

**POTENSI ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT YANG DIISOLASI
DARI SALURAN PENCERNAAN BROILER SEBAGAI
KANDIDAT PROBIOTIK PADA BROILER**

***POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM
DIGESTIVE TRACT OF BROILER AS CANDIDATES
PROBIOTICS IN BROILER***

MUHAMMAD NUR HIDAYAT



**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN
PASCASARJANA UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**



Optimization Software:
www.balesio.com

**POTENSI ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT YANG DIISOLASI
DARI SALURAN PENCERNAAN BROILER SEBAGAI
KANDIDAT PROBIOTIK PADA BROILER**

Disertasi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi
Ilmu Pertanian

Disusun dan diajukan oleh

MUHAMMAD NUR HIDAYAT

**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN
PASCASARJANA UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**



2018
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Nur Hidayat
Nomor Pokok : P0100313010
Program : Ilmu Pertanian

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 Desember 2018
Yang menyatakan

Muhammmad Nur Hidayat



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat dan hidayah-Nya dalam segenap aktifitas keseharian kita. Maha suci Allah SWT yang telah menciptakan manusia dalam bentuk yang paling indah. Hanya berkat nikmat kekuatan, kesehatan dan kesempatan yang senantiasa diberikan oleh Allah SWT, sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.

Gagasan yang melatari tajuk permasalahan ini timbul dari pelarangan penggunaan *Antibiotic Growth Promotants* (AGPs) sebagai imbuhan pakan (*feed additive*) khususnya pada broiler. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk menggantikan fungsi antibiotika sebagai imbuhan pakan pada broiler, yaitu penggunaan probiotik. Penulis bermaksud menyumbangkan suatu konsep tentang meningkatkan produktifitas broiler dengan memperbaiki keseimbangan ekosistem mikroorganisme dalam saluran pencernaan ternak melalui pemberian probiotik. Disamping itu diharapkan produk ternak yang dihasilkan lebih aman untuk dikonsumsi.

Disertasi ini disusun sebagai syarat untuk pencapaian gelar doktor.

Karya ini kupersembahkan kepada kedua orang tua kami terkasih, anda Abdul Hamid (alm.) dan Ibunda Iguna (Alm.) atas doa, lisan dan kasih sayangnya yang tiada henti dalam membesarkan mendidik penulis dengan nilai-nilai kemanusiaan sebagai bekal dalam



kehidupan ini. Terima kasih yang tulus kupersembahkan kepada kedua mertua kami Drs. H. Kamaruddin, AS., M.P. dan Hj. Hawis serta istri tercinta Musawirah, S.Pt., M.Si dan putriku tersayang Faiqah Raihaanun Hidayat dan Ananda Azka Ghaisan Hidayat (alm.) yang telah lebih dulu kembali ke pangkuan Ilahi. Semoga pengorbanan dan dukungan yang senantiasa diberikan kepada penulis senantiasa bernilai ibadah di sisi Allah SWT.

Banyak kendala yang dihadapi oleh penulis dalam rangka penyusunan disertasi ini, dan dari bantuan berbagai pihak, maka disertasi ini dapat penulis rampungkan. Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih kepada Ibu Prof. Dr. drh. Ratmawati Malaka, M.Sc sebagai Ketua Komisi Penasihat dan Ibu Prof.Dr.Ir Laily Agustina, M.S., serta Bapak Dr.Ir. Wempie Pakiding, M.Sc sebagai Anggota Komisi Penasihat, atas segala bimbingan, arahan dan bantuan yang telah diberikan mulai dari pengembangan minat permasalahan penelitian, pelaksanaan penelitian sampai penyusunan disertasi ini. Terima kasih juga penulis haturkan kepada Bapak Prof. Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc, Bapak Prof. Dr. Ir. Amran Laga, M.Si, Bapak Prof. Dr. Ir. M. Natsir Djide, M.Si, Apt., Ibu drh. Dwi Kesuma Sari, P.hD dan Ibu Dr. drh. Muflihana, M.Si. (eksternal) yang telah bersedia menjadi tim penguji pada ujian disertasi dan senantiasa memberikan saran-saran yang konstruktif dalam penulisan disertasi ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Rektor UIN Alauddin
assar Bapak Prof. Dr. Musafir Pababbari, M.Si., Dekan Fakultas Sain



dan Teknologi (FST), Bapak Prof. Dr. Arifuddin Ahmad, M.Ag., Ketua Jurusan Ilmu Peternakan Bapak Dr.Ir. Muh. Basir S.Paly, M.S dan kepada seluruh civitas akademik dalam lingkup FST UIN Alauddin atas dukungan dan pengertiannya selama penulis menempuh pendidikan. Semoga ilmu yang diperoleh dapat menambah kompetensi penulis dalam melaksanakan tri darma perguruan tinggi.

Terima kasih kepada seluruh teman-teman Program Studi Ilmu Pertanian khususnya angkatan 2013 yang senantiasa memberikan dukungan dan motivasi selama kebersamaannya menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Dan terakhir ucapan terimah kasih kepada seluruh keluarga, sahabat dan mereka yang namanya tidak tercantum, tetapi telah banyak membantu dalam penelitian dan penulisan disertasi ini. Semoga Allah SWT membalas kebaikannya, amin.

Makassar, 18 Desember 2018

Muhammad Nur Hidayat



ABSTRAK

MUHAMMAD NUR HIDAYAT. *Potensi Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Saluran Pencernaan Broiler sebagai Kandidat Probiotik pada Broiler* (dibimbing oleh Ratmawati Malaka, Laily Agustina dan Wempie Pakiding)

Upaya untuk mengurangi penggunaan antibiotika dalam pemeliharaan broiler dapat dilakukan dengan pemberian imbuhan pakan yang lain, seperti probiotik. Tujuan penelitian: 1) Mengisolasi dan mengetahui karakteristik isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari, 2) Mengetahui kemampuan tumbuh isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik pada berbagai uji probiotik, 3) Mendapatkan level optimum isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik dalam memperbaiki histologi vili usus halus, nilai hematologis dan bobot relatif organ limfoid, 4) Mengkaji pengaruh isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik terhadap daya cerna, performa dan mortalitas broiler, 5) Mengetahui kemampuan isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik untuk mengurangi penggunaan antibiotika pada broiler.

Diperoleh empat isolat yang telah diisolasi dari saluran pencernaan (usus halus) broiler umur tiga hari. Berdasarkan pendekatan molekuler melalui analisis gen 16S rRNA, maka isolat H7 yang terpilih sebagai kandidat probiotik teridentifikasi sebagai *Lactobacillus paracasei*. Pemberian isolat H7 (*Lactobacillus paracasei*) melalui air minum. Level 1 mL/hari (5.8×10^7 CFU), 3 mL/hari (1.7×10^8 CFU), dan 5 mL/hari (2.9×10^8 CFU) tidak mempengaruhi ($P > 0.05$) status hematologi dan organ limfoid pada broiler. Level 3 mL/hari per liter air minum (1.7×10^8 CFU) merupakan dosis optimum dalam meningkatkan tinggi vili dan luas permukaan vili bagian jejunum dan ileum serta kerapatan vili bagian ileum. Pemberian *Lactobacillus paracasei* pada level 3 mL/hari setiap liter air minum (1.7×10^8 CFU) tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap daya a protein dan serat kasar, konsumsi ransum, persentase lemak minimal, persentase karkas dan mortalitas, tetapi dapat memperbaiki tambahan bobot badan dan konversi ransum ketika diberikan pada 15 hari sampai 35 hari untuk menggantikan antibiotika.



