

**PENGARUH KOMPOSISI PAKAN DAN PENAMBAHAN PROBIOTIK
Lactobacillus plantarum TSD-10 SECARA *IN VITRO* TERHADAP
JUMLAH BAKTERI METANOGEN DAN PROTOZOA
DALAM RUMEN SAPI**

MELATI RAMADHANA

0706172310



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2010**

**PENGARUH KOMPOSISI PAKAN DAN PENAMBAHAN PROBIOTIK
Lactobacillus plantarum TSD-10 SECARA *IN VITRO* TERHADAP
JUMLAH BAKTERI METANOGEN DAN PROTOZOA
DALAM RUMEN SAPI**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk
memperoleh gelar Magister Sains

Oleh:

MELATI RAMADHANA

0706172310



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2010

JUDUL : PENGARUH KOMPOSISI PAKAN DAN PENAMBAHAN PROBIOTIK *Lactobacillus plantarum* TSD-10 SECARA *IN VITRO* TERHADAP JUMLAH BAKTERI METANOGEN DAN PROTOZOA DALAM RUMEN SAPI

NAMA : MELATI RAMADHANA

NPM : 0706172310

MENYETUJUI
1. Komisi Pembimbing

Dr. Yantiyati Widyastuti
Pembimbing I

Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc
Pembimbing II

2. Penguji

Prof. Dr. Indrawati Gandjar
Penguji I

Drs. Iman Santoso, M.Phil
Penguji II

**3. Ketua Program Studi Biologi
Program Pascasarjana FMIPA UI**

4. Ketua Pascasarjana FMIPA UI

Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed

Dr. Adi Basukriadi, M.Sc

Tanggal lulus: 22 Desember 2009

Date: 22 December 2009

Name : Melati Ramadhana

Title : **EFFECT OF FEEDING COMPOSITION AND PROBIOTIC *Lactobacillus plantarum* TSD-10 (IN VITRO) TO METHANOGENIC BACTERIA AND PROTOZOA IN RUMEN**

Thesis Supervisors: Dr Yantyati Widyastuti, Dr. Wibowo Mangunwardoyo

SUMMARY

Ruminants are herbivorous mammals that have special digestive tract, rumen, where digestion of cellulose and polysaccharides can be carried out by rumen microorganisms. Methanogenic bacteria in the rumen using H_2 compounds results from anaerobic fermentation of carbohydrates to form methane. Methane production in the rumen is an energetically wasteful process, since the feed intake will be converted to methane and eructated as gas (Bunthoen, 2007). Rumen protozoa have a potential role in the process of digestion and breakdown of organic material. Hydrogen (H_2) as one of the protozoa fermentation products are used by methanogenic bacteria to form methane. This causing methanogenic bacteria often found living attached to the surface of protozoa to keep a constant supply of hydrogen.

The purpose of this study is to enumerate the number of methanogenic bacteria and protozoa with different diet and after the addition of probiotic *Lactobacillus plantarum* TSD-10 in vitro.

This report consist of two parts, which are (1) **Effect of Feeding Composition on Total Methanogenic Bacteria and Protozoa Rumen**, and (2) **Influence of Probiotic *Lactobacillus plantarum* TSD-10 on Total Methanogenic Bacteria and Protozoa In Vitro**. The research was conducted at the Laboratory of Industrial Microbiology, Research Centre of Biotechnology– Indonesian Institute of Sciences (LIPI), Cibinong Bogor, from September 2008 – May 2009. The treatment are diet A with ratio of grass : concentrate (30 : 70) and diet B with ratio of grass : concentrate (70 : 30). The probiotic *L. plantarum* TSD-10 dose are 0%, 5%, 10% and 15% v/v.

The number of methanogenic bacteria obtained from diet A ranges between $(0,74 - 0,89) \times 10^7$ cfu/ml, whereas in diet B ranged from $(1,71 - 2,58) \times 10^7$ cfu/ml. Methanogenic bacteria average on feed B $((2,19 \pm 0,44) \times 10^7$ cfu/ml) higher than the feed A $((0,82 \pm 0,07) \times 10^7$ cfu/ml). Based on the Analysis of Variance (ANOVA), different composition of diet A and B, significantly affect the number of methanogenic bacteria (α 5%), with the best diet composition in suppressing the growth of methanogenic bacteria is diet A. The number of methanogenic bacteria in diet B are higher since the value of a more alkaline pH (8). According to Mirzaei-Aghsaghali *et al.* (2008), methanogenic bacteria are sensitive to changes in pH. Decrease in pH value will decrease the number of methanogenic bacteria and cause less methane gas produced. The low number of methanogenic bacteria on diet

A, can also be caused by the ratio of acetate : propionate obtained lower than in diet B, and it also causes a lower pH of the diet A (Lana *et al.*, 1998).

The ANOVA showed the methanogenic bacteria average between diet A and B in the morning and afternoon sampling significantly different between treatments (α 5%), with the best treatment in suppressing methanogenic bacteria from each sampling were diet A. Increased methanogenic bacteria after feeding may be associated with the presence of protozoa in the rumen ciliata that serves as a producer of hydrogen and bacterial attachment to methanogen. Composition diet B low in fiber and high in starch are preferred by the protozoan (Leedle and Greening, 1988).

The number of protozoa obtained from the diet A ranges between $(1,93 - 3,95) \times 10^5$ cells/ml, whereas the diet B ranged from $(2,81 - 4,35) \times 10^5$ cells/ml. Protozoa average on diet B $((3,76 \pm 0,83) \times 10^5$ cells/ml) higher than the diet A $((3,08 \pm 1,04) \times 10^5$ cells/ml). Based on the ANOVA, differences composition diet A and B, not significantly different between treatments (α 5%). Diet B with a higher pH value causes no influential ration of protozoa, which does not cause a decrease in the number of protozoa.

The ANOVA indicate that the average range of protozoa between diet A and B are significantly different (α 5%) in the morning sampling, with the best treatment in suppressing the number of protozoa are diet A. The afternoon sampling, ANOVA showed that the treatment was not significantly different (α 5%).

Protozoa observed in treatment diet A and B are families of, Ophryoscolecidae, Isotrichidae and Blepharocorythidae. Most number obtained from each diet is Ophryoscolecidae, while the-less is Blepharocorythidae. This is due to Ophryoscolecidae a part of the Order Entodiniomorphida who compiled most of rumen cilliata. In the contrary, Family Isotrichidae and Blepharocorythidae are part of the order Trichostomatida which is rarely found in rumen (Ogimoto and Imai, 1981).

Decreasing in the number of methanogenic bacteria in the diet B (56,8%) higher than diet A (29,8%), while the decrease in the number of protozoa in the diet B (64,9%) higher than diet A (62,7%). Diet B with a higher concentrate composition can provide a change in the pattern of rumen fermentation. These changes make the environment less suitable for methanogenic bacterial growth. One of the unfavorable change is a reduction of rumen pH values (Moss *et al.*, 2000).

On the addition of probiotics in vitro, the ANOVA showed the range of the number of methanogenic bacteria was not significantly different (α 5%) on the variations of diet A and B but significantly different (α 5%) on the number of protozoa, with the best in suppressing the growth of protozoa are diet A. Variations doses of probiotic significantly different (α 5%) on the number of methanogenic bacteria and protozoa, with the best dose 5% v/v to suppress methanogenic bacteria and 15% v/v to suppress protozoa in vitro.

Feed Digestibility Coefficient (FDC) shows the FDC from 27,99 – 31,95%, while the diet B ranged from 25,85 to 31,3%. In diet A, the value FDC obtained tended to increase (8,5%) along with increasing concentration of probiotic *L. plantarum* TSD-10. Increasing FDC value expected to suppress the growth of methanogenic bacteria by altering the rumen fermentation pattern which results in volatile fatty acids produced. Diet A shows the value of higher acetate than propionate, because diet A high on fiber that will support the growth of the acetate-producing bacteria species, diet B rich in starch that supports the growth of propionic-producing bacteria species, and marked by increasing propionate than acetate (France and Dijkstra, 2005).

xv + 85 pp

Bibl : 58 (1981 – 2008).

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah kepada hambaNya, sehingga tugas penelitian dan penulisan tesis dapat diselesaikan. Tesis sebagai laporan hasil penelitian mengenai pengaruh komposisi pakan dan pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* TSD-10 secara *in vitro* terhadap jumlah bakteri metanogen dan protozoa dalam rumen sapi yang telah dilaksanakan dari bulan September 2008 hingga Mei 2009. Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Yantyati Widyastuti dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. atas bimbingan, pengalaman dan pengetahuan yang sangat berharga selama dan setelah penulisan.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Prof. Dr. Indrawati Ganjar dan Drs. Iman Santoso, M.Phil. selaku penguji, atas masukan dalam penulisan tesis ini. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M. Biomed. dan Dr. Nisyawati selaku pimpinan Program Studi Pascasarjana Biologi Universitas Indonesia. Terima kasih kepada para staff Laboratorium Mikrobiologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Bogor, atas bantuan dan kerjasamanya selama penelitian berlangsung.

Terima kasih kepada Keluarga Bp. H. Rusdi Yustianto, Bp. H. Ruswan Usman (Alm.) dan suami Rendra Anandia Usman atas dukungan, doa, semangat dan kepercayaannya. Rekan-rekan Pascasarjana Biologi

angkatan 2007, khususnya Mikrobiologi Terapan, penulis ucapkan terima kasih sebesar-sebesarnya atas persahabatan yang diberikan. Kepada semua pihak yang terlibat dan membantu dalam penyelesaian tesis ini, penulis ucapkan terima kasih.

Penulis menyadari bahwa tesis masih jauh dari sempurna, karenanya kritik dan saran sangat penulis harapkan. Akhir kata penulis berharap semoga tesis dapat memberikan sumbangsih kepada khasanah ilmu pengetahuan, khususnya di bidang Mikrobiologi.

Depok, Desember 2009

Penulis

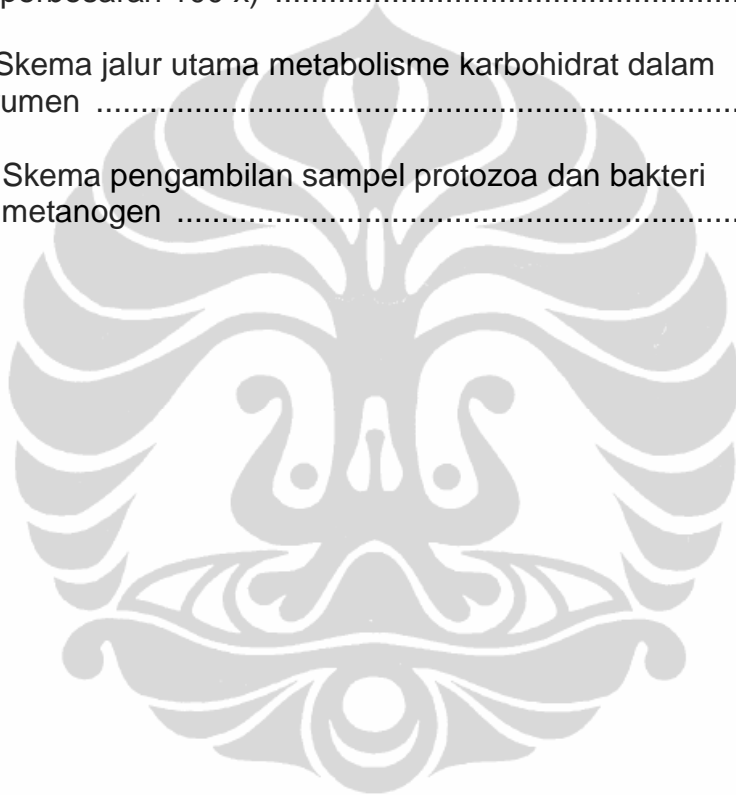
DAFTAR ISI

	Halaman
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
PENGANTAR PARIPURNA	1
MAKALAH I : PENGARUH KOMPOSISI PAKAN TERHADAP JUMLAH BAKTERI METANOGEN DAN PROTOZOA DALAM RUMEN SAPI	4
Pendahuluan	4
Metodologi	10
Bahan dan alat	12
Hasil dan pembahasan	17
Kesimpulan dan saran	29
Daftar acuan	30
Lampiran I	34
MAKALAH II : PENGARUH KOMPOSISI PAKAN DAN PENAMBAHAN PROBIOTIK <i>Lactobacillus plantarum</i> TSD-10 TERHADAP JUMLAH BAKTERI METANOGEN DAN PROTOZOA DALAM RUMEN SAPI SECARA <i>IN VITRO</i>	44
Pendahuluan	44
Metodologi	49
Bahan dan alat	51
Hasil dan pembahasan	59
Kesimpulan dan saran	69
Daftar acuan	70
Lampiran II	74
DISKUSI PARIPURNA	79
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN	84



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar I. 1. Skema pengambilan sampel protozoa dan bakteri metanogen	11
Gambar I. 2. Protozoa yang diperoleh selama penelitian (perbesaran 100 x)	26
Gambar II. 1. Skema jalur utama metabolisme karbohidrat dalam rumen	46
Gambar II. 2. Skema pengambilan sampel protozoa dan bakteri metanogen	50



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel I. 1. Jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda	18
Tabel I. 2. Nilai suhu dan pH pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda	19
Tabel I. 3. Data asam lemak <i>volatile</i> pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda	20
Tabel I. 4. Jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda pada pengambilan sampel pagi dan sore hari	21
Tabel I. 5. Jumlah protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda	23
Tabel I. 6. Rerata protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda pada pengambilan sampel pagi dan sore hari	24
Tabel I. 7. Jumlah Famili protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda pada waktu pengambilan sampel pagi dan sore hari	25
Tabel II. 1. Rerata bakteri metanogen ($\times 10^7$ cfu/ml) pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan probiotik <i>Lactobacillus plantarum</i> TSD-10	60
Tabel II. 2. Nilai pH pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan probiotik <i>Lactobacillus plantarum</i> TSD-10	61
Tabel II. 3. Nilai koefisien cerna bahan kering pakan pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan <i>Lactobacillus plantarum</i> TSD-10	62

Tabel II. 4. Data asam lemak <i>volatile</i> yang diperoleh pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan <i>Lactobacillus plantarum</i> TSD-10	64
Tabel II. 5. Rerata protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan <i>Lactobacillus plantarum</i> TSD-10	66



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran I. 1. Bagan cara kerja perhitungan bakteri metanogen dan protozoa	34
Lampiran I. 2. Analisis sidik ragam bakteri metanogen dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi	35
Lampiran I. 3. Analisis sidik ragam bakteri metanogen dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi di pagi hari	37
Lampiran I. 4. Analisis sidik ragam bakteri metanogen dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi di sore hari	39
Lampiran I. 5. Analisis sidik ragam protozoa dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi	41
Lampiran I. 6. Analisis sidik ragam protozoa dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi di pagi hari	42
Lampiran I. 7. Analisis sidik ragam protozoa dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi di sore hari	44
Lampiran II. 1. Bagan cara kerja perhitungan protozoa dan bakteri metanogen	74
Lampiran II. 2. Analisis sidik ragam bakteri metanogen secara <i>in vitro</i>	75
Lampiran II. 3. Analisis sidik ragam protozoa secara <i>in vitro</i>	77

PENGANTAR PARIPURNA

Gas metana merupakan salah satu gas penyebab pemanasan global. Gas metana yang dikeluarkan oleh hewan ruminansia merupakan salah satu dari tiga sumber gas yang berperan dalam efek rumah kaca selain nitrous oxida (N_2O) dan karbondioksida (CO_2) (Moss *et al.*, 2001; Gworgwor *et al.*, 2006). Emisi gas metana ikut berkontribusi terhadap pemanasan global (Bunthoen, 2007). Menurut Fonty *et al.* (2007), persentase gas metana yang dikeluarkan oleh hewan ruminansia pada saat bersendawa sekitar 8 - 13 % dari makanan yang dikonsumsi oleh hewan tersebut.

Gas metana yang dihasilkan pada saat fermentasi anaerob di dalam saluran pencernaan hewan ruminansia dipengaruhi oleh komposisi pakan seperti selulosa, hemiselulosa, dan residu terlarut pada pakan yang dikonsumsi oleh hewan tersebut. Produksi metana pada rumen hewan ruminansia merupakan proses yang sia-sia, karena pakan yang dikonsumsi oleh hewan tersebut akan dikonversikan menjadi metana dan dikeluarkan dalam bentuk gas.

Metana dihasilkan dari fermentasi anaerob karbohidrat oleh bakteri metanogen di dalam rumen ternak ruminansia (Santoso *et al.*, 2007). Pada rumen, bakteri metanogen berperan dalam memanfaatkan molekul hidrogen yang ditimbulkan oleh mikroorganisme rumen selama proses fermentasi anaerobik karbohidrat. Pembentukan metana di dalam rumen terjadi melalui reaksi sebagai berikut: $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$. Gas metana ini kemudian

dikeluarkan oleh hewan ruminansia pada saat bersendawa (Madigan *et al.*, 2003). Bakteri metanogen yang umum ditemui di dalam rumen yaitu *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanobacterium*, dan *Methanosarcina* (Whitford *et al.*, 2001).

Bakteri metanogen sering ditemui hidup menempel pada permukaan protozoa rumen (Beth de Ondarza, 2000). Protozoa rumen, siliata, ikut berkontribusi dalam proses metanogenesis dengan berperan sebagai penyedia hidrogen bagi bakteri metanogen dalam rumen (Irbis dan Ushida, 2004). Bakteri metanogen seringkali ditemukan berasosiasi dengan protozoa untuk tetap mendapatkan suplai hidrogen secara konstan.

Pakan hewan ruminansia dapat berupa hijauan (rumput-rumputan) ataupun konsentrat. Pemberian pakan berupa hijauan dan konsentrat dengan perbandingan tertentu dapat berpengaruh terhadap produksi gas metana dalam rumen sapi. Menurut Moe dan Tyrell (1979); Takahashi (2001); Santoso *et al.* (2007) menyatakan bahwa produksi gas metana secara alami dapat dipengaruhi oleh pemecahan karbohidrat seperti selulosa, hemiselulosa dan residu terlarut pada pakan. Adanya variasi pada pakan dapat mengubah pola fermentasi dalam rumen yang berpengaruh terhadap nilai pH rumen dan asam lemak *volatile* (Monteny *et al.*, 2006). Penurunan pH menyebabkan berkurangnya beberapa populasi protozoa, rumen siliata dan bakteri metanogen.

