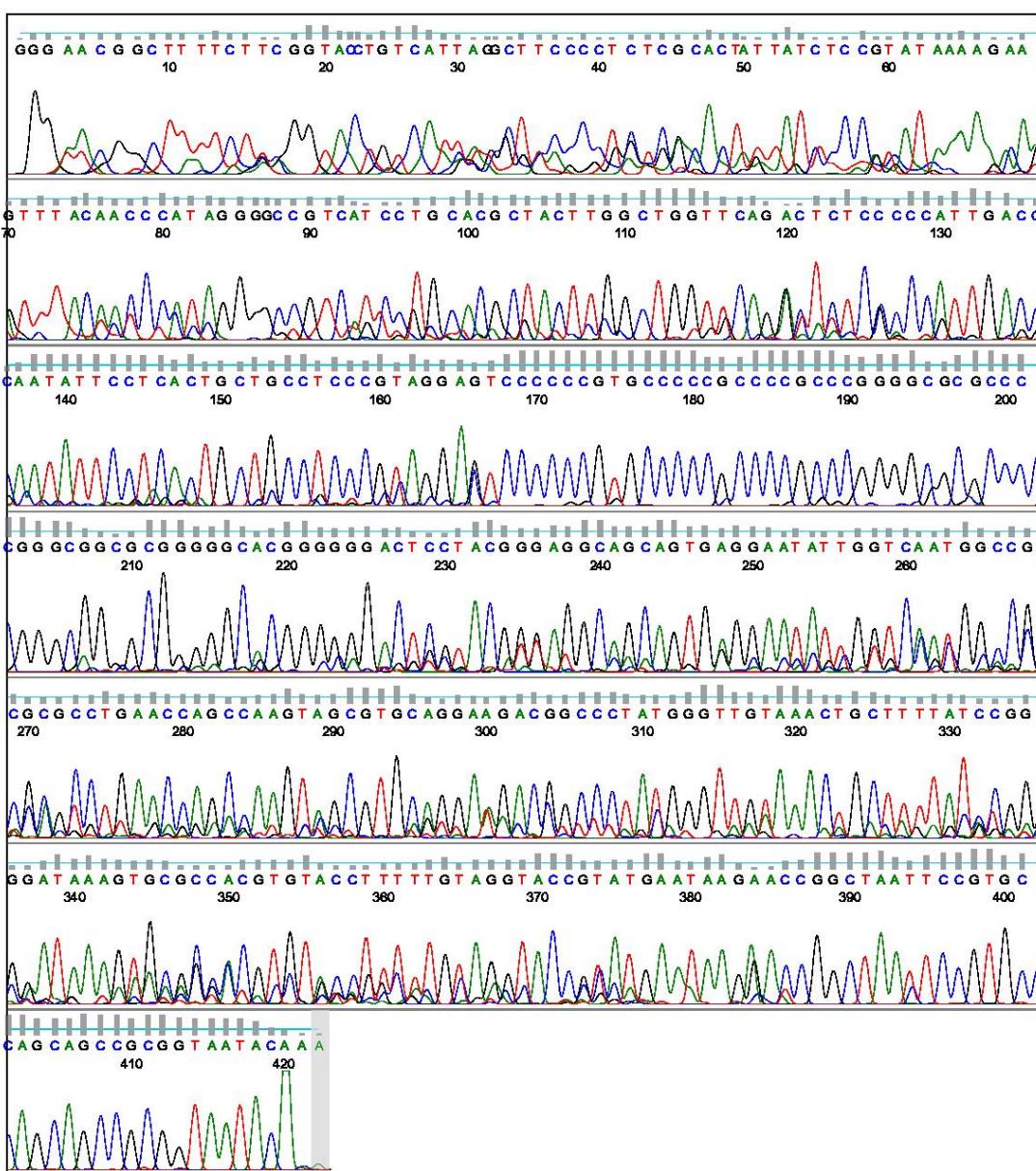
Page 1 of 1

File: 1st BASE 3994065 P1R HDA2.ab1

 Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3994065_P1R_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.2179
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 371, C = 488, G = 475, T = 409
Lane/Cap#: 60
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Feb 13, 2021 2:28PM