Kata Kunci: Probiotik, Histologi, *Lactobacillus paracasei*, broiler, performa

ABSTRACT

MUHAMMAD NUR HIDAYAT. Potential of Lactic Acid Bacterial Isolates Isolated from Digestion of Broilers as a Probiotic candidate in Broiler (Supervised by Ratmawati Malaka, Laily Agustina dan Wempie Pakiding)

Efforts to reduce the use of antibiotics in broiler maintenance can be done by giving other feed additive, such as probiotics. Research purposes: 1) Isolating and knowing the characteristics of BAL isolators from the broiler digestive tract which is three days old, 2) Knowing the growing ability of BAL isolates from three-day-old broiler digestive tracts that have the potential to be developed as probiotic candidates in various probiotic tests, 3) Getting the optimum level of BAL isolates from the three-day-old broiler digestive tract as a candidate for probiotics in improving the histology of small intestinal villi, hematological values and the relative weight of lymphoid organs, 4) Assessing the effect of LAB isolates from the three-day-old broiler digestive tract as a candidate for probiotics on digestibility, broiler performance, and mortality 5) Knowing the ability of BAL isolates from the three-day-old broiler digestive tract as a candidate for probiotics to reduce the use of antibiotics in broilers

Four isolates were isolated from the three-day-old broiler digestive tract (small intestine). Based on the molecular approach through analysis of the 16S rRNA gene, the H7 isolates selected as probiotic candidates were identified as *Lactobacillus paracasei*. Administration of H7 isolates (*Lactobacillus paracasei*) in the drinking water. level 1 mL/day (5.8×10^7 CFU), 3 mL/day (1.7×10^8 CFU), and 5 mL/day of drinking water (2.9×10^8 CFU) did not significant effect ($P>0.05$) hematological status and lymphoid organs in broilers. Level 3 mL/day per Liter of drinking water (1.7×10^8 CFU) is the optimum dose in increasing the height of villi and villi surface area of the jejunum and ileum and the density of villi in the ileum part. The administration of *Lactobacillus paracasei* at level 3 mL/day per Liter of drinking water (1.7×10^8 CFU) had no significant effect ($P>0.05$) on crude protein and fiber digestibility, ration consumption, the percentage of abdominal fat, carcass and mortality percentage, but can increase body weight and conversion ratio when given at the age of 15 days to 35 days to replace antibiotics.

Keywords: Probiotics, histology, *Lactobacillus paracasei*, broiler, performance



DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	iv
ABTRAK	vii
ABTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR ARTI LAMBING DAN SINGKATAN	xviii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	6
D. Kegunaan Penelitian	6
E. Ruang Lingkup	7
F. Definisi dan Istilah	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	11
A. Saluran Pencernaan Unggas	11
B. Usus Halus	12
C. Efek Imbuhan Pakan (<i>Feed Additive</i>) terhadap Histologi Usus halus	17
Mikroflora Saluran Pencernaan	19
Antibiotika	22
Resistensi dan Residu Antibiotika	25



G. Probiotik	27
H. Mekanisme Kerja Probiotik	30
I. Efek Probiotik Pada Ternak Unggas	33
J. Bakteri Asam Laktat (BAL)	37
K. Solusi Bakteri Asam Laktat Sebagai Kandidat Probiotik	41
L. Darah	42
1. Eritrosit	45
2. Hemoglobin	46
3. Hematokrit	48
4. Leukosit	48
M. Organ Limfoid	50
1. Timus	51
2. Bursa Fabricus	52
N. Kerangka Konseptual Penelitian	53
O. Hipotesis Penelitian	58
III. METODE PENELITIAN	59
A. Waktu dan Lokasi Penelitian	60
B. Prosedur Penelitian	60
1. Penelitian Tahap pertama	60
Tujuan Penelitian	60
Alat	61
Bahan	61
Pelaksanaan Penelitian	62
2. Penelitian Tahap Kedua	73
Tujuan Penelitian	73
Alat	73
Bahan	73
Pelaksanaan Penelitian	74
3. Penelitian Tahap Ketiga	83
Tujuan Penelitian.	83
Alat	83
Bahan	84



Pelaksanaan Penelitian	84
C. Analisis Data	89
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	90
Penelitian Tahap Pertama	
A. Isolasi dan identifikasi isolat Bakteri Asam Laktat (BAL)	90
1. Karakteristik, ciri fisiologi dan sifat biokimia Isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari	90
2. Pewarnaan Gram	91
3. Uji Katalase	93
4. Uji Methyl Red	94
5. Uji Motilitas	95
6. Tipe Fermentasi	96
B. Seleksi BAL sebagai Kandidat Probiotik	97
1. Ketahanan isolat terhadap berbagai kondisi pH	97
2. Ketahanan terhadap garam empedu	100
3. Suhu pertumbuhan optimum	103
4. Aktifitas antimikroba	105
C. Pemilihan Isolat Sebagai Kandidat Probiotik Untuk Uji <i>In Vivo</i>	112
D. Identifikasi isolat BAL terpilih (H7) sebagai kandidat probiotik melalui pendekatan molekuler analisis Gen 16S rRNA	115
Penelitian Tahap Kedua	118
A. Gambaran Histologi Vili Usus Halus	118
1. Tinggi vili	118
2. Luas permukaan vili	123
3. Kerapatan vili	127
B. Gambaran Hematologis	132
1. Eritrosit	134
2. Hemoglobin	135
3. Hematokrit	136



4. Leukosit	137
5. Indeks eritrosit (MCV,MCH dan MCHC	139
C. Organ Limfoid	141
Penelitian Tahap Ketiga	145
A. Daya Cerna	145
B. Performa Broiler	149
1. Konsumsi ransum	151
2. Pertambahan bobot badan	154
3. Konversi ransum	157
4. Lemak abdominal dan bobot karkas	161
5. Persentase ayam hidup	165
C. Pembahasan Umum	167
V. KESIMPULAN DAN SARAN	177
Kesimpulan	177
Saran	178
DAFTAR PUSTAKA	179



DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Komposisi bakteri dalam ileum broiler	22
2. Mikroba Kelompok Bakteri Asam Laktat (BAL) yang digunakan sebagai probiotik	30
3. BAKteri asam laktat yang diisolasi dari berbagai bagian organ pencernaan ayam kampung	42
4. Komposisi ransum basal selama penelitian	75
5. Hasil identifikasi isolat BAL yang diisolasi dari saluran pencernaan broiler	91
6. Kemampuan tumbuh isolat BAL asal saluran pencernaan pada berbagai suhu ($^{\circ}\text{C}$)	104
7. Urutan isolat (H2, H3, H5, dan H7) sebagai kandidat probiotik berdasarkan uji pH asam, garam empedu, suhu pertumbuhan optimum dan aktifitas antimikrba	113
8. Hasil pengujian biokimia isolate BAL H7 dengan system VITEK 2 versi 08.01	114
9. Hasil BLAST Gen 16s rRNA	117
10. Tinggi vili usus (mm) halus broiler umur tujuh hari, 14 hari, dan 35 hari	120
11. Luas permukaan vili (mm^2) usus halus broiler tujuh hari, 14 hari, dan 35 hari	126
12. Kerapatan vili (buah) usus halus broiler umur tujuh hari, 14 hari dan 35 Hari	128
13. Gambaran hematologis broiler yang dipelihara selama 35 hari	133
14. Persentase organ limfoid pada broiler umur 35 hari	142
15. Daya cerna protein dan serat kasar	147



16. Persentase lemak abdominal dan persentase bobot karkas broiler	161
17. Persentase ayam hidup	166

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Kerangka konseptual penelitia	57
2. Alur pelaksanaan penelitian	59
3. Ketahanan Isolat BAL terhadap berbagai kondisi pH	98
4. Ketahanan isolat BAL terhadap garam empedu	100
5. Diameter daya hambat isolat BAL terhadap <i>patogen Salmonella typhimurium</i> (Gram negatif)	106
6. Diameter daya hambat isolasi BAL terhadap patogen <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positif)	107
7. Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan Primer 63F dan 1387R	116
8. Vili Duodenum broiler, P1 (kontrol), P2 (probiotik 1 mL/ hari), P3 (probiotik 3 mL/ hari), dan P4 (probiotik 5 mL/ hari), Pewarnaan H & E dengan pembesaran 40 x 10. Skala bar 1000 μ	129
9. Vili jejunum broiler, P1 (kontrol), P2 (probiotik 1 mL/ hari), P3 (probiotik 3 mL/ hari), dan P4 (probiotik 5 mL/ hari), Pewarnaan H & E dengan pembesaran 40 x 10. Skala bar 1000 μ	130
10. Vili ileum broiler, P1 (kontrol), P2 (probiotik 1 mL/ hari), P3 (probiotik 3 mL/ hari), dan P4 (probiotik 5 mL/ hari), Pewarnaan H & E dengan pembesaran 40 x 10. Skala bar 1000 μ	131
11. Konsumsi protein (g) pada broileryang dipelihara selama 35 hari	157