Salah satu upaya untuk menekan produksi gas metana pada hewan ruminansia diantaranya dengan menggunakan probiotik. Probiotik

merupakan suplemen pakan dalam bentuk mikroorganisme hidup yang berguna dalam menjaga keseimbangan mikroorganisme pencernaan. Menurut Chaucheyras *et al.* (1995), *S. cereviceae* sebagai probiotik mampu menstimulasi bakteri asetogen untuk berkompetisi dengan bakteri metanogen, sehingga gas metana yang dihasilkan bakteri metanogen dapat ditekan. Salah satu probiotik yang dapat digunakan untuk hewan ruminansia adalah bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* TSD-10. Secara *in vitro*, *L. plantarum* TSD-10 mampu meningkatkan pencernaan terhadap pakan dan meningkatkan konsentrasi asam lemak *volatile* dengan memberikan kondisi lingkungan yang baik bagi mikroorganisme rumen (Widyastuti *et al.*, 1996; Widyastuti *et al.*, 1998). Melalui penelitian ini diharapkan pemberian komposisi pakan yang berbeda dan *L. plantarum* TSD-10 sebagai probiotik dapat mengurangi produksi gas metana dengan cara menekan keberadaan protozoa dan bakteri metanogen dalam rumen. Tujuan penelitian adalah menghitung jumlah bakteri metanogen dan protozoa dalam rumen sapi dan mengetahui pengaruh probiotik *L. plantarum* TSD-10 secara *in vitro* terhadap jumlah bakteri metanogen dan protozoa dengan pakan berbeda.

Makalah I

PENGARUH KOMPOSISI PAKAN TERHADAP JUMLAH BAKTERI METANOGEN DAN PROTOZOA DALAM RUMEN SAPI

Melati Ramadhana

ABSTRACT

This research aimed to enumerate methanogenic bacteria and protozoa in the rumen with different feeding composition between grass and concentrate, and also to recognize which composition influences methanogenic bacteria. The treatments were diets with grass : concentrate ratio (70 : 30) (diet A) and (30 : 70) (diet B). Methanogenic bacteria obtained from diet A were $0,82 \pm 0,07 \times 10^7$ cfu/ml and $2,19 \pm 0,44 \times 10^7$ cfu/ml from diet B. Protozoa were $3,08 \pm 1,04 \times 10^5$ sel/ml from diet A and $3,76 \pm 0,83 \times 10^5$ sel/ml from diet B. Statistical analysis indicated that effect of diet was significant ($p < 0.05$) on methanogenic bacteria with the best diet are diet A, but has not significant effect on protozoa. It can be concluded that diet composition affecting on methanogenic bacteria inside rumen ruminantia.

Keywords: concentrate, grass, methanogenic bacteria, protozoa, rumen.

PENDAHULUAN

Hewan ruminansia adalah mamalia herbivora yang memiliki saluran pencernaan khusus yaitu rumen, dimana pemecahan pakan seperti selulosa dan polisakarida dilakukan oleh mikroba rumen, yaitu bakteri, fungi dan protozoa (Madigan *et al.*, 2003). Hewan ruminansia merupakan hewan memamah biak yang mencerna makanannya dalam dua tahap. Pertama makanan dikunyah dan ditelan seperti pada umumnya. Makanan yang telah ditelan tersebut masuk ke dalam rumen dan terjadilah proses fermentasi oleh mikroorganisme di dalam rumen. Proses fermentasi di dalam rumen terjadi

selama 9-12 jam, setelah itu makanan kembali ke rongga mulut untuk dikunyah.

Organ pencernaan hewan ruminansia terbagi atas empat bagian yaitu rumen, retikulum, omasum dan abomasum. Rumen merupakan suatu kantung besar pada bagian pencernaan beberapa hewan herbivora. Berperan sebagai tempat penyimpanan bahan pangan yang telah ditelan untuk difermentasi oleh populasi mikroba anaerobik. Mikroorganisme tersebut memfermentasikan pakan menjadi asam lemak *volatile* dan protein. Keberadaan dan keberlangsungan dari stabilnya populasi mikroorganisme tersebut bergantung dari jenis pakan (perbandingan antara hijauan dan konsentrat), tingkatan dan frekuensi pemberian pakan juga interaksi antara mikroorganisme rumen (Dehority, 1998).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas dan pertumbuhan populasi mikroorganisme rumen adalah pH, temperatur, tekanan osmosis, kandungan bahan kering dan potensi reduksi-oksidasi. Nilai pH rumen normal berkisar 5,5 – 7. Fluktuasi pH rumen dapat terjadi karena jenis pakan, frekuensi dan waktu mencerna pakan. Temperatur rumen relatif konstan ($38 - 40^{\circ} \text{C}$). Temperatur rumen dapat meningkat hingga 41°C , pada saat terjadi fermentasi aktif (setelah mencerna pakan). Peningkatan temperatur rumen hingga diatas 40°C menyebabkan protozoa tidak dapat bertahan hidup (Dehority, 2003).

Fermentasi anaerobik karbohidrat dalam rumen menghasilkan gas hidrogen (H_2) yang digunakan untuk sintesis asam lemak *volatile*. Produksi

H₂ yang berlebih, dimanfaatkan oleh bakteri metanogen untuk membentuk gas metana (Bunthoen, 2007). Senyawa H₂ merupakan produk akhir dari protozoa, fungi dan bakteri, tidak terakumulasi di dalam rumen karena langsung dimanfaatkan oleh bakteri metanogen untuk membentuk gas metana (Moss *et al.*, 2000). Pembentukan gas metana di dalam rumen terjadi melalui reaksi sebagai berikut: $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$. Gas metana kemudian dikeluarkan oleh hewan ruminansia pada saat bersendawa (Madigan *et al.*, 2003).

Bakteri metanogen merupakan anggota dari domain Archaea dan termasuk kingdom Euryarchaeota. Bersifat anaerob obligat dan dapat dibedakan dari organisme lain karena menghasilkan gas metana sebagai hasil metabolisme utama. Koenzim F₄₂₀ dan koenzim M, merupakan salah satu pembeda dari Archaea lainnya, berperan penting dalam sintesis gas metana. Bakteri metanogen umumnya ditemukan di dalam rumen, yaitu *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanobacterium*, dan *Methanosarcina* (Whitford *et al.*, 2001).

Bakteri metanogen memperoleh energi dengan cara mengubah substrat utamanya menjadi gas metana. Substrat utama dari bakteri metanogen adalah hidrogen (H₂) dan karbondioksida (CO₂), format, dan asetat. Berdasarkan substratnya, bakteri metanogen diklasifikasikan ke dalam tiga kelompok. Kelompok pertama, yaitu bakteri metanogen yang menggunakan H₂, format dan beberapa alkohol, dengan CO₂ sebagai akseptor elektron. Kelompok kedua, yaitu bakteri metanogen yang

menggunakan senyawa C-1 sebagai substrat dan kelompok ketiga, yaitu menggunakan asetat sebagai substrat (Whitman *et al.*, 2006).

Peranan bakteri metanogen dalam rumen yaitu memanfaatkan molekul hidrogen dalam proses fermentasi rumen. Hal tersebut menyebabkan proses fermentasi di dalam rumen dapat terus berlangsung, namun menyebabkan hilangnya sejumlah energi yang diproduksi oleh hewan tersebut (Kamra, 2005).

Protozoa di dalam rumen keberadaannya mendominasi lebih kurang separuh dari total mikroorganisme rumen (Beth de Ondarza, 2000). Keberadaan protozoa di dalam rumen dapat mempengaruhi jumlah dan jenis bakteri rumen, proporsi dan konsentrasi asam lemak *volatile*, pH rumen dan konsentrasi amoniak. Protozoa juga berkontribusi secara langsung pada proses pencernaan dan pemecahan materi organik dalam rumen (Williams dan Coleman, 1988).

Protozoa yang umum ditemukan di dalam rumen yaitu flagelata dan siliata, namun protozoa siliata lebih banyak ditemui. Siliata diklasifikasikan ke dalam tiga ordo yaitu Prostomatida, Trichostomatida, dan Entodiniomorphida. Siliata berperan sebagai penyedia sumber nitrogen, pemecah selulosa dan penghasil asam lemak *volatile*. Siliata pada rumen juga menurunkan laju pemecahan pati oleh bakteri dengan cara memakan bakteri rumen (Ogimoto dan Imai, 1981).

Produk fermentasi protozoa serupa dengan yang dihasilkan oleh bakteri, khususnya asetat, butirat dan hidrogen. Protozoa rumen, siliata, ikut

berperan dalam proses metanogenesis sebagai penyedia hidrogen bagi bakteri metanogen dalam rumen (Irbis dan Ushida, 2004). Oleh karena itu, bakteri metanogen sering ditemukan hidup menempel pada permukaan protozoa rumen untuk tetap mendapatkan suplai hidrogen secara konstan (Beth de Ondarza, 2000).

Pakan hewan ruminansia dapat berupa hijauan (rumput-rumputan) ataupun konsentrat. Pemberian pakan hanya berupa hijauan saja tidak cukup, sehingga ditambahkan jenis pakan lain yaitu konsentrat (Suherman, 2003). Konsentrat adalah satu atau campuran dari beberapa jenis bahan pakan yang mengandung serat kasar atau bahan tak tercerna relatif rendah. Bahan-bahan yang biasa dipergunakan sebagai konsentrat diantaranya jagung giling, bungkil kelapa, dedak padi, bungkil kelapa sawit, ampas tebu, bekatul, kulit biji kedelai, kulit nanas dan ampas tahu (Siregar, 2007).

Hijauan yang biasa digunakan sebagai pakan sapi, yaitu jerami padi, daun tebu, daun jagung dan berbagai jenis rumput. Rumput yang biasa diberikan sebagai pakan, yaitu rumput gajah. Kandungan nutrisi rumput gajah berdasarkan 100% Berat Kering (BK) menurut Hartadi *et al.* (1993) lihat Syukur (2006) yaitu: Protein Kasar (PK) 10,1%; Lemak Kasar (LK) 2,5%; Serat Kasar (SK) 31,2%; Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen (BETN) 46,1%; dan abu 10,1%.

Pemberian pakan berupa hijauan dan konsentrat dengan perbandingan tertentu dapat berpengaruh terhadap produksi gas metana dalam rumen sapi. Tiga faktor utama yang mempengaruhi produksi gas

metana dalam rumen, yaitu laju fermentasi bahan organik, asam lemak *volatile* yang dihasilkan dan efisiensi dari biosintesis mikroba rumen. Menurut Moe dan Tyrell (1979); Takahashi (2001); dan Santoso *et al.* (2007) produksi gas metana secara alami dapat dipengaruhi oleh pemecahan karbohidrat seperti selulosa, hemiselulosa dan residu terlarut pada pakan. Adanya variasi pada pakan yang dikonsumsi juga dapat mengubah pola fermentasi dalam rumen. Hal tersebut berpengaruh terhadap asam lemak *volatile* yang dihasilkan (Monteny *et al.*, 2006).

Produksi gas metana berkurang seiring dengan meningkatnya asupan pakan konsentrat yang ditandai dengan rendahnya rasio asetat : propionat dan menurunnya nilai pH (Christophersen *et al.*, 2008). Meningkatnya pakan konsentrat akan menghasilkan lebih banyak propionat. Hal ini disebabkan karena adanya perubahan kelimpahan spesies mikroorganisme dalam saluran pencernaan.

Pembentukan propionat oleh mikroorganisme rumen membutuhkan hidrogen (H_2) yang dibutuhkan pula oleh bakteri metanogen sehingga mengakibatkan menurunnya produksi gas metana (Monteny *et al.*, 2006). Van Soest (1982) lihat Gworgwor *et al.* (2006) menjelaskan bahwa tingginya konsumsi pakan dari jenis biji-bijian membentuk kondisi kurang menguntungkan bagi bakteri metanogen karena menurunnya pH yang menyebabkan hilangnya beberapa populasi protozoa, rumen ciliata dan bakteri metanogen.

Penelitian bertujuan menghitung jumlah bakteri metanogen dan protozoa dalam rumen sapi yang diberi pakan dengan perbandingan rumput dan konsentrat berbeda, serta mengetahui komposisi pakan paling berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan bakteri metanogen dan protozoa dalam rumen sapi.

METODOLOGI

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Bidang Biologi Sel dan Jaringan, Pusat Penelitian Bioteknologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong Bogor. Waktu penelitian pada bulan September 2008 – Mei 2009.

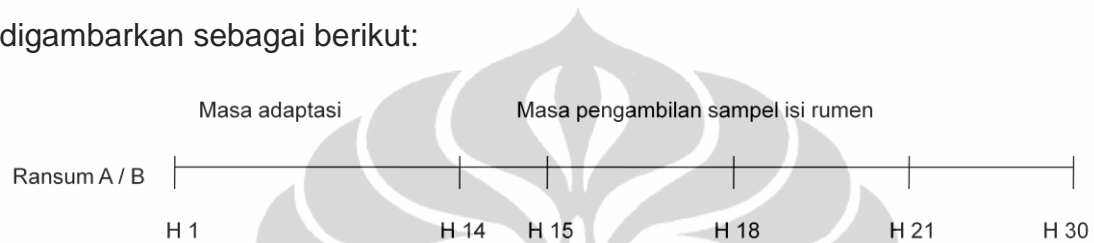
Rancangan percobaan

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan rancangan percobaan tukar ganti (Jones dan Kenward, 2003). Data bakteri metanogen dan protozoa yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf nyata 5%. Perhitungan dibantu menggunakan *software progame SAS version 9 for windows*.

Perlakuan yang diberikan sebagai berikut :

- A. Pakan dengan perbandingan hijauan:konsentrat (70:30), (ransum A).
- B. Pakan dengan perbandingan hijauan:konsentrat (30:70), (ransum B).

Masa adaptasi dari masing-masing ransum adalah 14 hari. Pengambilan isi rumen dilakukan setelah masa adaptasi. Skema pengambilan sampel digambarkan sebagai berikut:



Gambar 1. Skema pengambilan sampel protozoa dan bakteri metanogen.

Keterangan:

H 15 : Pengambilan sampel perhitungan bakteri metanogen ke-1 pada pagi dan sore hari.

H 18 : Pengambilan sampel perhitungan bakteri metanogen ke-2 pada pagi dan sore hari.

H 21 : Pengambilan sampel perhitungan bakteri metanogen ke-3 pada pagi dan sore hari.

H 30 : Awal pergantian pakan atau H1 untuk ransum berikutnya.

Parameter utama yang diukur adalah jumlah protozoa dan bakteri metanogen dari setiap perlakuan. Parameter pendukungnya adalah: pH cairan rumen, temperatur tubuh sapi, variasi pakan, dan variasi waktu.

BAHAN DAN ALAT

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah cairan rumen berasal dari sapi Peranakan Ongole (PO) yang sudah difistulasi, gas H₂ : CO₂ (80 : 20)(BOC Gases Indonesia), KH₂PO₄ (Merck), K₂HPO₄ (Sigma Aldrich), (NH₄)₂SO₄ (Merck), NaCl (Merck), MgSO₄.7H₂O (Sigma Aldrich), CaCl₂ (Merck), resazurin (Sigma), NaHCO₃ (Merck), L-Cysteine hydrochloride (Merck), Na₂S (Merck), formaldehyde (Merck), methylgreen (Merck), glukosa (Merck), rumput gajah dan konsentrat (Prima Feed).

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah sentrifuse (eppendorf), lemari pendingin (Modena, Sharp), mesin *roll tube*, autoklaf (Everlight), pH meter (Jenway), timbangan digital (Mettler), Neubauer *Counting Chamber* (Weber Scientific International), Vortex (Fisons), inkubator (Jouan), mikroskop binokuler (Nikon) dan alat-alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

Cara Kerja

Pengambilan Cairan Rumen

Pengambilan cairan rumen menggunakan metode Tokura *et al.* (1999). Cairan rumen diambil dari 1 ekor sapi PO berfistula. Sapi diberi pakan pada pagi hari (07.00 WIB) dan siang hari (13.00 WIB). Cairan rumen diambil 2 jam setelah pemberian pakan, dengan cara menyaring isi rumen menggunakan 4 lapis kain kasa steril. Cairan rumen selanjutnya dimasukkan ke dalam termos hangat ($\pm 40^{\circ}$ C).

Pengukuran pH Rumen

Pengukuran kadar pH rumen dilakukan dengan cara mencelupkan kertas indikator pH (*universal*) ke dalam cairan rumen. Warna yang timbul pada kertas indikator tersebut kemudian disesuaikan dengan skala warna yang tertera pada bungkus indikator pH.

Pengukuran Temperatur Tubuh Sapi

Temperatur tubuh sapi diukur dengan mencelupkan termometer air raksa pada bagian rumen melalui fistula sapi. Pengukuran diulang 3 kali.

Persiapan Cairan Rumen untuk Media Pertumbuhan

Persiapan cairan rumen untuk media pertumbuhan menggunakan metode Ogimoto dan Imai (1981). Cairan rumen disaring menggunakan kain saring steril untuk memisahkan partikel kasar kemudian diautoclave,

selanjutnya disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 menit dan disimpan di dalam *freezer* (-20° C).

Media Pengencer

Pengenceran cairan rumen menggunakan larutan pengencer berdasarkan Bryant dan Burkey (1953) *lihat* Ogimoto dan Imai (1981). Larutan mineral I (komposisi per 100 ml : K_2HPO_4 0,6 g dan akuades 100 ml) 7,5 ml; larutan mineral II (komposisi per 100 ml : NaCl 1,2 g; $(NH_4)SO_4$ 1,2 g; KH_2PO_4 0,6 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,16 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g dan akuades 100 ml) 7,5 ml; 0,3 g Na_2CO_3 , 0,1 ml larutan indikator resazurin 0,1% dan 100 ml akuades ditempatkan pada tabung Erlenmeyer dan dipanaskan hingga mendidih sambil dialiri gas CO_2 . Setelah mendidih ditambahkan 0,05 g L-cystein HCl ke dalam medium, kemudian dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi sebanyak 4,5 ml menggunakan pipet ukur, sambil dialiri gas CO_2 sampai indikator resazurin berubah warna dari merah muda menjadi bening. Tabung selanjutnya ditutup menggunakan sumbat karet no. 2 dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 20 menit.

Media Paynter dan Hungate (PH)

Media PH sebagai media pertumbuhan untuk bakteri metanogen berdasarkan Paynter dan Hungate (1968) *lihat* Ogimoto dan Imai (1981). Persiapan medium dilakukan dalam kondisi anaerob dengan perbandingan gas $H_2:CO_2$ (80:20). Komposisi media per 100 ml: agar (1,3 g); KH_2PO_4 (0,05

g); K_2HPO_4 (0,05 g); $(NH_4)_2SO_4$ (0,05 g); NaCl (0,10 g); $MgSO_4$ (0,05 g); $CaCl_2$ (0,01 g); larutan resazurin 0,1% (0,1 ml), dan akuades (70 ml).