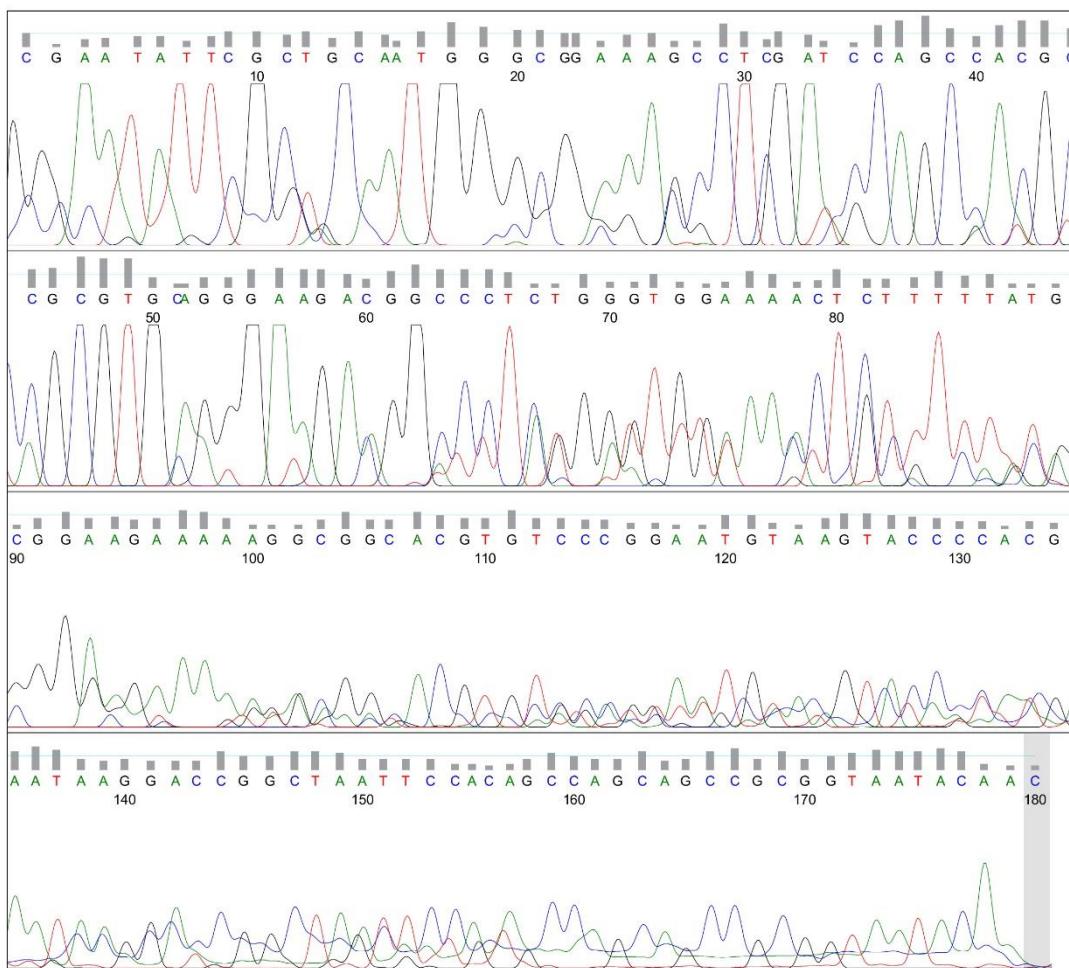
 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994066_P2R_HDA1.ab1

Sample Name: 3994066_P2R_HDA1
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: -16.1631
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 516, C = 430, G = 590, T = 325
Lane/Cap#: 58
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Okt 1, 2020 1:23PM



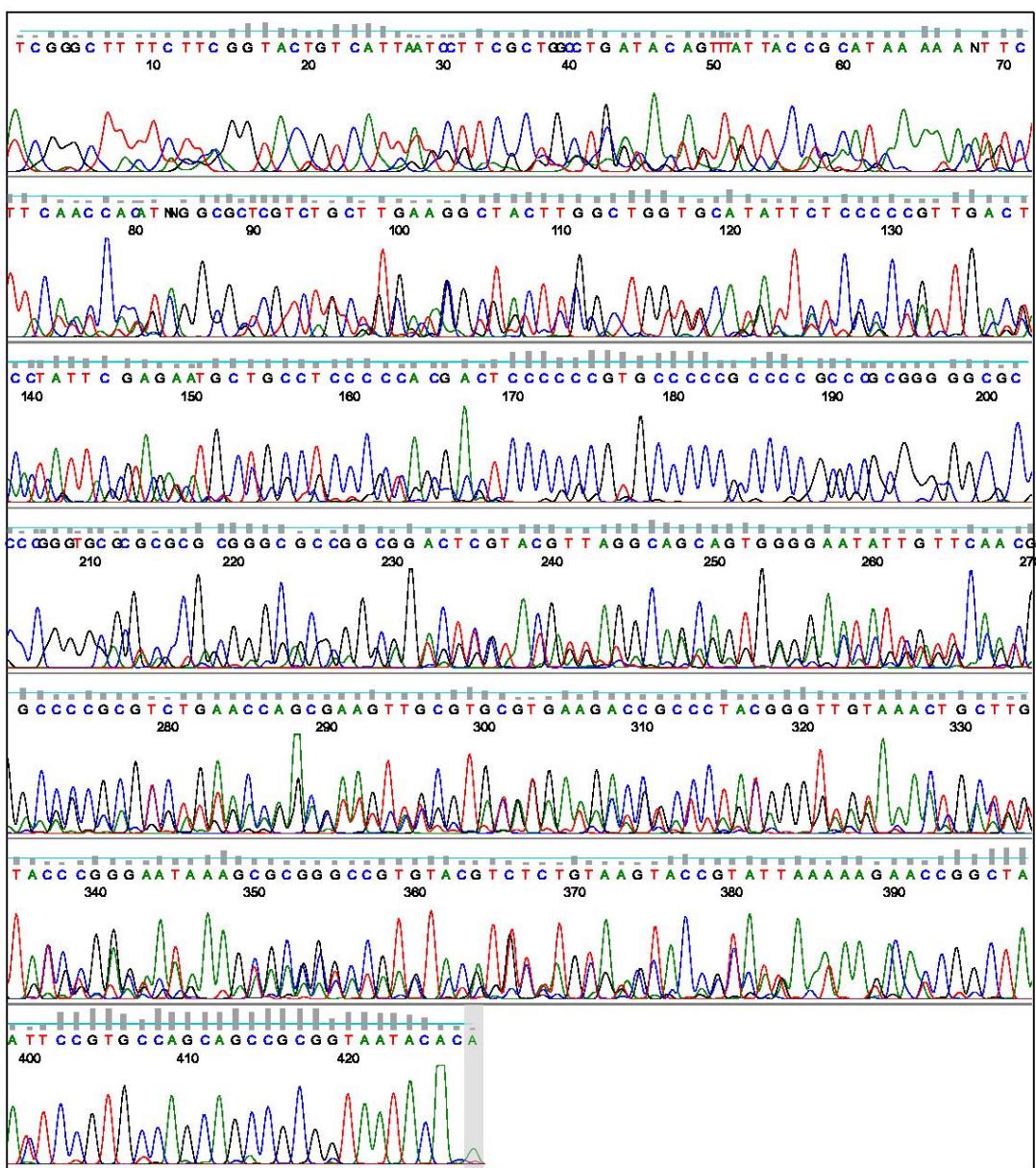
Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994067_P2R_HDA2.ab1

 Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3994067_P2R_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.1625
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 348, C = 485, G = 416, T = 362
Lane/Cap#: 56
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Feb 13, 2021 2:29PM

 FinchTV v.1.4.0

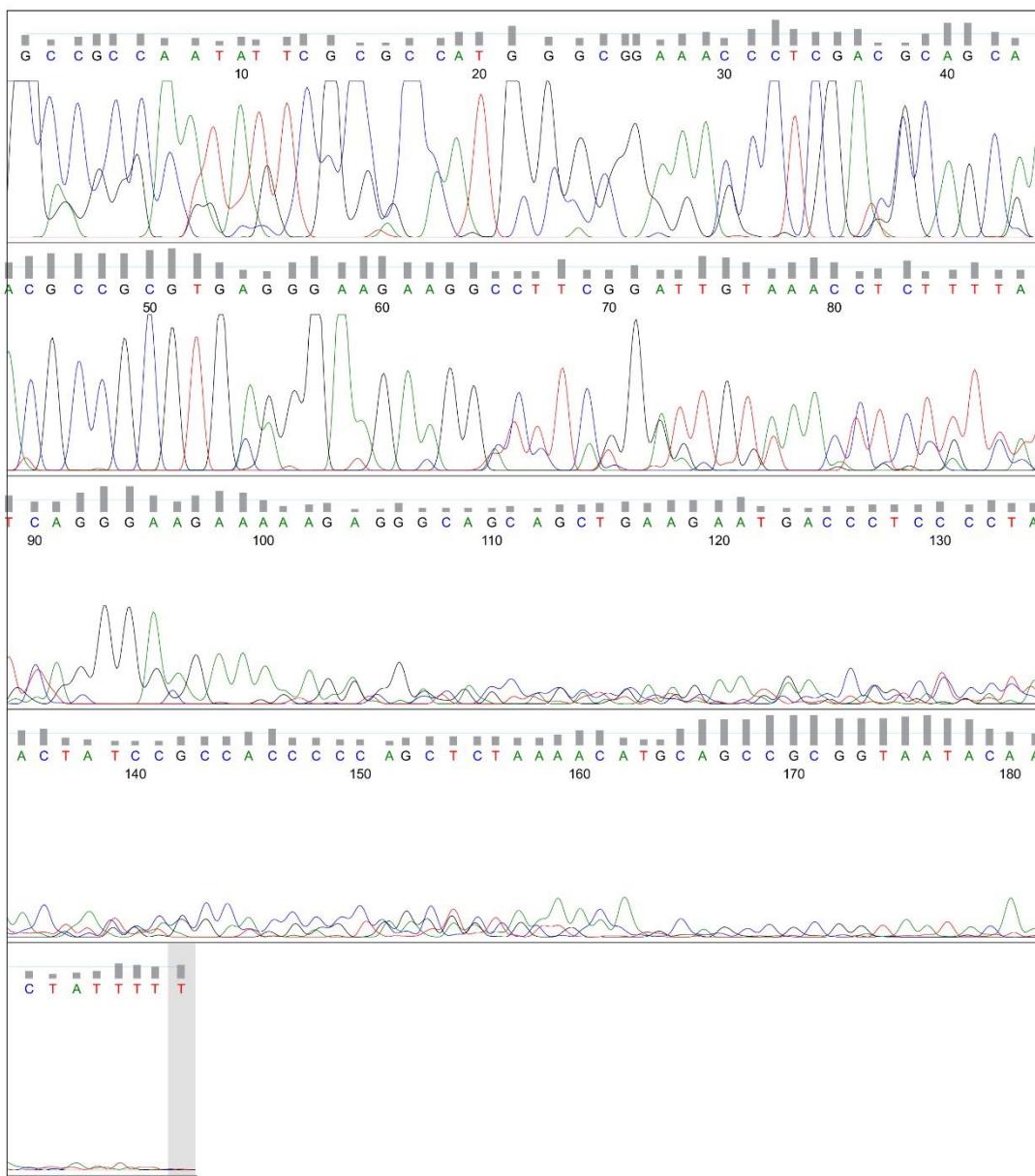
Page 1 of 1



File: 1st_BASE_3994068_P3R_HDA1.ab1

Sample Name: 3994068_P3R_HDA1
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: -16.1631
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 279, C = 306, G = 380, T = 189
Lane/Cap#: 54
Matrix: n/a
Direction: Native