12. Rasio energi dan protein dalam ransum yang dikonsumsi pada broiler yang dipelihara selama 35 hari	162
---	-----

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Morfologi isolat BAL asal saluran pencernaan broiler (usus halus) umur tiga hari	204
2. Hasil sekuens produk amplikasi Bakteri Asam Laktat isolat H7	205
3. Ketahanan Isolat BAL terhadap berbagai kondisi pH	207
4. Ketahanan isolat BAL terhadap garam empedu	209
5. Pertumbuhan isolat BAL pada berbagai suhu ($^{\circ}\text{C}$)	210
6. Aktifitas antimikroba isolat terhadap bakteri patogen Gram negatif dan Gram positif	211
7. Hasil sidik ragam tinggi vili usus halus broiler umur tujuh hari	212
8. Hasil sidik ragam tinggi vili usus halus broiler umur 14 hari	214
9. Hasil sidik ragam tinggi vili usus halus broiler umur 35 hari	216
10. Hasil sidik ragam luas vili usus halus broiler umur tujuh hari	218
11. Hasil sidik ragam luas vili usus halus broiler umur 14 hari	221
12. Hasil sidik ragam luas vili usus halus broiler umur 35 hari	224
13. Hasil sidik ragam kerapatan vili usus halus broiler umur tujuh hari	227
14. Hasil sidik ragam kerapatan vili usus halus broiler umur 14 hari	230
15. Hasil sidik ragam kerapatan vili usus halus broiler umur 35 hari	233



16. Hasil sidik ragam status hematologi broiler umur 35 hari	236
17. Hasil sidik ragam persentase organ limfoid broiler umur 35 hari	242
18. Hasil sidik ragam daya cerna protein kasar dan serat kasar broiler yang diberikan probiotik dan antibiotik	245
19. Hasil Sidik Ragam konsumsi ransum broiler yang diberikan probiotik dan antibiotik	247
20. Hasil sidik ragam Pertambahan Bobot Badan (PBB) broiler yang diberikan probiotik dan antibiotik	250
21. Hasil sidik ragam konversi ransum broiler yang diberikan probiotik dan antibiotik	253
22. Hasil sidik ragam konsumsi protein broiler yang diberikan probiotik dan antibiotik	256
23. Hasil sidik ragam rasio energi dan protein ransum yang dikonsumsi broiler selama 35 hari	259
24. Hasil sidik ragam persentase lemak abdominal dan persentase bobot karkas broiler yang diberikan antibiotik dan probiotik	260



DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/ Singkatan	Arti dan Keterangan
>	Lebih besar dari
%	Perseratus
^o C	Derajat celcius
β	Beta
BAL	Bakteri Asam Laktat
sp.	Spesies
spp.	Subspesies
et al.	Et alii
dkk	dan kawan-kawan
b/v	Berat per volume
Kkal	Kilokalori
ppm	Part per million, bagian perjuta
kg	Kilogram
g	Gram
mg	Milligram
mL	Milliliter
	Microliter
	Millimeter



cm	Centimeter
UV	Ultra violet
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
O ₂	Oksigen
NaCl	Natrium klorida
HCl	Asam klorida
KOH	Kalium hidroksi
CaCO ₃	Kalsium Karbonat
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic
BNF	Buffer Normal Formalin
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Deoxyribosa Nucleat Acid
mRNA	Reserve Ribosa Nucleat Acid
pH	Potensial Hydrogen
NA	Nutrien Agar
MRSA	deMan Ragosa Sharpe Agar
MRSB	deMan Ragosa Sharpe Broth
MR	Methyl Red
SIM	Sulfide Indol Motility
AGP	Antibiotic Growth Promotant
CFU	Colony Forming Unit
DOC	Day Old Chicken
	Pertambahan Bobot Badan
	Feed Conversi Ratio (Konversi Ransum)





Optimization Software:
www.balesio.com

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Industri peternakan broiler terus mengalami perkembangan hingga saat ini. Broiler merupakan jenis ternak unggas yang tujuan utama pemeliharaannya untuk produksi daging. Broiler menunjukkan kemajuan yang pesat dalam seleksi genetik terutama pada aspek pertumbuhan. Saat ini telah dihasilkan strain broiler yang memiliki waktu pemeliharaan yang relatif lebih pendek dari sebelumnya dengan bobot badan akhir yang sama. Hal tersebut menjadi salah satu alasan ternak ini memiliki peran yang strategis dalam penyediaan sumber protein hewani bagi masyarakat.

Usus halus merupakan tempat utama absorpsi zat-zat makanan dalam sistem pencernaan broiler. Kondisi usus halus yang baik sangat penting dalam memaksimalkan absorpsi zat-zat makanan dalam ransum yang dikonsumsi, sehingga potensi genetik ternak tersebut dapat tercapai. Kehadiran patogen, seperti *Salmonella* spp., *Escherchia coli*, *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., dan *Streptococcus* dapat menyebabkan fungsi usus halus terganggu. Apabila mikroba-mikroba tersebut dominan, maka toksin yang dihasilkan dapat menurunkan fungsi vili usus halus dalam absorpsi zat-zat makanan. Disisi lain patogen tersebut akan berkompetisi dengan tubuh ternak dalam memanfaatkan zat-zat makanan dalam sistem pencernaan. Salah satu upaya untuk membatasi pertumbuhan



dan perkembangan mikroba patogen tersebut, yaitu pemberian antibiotika. Akan tetapi penggunaan antibiotika pada unggas telah menyebabkan munculnya patogen yang resistensi terhadap antibiotika dan adanya residu dalam produk yang dihasilkan. Kedua hal tersebut telah menimbulkan kecemasan karena berpotensi menimbulkan resiko gangguan kesehatan pada konsumen.

Perkembangan persyaratan keamanan pangan menjadi salah satu alasan penggunaan *Antibiotic Growth Promotant* (AGP) dibatasi pada unggas. Pada tahun 1999 Uni Eropa telah menghentikan penggunaan beberapa jenis AGP pada unggas. Respon pemerintah Indonesia terhadap hal tersebut ditanggapi dengan pengeluan pelarangan penggunaan antibiotika sebagai pemacu pertumbuhan yang berlaku efektif 1 Januari 2018 yang tertuang dalam pasal 16 Permentan No. 14/2017 tentang klasifikasi obat hewan.

Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan sebagai alternatif pengganti antibiotika pada broiler, yaitu pemanfaatan mikroba yang bersifat menguntungkan dalam sistem pencernaan yang berfungsi sebagai probiotik. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa probiotik dapat berfungsi sebagai antimikroba, memperbaiki perkembangan vili usus halus, memperbaiki kondisi hematologis, memaksimalkan performa broiler dan sebagai imunomodulator dalam tubuh ternak. Oleh karena itu

asarkan hal tersebut, maka probiotik memiliki potensi untuk
akan sebagai imbuhan pakan alternatif pada broiler.



Pada prinsipnya pemanfaatan mikroba probiotik, yaitu menciptakan keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan. Ekosistem mikroflora dalam saluran pencernaan sangatlah kompleks dan interaksi yang terjadi antara mikroba akan mempengaruhi stabilitas ekosistem dan kesehatan ternak. Apabila mikroflora dalam usus tidak dalam keadaan seimbang, maka perlindungan secara biologi untuk melawan patogen tidak akan efektif. Oleh karena itu, kehadiran mikroba probiotik yang diberikan melalui pakan atau air minum diharapkan dapat memberikan dampak positif terhadap interaksi mikroflora dalam sistem pencernaan yang pada akhirnya akan memperbaiki produktifitas broiler.