Bahan-bahan tersebut ditempatkan di Erlenmeyer kemudian dipanaskan hingga mendidih untuk melarutkan agar sambil dialiri gas $H_2:CO_2$. Setelah mendidih, cairan rumen (30 ml), $NaHCO_3$ (0,5 g), Na_2S (0,03) dan L-cystein HCl (0,03 g) ditambahkan ke dalam medium. Medium kemudian dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi sebanyak 4 ml pada setiap tabung, sambil dialiri gas sampai indikator resazurin berubah warna dari merah muda menjadi kuning muda. Tabung selanjutnya ditutup menggunakan sumbat karet no. 3 dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ selama 20 menit.

Prosedur Menumbuhkan dan Menghitung Bakteri Metanogen

Bakteri metanogen ditumbuhkan dan dihitung menggunakan metode *roll tube* berdasarkan Ogimoto dan Imai (1981). Sebanyak 0,5 ml cairan rumen yang akan diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan larutan pengencer sampai tingkat pengenceran 10^{-5} . Pengenceran dilakukan secara anaerob dengan mengalirkan gas $H_2:CO_2$. Pada tingkat pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} , masing-masing diambil sebanyak 0,5 ml untuk ditumbuhkan pada media pertumbuhan metanogen di dalam tabung reaksi yang sudah dicairkan. Inokulasi cairan rumen dilakukan dalam keadaan anaerob. Setelah diinokulasi, tabung ditutup dengan sumbat karet dan media digoyangkan

perlahan. Media kemudian diletakkan secara mendatar pada mesin pemutar yang sudah diberi air es. Hal tersebut bertujuan untuk mengeraskan media secara merata. Setelah itu seluruh tabung diletakkan dalam inkubator bersuhu 39⁰ C selama 4 hari. Koloni yang tumbuh dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah populasi bakteri per ml cairan rumen} = \frac{\text{rerata koloni terhitung}}{\text{volume inokulum}} \times \text{faktor pengenceran}$$

Pewarnaan Protozoa

Pewarnaan protozoa menggunakan larutan Methylgreen-Formalin-Saline (MFS) sebanyak 4,5 ml larutan ditambahkan dengan 0,5 ml cairan rumen. Komposisi larutan MFS per 100 ml adalah 35% larutan formaldehyde 10 ml; akuades 90 ml; methylgreen 0,03 g dan NaCl 0,8 g (Ogimoto dan Imai, 1981). Protozoa dapat diamati 30 menit setelah penambahan larutan MFS. Pengamatan protozoa dilakukan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 100 x.

Identifikasi dan Penghitungan Protozoa

Pengamatan protozoa dimulai dengan meneteskan 1 ml larutan MFS pada Neubauer *counting chamber* kemudian ditutup menggunakan gelas penutup. Protozoa yang ada diamati dengan mikroskop sebanyak 10 bidang pandang dengan tiga kali pengulangan.

Identifikasi dan perhitungan protozoa berdasarkan pada Ogimoto dan Imai (1981) dengan rumus sebagai berikut :

$$N = n \times 72 \times d$$

Keterangan:

N = jumlah protozoa per 1 ml cairan rumen.
n = jumlah protozoa dalam 10 lapang pandang.
d = faktor pengenceran sampel.

Analisis *Volatile Fatty Acid* (VFA)

Analisis *Volatile Fatty Acid* (VFA) menggunakan metode IKM 15 untuk *Gas Chromatography* (GC) pada Laboratorium Balai Penelitian Ternak, Jl. Raya Tapos, Ciawi, Bogor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh komposisi pakan terhadap bakteri metanogen pada rumen sapi

Hasil perhitungan bakteri metanogen pada cairan rumen sapi yang diberi komposisi pakan berbeda, yaitu perlakuan ransum A dan perlakuan ransum B tersaji pada Tabel I. 1., dengan rerata bakteri metanogen pada ransum A, yaitu $(0,82 \pm 0,07) \times 10^7$ cfu/ml dan ransum B, yaitu $(2,19 \pm 0,44) \times 10^7$ cfu/ml. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan yang dicobakan terhadap jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi berbeda nyata antar perlakuan ($\text{sig} < \alpha 0.05$) (Lampiran I. 2). Hal ini berarti bahwa perbedaan komposisi ransum A dan B memberikan pengaruh terhadap

jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi. Berdasar nilai tengah, terlihat bahwa peningkatan jumlah bakteri metanogen terjadi pada pemberian ransum B dibandingkan ransum A.

Tabel I. 1. Jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda.

Komposisi pakan	Populasi bakteri metanogen ($\times 10^7$ cfu/ml)			Rerata
	1	2	3	
Ransum A	0,89	0,82	0,74	0,82 \pm 0,07
Ransum B	2,58	2,27	1,71	2,19 \pm 0,44

Keterangan : Nilai diperoleh dari 3x ulangan.

Lebih tingginya jumlah bakteri metanogen pada perlakuan ransum B dapat disebabkan karena nilai pH yang cenderung lebih basa. Nilai pH dari tiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel I. 2. Menurut Mirzaei-Aghsaghali *et al.* (2008) bakteri metanogen sensitif terhadap perubahan pH. Penurunan nilai pH akan menurunkan jumlah bakteri metanogen. Keberadaan bakteri metanogen sangat dipengaruhi oleh nilai pH, karena bakteri tersebut sangat sensitif terhadap perubahan nilai pH (Russel, 1998). Nilai pH ransum B cenderung lebih basa dapat disebabkan karena rasio asetat : propionat yang lebih tinggi dibanding ransum A (5,09:5,14) (Tabel I. 3). Menurut Russel (1998) dan Lana *et al.* (1998), penurunan rasio asetat : propionat akan dibarengi dengan menurunnya nilai pH.

Tabel I. 2. Nilai suhu dan pH pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda.

Komposisi pakan	1		2		3	
	Suhu (⁰ C)	pH	Suhu (⁰ C)	pH	suhu (⁰ C)	pH
Ransum A	38,5	7	39	7	39	7
Ransum B	39	8	39	8	39	8

Rendahnya jumlah bakteri metanogen pada ransum A, dapat pula disebabkan karena rasio asetat : propionat yang diperoleh lebih rendah dibandingkan pada ransum B. Nilai pH pada ransum A yang lebih rendah menunjukkan adanya penurunan rasio asetat : propionat. Menurut Russel (1998) dan Lana *et al.* (1998), pH rumen dipengaruhi oleh rasio asetat : propionat. Rasio asetat : propionat yang rendah akan disertai dengan rendahnya nilai pH.

Pembentukan asam propionat dalam rumen membutuhkan senyawa H₂ yang juga dibutuhkan dalam pembentukan metana (Christophersen, 2007). Pemanfaatan senyawa yang sama menyebabkan bakteri propionat dan bakteri metanogen berkompetisi dalam memanfaatkan H₂ dalam rumen (Russel, 1998), sehingga rendahnya rasio asetat : propionat akan dibarengi dengan rendahnya gas metana yang dihasilkan, dan begitu pula sebaliknya. Menurut France & Dijkstra (2005) dan Mirzaei-Aghsaghali *et al.* (2008), peningkatan asetat akan menghasilkan lebih banyak H₂ yang dapat dimanfaatkan oleh bakteri metanogen untuk membentuk gas metana, sehingga gas metana yang dihasilkan akan lebih tinggi.

Data asam lemak *volatile* dari tiap perlakuan ransum dapat dilihat pada

Tabel I. 3.

Tabel I. 3. Data asam lemak *volatile* pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda.

Komposisi pakan	Asam Lemak <i>Volatile</i> (mMol)				
	C2	C3	IC4	nC4	IC5
Ransum A	94,52	18,56	2,13	6,42	0,94
Ransum B	72,29	14,06	2,59	3,61	1,30

Keterangan:

C₂ : asetat; C₃ : propionat; iC₄ : isobutirat; nC₄ : n butirat; iC₅ : isovalerat.

Hasil perhitungan jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi dengan pengambilan sampel di pagi dan sore hari disajikan pada Tabel I. 4.

Berdasarkan hasil penghitungan, pada perlakuan ransum A diperoleh rerata bakteri metanogen sebesar $0,77 \times 10^7$ cfu/ml di pagi hari dan $0,86 \times 10^7$ cfu/ml di sore hari. Pada perlakuan ransum B, diperoleh rerata bakteri metanogen sebesar $2,17 \times 10^7$ cfu/ml di pagi hari dan $2,20 \times 10^7$ cfu/ml di sore hari. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan rerata bakteri metanogen antara ransum A dan B pada pengambilan sampel pagi dan sore hari berbeda nyata antar perlakuan ($\text{sig} < \alpha 0,05$), dengan perlakuan terbaik dalam menekan bakteri metanogen dari setiap pengambilan sampel adalah ransum A (Lampiran I. 3 dan I. 4).

Tabel I. 4. Jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda pada pengambilan sampel pagi dan sore hari.

Komposisi pakan	Populasi ($\times 10^7$ cfu/ml)						Rerata	
	1		2		3		Pagi	Sore
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore		
Ransum A	0,81	0,99	1,00	0,63	0,51	0,97	0,77 \pm 0,25	0,86 \pm 0,20
Ransum B	2,52	2,62	1,95	2,59	2,03	1,39	2,17 \pm 0,31	2,20 \pm 0,70

Keterangan : Nilai diperoleh dari 3x ulangan.

Pengambilan sampel rumen yang dilakukan pada interval waktu 2 jam setelah pemberian pakan (di pagi dan sore hari) menunjukkan jumlah bakteri metanogen pada ransum B lebih tinggi dibanding ransum A. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Leedle dan Greening (1988), yang membandingkan fluktuasi keberadaan bakteri metanogen pada sapi jantan menggunakan pakan berserat tinggi (komposisi 75% *alfalfa hay* : 25% campuran konsentrat) dan pakan berserat rendah (komposisi 25% *alfalfa hay* : 75% campuran konsentrat) setelah pemberian pakan. Pada pakan berserat tinggi, setelah pemberian pakan sampai dengan jam ke 8, terjadi penurunan jumlah bakteri metanogen (30,4%). Hal berbeda terjadi pada pemberian pakan berserat rendah, jumlah bakteri metanogen semakin meningkat setelah pemberian pakan (pada jam ke-2), selanjutnya terjadi penurunan jumlah bakteri metanogen terjadi pada jam ke-4 setelah pemberian pakan (55,4%).

Peningkatan bakteri metanogen setelah pemberian pakan dapat dihubungkan dengan keberadaan protozoa siliata dalam rumen. Protozoa siliata berperan sebagai tempat perlekatan bakteri metanogen dan juga sebagai produsen hidrogen (produk akhir metabolisme) bagi bakteri

metanogen. Pada pakan berserat rendah, bakteri metanogen dapat mencapai jumlah tertinggi pada 2 jam setelah pemberian pakan karena sifat dari protozoa yang lebih menyukai pati dibandingkan serat (Leedle dan Greening, 1988). Pakan konsentrat lebih banyak mengandung pati, sehingga lebih disukai oleh protozoa. Lebih banyak pati yang dimetabolisme, lebih banyak hidrogen yang dihasilkan untuk digunakan oleh bakteri metanogen.

Pengaruh komposisi pakan terhadap protozoa pada rumen sapi

Hasil perhitungan terhadap protozoa pada cairan rumen sapi yang diberi komposisi pakan berbeda, yaitu ransum A dan ransum B, tersaji pada Tabel I. 5. Rerata protozoa pada ransum B ($3,76 \times 10^5$ sel/ml) lebih tinggi dibandingkan ransum A ($3,08 \times 10^5$ sel/ml). Hasil perhitungan menggunakan analisis sidik ragam memperlihatkan bahwa tidak adanya perbedaan antar perlakuan yang dicobakan ($\text{sig} > \alpha 0.05$) (Lampiran I. 5). Hal ini berarti bahwa perbedaan komposisi ransum A dan B tidak memberikan pengaruh terhadap jumlah protozoa pada rumen sapi. Tidak berpengaruhnya ransum terhadap protozoa dimungkinkan karena nilai pH ransum B yang menunjukkan nilai basa, sehingga tidak terjadi penurunan pada jumlah protozoa.

Tabel I. 5. Jumlah protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda.

Komposisi pakan	Populasi ($\times 10^5$ sel/ml)			Rerata
	1	2	3	
Ransum A	3,35	3,95	1,93	$3,08 \pm 1,04$
Ransum B	2,81	4,12	4,35	$3,76 \pm 0,83$

Keterangan : Nilai diperoleh dari 3x ulangan.

Berdasar pada hasil penelitian Brown *et al.* (2006) diperoleh jumlah protozoa dua kali lebih besar ($1,46 \times 10^6$ sel/ml) pada sapi yang diberi pakan konsentrat sebesar 60% dibandingkan dengan pemberian pakan berupa jerami. Protozoa tersebut sebagian besar (89%) adalah *Entodinium spp.* Pemberian konsentrat dalam jumlah tinggi dapat menurunkan pH. Penurunan pH dibarengi dengan penurunan jumlah protozoa dalam rumen. Pada penelitian ini diperoleh hasil nilai pH yang cenderung basa, yaitu 8 (Tabel I. 2). Penelitian Franzolin dan Dehority (1996) lihat Dehority (2003) mengenai efek dari pakan dengan konsentrat tinggi (50% dan 75%) pada populasi protozoa rumen menunjukkan hasil penurunan pada pH rumen, dengan pH awal 6,5 dan pH akhir bernilai di bawah 6 yang ditandai dengan menurunnya populasi protozoa.

Hasil perhitungan rerata protozoa pada rumen sapi dengan pengambilan sampel di pagi dan sore hari disajikan pada Tabel I. 6. Berdasarkan hasil penghitungan, pada perlakuan ransum A diperoleh rerata protozoa sebesar $3,02 \times 10^5$ sel/ml di pagi hari dan $3,13 \times 10^5$ sel/ml di sore hari. Pada perlakuan ransum B, diperoleh rerata protozoa sebesar $4,12 \times 10^5$ sel/ml di pagi hari dan $3,39 \times 10^5$ sel/ml di sore hari. Berdasarkan hasil

perhitungan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan berbeda nyata ($\text{sig} < \alpha 0,05$) pada pengambilan sampel di pagi hari (Lampiran I. 6), dengan perlakuan A yang terbaik dalam menekan jumlah protozoa. Pada pengambilan sampel di sore hari (Lampiran I. 7), hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan tidak berbeda nyata ($\text{sig} > \alpha 0,05$).

Tabel I. 6. Rerata protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda pada pengambilan sampel pagi dan sore hari.

Komposisi pakan	Populasi ($\times 10^5$ sel/ml)						Rerata	
	1		2		3		Pagi	Sore
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore		
Ransum A	3,49	3,20	3,92	3,98	1,64	2,22	3,02 \pm 1.21	3,13 \pm 0.88
Ransum B	3,76	1,85	4,08	4,16	4,53	4,17	4,12 \pm 0.39	3,39 \pm 1.34

Keterangan : Nilai rerata diperoleh dari 3x ulangan.

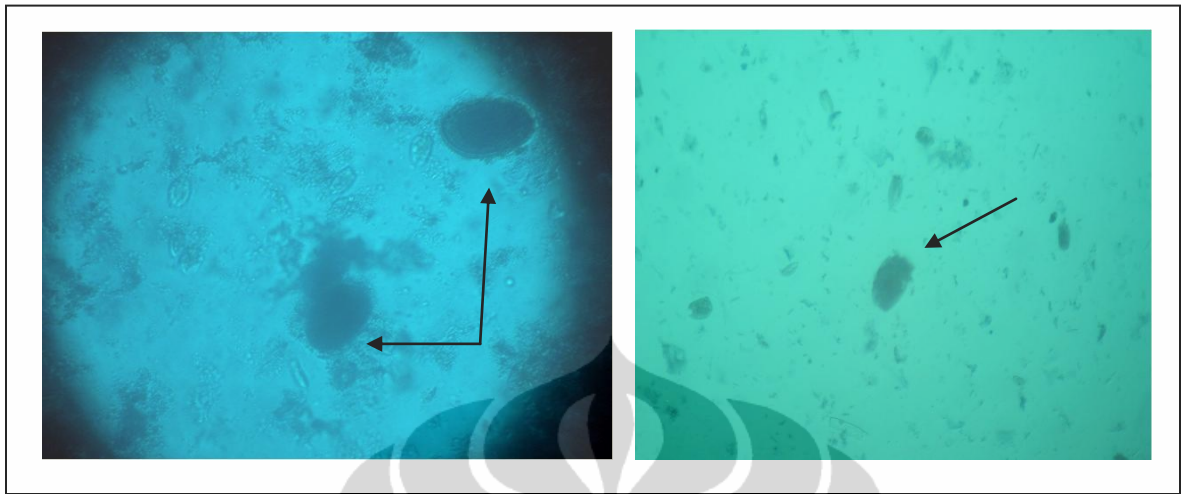
Hasil pengamatan terhadap protozoa rumen dengan komposisi pakan berbeda dan waktu pengambilan sampel pada pagi dan sore hari dapat dilihat pada Tabel I. 7. Protozoa yang diperoleh pada perlakuan A dan B sebanyak 3 famili, yaitu Ophryoscolecidae, Isotrichidae dan Blepharocorythidae. Famili protozoa yang paling banyak diperoleh dari setiap komposisi pakan adalah Ophryoscolecidae, sedangkan yang paling jarang diperoleh adalah Blepharocorythidae. Hal ini disebabkan Ophryoscolecidae masuk ke dalam Ordo Entodiniomorphida yang menyusun sebagian besar dari rumen siliata. Berlawanan dengan hal tersebut, Famili Isotrichidae dan Blepharocorythidae masuk ke dalam Ordo Trichostomatida. Ordo Trichostomatidae relatif jarang ditemui meskipun frekuensi penampakkannya di rumen relatif tinggi (Ogimoto dan Imai, 1981).

Tabel I. 7. Jumlah Famili protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda pada waktu pengambilan sampel pagi dan sore hari.