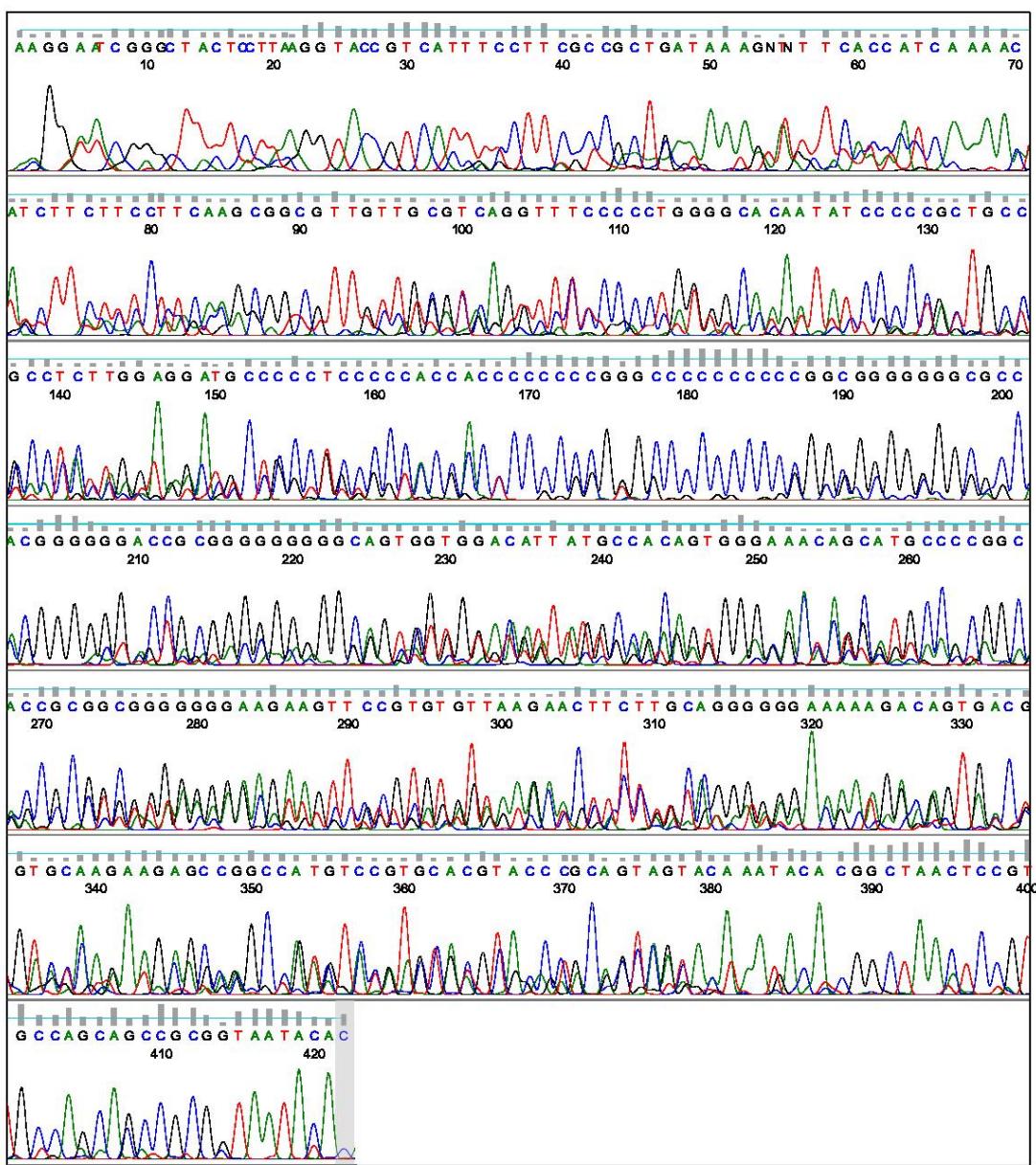


Printed: Okt 3, 2020 1:45PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994069_P3R_HDA2.ab1

Geospiza
www.geospiza.comSample Name: 3994069_P3R_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.2897
Comment: n/aSignal Strengths: A = 218, C = 290, G = 351, T = 232
Lane/Cap#: 52
Matrix: n/a
Direction: Native

Printed: Feb 13, 2021 2:30PM

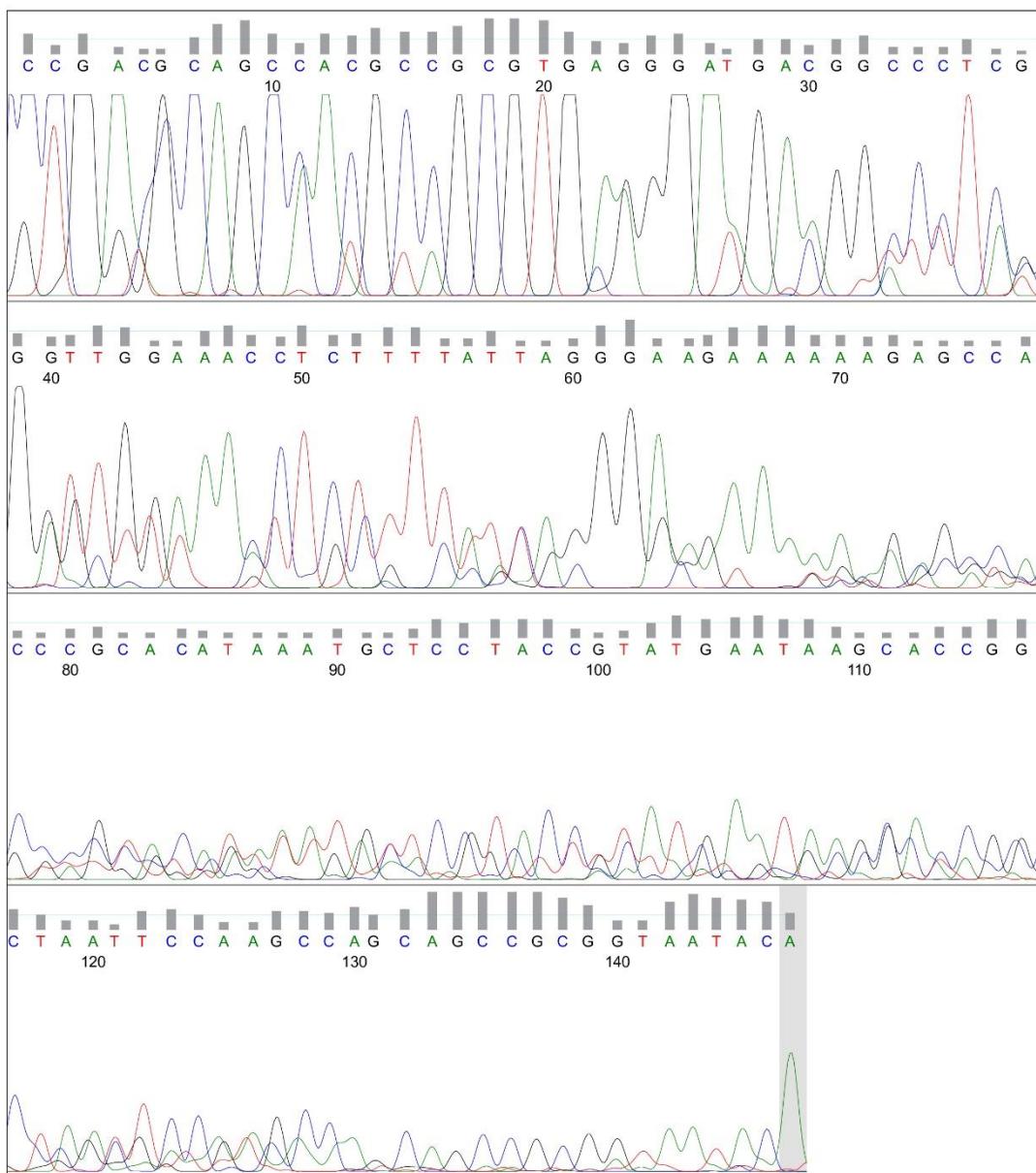
FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994070_P1Q_HDA1.ab1