Kelompok mikroba yang banyak digunakan sebagai kandidat probiotik, yaitu kelompok bakteri asam laktat (BAL). Kelompok bakteri ini dilaporkan bersifat menguntungkan pada inangnya (manusia dan ternak) karena dapat memperbaiki kondisi saluran pencernaan. BAL merupakan golongan mikroorganisme yang bermanfaat karena tidak memiliki sifat toksik bagi inang, sehingga BAL disebut juga sebagai mikroorganisme *generally recognize as safe* (GRAS), artinya mikroorganisme yang tidak beresiko bagi kesehatan. Disamping itu, BAL memiliki karakteristik tersendiri sebagai probiotik, karena adanya kemampuan untuk menghasilkan bakteriosin, hidrogen peroksida dan asam organik seperti asam laktat dalam jumlah tinggi yang dapat menurunkan pH kandungannya dan juga sekaligus menekan pertumbuhan patogen.



Setelah broiler menetas, maka kelompok BAL mulai berkembang dalam saluran pencernaan. Mikroba tersebut merupakan mikroflora normal sistem pencernaan broiler. Salah satu persyaratan mikroba untuk dijadikan sebagai probiotik pada ternak, yaitu mikroba tersebut berasal dari saluran pencernaan ternak itu sendiri. Berdasarkan hal tersebut, maka pada penelitian ini usus halus broiler umur tiga hari akan digunakan sebagai sumber isolat untuk mendapatkan BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada broiler.

B. Rumusan masalah

Antibiotika mulai digunakan dalam tahun 1940-an pada dosis subterapeutik (*subtherapeutic*) untuk meningkatkan pertumbuhan, memperbaiki efisiensi ransum, dan mengurangi terjadinya insiden penyakit pada ternak. Namun, penggunaan antibiotika yang tidak terkontrol telah memunculkan kecemasan konsumen terhadap keamanan pangan (daging dan telur). Beberapa laporan penelitian menunjukkan, bahwa penggunaan antibiotika telah menyebabkan munculnya patogen yang resistensi terhadap antibiotika dan adanya residu pada produk ternak.

Sejak negara-negara maju mulai membatasi penggunaan antibiotika sehubungan perkembangan persyaratan keamanan pangan, maka negara-negara berkembang juga telah mulai mengembangkan sebagai penelitian untuk mendapatkan imbuhan pakan (*feed additive*) alternatif yang relatif lebih aman. Di Indonesia berbagai hasil penelitian



telah dilaporkan penggunaan bahan-bahan lain sebagai imbuhan pakan untuk mengurangi penggunaan antibiotika, seperti tanaman obat (herbal), asam-asam organik, prebiotik dan probiotik.

Pemilihan mikroba-mikroba isolat lokal yang bersifat probiotik telah banyak diisolasi, namun masih sedikit penelitian yang melaporkan pemanfaatan isolat BAL sebagai kandidat probiotik yang berasal dari saluran pencernaan broiler khususnya umur tiga hari untuk diaplikasikan kembali kepada ternak tersebut.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan sebelumnya, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut, yaitu:

1. Bagaimana karakteristik isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari?
2. Bagaimana potensi isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik?
3. Berapa level optimum isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari dapat memperbaiki perkembangan histologi vili usus halus, nilai hematologis, dan bobot relatif organ limfoid?
4. Bagaimana pengaruh isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari dapat memperbaiki daya cerna, performa dan mortalitas broiler?
5. Apakah Isolat BAL yang diisolasi dari saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik dapat mengurangi penggunaan antibiotika pada broiler?



C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian, yaitu:

1. Mengisolasi dan mengetahui karakteristik isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari .
2. Mengetahui kemampuan tumbuh isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik pada berbagai uji probiotik.
3. Mendapatkan level optimum isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik dalam memperbaiki histologi vili usus halus, nilai hematologis dan bobot relatif organ limfoid.
4. Mengkaji pengaruh isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik terhadap daya cerna, performa dan mortalitas broiler.
5. Mengetahui kemampuan isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik untuk mengurangi penggunaan antibiotika pada broiler.

D. Kegunaan Penelitian

1. Mendapatkan isolat BAL dari saluran pencernaan broiler sebagai sumber kultur untuk pembuatan dan pengembangan probiotik pada unggas.



2. Mendapatkan metode yang tepat dalam pemanfaatan isolat BAL sebagai pengganti antibiotika.
3. Sebagai bahan informasi tentang potensi isolat bakteri lokal yang berasal dari saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik untuk mengurangi penggunaan antibiotika pada broiler.
4. Sebagai sumber informasi bagi industri peternakan dalam memanfaatkan usus halus broiler umur tiga hari sebagai sumber isolat mikroba probiotik.

E. Ruang Lingkup

Penelitian ini akan dibagi dalam tiga tahap.

1. Penelitian tahap pertama mencakup isolasi dan karakteristik BAL yang diperoleh dan potensinya sebagai kandidat probiotik. Pengujian yang dilakukan, yaitu uji biokimia (uji *Methyl Red*), uji motilitas, uji katalase, uji tipe fermentasi). Untuk pengujian kandidat probiotik dilakukan uji ketahanan terhadap pH asam (pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, dan pH 6). uji ketahanan garam empedu 0,3%, uji pertumbuhan suhu optimum (30⁰C, 37⁰C, dan 41⁰C), dan uji aktivitas antimikroba.
2. Penelitian tahap kedua mencari level terbaik isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik terhadap perkembangan vili usus halus (duodenum,



jejunum, dan ileum) yang meliputi tinggi vili, lebar vili dan kerapatan vili. Pada kondisi hematologis yang diukur, yaitu hemoglobin, hematokrit, eritrosit, leukosit, dan indeks eritrosit. Pada organ limfoid yang diukur dan diamati, yaitu bursa fabrisius, timus dan limfa.

3. Penelitian tahap ketiga mencakup aplikasi level terbaik (optimum) isolat BAL yang diperoleh pada penelitian tahap kedua, batasan penelitian pada daya cerna, konsumsi ransum, penambahan bobot badan, konversi ransum, persentase lemak abdominal, persentase karkas dan mortalitas.

F. Definisi dan Istilah

1. Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang dapat menghasilkan asam laktat dengan cara fermentasi.
2. Imbuhan pakan (*feed additive*) merupakan suatu bahan yang ditambahkan ke dalam ransum dalam jumlah yang kecil, tetapi bukan bahan yang terdapat dalam ransum, tujuannya untuk memperbaiki kualitas produksi ternak .
3. Antibiotika adalah produk metabolik yang dihasilkan suatu organisme tertentu, yang dalam jumlah sangat kecil bersifat merusak atau menghambat mikroorganisme lain.



4. Probiotik adalah sedian kultur organisme hidup dalam bentuk bubuk atau cair atau komponen dari sel mikroorganisme yang dapat memberikan manfaat pada ternak atau inangnya
5. Konsumsi ransum merupakan jumlah ransum yang dikonsumsi dalam jangka waktu tertentu untuk memenuhi energi dan zat nutrisi yang lain.
6. Pertambahan bobot badan merupakan salah satu ukuran yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan melalui pengukuran kenaikan bobot badan dengan cara melakukan penimbangan dalam jangka waktu hari, minggu, atau setiap bulan.
7. Konversi ransum merupakan perbandingan antara jumlah ransum yang dikonsumsi dengan pertambahan bobot badan dalam waktu tertentu.
8. Lemak abdominal adalah lemak yang berada di sekitar perut dan abdomen.
9. Karkas adalah bagian tubuh ayam yang telah dikeluarkan organ bagian dalam (hati, rempela tembolok, dan usus), kaki, dan kepala.
10. Vili adalah bagian permukaan dinding usus halus yang berbentuk tonjolan halus, berfungsi untuk memperoleh daerah absorpsi yang luas.