Komposisi pakan	Famili	Populasi ($\times 10^5$ sel/ml)						Rerata	
		1		2		3		Pagi	Sore
		Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore		
Ransum A	Ophryoscolecidae	3,34	3,02	3,70	3,79	1,58	2,17	2,87 \pm 1,13	2,99 \pm 0,81
	Isotrichidae	0,15	0,17	0,23	0,19	0,07	0,04	0,15 \pm 0,08	0,13 \pm 0,08
	Blepharocorythidae	0	0	0	0	0,002	0,005	0,0007 \pm 0	0,0017 \pm 0
Ransum B	Ophryoscolecidae	3,73	1,81	3,99	4,11	4,4	4,03	4,04 \pm 0,34	3,32 \pm 1,30
	Isotrichidae	0,03	0,04	0,08	0,04	0,12	0,14	0,08 \pm 0,04	0,07 \pm 0,06
	Blepharocorythidae	0	0	0	0,005	0,002	0	0,0007 \pm 0	0,0017 \pm 0

Keterangan : Nilai rerata diperoleh dari 3x ulangan.

Rerata Famili Ophryoscolecidae lebih tinggi pada ransum B dibandingkan pada ransum A. Menurut Christophersen (2007), populasi rumen siliata akan meningkat seiring dengan meningkatnya persentase konsentrat pada pakan, khususnya *Entodinium* spp. yang termasuk ke dalam famili Ophryoscolecidae. Famili Isotrichidae ditemukan hidup menempel pada dinding retikulum dan akan bermigrasi ke rumen setelah mencerna pakan, yang dapat diakibatkan karena adanya rangsang kimiawi terhadap sukrosa dan karbohidrat terlarut yang terdapat dalam pakan (Abe *et al.*, 1981; Dehority, 1984).



Gambar I. 1. Protozoa yang diperoleh selama penelitian (perbesaran 100 x).
Keterangan: A dan B. Famili Isotrichidae; C. Famili Ophryoscolecidae.

Pengambilan sampel cairan rumen yang dilakukan 2 jam setelah pemberian pakan dimungkinkan memberikan pengaruh terhadap keberadaan Isotrichidae. Berdasar pada hasil penelitian Ankraah *et al.* (1990) menunjukkan bahwa konsentrasi Isotrichidae mengalami penurunan pada 40 menit sampai 4 jam setelah pemberian pakan. Jumlah Isotrichidae dalam rumen bervariasi, dipengaruhi oleh waktu pengambilan sampel, pakan dan frekuensi pemberian pakan (Dehority dan Tirabasso, 1989).

Hubungan antara bakteri metanogen dan protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh rerata bakteri metanogen dan protozoa yang lebih tinggi pada ransum B dibandingkan pada ransum A (Tabel I. 1. dan I. 5.), sehingga dapat dikatakan bahwa keberadaan protozoa

dan bakteri metanogen saling berhubungan. Menurut Chagan *et al.* (1999) bahwa keberadaan protozoa khususnya siliata berhubungan secara signifikan dengan bakteri metanogen pada rumen. Protozoa siliata merupakan kohabitan yang penting untuk bakteri metanogen karena selain menjadi sumber hidrogen juga menyediakan tempat untuk perlekatan (Hegarty, 2001).

Bakteri metanogen dan protozoa keberadaannya saling menguntungkan satu sama lain. Protozoa diuntungkan dengan metanogen karena menjaga konsentrasi H_2 tetap rendah, sehingga dapat meningkatkan energi per mol glukosa yang diubah oleh protozoa siliata. Bakteri metanogen yang hidup secara endosimbiosis dengan protozoa memperoleh keuntungan dengan tinggal di dalam protozoa yang terlindung dan bebas dari oksigen. Bakteri metanogen dari ordo Methanobacteriales banyak ditemukan berasosiasi dengan protozoa siliata, sedangkan ordo Entodiniomorphid adalah protozoa yang banyak ditemukan berasosiasi dengan bakteri metanogen (Christophersen, 2007).

Aktivitas protozoa siliata secara signifikan berkaitan dengan metanogenesis dalam rumen. Peniadaan protozoa siliata dari rumen dapat menurunkan sekitar 30-45% dari emisi metana yang dihasilkan rumen. Metanogen yang berasosiasi dengan protozoa dapat dibagi menjadi dua kategori, berkoloni ekstraselular dan intraselular (Vogels *et al.*, 1980; Jouany, 1991; Finlay *et al.*, 1994; lihat Chagan *et al.*, 1999). Berkoloni ekstraselular yaitu bakteri metanogen menempel pada bagian luar dari siliata

(ektosimbiotik), sedangkan berkoloni intraselular berarti bakteri metanogen berada di dalam protozoa (endosimbiotik) (Christophersen, 2007). Bakteri metanogen yang berasosiasi dengan protozoa siliata bertanggung jawab untuk proses metanogenesis dalam cairan rumen antara 9 - 25% dan peniadaan protozoa dari rumen (defaunasi) berkaitan dengan penurunan pada produksi metana (Ushida *et al.*, 1997 *lihat* Gworgwor *et al.*, 2006).



KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian pengaruh komposisi pakan terhadap bakteri metanogen dan protozoa dalam rumen sapi, maka disimpulkan sebagai berikut:

1. Rerata jumlah bakteri metanogen yang diperoleh dari cairan rumen sapi yang diberi ransum A adalah $(0,82 \pm 0,07) \times 10^7$ cfu/ml, sedangkan rerata jumlah bakteri pada ransum B adalah $(2,19 \pm 0,44) \times 10^7$ cfu/ml. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan perlakuan berbeda nyata pada taraf uji 5%, dengan perlakuan ransum A terbaik dalam menekan pertumbuhan bakteri metanogen sehingga dapat memberikan efisiensi energi pada sapi.
2. Rerata jumlah protozoa yang diperoleh dari cairan rumen sapi yang diberi ransum A adalah $(3,08 \pm 1,04) \times 10^5$ sel/ml, sedangkan rerata jumlah bakteri pada ransum B adalah $(3,76 \pm 0,83) \times 10^5$ sel/ml. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan jenis pakan yang lebih bervariasi, penggantian rumput gajah dengan tanaman Leguminosa ataupun variasi pada konsentrat, sehingga didapat informasi yang lebih luas untuk menekan pertumbuhan bakteri metanogen dan protozoa pada rumen sapi.

DAFTAR ACUAN

- Abe, M., T. Iriki, N. Tobe, & H. Shibui. 1981. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. **41**(3): 758—765.
- Ankrah, P., S. C. Loerch & B. A. Dehority. 1990. Sequestration, migration and lysis of protozoa in the rumen. *Journal of General Microbiology*. **136** : 1869—1875.
- Beth de Ondarza, M. 2000. Rumen microbiology. <http://www.milkproduction.com/library/articles/rumen.microbiology.htm>. 11 September 2008, pk: 14.04 wib.
- Brown, M. S., C. H. Ponce, & R. Pulikanti. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets : Performance and ruminal metabolism. *Journal of animal Science*. **84**: 25—33.
- Bunthoen PEN. 2007. Studies on manipulation of ruminal fermentation and methanogenesis by natural products. Dissertation. The United Graduate School of Agricultural Science, Iwate University: x + 118 hlm.
- Chagan, I., M. Tokura, Jean-Pierre Jouany, & K. Ushida. 1999. Short communication: Detection of methanogenic archaea associated with rumen ciliate protozoa. *Journal of General and Applied Microbiology*. **45** : 305—308.
- Christophersen, C. T. 2007. Grain and artificial stimulation of the rumen change the abundance and diversity of methanogens and their association with ciliates. Thesis. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Western Australia, (?): xii + 128 hlm.
- Christophersen, C. T., A-D. G. Wright, & P. E. Vercoe. 2008. In vitro methane emission and acetate:propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. *Journal Animal Science*. **86**: 384 – 389.
- Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*. **48**(1): 182—185.
- Dehority, B. A. & P. A. Tirabasso. 1989. Factors affecting the migration and sequestration of rumen protozoa in the family Isotrichidae. *Journal of General Microbiology*. **135**: 539—548.

- Dehority, B. A. 1998. Microbial interaction in the rumen. *Revista de La Facultad de Agronomia*. **15**: 69—86.
- Dehority, B. A. 2003. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham: vii + 372 hlm.
- France, J & J. Dijkstra. 2005. Volatile fatty acid production *dalam* Dijkstra, J., J.M. Forbes & J. France (Eds.). 2005. Quantitative Aspect of ruminant digestion and metabolism. 2nd Edition. CABI Publishing, USA. Xii + 734 hlm.
- Gworgwor, Z. A., T. F. Mbahi & B. Yakubu. 2006. Environmental implications of methane production by ruminants: a review. *Journal of Sustainable Development in Agriculture and Environment*. **2**(1): 1—14.
- Hegarty, R. 2001. Gas emissions from the Australian livestock sector. What do we know, what can we do?. Australian Greenhouse Office, Canberra. 32 hlm.
- Irbis, C. & K. Ushida. 2004. Detection of methanogens and proteobacteria from a single cell of rumen ciliate protozoa. *Journal of General and Applied Microbiology*. **50**: 203 -- 212.
- Jones, B. & M.G. Kenward. 2003. Design and analysis of cross-over trials. 2nd Ed. Chapman and Hall, Boca Raton. 394 hlm.
- Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*. **89**(1): 124-135.
- Lana, R.P., J.B. Russell, & M.E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal Animal Science*. **76**: 2190—2196.
- Leedle, J. A. Z. & R. C. Greening. 1988. Postprandial Changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high- or low- forage diets once daily. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**(2): 502—506.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, & J. Parker. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th Ed. Prentice Hall, London: xxv + 1077 hlm.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., N. Maheri-Sis, A. Mirza-Aghazadeh, Y. Ebrahimnezhad, M. R. Dastouri, & A. A. Golshani. 2008. Estimation of

- methane production in sheep using nutrient composition of the diet. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **7**(6) : 765—770.
- Moss, A.R., Jean-Pierre Jouany, & J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annual Zootechnology*. **49**: 231-253.
- Monteny, Gert-Jan, A. Bannink, & D. Chadwick. 2006. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. **112**: 163 – 170.
- Ogimoto, K., & S. Imai. 1981. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo: viii + 231 hlm.
- Russell, J.B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *Journal Dairy Science*. **81**: 3222—3230.
- Santoso, B., B. Mwenya, C. Sar., & J. Takahashi. 2007. Methane production and energy partition in sheep fed timothy silage or hay-based diets. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. **12**(1): 27-33.
- Siregar, S. B. 2007. Penggemukan sapi. Penebar Swadaya, Jakarta: vi + 114 hlm.
- Suherman, D. 2003. Kombinasi rumput gajah dan konsentrat dalam ransum terhadap kuantitas produksi susu sapi perah Holstein. *Jurnal Penelitian UNIB*. **IX**(2): 66—70.
- Syukur, D. A. 2006. Integrasi usaha peternakan sapi pada perkebunan tebu. <http://www.disnakkeswan-lampung.go.id>. 9 November 2008, pk: 14.40 WIB.
- Tamminga, S., A. Bannink, J. Dijkstra, & R. Zom. 2007. Feeding strategies to reduce methane loss in cattle. Animal Sciences Group. <http://www.asg.wwr.nl>. 4 Juni 2009, pk. 16.53 WIB.
- Tokura, M., K. Tajima, & K. Ushida. 1999. Isolation of *Methanobrevibacter* sp. As a ciliate-associated ruminal methanogen. *Journal of General and Applied Microbiology*. **45**: 43—47.
- Whitford, M.F., R. M. Teather, & R. J. Forster. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from bovine rumen. *Biomed Central Microbiology*. (?): 1—5.

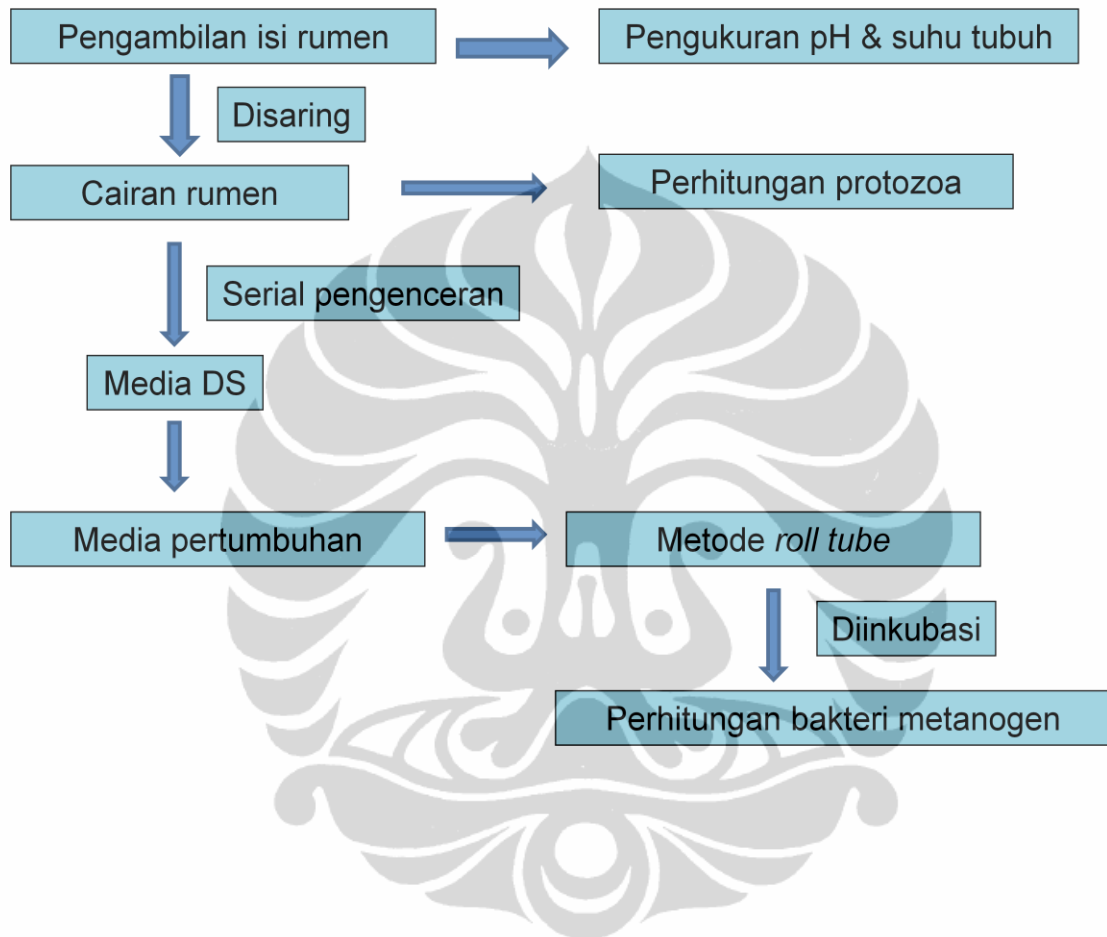
Whitman, W. B., T. L. Bowen, & D. R. Boone. 2006. The methanogenic bacteria *dalam* Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, dan E. Stackebrandt (Eds.). 2006. *The Prokaryotes. 3rd Ed. A handbook on the biology of bacteria : Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes.* Springer, (?): v+1143 hlm.

Williams, A.G. & G.S. Coleman. 1988. The rumen protozoa. *Dalam:* Hobson, P.N. (ed.). 1988. *The rumen microbial ecosystem.* Elsevier Applied Science, London: xii + 527 hlm.



LAMPIRAN

Lampiran I. 1. Bagan cara kerja perhitungan bakteri metanogen dan protozoa.



Lampiran I. 2. Analisis sidik ragam bakteri metanogen dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi.

The SAS System
The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	9.97239583	0.76710737	10.38	0.0182
Error	4	0.29566667	0.07391667		
Corrected Total	17	10.26806250			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	respon Mean
0.971205	18.11502	0.271876	1.500833

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	8.38451250	8.38451250	113.43	0.0004
ulangan(ransum)	4	0.24946667	0.06236667	0.84	0.5634
period	2	0.79592500	0.39796250	5.38	0.0734
ulangan(period)	4	0.14751667	0.03687917	0.50	0.7414
ransum*period	2	0.39497500	0.19748750	2.67	0.1833

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for ulangan(ransum) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	8.38451250	8.38451250	105.86	0.0093

Ransum memberikan pengaruh nyata terhadap bakteri metanogen, karena $Pr > F$ (0.0093) kurang dari 5%.

Uji Duncan

The SAS System
The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for respon

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

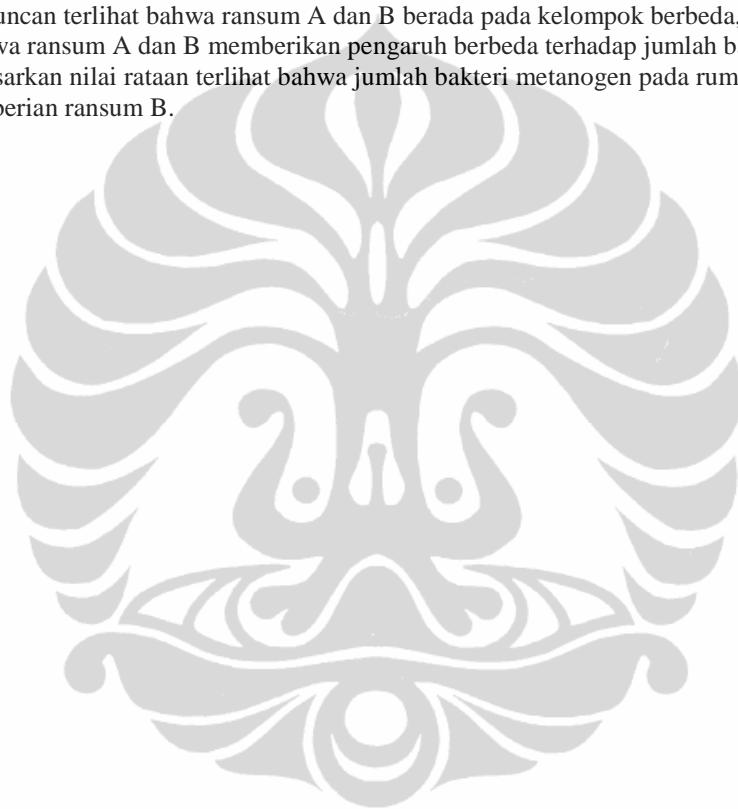
Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	2
Error Mean Square	0.079204
Number of Means	2

Critical Range 0.5708

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	ransum
A	2.1833	9	B
B	0.8183	9	A

Berdasarkan uji Duncan terlihat bahwa ransum A dan B berada pada kelompok berbeda, yang menunjukkan bahwa ransum A dan B memberikan pengaruh berbeda terhadap jumlah bakteri metanogen. Berdasarkan nilai rata-rata terlihat bahwa jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi lebih besar dengan pemberian ransum B.



Lampiran I. 3. Analisis sidik ragam bakteri metanogen dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi di pagi hari.