Sample Name: 3994070_P1Q_HDA1
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: -16.1631
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 267, C = 257, G = 318, T = 164
Lane/Cap#: 50
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Okt 3, 2020 1:46PM

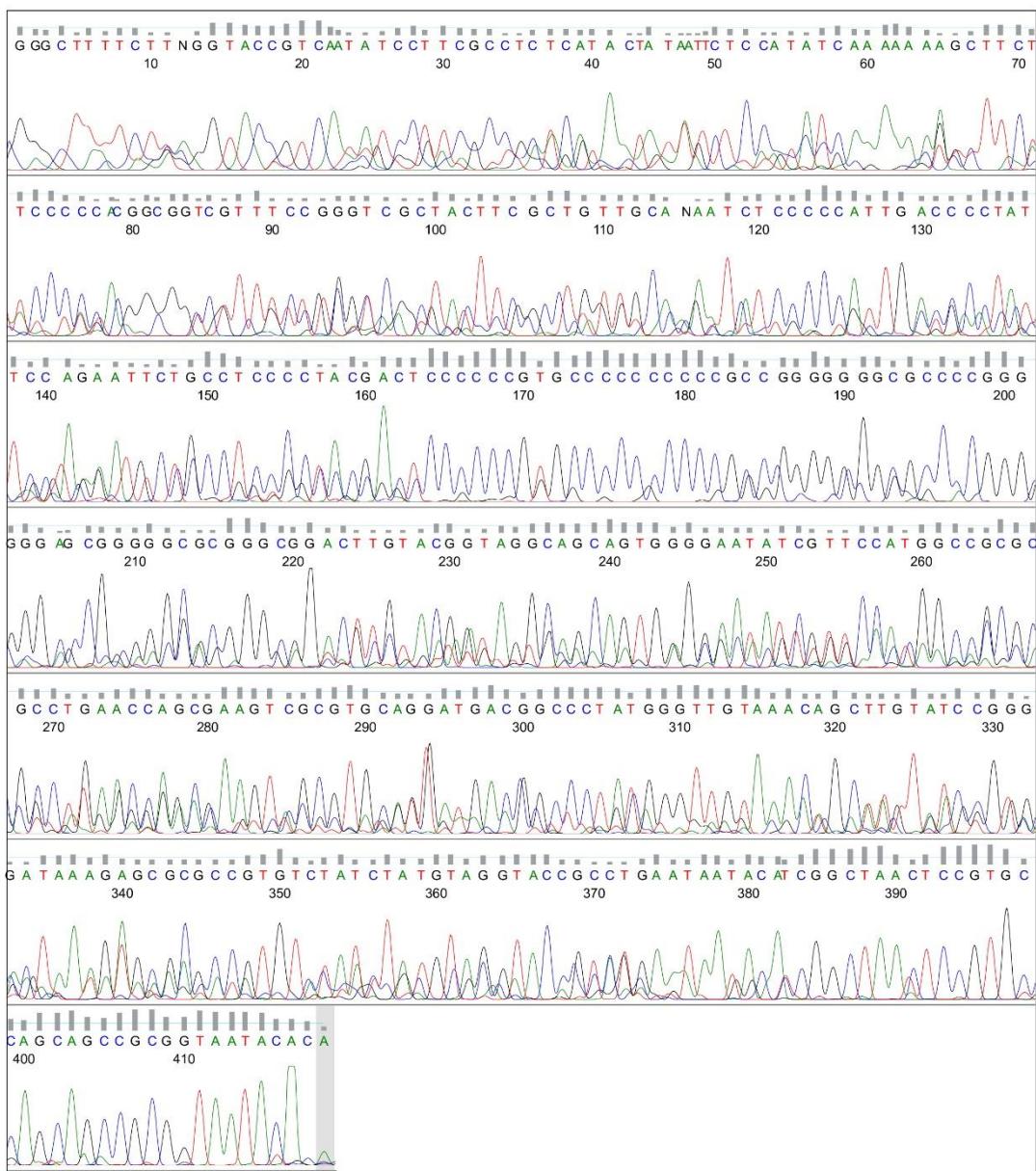


Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994071_P1Q_HDA2.ab1**Geospiza**
www.geospiza.com

Sample Name: 3994071_P1Q_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.5085
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 300, C = 424, G = 379, T = 312
Lane/Cap#: 79
Matrix: n/a
Direction: Native