11. Hemoglobin merupakan zat warna (pigmen) darah yang berupa ikatan kompleks protein terkonjugasi, dibentuk oleh pigmen (heme) dan protein (globin) sederhana.
12. Hematokrit adalah persentase (berdasarkan volume) dari darah, yang terdiri dari sel-sel darah merah.
13. Eritrosit adalah sel-sel darah merah yang merupakan bagian utama sel-sel darah.
14. Leukosit adalah sel darah putih yang mempunyai inti dan dapat bergerak secara aktif di dalam tubuh.
15. Limposit adalah bagian dari sel darah putih yang berperan untuk kekebalan atau pertahanan tubuh dan tidak bergerak.
16. Bursa fabrisius adalah organ limfoid primer yang berfungsi sebagai tempat pematangan dan deferensiasi bagi sel dari sistem pembentukan antibodi.
17. Timus adalah organ limfoid primer yang memproses limfosit sejenis sel darah putih yang melawan infeksi dalam tubuh
18. Limpa adalah termasuk organ limfoid yang berfungsi dalam sistem peredaran darah dan sistem kekebalan tubuh.
19. Daya cerna merupakan persentase dari ransum yang masuk ke dalam saluran pencernaan dan diabsorpsi oleh tubuh.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Saluran Pencernaan Ternak Unggas

Secara anatomi saluran pencernaan unggas dapat dibagi dalam beberapa subbagian, yaitu paruh, esopagus, tembolok, proventrikulus, ventrikulus, usus halus, usus besar, dan sekum. Usus halus merupakan bagian yang paling penting dalam pencernaan komponen-komponen makanan dan absorpsi zat-zat makanan (*nutrient*). Sedangkan usus besar dan sekum merupakan tempat yang banyak terjadi kolonisasi mikroba (Koutsos and Arias, 2006).

Sistem pencernaan berhubungan langsung dengan lingkungan luar, sehingga tempat ini merupakan tempat masuknya organisme patogen secara potensial. Saluran pencernaan (*gastrointestinal*) merupakan suatu ekosistem yang mengandung berbagai jenis mikrobiota yang mempunyai peran dalam pencernaan ransum, sistem pertahanan dan pertumbuhan epitel usus (Winarsih, 2005).

Ransum yang dikonsumsi unggas akan disimpan untuk sementara waktu pada tembolok yang merupakan bagian esopagus yang mengalami pelebaran. Ransum yang terdapat pada tembolok akan dilunakkan (Ely dan Bade, 1998). Sebagian dari ransum tersebut mengalami fermentasi menjadi asam laktat, hal tersebut menyebabkan pH tembolok menjadi asam. Mikroba yang berperan dalam proses fermentasi dalam



tembolok diantaranya *Lactobacillus salivarius*. Pada dasarnya setiap bagian saluran pencernaan unggas memiliki karakteristik tingkat keasamaan (pH) yang berbeda, yaitu tembolok (4.5), proventrikulus (4.4), ventrikulus (2.6), duodenum (5.7- 6.0), jejunum (5,8), ileum (6.3), kolon (6.3) dan sekum (5.7) (Sun, 2004).

Gerakan peristaltik pada saluran pencernaan secara tidak langsung akan membantu ransum yang dikonsumsi bergerak ke bagian pertengahan saluran pencernaan. Gerakan ini juga membantu mencegah perlekatan beberapa mikroba pada bagian sel-sel epitel saluran pencernaan. Mikroba yang tidak mampu melekat akan dikeluarkan dari usus oleh cairan musin (Sun 2004). Diantara mikroba bakteri Gram negatif yang dapat melekat dan tumbuh pada sel-sel epitel tembolok, lamina propria, dan permukaan vili usus, yaitu *Eschericia coli* (Edelman *et al.*, 2003).

B. Usus Halus

Usus halus merupakan organ utama dalam proses pencernaan dan absorpsi pada saluran pencernaan unggas. Usus halus terdiri atas tiga bagian, yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Berbagai jenis enzim yang terlibat dalam mempercepat dan meningkatkan efisiensi pemecahan zat-zat makanan, seperti karbohidrat, protein dan lemak sehingga lebih

ah untuk diabsorpsi (Suprijatna dkk., 2005). Terdapat tiga golongan enzim yang disekresikan di saluran pencernaan, yaitu karbohidrase, amilase, dan lipase. Enzim pencernaan yang disekresikan pankreas,



yaitu amilase, lipase, tripsin, khimotripsin, elastase, dan karbosipeptidase (Anggorodi, 1995). Cairan pankreas yang memasuki duodenum melalui kelenjar pankreas mengandung tiga macam enzim yang mempengaruhi pencernaan lemak. Enzim-enzim tersebut, yaitu lipase, fosfolipase dan kolesterol esterase (Piliang dan Al Haj, 2006). Sedangkan enzim yang dihasilkan dalam usus halus untuk membantu proses pencernaan, yaitu enterokinase, lipase dan peptidase (Denbow, 2000).

Secara histologi usus halus terdiri atas lapisan fungsional, yaitu mukosa (*lamina epithelia*, *lamina propria* dan *muscularis mucosae*), submukosa, muskularis (*tunica muscularis*) dan serosa (*tunica serosa*). Submukosa merupakan jaringan kolagen longgar yang mengandung pembuluh darah, pembuluh limfa dan saraf. Tunika muskularis terdiri dari otot polos yang menyebar sebagai lapisan sirkular dan longitudinal. Serosa atau tunika adventesia merupakan lapisan terluar terdiri dari jaringan ikat longgar, mengandung pembuluh darah dan saraf (Denbow, 2000 dan Sturkie, 2000).

Bentuk mukosa usus halus tersusun ke dalam tonjolan berbentuk jari yang disebut vili, memiliki fungsi untuk memperluas daerah permukaan. Vili merupakan ciri khas bagi usus halus. Pada bagian permukaan epitel vili terdapat mikrovili yang merupakan penjuruan sitoplasma yang penting dalam meningkatkan efisiensi penyerapan zat

nutrisi. Mukosa usus halus memiliki karakteristik tersendiri dengan adanya kriptas Lieberkuhn. Pada lapisan epitel terdapat sel goblet



penghasil mukus. Daerah usus halus penting dalam proses transfer zat makanan dari bagian lumen ke dalam pembuluh darah dan limfa (Denbow, 2000 dan Sturkie, 2000).

Fungsi usus halus sebagai tempat pencernaan dan absorpsi zat-zat makanan dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya luas permukaan epitel usus, jumlah lipatan-lipatannya, jumlah vili dan makrovili, tinggi dan luas permukaan vili luas serta penampang usus halus (Yao *et al.*, 2006; Sugito dkk., 2007). Luas penampang usus halus dipengaruhi oleh panjang dan lebar vili, penambahan bobot dan panjang usus halus, penambahan besar rongga usus halus, dan penambahan luas permukaan usus halus (Yao *et al.*, 2006).

Duodenum merupakan bagian usus halus pertama yang berfungsi untuk pemecahan zat-zat makanan menjadi bentuk yang siap untuk diabsorpsi, seperti air, natrium, zat besi dan folat (Dellmann dan Brown 1992; Ganong, 2008). Di dalam duodenum ransum akan dicampurkan dengan garam empedu dan enzim pankreas. Jumlah vili pada daerah duodenum lebih banyak dan memiliki lipatan mukosa yang melingkar (Banks, 1993). Pada duodenum terdapat kelenjar Lieberkuhn yang disusun oleh sel epitel silindris sebaris. Kelenjar Lieberkuhn menghasilkan mukus dan beberapa enzim untuk metabolisme peptida, lemak, dan karbohidrat (Dellmann dan Brown 1992).

Bagian jejunum dan ileum memiliki peran yang penting dalam proses absorpsi zat makanan, seperti asam amino, vitamin dan



monosakarida ke dalam sirkulasi darah (Denbow, 2000). Bagian Jejunum merupakan tempat absorpsi mikronutrient paling banyak, sekaligus sebagai tempat penyerapan obat.