The SAS System
The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	11.73611111	0.90277778	10.02	0.0194
Error	4	0.36046667	0.09011667		
Corrected Total	17	12.09657778			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	respon Mean
	0.970201	20.40596	0.300194	1.471111

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	8.73620000	8.73620000	96.94	0.0006
ulangan(ransum)	4	1.31444444	0.32861111	3.65	0.1190
period	2	0.46441111	0.23220556	2.58	0.1910
ulangan(period)	4	0.74215556	0.18553889	2.06	0.2507
ransum*period	2	0.47890000	0.23945000	2.66	0.1844

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for ulangan(pakan) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	8.73620000	8.73620000	24.78	0.0381

Ransum memberikan pengaruh nyata terhadap respon pada pengambilan sampel di pagi hari, karena $Pr > F$ (0.0381) kurang dari 5%.

Uji Duncan

The SAS System
The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for respon

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	2
Error Mean Square	0.352517
Number of Means	2
Critical Range	1.204

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	ransum
A	2.1678	9	B
B	0.7744	9	A

Berdasarkan uji Duncan terlihat bahwa ransum A dan B berada pada kelompok berbeda, yang menunjukkan bahwa pada pengambilan sampel di pagi hari ransum A dan B memberikan pengaruh yang berbeda terhadap jumlah bakteri metanogen. Berdasarkan nilai rata-rata terlihat bahwa jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi lebih besar pada pemberian ransum B.



Lampiran I. 4. Analisis sidik ragam bakteri metanogen dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi di sore hari.

The SAS System
The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	12.01512778	0.92424060	8.96	0.0238
Error	4	0.41276667	0.10319167		
Corrected Total	17	12.42789444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	respon Mean
0.966787	20.98810	0.321235	1.530556

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	8.04005000	8.04005000	77.91	0.0009
ulangan(ransum)	2	0.00973333	0.00486667	0.05	0.9545
period	2	1.23257778	0.61628889	5.97	0.0629
ulangan(period)	4	0.71498889	0.17874722	1.73	0.3038
ransum*period	2	1.98120000	0.99060000	9.60	0.0297

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for ulangan(ransum) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	8.04005000	8.04005000	1652.07	0.0006

Ransum memberikan pengaruh nyata terhadap respon pada pengukuran pagi hari, karena Pr > F (0.0381) kurang dari 5%.

Uji Duncan

The SAS System
The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for respon

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	2
Error Mean Square	0.004867

Number of Means	2
Critical Range	0.1415

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Ransum
-----------------	------	---	--------

A	2.19889	9	B
B	0.86222	9	A

Berdasarkan uji Duncan terlihat bahwa ransum A dan B berada pada kelompok berbeda, yang menunjukkan bahwa pada pengambilan sampel di pagi hari ransum A dan B memberikan pengaruh berbeda terhadap jumlah bakteri metanogen. Berdasarkan nilai rata-rata terlihat bahwa jumlah bakteri metanogen pada rumen sapi lebih besar pada pemberian ransum B.



Lampiran I. 5. Analisis sidik ragam protozoa dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi.

The SAS System
The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	142754616000	10981124308	3.32	0.1280
Error	4	13225982400	3306495600		
Corrected Total	17	155980598400			

R-Square Coeff Var Root MSE respon Mean
0.915208 16.82530 57502.14 341760.0

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	20906035200	20906035200	6.32	0.0657
ulangan(ransum)	4	12534998400	3133749600	0.95	0.5201
period	2	34430097600	17215048800	5.21	0.0770
ulangan(period)	4	3671870400	917967600	0.28	0.8789
ransum*period	2	71211614400	35605807200	10.77	0.0245

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for ulangan(ransum) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Ransum	1	20906035200	20906035200	11.47	0.0772

Ransum memberikan pengaruh tidak nyata terhadap protozoa, karena $Pr > F$ (0.0772) lebih dari 5%.

Lampiran I. 6. Analisis sidik ragam protozoa dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi di pagi hari.

The SAS System

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	163185292800	12552714831	1.98	0.2670
Error	4	25354252800	6338563200		
Corrected Total	17	188539545600			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	respon Mean
0.865523	22.28367	79615.09	357280.0

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	54846720000	54846720000	8.65	0.0423
ulangan(ransum)	4	4890816000	1222704000	0.19	0.9300
period	2	25497907200	12748953600	2.01	0.2486
ulangan(period)	4	6881356800	1720339200	0.27	0.8827
ransum*period	2	71068492800	35534246400	5.61	0.0691

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for ulangan(ransum) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	54846720000	54846720000	164.75	0.0060

Pakan memberikan pengaruh nyata terhadap protozoa pada pengambilan sampel di pagi hari, karena Pr > F (0.0060) kurang dari 5%.

Uji Duncan

The SAS System
The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for respon

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 2
 Error Mean Square 3.329E8

 Number of Means 2
 Critical Range 37007

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	pakan
-----------------	------	---	-------

A	412480	9	B
B	302080	9	A

Berdasarkan uji Duncan terlihat bahwa ransum A dan B berada pada kelompok berbeda, menunjukkan bahwa pada pengukuran pagi hari ransum A dan B memberikan pengaruh yang berbeda terhadap jumlah protozoa. Berdasarkan nilai rata-rata terlihat bahwa jumlah protozoa pada rumen sapi lebih besar pada pemberian ransum B.



Lampiran I. 7. Analisis sidik ragam protozoa dengan pemberian ransum A dan B pada rumen sapi di sore hari.

The SAS System

The GLM Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	194597568000	14969043692	9.57	0.0211
Error	4	6257433600	1564358400		
Corrected Total	17	200855001600			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	respon Mean
0.968846	12.12358	39551.97	326240.0

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	3023308800	3023308800	1.93	0.2368
ulangan (ransum)	4	35583897600	8895974400	5.69	0.0604
period	2	71734521600	35867260800	22.93	0.0064
ulangan (period)	4	2677132800	669283200	0.43	0.7845
ransum*period	2	81578707200	40789353600	26.07	0.0051

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for ulangan(pakan) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ransum	1	3023308800	3023308800	0.32	0.6267

Ransum memberikan pengaruh tidak nyata terhadap protozoa, karena $Pr > F$ (0.6267) lebih dari 5%.

Makalah II

PENGARUH KOMPOSISI PAKAN DAN PENAMBAHAN PROBIOTIK

***Lactobacillus plantarum* TSD-10 TERHADAP JUMLAH BAKTERI**

METANOGEN DAN PROTOZOA DALAM RUMEN SAPI

SECARA *IN VITRO*

Melati Ramadhana

Abstract

This research aimed to determine the effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* TSD-10 in vitro on the number of methanogenic bacteria and protozoa by using different variations of feeding to reduce the production of methane. The treatments were to supply ruminantia with grass : concentrate ratio (70 : 30) (diet A) and (30 : 70) (diet B). Methanogenic bacteria obtained from diet A, control ($2,28 \times 10^7$ cfu/ml) with probiotic doses given were 5% ($1,41 \times 10^7$ cfu/ml), 10% ($1,80 \times 10^7$ cfu/ml), and 15% ($2,65 \times 10^7$ cfu/ml). For diet B with same probiotic dose were control ($1,83 \times 10^7$ cfu/ml), 5% ($1,37 \times 10^7$ cfu/ml), 10% ($2,70 \times 10^7$ cfu/ml) and 15% ($2,36 \times 10^7$ cfu/ml). Protozoa for diet A were control ($2,11 \times 10^5$ cell/ml), 5% ($4,27 \times 10^5$ cell/ml), 10% ($4,75 \times 10^5$ cell/ml), 15% ($0,98 \times 10^5$ cell/ml) and diet B were control ($0,96 \times 10^5$ cell/ml), 5% ($0,68 \times 10^5$ cell/ml), 10% ($0,74 \times 10^5$ cell/ml) and 15% ($0,48 \times 10^5$ cell/ml). Statistical analysis indicated that probiotic *L. Plantarum* TSD-10 has significant influence ($p < 0,05$) in suppressing the number of methanogenic bacteria and protozoa.

Keywords: concentrate, grass, methanogenic bacteria, probiotic, protozoa.

PENDAHULUAN

Gas metana yang dikeluarkan oleh hewan ruminansia merupakan salah satu dari tiga sumber gas metana terbesar selain nitrous oxida (N_2O) dan karbondioksida (CO_2) yang berperan dalam efek rumah kaca (Moss *et al.*, 2000; Gworgwor *et al.*, 2006). Emisi gas metana juga berkontribusi

terhadap pemanasan global (Bunthoen, 2007). Menurut Fonty *et al.* (2007), persentase gas metana yang dikeluarkan oleh hewan ruminansia pada saat bersendawa sekitar 8 - 13 % dari makanan yang dikonsumsi oleh hewan tersebut.

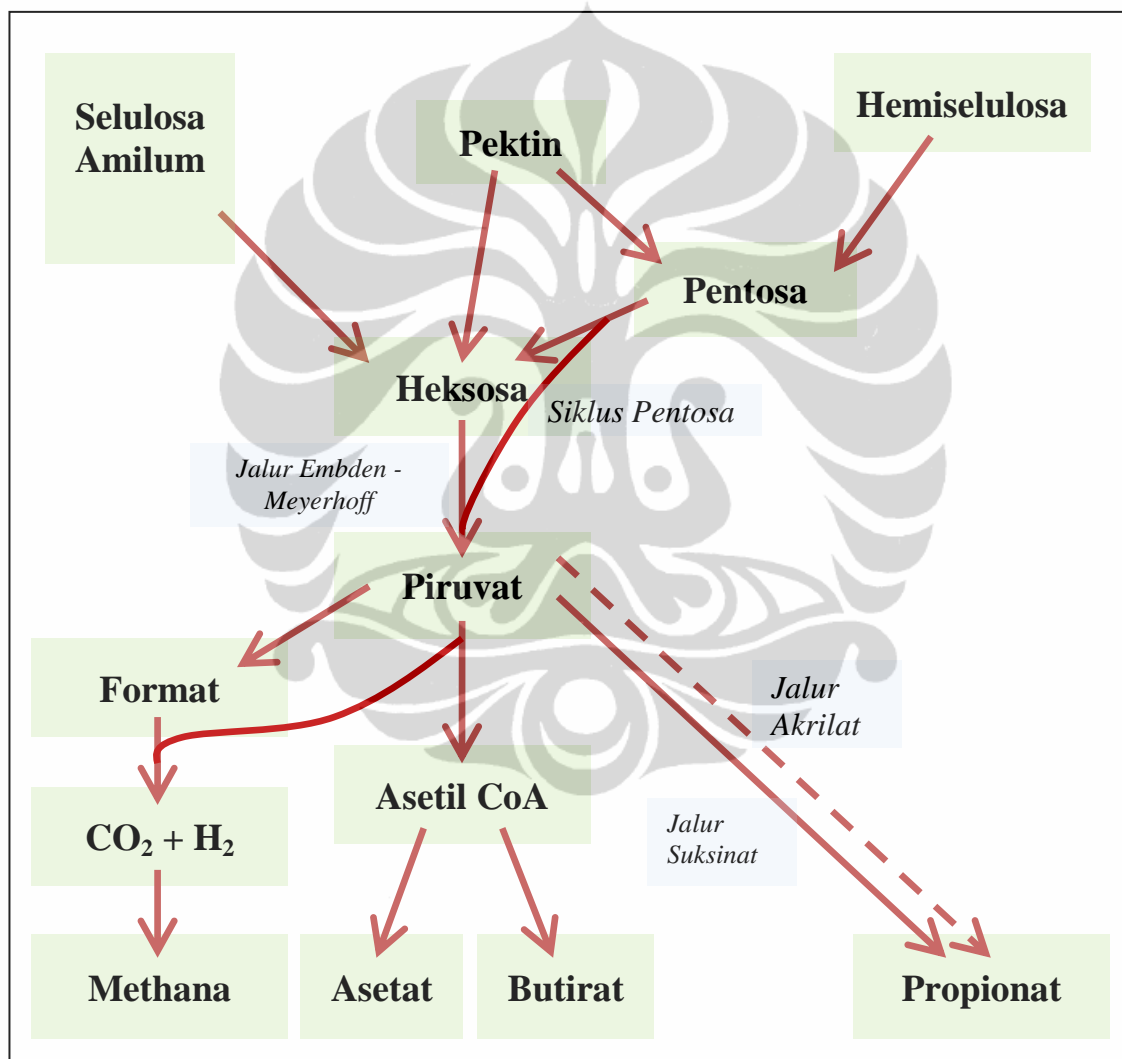
Gas metana yang dihasilkan pada saat fermentasi anaerob di dalam saluran pencernaan hewan ruminansia dipengaruhi oleh komposisi pakan seperti selulosa, hemiselulosa, dan gula terlarut pada pakan yang dikonsumsi oleh hewan tersebut. Produksi metana pada rumen hewan ruminansia merupakan proses yang sia-sia, karena pakan yang dikonsumsi oleh hewan tersebut akan dikonversikan menjadi metana dan dikeluarkan dalam bentuk gas.

Volatile Fatty Acid (VFA), diproduksi di dalam rumen sebagai produk akhir dari fermentasi mikroorganisme rumen. Asetat, butirrat, dan propionat merupakan VFA utama yang dihasilkan dalam rumen, selain itu dihasilkan juga dalam jumlah kecil seperti valerat, kaproat, butirrat, isobutirat, isovalerat, dan 2-metilbutirat (France dan Dijkstra, 2005).

Bakteri rumen pada umumnya menggunakan jalur Embden-Meyerhof-Parnas dan Pentosa-fosfat untuk memfermentasikan hasil pemecahan polisakarida seperti selulosa menjadi piruvat. Pemecahan selulosa oleh bakteri selulolitik dalam rumen menghasilkan piruvat (FIS, 2003). Piruvat kemudian dimetabolisme oleh bakteri rumen lainnya seperti bakteri asetat dan propionat, melalui berbagai jalur menjadi berbagai macam produk akhir

seperti format, asetat, propionat, butirat, laktat, suksinat, metanol, etanol, CO₂ dan H₂ (Theodorou dan France, 2005).

Berikut merupakan skema yang menunjukkan jalur utama metabolisme karbohidrat dalam rumen.



Gambar II. 1. Skema jalur utama metabolisme karbohidrat dalam rumen (FIS, 2003).

Pakan rumput yang tinggi kandungan serat akan mendukung produksi asetat dan proporsi perbandingan molar asetat : propionat : butirat berkisar antara 70 : 20 : 10, sedangkan pakan konsentrat yang kaya akan pati akan mendukung pertumbuhan jenis bakteri penghasil propionat dan ditandai dengan meningkatnya propionat dibandingkan asetat. Pakan konsentrat dapat mendorong berkembangnya populasi protozoa dan ditandai dengan meningkatnya propionat (France dan Dijkstra, 2005).

Penggunaan probiotik pada hewan ruminansia berguna untuk menjaga keseimbangan mikroorganisme di dalam rumen. Probiotik juga mampu meningkatkan pencernaan mikroorganisme rumen terhadap pakan. Kajian mengenai probiotik dalam meningkatkan fermentasi rumen dan produktivitas hewan telah banyak dilakukan. Namun, mengenai efek probiotik untuk menekan pertumbuhan bakteri metanogen dan protozoa sehingga mengurangi produksi gas metana masih belum begitu banyak dilakukan (Moss *et al.*, 2000).

Pengertian probiotik menurut Ngadiyono *et al.* (2001) lihat Hau (2005) ialah suatu produk yang mengandung satu atau campuran berbagai macam mikroorganisme, memiliki fungsi sebagai pencerna serat dalam pakan dan dapat berinteraksi positif dengan mikroba rumen ternak. Fuller (1992) mendefinisikan probiotik sebagai suplemen pakan dalam bentuk mikroorganisme hidup yang memberikan efek menguntungkan pada hewan inang dengan memperbaiki keseimbangan mikroorganisme pencernaan. Penggunaan probiotik di dalam pakan bertujuan untuk membuat

keseimbangan mikroorganisme yang bermanfaat dalam proses degradasi komponen zat gizi di dalam rumen (Haryanto, 2002).

Penggunaan probiotik dilakukan secara *in vivo* yaitu menambahkan probiotik ke dalam pakan untuk mendegradasi serat menjadi senyawa sederhana, sehingga pakan menjadi mudah untuk dicerna. Pemberian secara *in vivo* yaitu probiotik diberikan langsung ke ternak, sehingga meningkatkan fermentasi pakan dalam rumen dan mempengaruhi metabolisme ternak. Mikroorganisme sebagai probiotik dapat berupa bakteri atau jamur (Sugoro dan Pikoli, 2004). Beberapa mikroorganisme yang sering digunakan sebagai probiotik pada ternak ruminansia antara lain *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cereviceae*, dan *Aspergillus oryzae* (Widyastuti *et al.*, 1998).

Informasi mengenai penggunaan probiotik untuk mengurangi produksi gas metana pada hewan ternak masih sedikit ditemui (Moss *et al.*, 2000). Salah satunya adalah penelitian dari Chaucheyras *et al.* (1995) mengenai penggunaan *S. cereviceae* sebagai probiotik yang mampu menstimulasi bakteri asetogen untuk berkompetisi dengan bakteri metanogen, sehingga gas metana yang dihasilkan bakteri metanogen dapat ditekan.

Salah satu probiotik yang dapat digunakan untuk hewan ruminansia adalah bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* TSD-10. *L. plantarum* TSD-10 diisolasi dari kotoran sapi. Beberapa penelitian sudah dilakukan dengan menggunakan *L. plantarum* TSD-10 sebagai probiotik. Secara *in vitro*, *L. plantarum* TSD-10 mampu meningkatkan pencernaan terhadap pakan

dengan memberikan kondisi lingkungan yang baik bagi mikroorganisme rumen (Widyastuti *et al.*, 1998). *L. plantarum* TSD-10 juga mampu meningkatkan konsentrasi asam lemak *volatile* (Widyastuti *et al.*, 1996). Melalui penelitian ini diharapkan pemberian *L. plantarum* TSD-10 sebagai probiotik dapat mengurangi produksi gas metana dengan cara menekan keberadaan protozoa dan bakteri metanogen dalam rumen.

Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh probiotik *L. plantarum* TSD-10 secara *in vitro* terhadap jumlah bakteri metanogen dan protozoa dengan variasi ransum berbeda.

METODOLOGI

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Bidang Biologi Sel dan Jaringan, Pusat Penelitian Bioteknologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong Bogor. Waktu penelitian pada bulan September 2008 – Mei 2009.