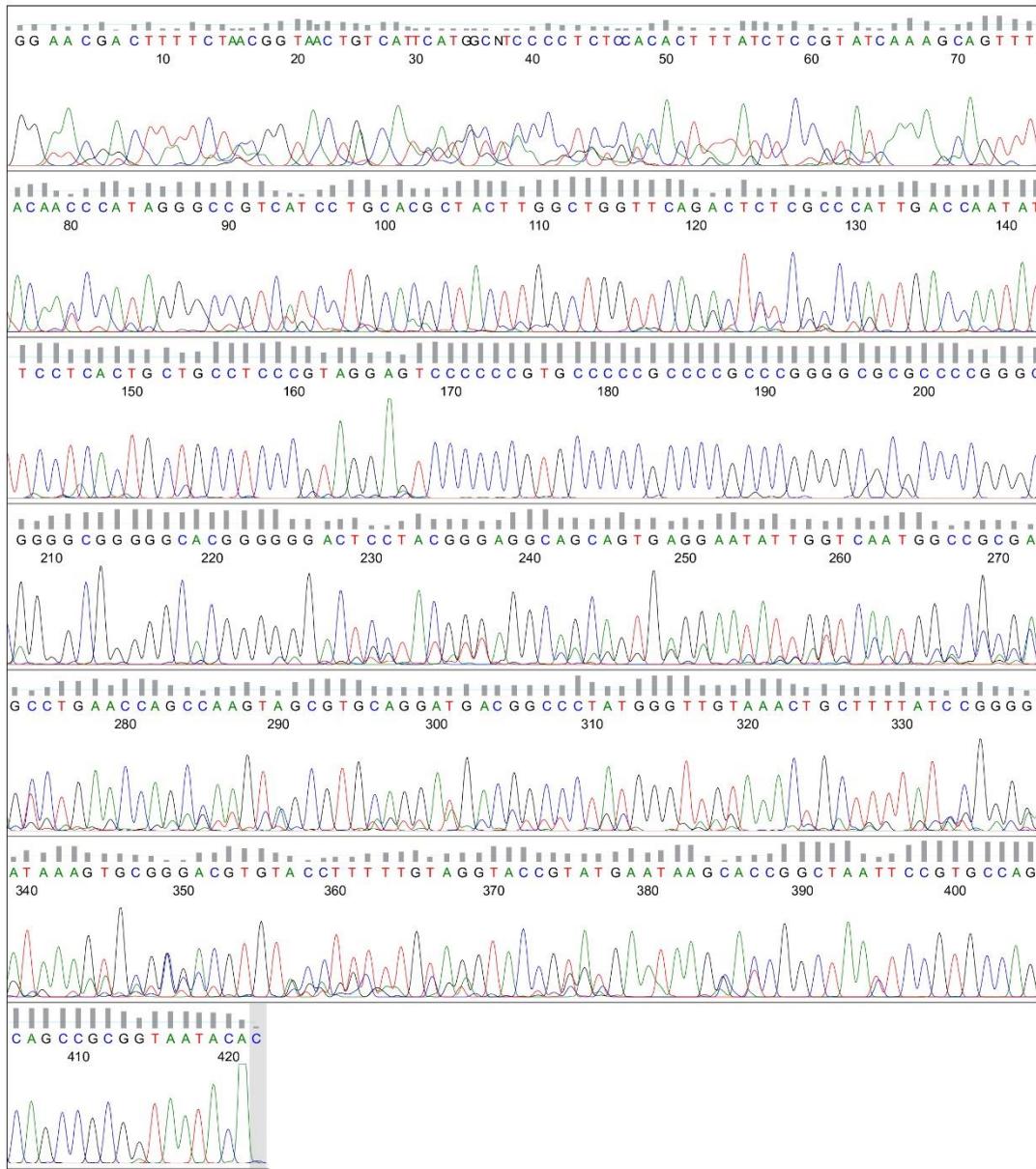


Printed: Feb 13, 2021 2:31PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994073_P2Q_HDA2.ab1

Geospiza
www.geospiza.comSample Name: 3994073_P2Q_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.2747
Comment: n/aSignal Strengths: A = 261, C = 371, G = 392, T = 261
Lane/Cap#: 75
Matrix: n/a
Direction: Native