Daerah ileum usus halus mirip dengan jejunum. Vili pada ileum membentuk kelompok. Daerah ileum tidak memiliki lipatan-lipatan mukosa (Banks, 1993). Motalitas makanan yang melewati ileum lebih lambat daripada jejunum. Hal itu memungkinkan kesempatan makanan untuk kontak lebih lama dengan mukosa sehingga absorpsi nutrisi lebih banyak (Aziza, 2010). Fungsi vili usus halus akan meningkat dengan bertambahnya ukuran tinggi vili jejunum dan ileum (Ruttanavut and Yamauchi, 2010). Secara keseluruhan bobot relatif usus (g/100 g bobot badan) pada broiler strain *Hubbard* jantan umur 42 hari yaitu duodenum 0.57%, jejunum 0.94%, dan ileum 0.89%. Selanjutnya panjang usus (cm/100 g bobot badan), yaitu duodenum (1.81 cm), jejunum (3.79 cm), dan ileum (4.03 cm) (Incharoen *et al.*, 2013).

Perubahan volume vili usus halus telah diteliti Uni *et al.*, (1998). Pada penelitian tersebut broiler dipuasakan selama 36 jam setelah menetas. Pengamatan perubahan volume vili diukur setelah menetas sampai hari ke-14. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah menetas sampai hari ke-2, volume vili pada semua bagi usus halus tidak mengalami perkembangan yang berarti. Pertumbuhan volume vili duodenum mencapai puncaknya pada hari ke-7, sedangkan volume vili jejunum dan ileum terus berlanjut hingga hari ke-14. Sedangkan



perubahan kedalaman *crypt* pada semua bagian usus halus mengalami peningkatan dua sampai tiga kali lipat seiring bertambahnya umur. Kedalaman *crypt* tertinggi pada duodenum kemudian jejunum dan ileum.

Jumlah sel enterosit per area pada semua bagian usus halus berkisar antara 200.000 sampai 280.000 dan hanya sedikit mengalami perubahan dengan bertambahnya umur broiler. Demikian juga kepadatan mikrovili sedikit mengalami peningkatan seiring bertambahnya umur broiler. Kandungan DNA di duodenum, jejunum, dan ileum berkisar 14-25 mili gram jaringan. Perubahan kandungan DNA pada semua bagian usus halus tidak memberikan pola yang jelas seiring bertambahnya umur. Konsentrasi RNA per gram jaringan pada semua bagian usus halus mengalami penurunan seiring bertambahnya umur broiler. Namun konsentrasi RNA pada jejunum secara signifikan lebih tinggi (Uni *et al.*, 1998).

Setiap bagian dari usus halus memiliki karakteristik sendiri terhadap jenis mikronutrien yang diabsorpsi. Proses pencernaan utama berlangsung pada bagian duodenum. Hati menyalurkan empedu masuk ke dalam duodenum, sedangkan pankreas menyalurkan enzim yang digunakan bersama-sama dengan enzim yang dihasilkan usus halus untuk proses pencernaan (Denbow, 2000). Aktivitas disakaridase terendah di duodenum dan tertinggi di jejunum dan ileum (Nunez *et al.*, 2000). Pada hari ke-2 setelah menetas aktivitas disakaridase dua sampai



empat kali lipat kemudian stabil pada tingkat yang lebih rendah pada usus halus bagian distal (Uni *et al.*, 1998).

C. Efek Imbuhan Pakan terhadap Histologi Usus Halus

Berbagai upaya yang telah dilakukan para ilmuwan untuk meningkatkan fungsi usus halus dalam proses absorpsi zat-zat makanan diantaranya penggunaan asam organik. Laporan Atapattu and Nelligaswatta, (2005) dan Abdel-Fattah *et al.*, (2008), menunjukkan, bahwa asam organik yang diberikan pada air minum atau ransum dapat meningkatkan fungsi absorpsi dan enzim pencernaan usus halus. Meningkatnya fungsi usus halus dalam proses absorpsi menurut Deghani and Jahanian (2012), sehubungan dengan membaiknya kondisi vili (lebih tinggi). Hal tersebut menyebabkan luas area absorpsi lebih besar (Awad *et al.*, 2008). Gambaran pertumbuhan saluran pencernaan dapat diamati secara morfologi atau histologi usus seperti tinggi vili, ketebalan dan volume mukosa, kedalaman celah Lieberkuhn (Klurfeld, 1999).

Suplementasi zeolit alami dan modifikasi dalam ransum broiler dapat meningkatkan rasio tinggi vili dengan kedalaman *crypt* dan aktivitas enzim pencernaan. Vili dan mikrovili pada mukosa usus dapat mempengaruhi sekresi enzim pencernaan. Oleh karena itu pemberian zeolit alami dan modifikasi dapat memberikan efek yang menguntungkan morfologi mukosa usus halus yang ditandai dengan tingginya aktivitas enzimatik pencernaan (Wu *et al.*, 2013).



Penggunaan probiotik *Enterococcus faecium* dalam ransum broiler terbukti dapat meningkatkan tinggi vili jejunum (Chichlowski *et al.*, 2007) dan tinggi vili ileum (Samli *et al.*, 2007). Penggunaan probiotik dalam strain tunggal maupun campuran juga memberikan pengaruh yang berbeda secara signifikan ($P < 0.05$) dibandingkan tanpa probiotik terhadap morfologi usus pada tinggi vili dan lebar vili pada duodenum dan jejunum. Namun pada dasarnya menurut Holl dalam tahun 2008, bahwa setiap strain mikroba yang digunakan sebagai probiotik memberikan efek yang spesifik. Bahkan strain-strain yang masih berasal dari sesama species bakteri memiliki efek fisiologis yang berbeda (Harimurti dan Rahayu, 2009).

Peningkatan tinggi vili dan lebar vili dipastikan akibat meningginya asam lemak rantai pendek yang diproduksi oleh probiotik. Asam lemak rantai pendek ini berperan dalam stimulasi perbanyakan sel epitel usus, karena asam lemak rantai pendek merupakan komponen fosfolipid membran epitel (Samanya and Yamauchi, 2002; Ichikawa *et al.*, 1999; Gunal *et al.*, 2006 dan Ahmad 2006).

Selain probiotik, antibiotika juga terbukti dapat memperbaiki penampilan vili-vili usus (Park, 2008). Peningkatan tinggi vili dan lebar vili diasosiasikan dengan lebih luasnya permukaan vili untuk absorpsi nutrisi masuk ke dalam aliran darah (Miles *et al.*, 2006). Hasil penelitian pada

er dengan membandingkan pemberian kombinasi antibiotika Tylogen (tylosin-gentamicin) secara injeksi pada dosis yang bertingkat mulai



dari 0.1 mL/ekor, 0.2 mL/ekor dan 0.3 mL/ekor dengan tanpa antibiotik (*placebo*) menunjukkan, ketebalan struktur duodenum semakin bertambah dengan meningkatnya dosis antibiotika yang digunakan. Sehingga jika dilihat dari struktur histologisnya berkembang dengan baik dibandingkan dengan tanpa antibiotika dalam kondisi lingkungan yang sama (Raditya dkk., 2013).

Kondisi vili yang panjang menyebabkan produksi enzim pencernaan lebih banyak, sehingga absorpsi akan lebih efektif dan memperbaiki sistem transport nutrien (Awad *et al.*, 2009). Rahimi *et al.*, (2010) dan Smirnov *et al.*, (2005) menemukan, bahwa penambahan probiotik BAL menyebabkan ukuran dan kepadatan sel-sel goblet cenderung bertambah dibandingkan kontrol.

D. Mikroflora Saluran Pencernaan

Populasi mikrobiota di dalam saluran pencernaan unggas sekitar 10^7 - 10^{11} sel/g digesta. Dengan menggunakan *culture-independent flow cytometric method*, kepadatan bakteri di ileum dan sekum padai ayam broiler umur satu hari dapat diketahui, yaitu sekitar 10^8 - 10^{10} sel/g digesta (Apajalahti *et al.*, 2004). Populasi mikroba setelah tiga hari menetas mengalami perubahan, yaitu pada sekum mencapai 10^9 sel/g digesta dan ileum 10^{11} sel/g digesta. Jumlah mikroba tersebut relatif tetap stabil untuk hari berikutnya (Lu *et al.*, 2003).