Rancangan percobaan

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode eksperimental dengan rancangan percobaan tukar ganti (Jones dan Kenward, 2003) berpola faktorial. Data bakteri metanogen dan protozoa yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam dan dilanjutkan dengan

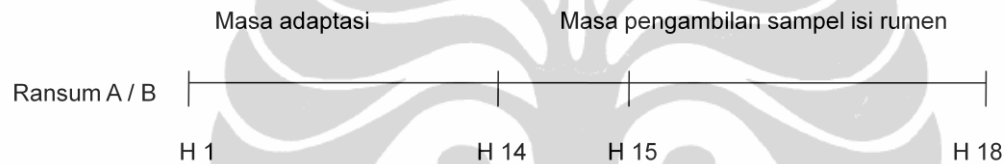
uji Duncan pada taraf nyata 5%. Perhitungan dibantu dengan menggunakan *software progame SAS version 9 for windows*.

Perlakuan yang diberikan sebagai berikut :

- A. Pakan dengan perbandingan hijauan : konsentrat (70 : 30) (ransum A).
- B. Pakan dengan perbandingan hijauan : konsentrat (30 : 70) (ransum B).

Masa adaptasi dari masing-masing ransum adalah 14 hari.

Pengambilan isi rumen dilakukan setelah masa adaptasi. Skema pengambilan sampel digambarkan sebagai berikut:



Gambar II. 2. Skema pengambilan sampel protozoa dan bakteri metanogen.

Keterangan:

H 15 : Pengambilan sampel in vitro 0 jam.

H 18 : Pengambilan sampel in vitro 72 jam.

Parameter utama yang diukur adalah jumlah protozoa dan bakteri metanogen dari setiap perlakuan. Parameter pendukungnya adalah: pH cairan rumen, temperatur tubuh sapi, asam lemak *volatile*, populasi probiotik awal, laju pencernaan pakan, variasi pakan, waktu dan dosis probiotik.

Variasi dosis probiotik yang diberikan adalah (v/v):

- I. Tanpa pemberian probiotik.
- II. Pemberian probiotik 5 %.
- III. Pemberian probiotik 10 %.

IV. Pemberian probiotik 15 %.

BAHAN DAN ALAT

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cairan rumen berasal dari sapi Peranakan Ongole (PO) berfistula, kultur mikroba probiotik *Lactobacillus plantarum* TSD-10, gas H₂ : CO₂ (80 : 20) (BOC Gases Indonesia), KH₂PO₄ (Merck), K₂HPO₄ (Sigma Aldrich), (NH₄)₂SO₄ (Merck), NaCl (Merck), MgSO₄.7H₂O (Sigma Aldrich), CaCl₂ (Merck), resazurin (Sigma), NaHCO₃ (Merck), L-Cysteine hydrochloride (Merck), Na₂S (Merck), formaldehyde (Merck), methylgreen (Merck), glukosa (Merck), yeast ekstrak (Oxoid), Lab Lemco powder (Oxoid), pepton (Becton, Dickinson Company), agar, CH₃COONa (Merck), C₆H₈O₇.2NH₃ (Merck), MnSO₄ (Merck), CaCO₃ (Merck), Tween 80 (Merck), Na₂HPO₄.7H₂O (Merck), KCl (Merck), Na₂CO₃ (Analar), HCl (J.T. Baker), rumput gajah, dan konsentrat (Prima Feed).

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sentrifuse (ependorf), mesin *roll tube*, autoklaf (Everlight), pH meter (Jenway), timbangan digital

(Mettler), oven (Jouan), *water bath* (Grant), Neubauer *counting chamber* (Weber Scientific International), inkubator (Jouan), *colony counter pen* (Sibata), desikator (Schott), mikroskop binokuler (Nikon) dan alat-alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

Cara Kerja

Pengambilan Cairan Rumen

Pengambilan cairan rumen menggunakan metode Tokura *et al.* (1999). Cairan rumen diambil dari 1 ekor sapi PO berfistula. Sapi diberi pakan pada pagi hari (07.00 WIB) dan siang hari (13.00 WIB). Cairan rumen diambil 2 jam setelah pemberian pakan di pagi hari dengan cara menyaring isi rumen menggunakan 4 lapis kain saring steril. Cairan rumen selanjutnya dimasukkan ke dalam termos hangat ($\pm 40^{\circ} \text{C}$).

Pengukuran pH Rumen

Pengukuran kadar pH rumen dilakukan dengan cara mencelupkan kertas indikator pH (*universal*) ke dalam cairan rumen. Warna yang timbul pada kertas indikator tersebut kemudian disesuaikan dengan skala warna yang tertera pada bungkus indikator pH.

Pengukuran Temperatur Tubuh Sapi

Temperatur tubuh sapi diukur dengan mencelupkan termometer air raksa pada bagian fistula sapi. Pengukuran diulang 3 kali.

Persiapan Cairan Rumen untuk Media Pertumbuhan

Persiapan cairan rumen untuk media pertumbuhan menggunakan metode Ogimoto & Imai (1981). Cairan rumen disaring menggunakan kain saring steril untuk memisahkan partikel kasar kemudian di *autoclave*, selanjutnya disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 menit dan disimpan di dalam *freezer* (-20°C).

Media Pengencer

Pengenceran cairan rumen menggunakan larutan pengencer berdasarkan Bryant dan Burkey (1953) *lihat* Ogimoto dan Imai (1981). Larutan mineral I (komposisi per 100 ml: K_2HPO_4 0,6 g dan akuades 100 ml) 7,5 ml; larutan mineral II (komposisi per 100 ml: NaCl 1,2 g; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 1,2 g; KH_2PO_4 0,6 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,16 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g dan akuades 100 ml) 7,5 ml; 0,3 g Na_2CO_3 , 0,1 ml larutan indikator resazurin 0,1% dan 100 ml akuades ditempatkan pada tabung Erlenmeyer dan dipanaskan hingga mendidih sambil dialiri gas CO_2 . Setelah mendidih ditambahkan 0,05 g L-cystein HCl ke dalam medium, kemudian dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi sebanyak 4,5 ml menggunakan pipet ukur, sambil dialiri gas CO_2 sampai indikator resazurin berubah warna dari merah muda menjadi bening.

Tabung selanjutnya ditutup menggunakan sumbat karet no. 2 dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Media Paynter dan Hungate (PH)

Media PH sebagai media pertumbuhan untuk bakteri metanogen berdasarkan Paynter dan Hungate (1968) *lihat* Ogimoto dan Imai (1981). Persiapan medium dilakukan dalam kondisi anaerob dengan perbandingan gas $\text{H}_2 : \text{CO}_2$ (80 : 20). Komposisi media per 100 ml: agar (1,3 g); KH_2PO_4 (0,05 g); K_2HPO_4 (0,05 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,05 g); NaCl (0,10 g); MgSO_4 (0,05 g); CaCl_2 (0,01 g); larutan resazurin 0,1% (0,1 ml), dan akuades (70 ml). Bahan-bahan tersebut ditempatkan di Erlenmeyer kemudian dipanaskan hingga mendidih untuk melarutkan agar sambil dialiri gas $\text{H}_2 : \text{CO}_2$. Setelah mendidih, cairan rumen (30 ml), NaHCO_3 (0,5 g), Na_2S (0,03) dan L-cystein HCl (0,03 g) ditambahkan ke dalam medium. Medium kemudian dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi sebanyak 4 ml pada setiap tabung, sambil dialiri gas sampai indikator resazurin berubah warna dari merah muda menjadi kuning muda. Tabung selanjutnya ditutup menggunakan sumbat karet no. 3 dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Prosedur Menumbuhkan dan Menghitung Bakteri Metanogen

Bakteri metanogen ditumbuhkan dan dihitung menggunakan metode *roll tube* berdasarkan Ogimoto dan Imai (1981). Sebanyak 0,5 ml cairan

rumen yang akan diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan larutan pengencer sampai tingkat pengenceran 10^{-5} . Pengenceran dilakukan secara anaerob dengan mengalirkan gas $H_2:CO_2$. Pada tingkat pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} , masing-masing diambil sebanyak 0,5 ml untuk ditumbuhkan pada media pertumbuhan metanogen di dalam tabung reaksi yang sudah dicairkan. Inokulasi cairan rumen dilakukan dalam keadaan anaerob. Setelah diinokulasi, tabung ditutup dengan sumbat karet dan media digoyangkan perlahan. Media kemudian diletakkan secara mendatar pada mesin pemutar yang sudah diberi air es. Hal tersebut bertujuan untuk mengeraskan media secara merata. Setelah itu seluruh tabung diletakkan dalam inkubator bersuhu $39^{\circ}C$ selama 4 hari.

Koloni yang tumbuh dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah populasi bakteri per ml cairan rumen} = \frac{\text{rerata koloni terhitung}}{\text{volume inokulum}} \times \text{faktor pengenceran}$$

Pewarnaan Protozoa

Pewarnaan protozoa menggunakan larutan Methylgreen-Formalin-Saline (MFS) sebanyak 4,5 ml larutan MFS ditambahkan dengan 0,5 ml cairan rumen. Komposisi larutan MFS didasarkan pada Ogimoto dan Imai (1981), dengan komposisi per 100 ml: 35% larutan formaldehyde 10 ml; akuades 90 ml; methylgreen 0,03 g dan NaCl 0,8 g. Protozoa dapat diamati

30 menit setelah penambahan larutan MFS. Pengamatan protozoa dilakukan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 100 x.

Identifikasi dan Penghitungan Protozoa

Pengamatan protozoa dimulai dengan meneteskan 1 ml larutan MFS pada *haemocytometer*, kemudian ditutup menggunakan gelas penutup.

Protozoa yang ada diamati dengan mikroskop sebanyak 10 bidang pandang dengan tiga kali pengulangan. Identifikasi dan perhitungan protozoa

berdasarkan pada Ogimoto dan Imai (1981) dengan rumus sebagai berikut :

$$N = n \times 72 \times d$$

Keterangan:

N = jumlah protozoa per 1 ml cairan rumen
n = jumlah protozoa dalam 10 lapang pandang
d = faktor pengenceran sampel

Media MRS

Medium *preculture* menggunakan medium MRS berdasarkan De Mann *et al.* (1960) lihat Ogimoto dan Imai (1981) dengan komposisi per 100 ml:

glukosa 2 g; yeast ekstrak 0,4 g; Lab-Lemco *powder* 0,8 g; pepton 1 g;

K₂HPO₄ 0,2 g; CH₃COONa 0,32 g; C₆H₈O₇.2NH₃ 0,2 g; MgSO₄.7H₂O 0,02 g;

MnSO₄.H₂O 0,005 g; dan tween 80 0,1 ml. Komposisi medium MRSA sama

dengan komposisi medium MRS dengan penambahan agar 1,3 g dan CaCO₃ 0,5 g.

Prosedur Menumbuhkan dan Menghitung Probiotik *Lactobacillus plantarum* TSD-10.

L. plantarum TSD-10 ditumbuhkan secara *stabculture* pada medium MRS dan diambil sebanyak 1 ose untuk ditumbuhkan pada 5 ml medium MRS sebagai medium *preculture*, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30⁰ C selama 24 jam. Sebelum digunakan pada kultur *in vitro*, terlebih dahulu sebanyak 5% v/v *L. plantarum* TSD-10 dari medium *preculture* ditumbuhkan pada medium MRS dan diinkubasi selama 15 jam pada suhu 30⁰ C.

L. plantarum TSD-10 dihitung menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dengan pengenceran berseri. Suspensi sel diencerkan di dalam akuades steril yang mengandung 0,98% NaCl hingga faktor pengenceran 10⁶, 10⁷ dan 10⁸ secara duplo. Suspensi sel sebanyak 0,2 ml dari masing-masing faktor pengenceran diambil menggunakan mikropipet dan ditetaskan pada cawan petri, setelah itu dilanjutkan dengan menuangkan medium MRS. Biakan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30⁰ C selama 48 jam. Jumlah koloni sel yang tumbuh dihitung berdasarkan Gandjar *et al.*, (1992), dengan rumus :

$$\text{Jumlah populasi bakteri per ml cairan rumen} = \frac{\text{rerata koloni terhitung}}{\text{volume inokulum}} \times \text{faktor pengenceran}$$

Buffer Mc Dougall

Persiapan *buffer Mc Dougall* berdasarkan metode Craig (1992).

Komposisi *buffer Mc Dougall* per liter adalah NaHCO_3 9,8 g; $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 g; KCl 0,57 g; NaCl 0,47 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g; CaCl 0,045 g dan akuades 1 L. pH *buffer* disesuaikan sampai mencapai 6,7 dengan menggunakan pH meter dan penambahan HCl 6 M.

Persiapan Bahan Kering

Rumput gajah yang akan digunakan untuk kultur *in vitro* terlebih dahulu dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 60°C hingga mencapai berat yang stabil. Setelah itu diblender sampai halus dan ditimbang masing-masing 0,5 g untuk kemudian dimasukkan ke dalam tabung-tabung uji *in vitro*.

Fermentasi Kultur *in vitro*

Percobaan dilakukan berdasarkan metode Tilley dan Terry (1963) lihat Kaunang (2004) yang dimodifikasi. Fermentasi *in vitro* menggunakan tabung reaksi dengan sumbat karet no. 3. Setiap tabung berisi serbuk rumput gajah sebanyak 0,5 g, cairan rumen dan *buffer Mc Dougall* masing-masing 5 ml (perbandingan 1:1). Kedalam tiap-tiap tabung ditambahkan probiotik

sebanyak (v/v) 5%, 10%, 15% dan tanpa pemberian probiotik sebagai kontrol. Inkubasi dilakukan menggunakan *waterbath* bersuhu 39⁰ C selama 72 jam.

Persiapan Cawan dan Kertas Saring

Cawan porselen yang berisi kertas saring di oven pada suhu 135⁰ C selama 2 jam. Setelah itu dimasukkan ke dalam desikator berisi silika gel selama 30 menit. Cawan-cawan porselen tersebut kemudian ditimbang menggunakan timbangan digital dan dicatat sebagai berat awal.

Kecernaan Bahan Kering

Pengukuran kecernaan bahan kering ditentukan dengan metode Tilley dan Terry (1963) *lihat* Kaunang (2004). Serbuk rumput yang sudah diinkubasikan dengan cairan rumen disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 2. Setelah itu, dibilas menggunakan akuades dan aseton teknis, masing-masing sebanyak 3 kali. Endapan yang telah tersaring kemudian dikeringkan dengan cara di oven selama 2 jam pada suhu 135⁰ C kemudian dimasukkan ke dalam desikator berisi gel silika selama 30 menit selanjutnya ditimbang untuk memperoleh data berat akhir. Sebagai blanko digunakan cairan rumen tanpa perlakuan.

Koefisien cerna bahan kering dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$KCBK (\%) = \frac{BK \text{ awal} - (BK \text{ residu} - BK \text{ blanko})}{BK \text{ awal}} \times 100$$

Keterangan :

KCBK = Koefisien cerna bahan kering.

BK = Bahan kering.

Analisis Volatile Fatty Acid (VFA)

Analisis *Volatile Fatty Acid* (VFA) menggunakan metode IKM 15 untuk *Gas Chromatography* (GC) pada Laboratorium Balai Penelitian Ternak, Jl. Raya Tapos, Ciawi, Bogor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh komposisi pakan terhadap bakteri metanogen pada rumen sapi dengan penambahan probiotik *Lactobacillus plantarum* TSD -10 secara *in vitro*.

Hasil perhitungan terhadap bakteri metanogen pada cairan rumen sapi yang diberi komposisi pakan berbeda yaitu ransum A dan B, dan probiotik *L. plantarum* TSD-10 secara *in vitro* selama 72 jam tersaji pada Tabel II. 1. Konsentrasi probiotik *L. plantarum* TSD-10 pada ransum A adalah $1,86 \times 10^9$ cfu/ml. dan ransum B adalah $0,22 \times 10^9$ cfu/ml. Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan analisis sidik ragam, menunjukkan bahwa perlakuan ransum secara *in vitro* tidak berbeda nyata ($\text{sig} > \alpha 0.05$) (Lampiran II. 1). Tidak adanya perbedaan antara ransum A dan B

dimungkinkan karena nilai pH akhir kedua ransum yang cenderung asam sehingga menghambat pertumbuhan bakteri metanogen. Penambahan probiotik *L. plantarum* TSD-10 ke dalam rumen secara *in vitro* mampu menurunkan nilai pH rumen (pH 6). Terlihat pada Tabel II. 2, nilai pH cairan rumen pada perlakuan ransum A dan B setelah dilakukan uji *in vitro*, semuanya menurun menjadi pH 6. Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan analisis sidik ragam, menunjukkan bahwa konsentrasi probiotik secara *in vitro* berbeda nyata antar perlakuan pakan ($\text{sig} < \alpha 0.05$) dengan konsentrasi probiotik 5% terbaik dalam menekan pertumbuhan bakteri metanogen (Lampiran II. 1).

Tabel II. 1. Rerata bakteri metanogen ($\times 10^7$ cfu/ml) pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan probiotik *Lactobacillus plantarum* TSD-10.

Komposisi pakan	Waktu (jam)	Dosis probiotik (%)	Bakteri metanogen ($\times 10^7$ cfu/ml)
Ransum A	0	-	2,01 \pm 0,63
	72	0	2,28 \pm 0,94
		5	1,41 \pm 0,26
		10	1,80 \pm 0,34
		15	2,65 \pm 0,33
Ransum B	0	-	3,17 \pm 1,44
	72	0	1,83 \pm 0,05
		5	1,37 \pm 0,11
		10	2,70 \pm 0,26
		15	2,36 \pm 0,37

Nilai rerata diperoleh dari 3x ulangan.

Penurunan jumlah bakteri metanogen pada perlakuan ransum B (56,8%) lebih besar dibanding ransum A (29,8%). Variasi ransum B mampu menekan pertumbuhan bakteri metanogen karena perbandingan nilai pakan

konsentrat yang lebih tinggi. Menurut Van Soest (1982) lihat Moss *et al.* (2000), menyatakan bahwa tingginya pakan konsentrat ataupun adanya penambahan karbohidrat terlarut dapat memberikan perubahan dalam pola fermentasi rumen. Perubahan tersebut menjadikan lingkungan yang kurang sesuai untuk pertumbuhan bakteri metanogen. Salah satu perubahan yang kurang menguntungkan tersebut adalah penurunan nilai pH rumen (lebih asam).

Tabel II. 2. Nilai pH pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan probiotik *Lactobacillus plantarum* TSD-10.

Komposisi pakan	Waktu (jam)	Dosis probiotik (%)	pH
Ransum A	0	-	7,0
	72	0	6,0
		5	6,0
		10	6,0
		15	6,0
Ransum B	0	-	8,0
	72	0	6,0
		5	6,0
		10	6,0
		15	6,0

Nilai rerata diperoleh dari 3x ulangan.