Printed: Okt 3, 2020 1:47PM

FinchTV v.1.4.0

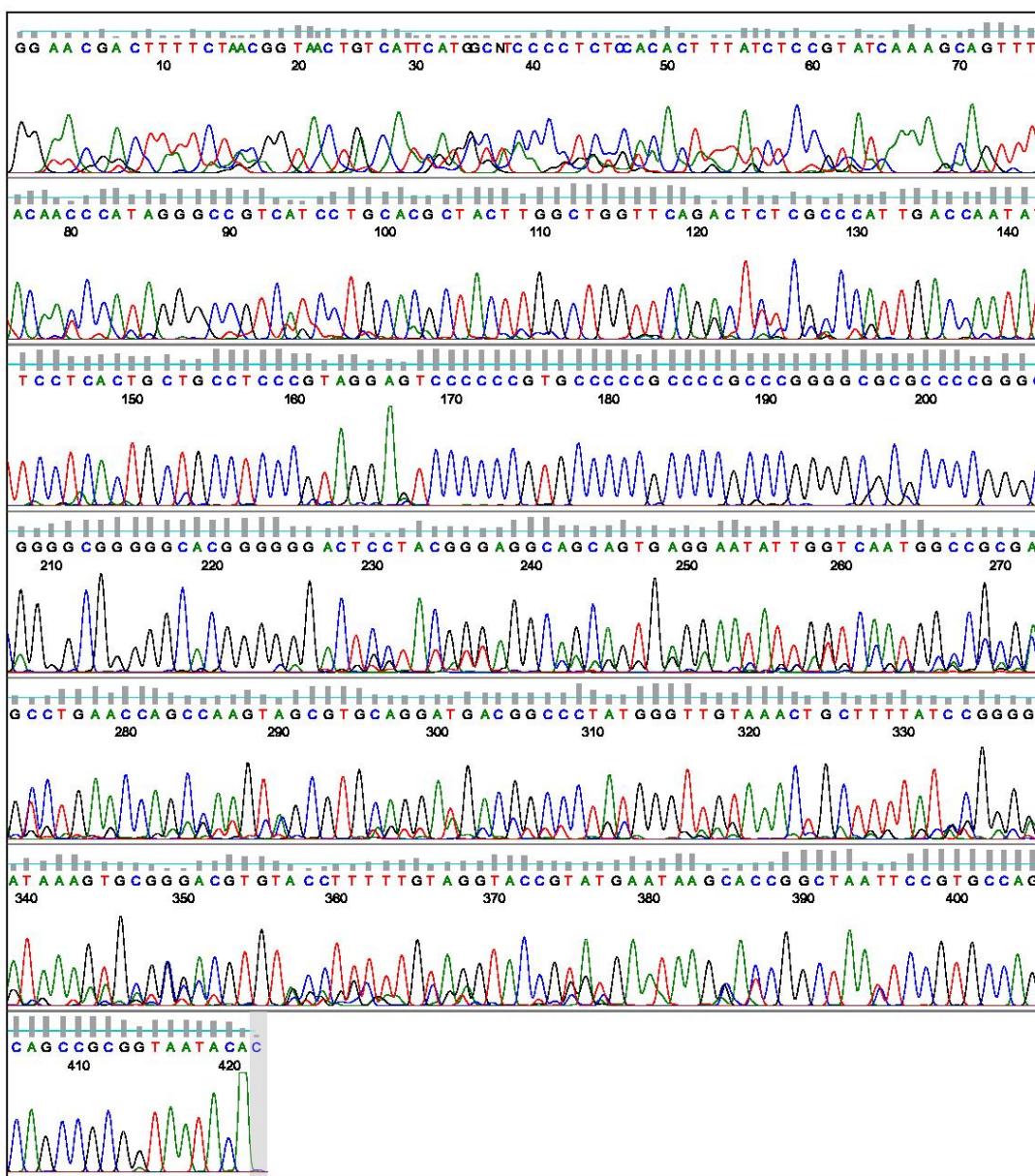
Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994073_P2Q_HDA2.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3994073_P2Q_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.2747
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 261, C = 371, G = 392, T = 261
Lane/Cap#: 75
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Feb 13, 2021 2:32PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994074_P3Q_HDA1.ab1