Mikroba di dalam usus dapat dibagi menjadi dua, yaitu menguntungkan (*commensal*) dan merugikan (*harmful*). Bakteri yang merugikan dapat menyebabkan infeksi, pembusukan pada usus, dan menghasilkan toksin. Sedangkan bakteri yang menguntungkan dapat menghasilkan vitamin. Bakteri yang menempati saluran usus dan bila dianalogikan sebagai tumbuhan dikenal sebagai mikroflora usus (Nakazawa and Hosono, 1992).

Populasi mikroba di dalam saluran pencernaan khususnya pada bagian sekum broiler cukup beragam. Genus *Lactobacillus* telah banyak ditemukan mulai pada hari ke-3 dan ke-14 dibandingkan hari ke-7, hari ke-21 sampai hari ke-49. Demikian juga populasi BAL pada ileum broiler sudah mulai berkembang dari hari ke-3 hingga hari ke-21 terutama spesies *Lactobacillus achidophilus*, sedangkan pada hari ke-21 sampai hari ke-49, yaitu *Lactobacillus crispatus* (Lu *et al.*, 2003).

Terdapat sekitar 100-400 jenis bakteri atau flora di dalam usus. Bakteri yang digolongkan sebagai bakteri non-patogen diantaranya *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, dan *Lactobacillus*, sedangkan bakteri patogen, seperti *Clostridium*, *Shigella*, dan *Vellonella*. Populasi bakteri non-patogen dan patogen hidup dalam keseimbangan, jika hal tersebut berubah, maka bakteri patogen dapat meningkat, konsekuensinya kondisi kesehatan akan terganggu. Keseimbangan flora usus dapat terganggu adanya antibiotika, infeksi bakteri dan virus, kemoterapi, radiasi, pola makan, stres dan iklim (Gsianturi, 2002). Patogen yang sering



menyebabkan gangguan di dalam saluran pencernaan khususnya pada usus halus, yaitu *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC). EPEC yang terdapat dalam saluran pencernaan, dapat merusak mukosa saluran pencernaan secara potensial (Savkovic, 2005).

Manajemen mikroflora usus dapat dilakukan dengan peningkatan proporsi bakteri non patogen dan menekan jumlah bakteri patogen. Cara untuk mendapat proporsi bakteri non patogen yang tinggi adalah dengan mengkonsumsi bakteri probiotik dan menyediakan nutrisi yang sesuai untuk bakteri probiotik, agar di dalam usus bakteri tersebut berkembang dengan pesat. Kelompok oligosakarida, inulin serta beberapa jenis peptida dari protein dapat mencapai usus, sehingga bakteri non patogen tersebut akan mendominasi populasi (Hariabriansah, 2004).

Senyawa musin (*mucin*) di dalam saluran pencernaan dapat berperan sebagai sumber nutrisi bagi bakteri anaerob. Oleh karena itu berkurangnya sekresi senyawa musin dalam usus halus sejalan dengan berkurangnya pertumbuhan bakteri anaerob. Pada kondisi tersebut akan memberikan keuntungan untuk pertumbuhan bakteri jenis *coliform* (Lan *et al.*, 2004). Pada Tabel 1 disajikan komposisi bakteri pada bagian ileum broiler.



Tabel 1. Komposisi bakteri dalam ileum broiler

No.	Jenis Mikroba	Jumlah (%)
1.	<i>Lactobacillus</i>	70
2.	<i>Clostridiaceae</i>	11
3.	<i>Streptococcus</i>	6.5
4.	<i>Enterococcus</i>	6.5

Sumber: Lut *et al.*, (2003).

E. Antibiotika

Istilah antibiotika diberikan pada produk metabolik yang dihasilkan suatu organisme tertentu, yang dalam jumlah sangat kecil bersifat merusak atau menghambat mikroorganisme lain. Setiap antibiotika memiliki efektivitas sangat beragam terhadap berbagai jenis bakteri. Terdapat antibiotika yang mempunyai sasaran terhadap bakteri Gram negatif dan atau Gram positif. Keefektifan suatu antibiotika sangat tergantung pada lokasi infeksi dan kemampuan antibiotika mencapai lokasi tersebut (Pelczar dan Chan, 2008).

Pengaruh antibiotika pada ransum ternak bersifat sekunder. Antibiotika digunakan secara luas dalam ransum unggas dan babi untuk mempertinggi laju dan efisiensi pertumbuhan bobot badan ternak tersebut (Anggorodi, 1995). Umumnya penggunaan antibiotika yang berfungsi sebagai perangsang pertumbuhan yang ditambahkan ke dalam ransum ternak, yaitu sekitar 5-50 ppm (Jeffrey, 1999). Selanjutnya Engberg



et al., (2000) melaporkan bahwa penggunaan antibiotika *zinc bacitracin* pada dosis 50-150 mg/kg ransum dapat meningkatkan pertambahan bobot hidup dan konversi ransum.

Antibiotika yang digunakan pada ternak unggas memiliki fungsi untuk pengobatan, pencegahan penyakit dan perangsang pertumbuhan (*growth promoter*) untuk memperbaiki performanya. Diawal tahun 1900 antibiotika menjadi perintis (*pioneers*) pertama yang dilaporkan sebagai substansi kimia yang dapat mengobati penyakit sipilis pada manusia, infeksi *Streptococci* dan *Staphylococci* pada tikus dan kelinci (Jones and Ricket, 2003).

Dalam tahun 1946 dilaporkan hasil penelitian pertama tentang pengaruh positif antibiotika *sulfasuxidine* dan *streptothricin* terhadap pertumbuhan unggas (Sun, 2004). Pada mulanya antibiotika dipercaya mempunyai hubungan dengan vitamin B₁₂ (Jones and Ricket, 2003). Beberapa antibiotika yang ditambahkan ke dalam ransum ternak yang berfungsi sebagai perangsang pertumbuhan, yaitu *bacitracin*, *chlortetracycline*, *erythromycin*, *lincomycin*, *novobiocin*, *oxytetracycline*, dan *penicilin*. Antibiotika-antibiotika tersebut secara tidak langsung dapat meningkatkan pertambahan bobot badan, memperbaiki konversi ransum, menurunkan mortalitas, dan mengurangi patogen yang ada di dalam usus sehingga nutrisi lebih tersedia untuk ayam (Sun, 2004).

Penggunaan antibiotika dalam kadar yang tinggi, yaitu 200 g/ton ransum dalam waktu yang pendek pada ayam yang



menderita infeksi seperti penyakit alat pernapasan, dapat mempercepat penyembuhan, pemulihan ayam dalam pertumbuhan dan produksi telurnya (Anggorodi, 1995). Salah satu antibiotika yang sering ditambahkan ke dalam ransum ternak, yaitu *zinc bacitracin*. Antibiotika ini merupakan campuran polipeptida yang mempunyai berat molekul 1422.69 g/mol. Pertama kali dijelaskan di tahun 1945 sebagai enzim yang dihasilkan oleh *Bacillus* spp. yang sekarang dikenal sebagai *Bacillus licheniformis* (Phillips, 1999).