Bakteri asam laktat sebagai probiotik (*L. plantarum* TSD-10) yang ditumbuhkan pada cairan rumen secara *in vitro* mampu menurunkan pH cairan rumen tersebut. Menurut Erdman (1998) lihat Hau *et al.* (2005) pH 6,8 adalah pH yang terbaik atau optimum untuk aktifitas dan pertumbuhan mikroba rumen. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Widyastuti *et al.* (1997) yang menggunakan *L. plantarum* TSD-10 sebagai probiotik, menunjukkan adanya penurunan pH menjadi 6,6 - 6,8. Penurunan pH tersebut

menunjukkan adanya pemanfaatan bahan-bahan nutrisi dalam cairan rumen dengan menghasilkan asam. Asam-asam yang diproduksi tersebut berupa suksinat, asetat, butirat dan propionat sebagai hasil metabolisme pada kondisi anaerob (Sugoro dan Pikoli, 2004). Pada perlakuan kontrol, menurunnya pH dapat disebabkan karena akumulasi H₂ yang menyebabkan kondisi rumen menjadi lebih asam sehingga terjadi penurunan nilai pH.

Hasil perhitungan Koefisien Cerna Bahan Kering (KCBK) pakan pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan probiotik *L. plantarum* TSD-10 secara *in vitro* tersaji pada Tabel II. 3. Pada ransum A rerata KCBK yang diperoleh berkisar dari 27,99 – 31,95%, sedangkan pada ransum B berkisar dari 25,85 - 31,3%. Pada ransum A, nilai KCBK yang diperoleh cenderung meningkat (8,5%) seiring dengan bertambahnya konsentrasi probiotik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Widyastuti *et al.* (1997) yang menunjukkan bahwa inokulasi bakteri asam laktat, dalam hal ini *L. plantarum* TSD-10 sebagai probiotik, dapat meningkatkan pencernaan terhadap substrat.

Tabel II. 3. Nilai koefisien cerna bahan kering pakan pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan *Lactobacillus plantarum* TSD-10.

Komposisi pakan	Dosis probiotik (%)			
	0	5	10	15
Ransum A	27,99±2,02	29,82±0,79	31,95±2,22	31,01±0,62
Ransum B	31,30±0,61	25,85±0,95	26,49±0,99	26,59±0,48

Nilai rerata diperoleh dari 3x ulangan (dalam %)

Pada ransum B, nilai KCBK menurun (17,4%) setelah diberi perlakuan probiotik. Hal tersebut dapat dikarenakan besarnya penurunan pH pada ransum B yang semula basa (pH 8) menjadi asam (pH 6). Penurunan pH dapat mempengaruhi keberadaan bakteri selulolitik dalam rumen yang berperan untuk memecah serat pakan. Fermentasi pakan konsentrat dalam rumen berlangsung dengan cepat dan memberikan kondisi substrat yang sesuai untuk bakteri penghasil asam laktat, salah satunya adalah *L. plantarum*. Produksi asam laktat tersebut mampu menurunkan pH yang dapat menghambat bakteri selulolitik (Sretenovic, *et al.*, 2008). Menurut Heinrichs (2005), pakan konsentrat mampu meningkatkan produksi asam lemak *volatile* pada rumen, seperti asetat, butirrat dan propionat, yang mampu menurunkan pH rumen.

Nilai pH merupakan salah satu faktor penting pada rumen, khususnya untuk bakteri selulolitik yang tidak dapat tumbuh pada pH 6,0 atau kurang (Stewart, 1977, *lihat* Wallace dan Newbold, 1992). Tidak seperti bakteri selulolitik dan metanogen, bakteri asam laktat lebih toleran terhadap pH rendah, hal tersebut membuat bakteri asam laktat mampu berkompetisi dengan bakteri metanogen dalam memanfaatkan hidrogen walaupun dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Moss *et al.*, 2000).

Peningkatan nilai KCBK diharapkan mampu menekan pertumbuhan bakteri metanogen dengan cara mengubah pola fermentasi pada rumen. Perubahan pola fermentasi akan mengakibatkan perubahan pada asam

lemak *volatile* yang dihasilkan. Hasil analisis uji asam lemak *volatile* tersaji pada Tabel II. 4.

Tabel II. 4. Data asam lemak *volatile* yang diperoleh pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan *Lactobacillus plantarum* TSD-10.

Waktu	Komposisi probiotik (%)	Asam Lemak <i>Volatile</i> (mMol)						Total
		C2	C3	IC4	nC4	IC5	nC5	
Ransum A								
0 jam	-	94,52	18,56	2,13	6,42	0,94	0	122,57
72 jam	0	137,83	41,91	7,36	12,25	1,58	1,27	202,20
	5	191,42	65,71	8,68	21,08	1,52	2,99	291,40
	10	189,47	68,76	3,65	20,93	1,64	3,94	288,39
	15	196,88	74,89	4,24	24,07	1,75	4,13	305,76
Ransum B								
0 jam	-	72,29	14,06	2,59	3,61	1,30	0	93,85
72 jam	0	73,10	30,44	4,62	11,78	2,04	1,31	123,29
	5	145,77	44,64	6,81	14,83	1,61	2,41	216,07
	10	152,48	45,08	6,73	15,16	1,06	2,36	222,87
	15	158,24	59,03	5,44	23,22	1,88	4,31	252,12

Keterangan:

C₂ : asetat; C₃ : propionat; iC₄ : isobutirat; nC₄ : n butirat; iC₅ : isovalerat; nC₅ : n valerat.

Tabel II. 4. menunjukkan bahwa penambahan bakteri asam laktat sebagai probiotik mampu meningkatkan semua komponen asam lemak *volatile*. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Widyastuti *et al.* (1998), yaitu penggunaan probiotik *L. plantarum* TSD-10 mampu meningkatkan keberadaan asam lemak *volatile* dibandingkan dengan perlakuan kontrol.

Menurut Dawson dan Newman (1988) lihat Widyastuti *et al.* (1998) bahwa penambahan probiotik dalam fermentasi *in vitro* dapat meningkatkan konsentrasi asam lemak *volatile* total.

Perlakuan ransum A menunjukkan nilai asetat yang lebih tinggi dibandingkan propionat. Pakan rumput yang tinggi kandungan serat akan mendukung pertumbuhan spesies bakteri penghasil asetat dengan proporsi perbandingan molar asetat : propionat : butirat berkisar antara 70 : 20 : 10, sedangkan pakan konsentrat yang kaya akan pati mendukung pertumbuhan jenis bakteri penghasil propionat dan ditandai dengan meningkatnya propionat dibandingkan asetat, meskipun asetat tetap menjadi asam lemak *volatile* dengan kelimpahan tertinggi (France dan Dijkstra, 2005).

Pembentukan propionat dalam rumen membutuhkan senyawa H₂ (Christophersen, 2007), hal tersebut menyebabkan adanya kompetisi antara bakteri metanogen dengan bakteri pembentuk propionat dalam menggunakan senyawa H₂ (Russel, 1998). Peningkatan asetat menghasilkan lebih banyak H₂ yang dapat dimanfaatkan oleh bakteri metanogen, sehingga gas metana yang dihasilkan akan lebih besar (France dan Dijkstra, 2005; Mirzaei-Aghsaghali *et al.*, 2008)

Pengaruh komposisi pakan terhadap protozoa pada rumen sapi dengan penambahan probiotik *Lactobacillus plantarum* TSD -10 secara invitro.

Hasil perhitungan terhadap protozoa pada cairan rumen sapi yang diberi komposisi pakan berbeda, yaitu ransum A dan ransum B dan probiotik

secara *in vitro* selama 72 jam tersaji pada Tabel II. 5. Konsentrasi probiotik pada ransum A adalah $1,86 \times 10^9$ cfu/ml dan pada ransum B adalah $0,22 \times 10^9$ cfu/ml.

Tabel II. 5. Rerata protozoa pada rumen sapi dengan komposisi pakan berbeda dan penambahan *Lactobacillus plantarum* TSD-10.

Komposisi pakan	Waktu	Dosis probiotik (%)	Protozoa ($\times 10^5$ cfu/ml)
Ransum A	0	-	$2,63 \pm 0,60$
	72	0	$2,11 \pm 0,46$
		5	$4,27 \pm 0,33$
		10	$1,58 \pm 0,19$
		15	$0,98 \pm 0,15$
Ransum B	0	-	$1,37 \pm 0,12$
	72	0	$0,96 \pm 0,05$
		5	$0,68 \pm 0,05$
		10	$0,74 \pm 0,02$
		15	$0,48 \pm 0,04$

Nilai rerata diperoleh dari 3x ulangan.

Penurunan jumlah protozoa pada ransum B (64,9%) lebih besar dibandingkan ransum A (62,7%). Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa ransum A dan B berbeda nyata ($\text{sig} < \alpha 0,05$), dengan perlakuan terbaik dalam menekan jumlah protozoa pada ransum B. Ransum B mampu menekan pertumbuhan protozoa dimungkinkan karena tipe pakan dengan

perbandingan konsentrat yang lebih tinggi dan menurunnya nilai pH akibat penambahan probiotik (Tabel II. 2.). Pemberian konsentrat dalam jumlah tinggi dapat menurunkan pH. Penurunan pH dibarengi dengan penurunan jumlah protozoa dalam rumen. Penelitian Franzolin dan Dehority (1996) *lihat* Dehority (2003) mengenai efek dari pakan dengan konsentrat tinggi (50% dan 75%) pada konsentrasi protozoa rumen menunjukkan hasil penurunan pada pH rumen hingga bernilai di bawah 6 yang ditandai dengan menurunnya konsentrasi protozoa.

Rendahnya jumlah protozoa pada ransum B, ditunjukkan dengan rendahnya nilai KCBK pada ransum B (Tabel II. 3.). Nilai KCBK pada ransum B yang menurun ditandai pula dengan menurunnya bakteri metanogen. Menurut Ushida dan Jouany (1996), aktivitas metabolisme protozoa meningkat pada saat pembentukan metana yang ditunjukkan dengan nilai pencernaan bahan kering. Hal tersebut memperlihatkan adanya transfer hidrogen antar spesies yang terjadi antara protozoa dan bakteri metanogen yang memungkinkan protozoa untuk memecah substrat lebih banyak. Rendahnya pencernaan terhadap pakan mengakibatkan rendahnya ketersediaan nutrisi untuk protozoa, sehingga terjadi penurunan jumlah protozoa (Hau *et al.*, 2005). Menurunnya jumlah protozoa berdampak pada berkurangnya bakteri metanogen yang hidup bersimbiosis dengan protozoa.

Jumlah protozoa dan bakteri metanogen lebih rendah pada ransum B dibanding ransum A. Hal tersebut menunjukkan adanya hubungan antara protozoa dan bakteri metanogen. Protozoa merupakan kohabitan yang

penting untuk bakteri metanogen karena selain menjadi sumber hidrogen juga menyediakan tempat untuk perlekatan (Hegarty, 2001). Menurut Newbold *et al.* (1995), sekitar 9 – 25% proses metanogenesis dalam rumen dihasilkan dari bakteri metanogen yang berhubungan dengan protozoa siliata.

Molekul hidrogen yang dihasilkan oleh protozoa digunakan oleh bakteri metanogen, hal tersebut ditunjukkan dengan produksi asam lemak *volatile* protozoa seperti laktat dan butirir, berkurang dengan adanya bakteri metanogen (Hilman *et al.*, 1988). Menurut Schonhusen *et al.* (2003), ketiadaan protozoa dalam rumen secara *in vivo*, tidak hanya menurunkan pencernaan terhadap karbohidrat (4%), menurunkan rasio asetat : propionat dan butirir, tapi juga menurunkan produksi metana oleh hewan tersebut.

Hasil perhitungan menggunakan analisis sidik ragam menunjukkan adanya perbedaan pada setiap perlakuan probiotik ($\text{sig} < \alpha 0,05$) (Lampiran II. 3). Uji lanjutan menggunakan uji Duncan, menunjukkan bahwa konsentrasi probiotik *L. plantarum* TSD-10 yang paling berpengaruh dalam menekan keberadaan protozoa pada rumen sapi secara *in vitro* adalah 15%, baik pada pakan A maupun B.



KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, disimpulkan bahwa penambahan probiotik *L. plantarum* TSD-10 secara *in vitro* berpengaruh dalam menekan jumlah bakteri metanogen dan protozoa pada taraf uji statistik 5%. Penambahan probiotik *L. plantarum* TSD-10 pada ransum B mampu menurunkan jumlah bakteri metanogen dan protozoa pada dosis 5% v/v.

SARAN

Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan komposisi pakan yang lebih bervariasi juga penggunaan probiotik selain Bakteri Asam Laktat (BAL) untuk menekan pertumbuhan bakteri metanogen dan protozoa dalam rumen sapi.



DAFTAR ACUAN

- Bunthoen PEN. 2007. Studies on manipulation of ruminal fermentation and methanogenesis by natural products. Dissertation. The United Graduate School of Agricultural Science, Iwate University: x + 118 hlm.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin & P. Gouet. 1995. In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(9): 3466—3467.
- Christophersen, C. T. 2007. Grain and artificial stimulation of the rumen change the abundance and diversity of methanogens and their association with ciliates. Thesis. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Western Australia, (?): xii + 128 hlm.
- Craig, M. A. 1992. Detoxification of certain environmental protection agency declared toxins by naturally occurring anaerobic organisms. <http://www.wipo.int>. 3 Desember 2008, pk: 21.47 wib.
- Dehority, B. A. 2003. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham: vii + 372 hlm.
- Fonty, G., K. Joblin, M. Chavarot, R. Roux, G. Naylor & F. Michallon. 2007. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in

methanogen-free lambs. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**(20) : 6391—6403.

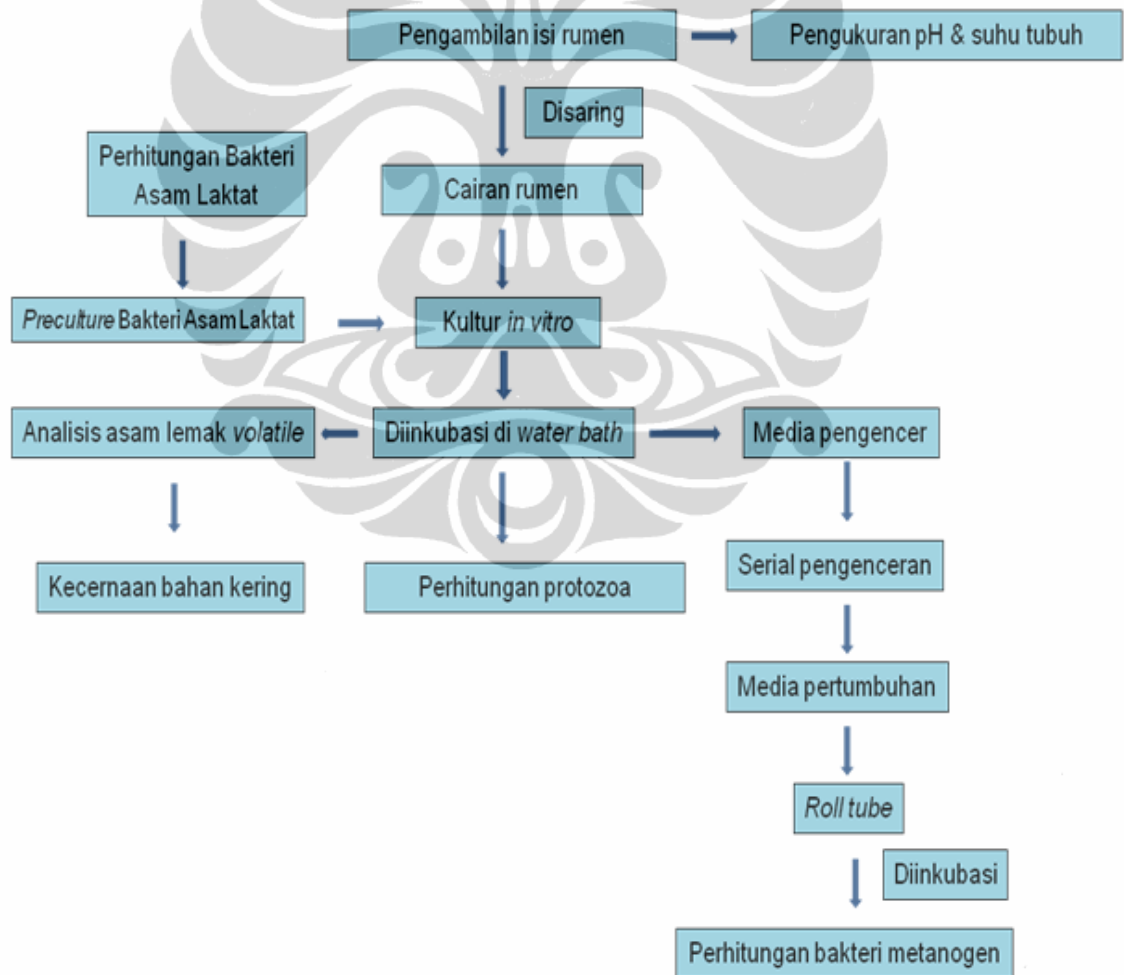
- Feed Innovation Services (FIS). 2003. The effects of grass silage treated with EM-silage on methane and volatile fatty acid production in the rumen. A report by: Feed Innovation Services (FIS), Noordwolde. 1—12.
- France, J & J. Dijkstra. 2005. Volatile fatty acid production *dalam* Dijkstra, J., J.M. Forbes & J. France (Eds.). 2005. Quantitative Aspect of ruminant digestion and metabolism. 2nd Edition. CABI Publishing, USA. Xii + 734 hlm.
- Fuller, R. 1992. Probiotics. The scientific basis. Chapman & Hall, London. viii + 398 hlm.
- Gworgwor, Z. A., T. F. Mbahi & B. Yakubu. 2006. Environmental implications of methane production by ruminants: a review. *Journal of Sustainable Development in Agriculture and Environment*. **2**(1): 1—14.
- Haryanto, B., Supriyati, A. Thalib, Surayah, Abdurahman, & K. Sumanto. 2002. Penggunaan probiotik dalam upaya peningkatan fermentasi mikrobial rumen *dalam* Haryanto, B., B. Setiadi, R. M. A. Adjid, A. P. Sinurat, P. Situmorang, B. Risdiono, S. Tarigan, A. Wiyono, M. B. Tresnawati, T. B. Murdiati, A. Bakar, & Ashari (Eds.). *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Ciawi-Bogor, 30 September – 1 Oktober 2002.
- Hau, D. K., M. Nenobais, J. Nulik & N. G. F. Katipana. 2005. Pengaruh probiotik terhadap kemampuan cerna mikroba rumen sapi bali. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. ? : 171—180.
- Hegarty, R. 2001. Gas emissions from the Australian livestock sector. What do we know, what can we do?. Australian Greenhouse Office, Canberra. 32 hlm.
- Heinrichs, J. 2005. Rumen development in the dairy calf. *Advances in Dairy Technology*. **17**: 179 – 187.
- Hillman, K., D. Lloyd, & A. G. Williams. 1988. Interactions between the methanogen *Methanosarcina barkeri* and rumen holotrich ciliate protozoa. *Letters in Applied Microbiology*. **7**: 49 – 53.