Sample Name: 3994074_P3Q_HDA1

Signal Strengths: A = 465, C = 394, G = 486, T = 260

Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob

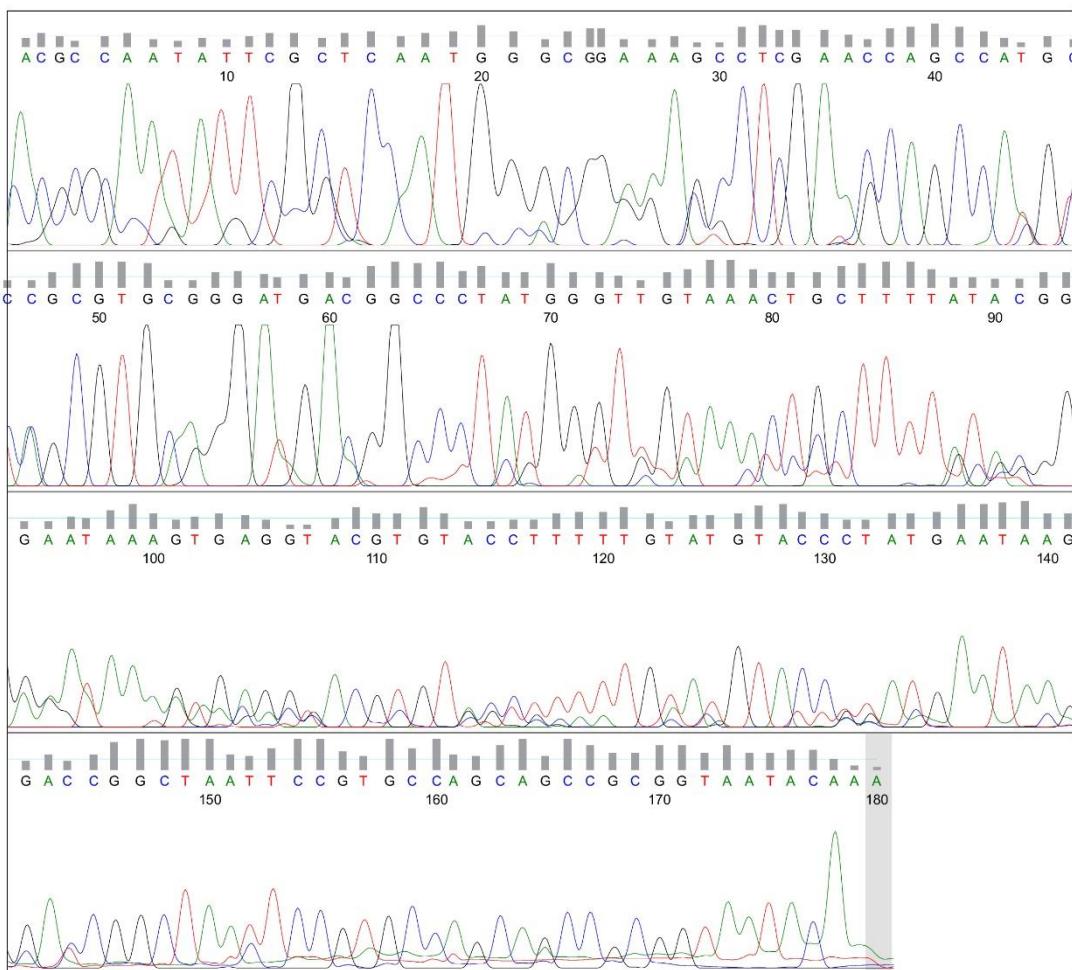
Lane/Cap#: 73

Spacing: -16.1631

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native

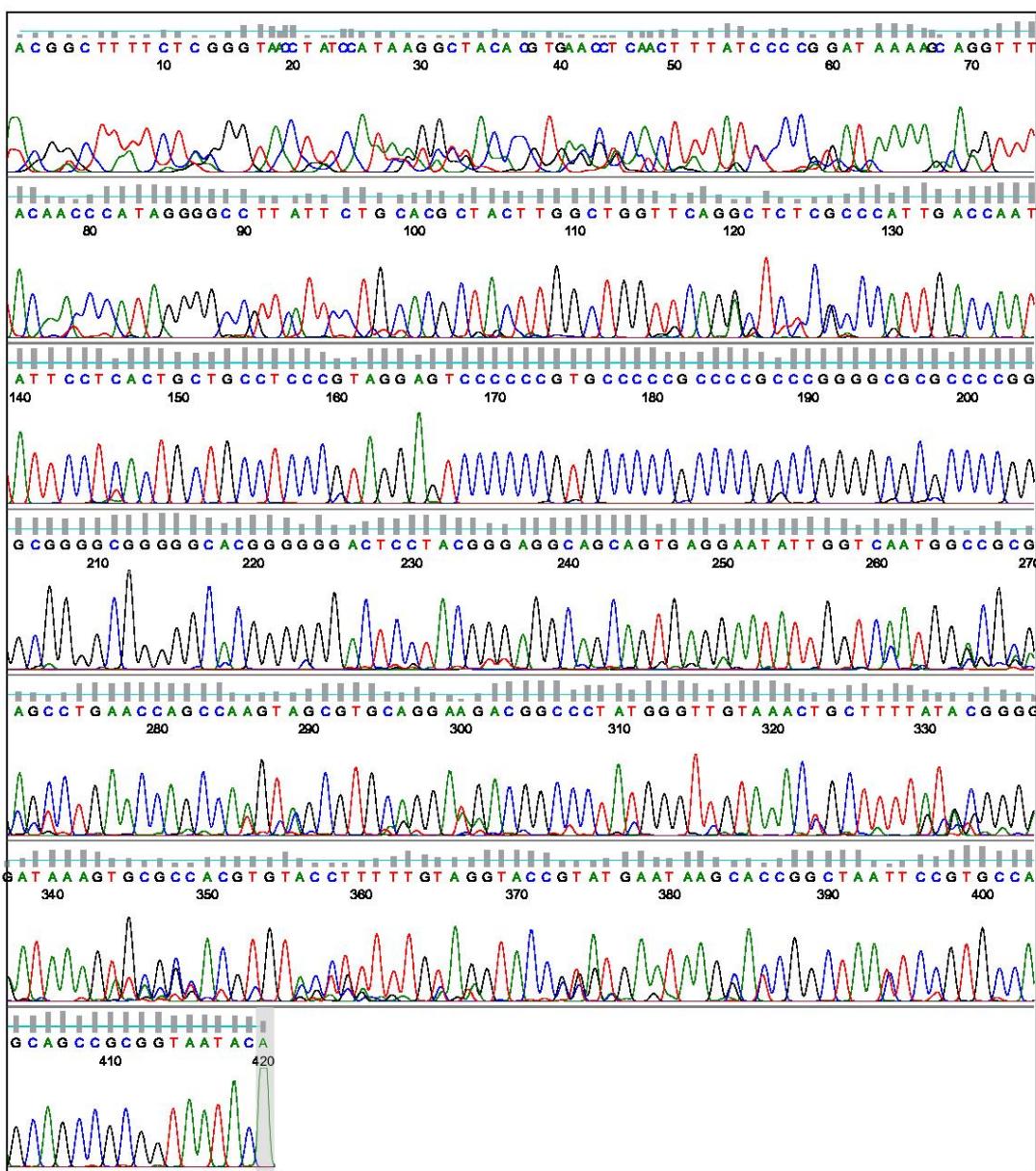


Printed: Okt 3, 2020 1:48PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

File: 1st_BASE_3994075_P3Q_HDA2.ab1

Geospiza
www.geospiza.comSample Name: 3994075_P3Q_HDA2
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.1588
Comment: n/aSignal Strengths: A = 428, C = 541, G = 552, T = 458
Lane/Cap#: 71
Matrix: n/a
Direction: Native

Printed: Feb 13, 2021 2:32PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1



Pengambilan cairan rumen
di Lolit SPOtong

Pengambilan cairan rumen
di Peternak di Malang

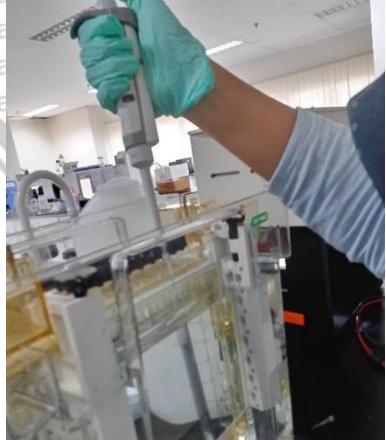
Penanganan sampel
dengan nitrogen cair



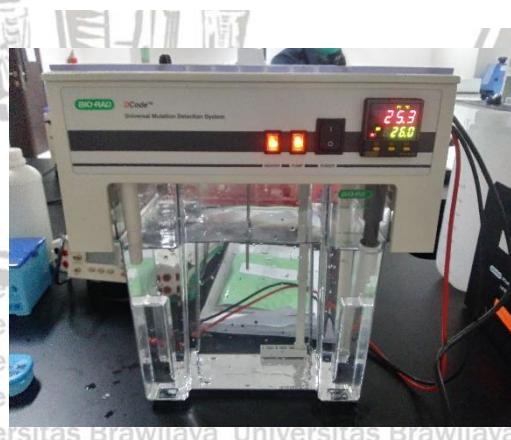
Persiapan analysis PCR-
DGGE



Proses PCR



Proses DGGE



Analisis DGGE