- Jones, B. & M.G. Kenward. 2003. Design and analysis of cross-over trials. 2nd Ed. Chapman and Hall, Boca Raton: 394 hlm.
- Kaunang, C. L. 2004. Respons ruminant terhadap pemberian hijauan pakan yang dipupuk air belerang. Disertasi. Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Xii + 105 hlm.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, & J. Parker. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th Ed. Prentice Hall, London: xxv + 1077 hlm.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., N. Maheri-Sis, A. Mirza-Aghazadeh, Y. Ebrahimnezhad, M. R. Dastouri, & A. A. Golshani. 2008. Estimation of methane production in sheep using nutrient composition of the diet. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **7(6)** : 765—770.
- Moss, A.R., Jean-Pierre Jouany, & J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annual Zootechnology*. **49**: 231-- 253.
- Newbold, C. J., B. Lassalas, & J. P. Jouany. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in Applied Microbiology*. **21**: 230 – 234.
- Ogimoto, K., & S. Imai. 1981. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo: viii + 231 hlm.
- Russell, J.B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *Journal Dairy Science*. **81**: 3222—3230.
- Schonhusen, U., Zitnan, R. Kuhla, S., Jentsch, W., Derno, M., & Voigt, J. 2003. Effects of protozoa on methane production in rumen and hindgut of calves around time of weaning. *Archives of Animal Nutrition*. **57(4)**: 279 – 295.
- Sretenovic, Lj., M. P. Petrovic, S. Aleksic, V. Pantelic, V. Katic, V. Bogdanovic, & R. Beskorovajni. 2008. Influence of yeast, probiotics, and enzymes in rations on dairy cows performance during transition. *Biotechnology in Animal Husbandry*. **24(5-6)**: 33—43.
- Sugoro, I., & M. R. Pikoli. 2004. Uji viabilitas isolat khamir bahan probiotik dalam cairan rumen kerbau steril *dalam* Rachmad, M., J. R. Dumais, S. Trijoko, M. Akhadi, Bunawas, Z. Alatas, Syarbaini, & N. Hayati (Eds.). *Pemanfaatan IPTEK nuklir dalam menyongsong kebangkitan*

- teknologi yang berkeselamatan handal dan ramah lingkungan.*
Prosiding Presentasi Ilmiah Keselamatan Radiasi dan Lingkungan X.
14 Desember 2004.
- Suskovic, J., B. Kos, J. Goreta & S. Matosic. 2001. Role of lactic acid bacteria and Bifidobacteria in symbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology*. **39**(3) : 227—235.
- Theodorou, M. K. & J. France. 2005. Rumen microorganism and their interaction *dalam* Dijkstra, J., J.M. Forbes dan J. France (Eds.). 2005. Quantitative Aspect of ruminant digestion and metabolism. 2nd Edition. CABI Publishing, USA. Xii + 734.
- Ushida, K., & J. P. Jouany. 1996. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. *Letters in Applied Microbiology*. **23**: 129 – 132.
- Wallace, R. J. & C. J. Newbold. 1992. Probiotics for ruminants *dalam* Fuller, R (Ed.). 1992. Probiotics: The scientific basis. Chapman & Hall, London. viii + 398 hlm.
- Widyastuti, Y., J. Rachmat, E. Sofarianawati, & S. Ratnakomala. 1996. Microbial process development for probiotic using lactic acid bacteria : growth and viability of lactic acid bacteria for probiotics. *Annual Reports International Centre for Biotechnology*. **19**: 617—622.
- Widyastuti, Y., S. Ratnakomala, E. Sofarianawati & J. Rachmat. 1997. Microbial process development for probiotic using lactic acid bacteria: co-cultures of lactic acid bacteria as probiotic for the rumen. *Annual Reports International for Centre Biotechnology*. **20**: 676—680.
- Widyastuti, Y., S. Ratnakomala, E. Sofarianawati, & J. Rachmat. 1998. Microbial process development for probiotic using lactic acid bacteria: Characteristics of a new probiotic of *Leuconostoc citreum* TSD-10 for cows. *Annual Reports International Centre for Biotechnology*. **21**: 804—808.

LAMPIRAN

Lampiran II. 1. Bagan cara kerja perhitungan protozoa dan bakteri metanogen.



Lampiran II. 2. Analisis sidik ragam bakteri metanogen secara *in vitro*.

The SAS System
The GLM Procedure

Dependent Variable: Respon

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	5.71479562	0.81639937	4.67	0.0051
Error	16	2.79662733	0.17478921		
Corrected Total	23	8.51142296			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Respon Mean
0.671427	20.40359	0.418078	2.049042

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Pakan	1	0.00573504	0.00573504	0.03	0.8585
Probiotik	3	4.08226146	1.36075382	7.79	0.0020
Pakan*Probiotik	3	1.62679913	0.54226638	3.10	0.0563

Interaksi pakan dengan probiotik tidak berpengaruh nyata pada bakteri metanogen karena nilai Pr > F (0.0563) lebih dari 5%.

Pakan tidak berpengaruh nyata terhadap bakteri metanogen, karena Pr > F (0.8585) lebih dari 5% .

Probiotik berpengaruh nyata terhadap bakteri metanogen, karena Pr > F (0.0020) kurang dari 5%.

Uji Duncan

The SAS System
The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for Respon

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.174789

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.5117	.5366	.5521

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Probiotik
A	2.5037	6	15%
A	2.2473	6	10%
A	2.0552	6	Kontrol
B	1.3900	6	5%

Dari uji Duncan di atas dapat dilihat bahwa pemberian probiotik pada konsentrasi 15 % dan 10 % memberikan respon (jumlah bakteri metanogen) yang sama dengan kontrol, sedangkan pemberian probiotik pada konsentrasi 5 % menghasilkan respon (jumlah bakteri metanogen) yang lebih sedikit dari kontrol.

Lampiran II. 3. Analisis sidik ragam protozoa secara *in vitro*.

The SAS System
The GLM Procedure

Dependent Variable: Respon

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	331652188800	47378884114	98.28	<.0001
Error	16	7713100800	482068800		
Corrected Total	23	339365289600			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Respon Mean
0.977272	14.84521	21956.07	147900.0

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Pakan	1	140454000000	140454000000	291.36	<.0001
Probiotik	3	100843574400	33614524800	69.73	<.0001
Pakan*Probiotik	3	90354614400	30118204800	62.48	<.0001

Interaksi pakan dengan probiotik berpengaruh nyata pada respon karena nilai Pr > F (<0.0001) lebih kecil dari 5%.

Uji Duncan

The SAS System
The GLM Procedure

Dependent Variable: Respon

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	331652188800	47378884114	98.28	<.0001
Error	16	7713100800	482068800		
Corrected Total	23	339365289600			

R-Square Coeff Var Root MSE Respon Mean
0.977272 14.84521 21956.07 147900.0

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Perlakuan	7	331652188800	47378884114	98.28	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Perlakuan	7	331652188800	47378884114	98.28	<.0001

The SAS System

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for Respon

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 16
Error Mean Square 4.8207E8

Number of Means	2	3	4	5	6	7
Critical Range	38004	39852	41007	41800	42372	42799
8	43124					

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Perlakuan
A	429600	3	A572
B	211200	3	AK72
C	158400	3	A1072
D	98400	3	A1572

	D			
	D	96480	3	BK72
	D			
E	D	73920	3	B1072
E	D			
E	D	67680	3	B572
E				
E		47520	3	B1572

Berdasar uji Duncan dapat dilihat bahwa pemberian ransum A dengan konsentrasi probiotik 5 % (A572) menghasilkan jumlah protozoa paling besar dan lebih besar dari kontrol (AK72).

Pemberian ransum A dengan konsentrasi probiotik 10% dan 15% (A1072 dan A1572) menghasilkan jumlah protozoa yang lebih kecil dari kontrol (AK72).

Pemberian ransum B dengan konsentrasi probiotik 15% (B1572) menghasilkan jumlah protozoa yang lebih kecil dari kontrol (BK72).

Sedangkan ransum B dengan konsentrasi 10% (B1072) dan 5% (B572) menghasilkan jumlah protozoa yang sama dengan kontrol (BK72).

Berdasar nilai mean juga dapat dilihat bahwa ransum A yang diberi probiotik menghasilkan jumlah protozoa yang lebih besar daripada ransum B yang diberi probiotik pada pengukuran 72 jam.

DISKUSI PARIPURNA

Pemberian komposisi ransum yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan pada populasi bakteri metanogen dan protozoa. Penurunan populasi bakteri metanogen terjadi pada pemberian ransum A. Jumlah bakteri metanogen yang diperoleh dari ransum A berkisar antara $(0,74 - 0,89) \times 10^7$ cfu/ml, sedangkan pada ransum B berkisar antara $(1,71 - 2,58) \times 10^7$ cfu/ml. Rerata bakteri metanogen pada ransum B $((2,19 \pm 0,44) \times 10^7$ cfu/ml) lebih tinggi dibandingkan ransum A $((0,82 \pm 0,07) \times 10^7$ cfu/ml). Berdasarkan analisis sidik ragam, perbedaan komposisi ransum A dan B, berbeda nyata antar perlakuan ($\text{sig} < \alpha 0,05\%$), dengan komposisi ransum terbaik dalam menekan pertumbuhan bakteri metanogen adalah ransum A.

Tingginya jumlah bakteri metanogen pada ransum B dapat disebabkan karena nilai pH yang lebih basa (8). Menurut Mirzaei-Aghsaghali *et al.* (2008) bakteri metanogen sensitif terhadap perubahan pH. Penurunan nilai pH akan menurunkan jumlah bakteri metanogen dan menyebabkan berkurangnya gas metana yang dihasilkan. Rendahnya jumlah bakteri metanogen pada ransum A, dapat pula disebabkan karena rasio asetat : propionat yang diperoleh lebih rendah dibandingkan pada ransum B, dan hal tersebut juga menyebabkan lebih rendahnya pH ransum A (Lana *et al.*, 1998).

Hasil berbeda ditunjukkan dengan penambahan probiotik *L. plantarum* TSD-10 secara *in vitro*, penurunan populasi bakteri metanogen terjadi pada ransum B (56,8 %) lebih besar dibanding ransum A (29,8 %). Kandungan

konsentrat yang banyak mengandung pati, mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat sebagai probiotik dengan menghasilkan asam laktat. Asam laktat tersebut akan digunakan oleh bakteri propionat untuk mensintesis asam propionat. Sintesis asam propionat memerlukan hidrogen yang juga diperlukan dalam pembentukan gas metana oleh bakteri metanogen (Christophersen, 2007), hal tersebut menunjukkan adanya kompetisi antara bakteri metanogen dengan bakteri penghasil propionat dalam menggunakan hydrogen (Russel, 1998). Berkurangnya hidrogen mengakibatkan berkurangnya pula populasi bakteri metanogen.

Jumlah protozoa yang diperoleh dari ransum A berkisar antara $(1.93 - 3.95) \times 10^5$ sel/ml, sedangkan pada ransum B berkisar antara $(2.81 - 4.35) \times 10^5$ sel/ml. Rerata protozoa pada ransum B $((3.76 \pm 0.83) \times 10^5$ sel/ml) lebih tinggi dibandingkan ransum A $((3.08 \pm 1.04) \times 10^5$ sel/ml). Berdasarkan analisis sidik ragam, perbedaan komposisi ransum A dan B, tidak berbeda nyata antar perlakuan ($\text{sig} > \alpha 0.05\%$). Tidak berpengaruhnya ransum terhadap protozoa dimungkinkan karena nilai pH ransum B yang menunjukkan nilai basa, sehingga tidak terjadi penurunan pada jumlah protozoa.

Penambahan probiotik *L. plantarum* TSD-10 menunjukkan hasil yang berbeda. Terjadi penurunan jumlah protozoa pada perlakuan ransum B (64,9%) lebih besar dibanding ransum A (62,7%). Hal tersebut dapat disebabkan karena rendahnya nilai pencernaan pakan pada ransum B. Pada

ransum A, nilai KCBK yang diperoleh cenderung meningkat (8,5%) seiring dengan bertambahnya konsentrasi probiotik. Aktivitas metabolisme protozoa akan meningkat pada saat pembentukan metana oleh bakteri metanogen karena adanya transfer hidrogen antar spesies (Ushida dan Jouany, 1996). Penurunan populasi metanogen pada ransum B setelah pemberian probiotik *L. plantarum* TSD-10, menunjukkan adanya hubungan antara protozoa dan bakteri metanogen. Rendahnya pencernaan terhadap pakan mengakibatkan rendahnya ketersediaan nutrisi untuk protozoa, sehingga terjadi penurunan jumlah protozoa (Hau *et al.*, 2005),

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan rerata bakteri metanogen dan protozoa antara ransum A dan B pada pengambilan sampel pagi dan sore hari berbeda nyata antar perlakuan ($\text{sig} < \alpha 0,05$), dengan perlakuan terbaik dalam menekan bakteri metanogen dari setiap pengambilan sampel adalah ransum A. Hal tersebut dapat disebabkan karena ransum B banyak mengandung pati yang lebih mudah dicerna oleh protozoa. Peningkatan pencernaan akan lebih banyak menghasilkan hidrogen sebagai produk akhir metabolisme yang akan digunakan oleh bakteri metanogen untuk mensintesis gas metana. Peningkatan protozoa disertai pula dengan meningkatnya bakteri metanogen, karena protozoa siliata merupakan kohabitan yang penting untuk bakteri metanogen sebagai penyedia sumber hidrogen (Hegarty, 2001). Hal tersebut menunjukkan adanya hubungan antara protozoa dan bakteri metanogen.

Perhitungan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa rerata protozoa antar ransum A dan B berbeda nyata ($\text{sig} < \alpha 0,05$) pada pengambilan sampel di pagi hari, dengan perlakuan A yang terbaik dalam menekan jumlah protozoa. Pada pengambilan sampel di sore hari, hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan tidak berbeda nyata ($\text{sig} > \alpha 0,05$).

Protozoa yang diperoleh pada perlakuan A dan B sebanyak 3 famili yaitu Ophryoscolecidae, Isotrichidae dan Blepharocorythidae. Famili protozoa yang paling banyak diperoleh dari setiap komposisi pakan adalah Ophryoscolecidae, sedangkan yang paling jarang diperoleh adalah Blepharocorythidae. Hal ini disebabkan Ophryoscolecidae masuk ke dalam Ordo Entodiniomorphida yang menyusun sebagian besar dari rumen siliata. Berlawanan dengan hal tersebut, Famili Isotrichidae dan Blepharocorythidae masuk ke dalam Ordo Trichostomatida. Ordo Trichostomatida relatif jarang ditemui meskipun frekuensi penampakkannya di rumen relatif tinggi (Ogimoto dan Imai, 1981).

Pada penambahan probiotik secara *in vitro*, hasil analisis sidik ragam menunjukkan perlakuan yang dicobakan terhadap jumlah bakteri metanogen tidak berbeda nyata ($\text{sig} > \alpha 0,05$) pada variasi ransum A dan B namun berbeda nyata ($\text{sig} < \alpha 0,05$) terhadap jumlah protozoa dengan ransum B yang terbaik dalam menekan pertumbuhan protozoa. Variasi dosis probiotik berbeda nyata ($\text{sig} < \alpha 0,05$) terhadap jumlah bakteri metanogen dan

protozoa, dengan dosis terbaik 5% v/v untuk menekan bakteri metanogen dan 15% v/v untuk menekan protozoa secara *in vitro*.



RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Rerata bakteri metanogen yang diperoleh dari cairan rumen sapi dengan pemberian ransum A adalah $(0,82 \pm 0,07) \times 10^7$ cfu/ml, sedangkan pada ransum B adalah $(2,19 \pm 0,44) \times 10^7$ cfu/ml. Ransum terbaik dalam menekan pertumbuhan bakteri metanogen adalah ransum A. Rerata protozoa yang diperoleh dari cairan rumen sapi dengan pemberian ransum A adalah $(3,08 \pm 1,04) \times 10^5$ sel/ml, sedangkan pada ransum B adalah $(3,76 \pm 0,83) \times 10^5$ cfu/ml.

Penambahan probiotik *Lactobacillus plantarum* TSD-10 secara *in vitro* dengan dosis 0 – 15% v/v berpengaruh dalam menekan jumlah bakteri metanogen dan protozoa pada taraf uji statistik 5%. Penambahan probiotik pada ransum B mampu menurunkan jumlah bakteri metanogen dan protozoa pada dosis probiotik 5% v/v.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan jenis pakan yang lebih bervariasi juga penggunaan probiotik selain *Lactobacillus plantarum* TSD-10 sehingga diperoleh informasi yang lebih luas untuk menekan pertumbuhan bakteri metanogen dan protozoa dalam rumen.

DAFTAR ACUAN

- Christophersen, C. T. 2007. Grain and artificial stimulation of the rumen change the abundance and diversity of methanogens and their association with ciliates. Thesis. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Western Australia, (?): xii + 128 hlm.
- Hau, D. K., M. Nenobais, J. Nulik & N. G. F. Katipana. 2005. Pengaruh probiotik terhadap kemampuan cerna mikroba rumen sapi bali. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. ? : 171—180.
- Hegarty, R. 2001. Gas emissions from the Australian livestock sector. What do we know, what can we do?. Australian Greenhouse Office, Canberra. 32 hlm.
- Lana, R.P., J.B. Russell, & M.E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal Animal Science*. **76**: 2190—2196.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., N. Maheri-Sis, A. Mirza-Aghazadeh, Y. Ebrahimnezhad, M. R. Dastouri, & A. A. Golshani. 2008. Estimation of methane production in sheep using nutrient composition of the diet. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **7**(6) : 765—770.
- Ogimoto, K., & S. Imai. 1981. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo: viii + 231 hlm.
- Russell, J.B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *Journal Dairy Science*. **81**: 3222—3230.
- Ushida, K., & J. P. Jouany. 1996. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. *Letters in Applied Microbiology*. **23**: 129 – 132.