Antibiotika dapat dikelompokkan berdasarkan cara kerjanya dalam menghambat/menghentikan metabolisme bakteri, yaitu (McDonald *et al.*, 2002):

1. Mengganggu atau ikut dalam sintesis materi pada dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan sel pecah/meledak (*burst*). Targetnya, yaitu bakteri Gram positif. Kelompok antibiotika ini memiliki berat molekul di atas 1200.
2. Menghambat sintesis protein pada bakteri Gram positif, kelompok antibiotika ini memiliki berat molekul di atas 500 (tipe sedang).
3. Menghambat sintesis DNA bakteri dan mempunyai spektrum yang luas. Kelompok antibiotika ini memiliki berat molekul kira-kira 250.
4. Terlibat dalam mengganggu keseimbangan elektrolit (Na/K) sel bakteri. Antibiotika ini bekerja pada transport potasium ke



dalam sel, sehingga sel menghasilkan energi untuk mengeluarkan (memompa) ion yang terdapat di dalam sel. Pada saat jumlah yang potasium masuk ke dalam semakin banyak, sehingga terjadi akumulasi. Maka kondisi ini menyebabkan air masuk ke dalam sel secara osmosis, hal tersebut menyebabkan sel dapat menjadi pecah. Antibiotika jenis ini termasuk kelompok *ionophore*.

F. Resistensi dan Residu Antibiotika

Mengonsumsi produk ternak yang mengandung antimikroba (antibiotika) dapat memberikan resiko bagi kesehatan. Keberadaan residu antibiotika dalam pangan asal hewan dapat mengakibatkan efek yang buruk bagi manusia, diantaranya alergi keracunan, karsinogen, dan resistensi mikroorganisme terhadap antibiotika tertentu. Adanya potensi efek residu yang membahayakan kesehatan manusia, maka perlu ada ketentuan nilai Batas Maksimum Residu (BMR) dalam produk ternak untuk masing-masing antibiotika berdasarkan Standar Nasional Indonesia (BSN 2001).

Munculnya kecemasan terhadap penggunaan antibiotika menjadi salah satu alasan beberapa jenis antibiotika telah dilarang penggunaannya dalam ransum ternak (Barton, 2000). Pada tahun 1999

Erropa (EU) telah melarang empat antibiotika yang berfungsi sebagai pangsang pertumbuhan (*growth promotant antibiotic*) seperti *tylosin*, *virginiamycin*, *zinc bacitracin*, dan *virginiamycin* (Huyghebaert, 2005).



Penggunaan antibiotik secara terus menerus dalam dosis yang rendah pada ternak dapat menyebabkan mikroba tersebut menjadi resistensi. Proses terjadinya mikroba resistensi dapat melalui mutasi gen, penghambatan aktivitas antibiotik secara enzimatik, perubahan protein yang merupakan target antibiotika, perubahan jalur metabolik, efluks antibiotik, dan perubahan permeabilitas membran (Naim, 2008). Akibat yang muncul pada mikroba yang resistensi terhadap antibiotika, yaitu menjadi lebih efisien untuk bertahan hidup dibandingkan dengan mikroba yang normal (Sun, 2004). Disamping itu penggunaan antibiotika juga mempunyai dampak terhadap mikroorganisme usus yang menguntungkan (Karaoglu and Durdag, 2005).

Hasil penelitian di Inggris menunjukkan banyak ternak di negara tersebut telah terinfeksi *enterococci* yang resistensi terhadap antibiotika *vancomycin*. Ditemukan sekitar 22 isolat yang berasal dari ternak telah resistensi terhadap antibiotika. Pada daging mentah ditemukan sekitar 5 isolat telah resistensi terhadap antibiotika. Demikian juga pada manusia ditemukan sekitar 62 isolat *Enterococci* telah resistensi terhadap antibiotika (Bates *et al.*, 1994). Selanjutnya pada peternakan unggas ditemukan sekitar 91-92 isolat *Salmonella* ssp. yang telah resistensi terhadap antibiotika *erythromycin*, *lincomycin*, dan *penicillin*. Umumnya *Salmonella* ssp. yang resistensi terhadap antibiotika tersebut ditemukan

in produk unggas, unggas hidup dan lingkungan perunggasan (Roy *et al.*, 2002)



Campylobacter dan beberapa strain *Escherchia coli* juga telah ditemukan resistensi terhadap antibiotika. Penyebaran mikroba tersebut ke wilayah lain dapat terjadi melalui beberapa cara, seperti penggunaan kotoran ternak sebagai pupuk (Doyle, 2001; McEwen and Fedorka-Cray, 2002), pemanfaatan air yang terkontaminasi, dan perdagangan ternak antar-negara (Sun, 2004).

Residu antibiotika merupakan senyawa asal dan atau metabolitnya yang terdapat dalam jaringan produk hewani dan termasuk residu hasil uraian lainnya dari antibiotika tersebut. Residu dalam bahan makanan (terutama jaringan ternak untuk konsumsi) meliputi senyawa asal yang tidak berubah, metabolit dan/atau konjugat lain. Beberapa metabolit obat diketahui bersifat kurang atau tidak toksik dibandingkan dengan senyawa asalnya, namun beberapa metabolit bersifat lebih toksik. Residu antibiotika dalam makanan asal hewan erat kaitannya dengan penggunaan antibiotika untuk pencegahan dan pengobatan penyakit serta penggunaannya sebagai imbuhan pakan. Ransum yang mengandung antibiotika akan berinteraksi dengan jaringan (organ) dalam tubuh ternak, meskipun dalam jumlah yang kecil pengaruh yang ditimbulkan tidak secara langsung tetapi akan berefek kronis dan tetap berada dalam tubuh ternak (Tantina, 2014).

G. Probiotik

Probiotik didefinisikan sebagai organisme yang memberikan kontribusi terhadap keseimbangan mikroba dalam usus (Haddadin *et al.*,



1996; Holzapfel *et al.*, 2001; dan Hammes and Hertel, 2002). Kata probiotik berasal dari bahasa Yunani yang artinya “untuk hidup” dan pertama kali digunakan oleh Lilley dan Stillwell pada tahun 1965 untuk menjelaskan substansi yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme yang merangsang pertumbuhan organisme lain (Holzapfel and Schilinger, 2002). Probiotik mengandung bakteri spesifik, tahan dalam situasi kering dan suhu lingkungan tertentu serta menghasilkan respon optimum dalam jarak dosis tertentu (Mahdavi *et al.*, 2005).

Probiotik dapat memelihara lingkungan mikroba yang ada di dalam saluran pencernaan unggas menjadi lebih baik dengan cara mengurangi jumlah mikroba patogen yang ada pada saluran pencernaan. Kondisi lingkungan pencernaan yang baik ini menyebabkan terjadinya peningkatan daya cerna, absorpsi dan efisiensi pemanfaatan ransum (Khaksefidi and Ghoorchi, 2006). Terdapat beberapa faktor yang dapat menurunkan efektifitas probiotik pada unggas dalam berkompetisi dengan patogen, yaitu penggunaan antibiotika, stres, penyakit, molting, pemuasaan (Doyle and Erickson, 2006), dan dosis (Karaoglu and Durdag, 2005).

Pemberian kultur mikrobial yang berfungsi sebagai probiotik dapat memberikan beberapa manfaat pada ternak, yaitu (Rolfe, 2000 dan Mahdavi *et al.*, 2005),:

1. Menstimulasi nafsu makan (*appetite*).
2. Memperbaiki keseimbangan mikroba usus.



3. Mensintesis vitamin dan memperbaiki sistem imunitas.
4. Menghasilkan enzim pencernaan (β -galactosidase).
5. Menggunakan karbohidrat yang tidak tercerna.
6. Mestimulasi produksi asam laktat dan asam lemak rantai pendek.
7. Menurunkan kadar kolesterol, menurunkan pH.
8. Menghasilkan bakteriosin, serta berkompetisi dengan mikroba lainnya untuk melekat pada dinding usus.

Persyaratan lain bakteri asam laktat (BAL) untuk dapat digunakan sebagai kandidat probiotik, yaitu (Fuller, 1989 dan Mahdavi *et al.*, 2005).

1. Berasal dari inang dan tidak bersifat patogen.
2. Toleran terhadap asam dan garam empedu.
3. Mampu tumbuh, memproduksi asam dalam jumlah besar dan cepat pada saluran pencernaan.
4. Memproduksi substansi antimikrobia (bakteriosin) yang dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen.
5. Memiliki kemampuan menempel pada sel epitel usus, sehingga akan terjadi peningkatan kekebalan ayam terhadap infeksi bakteri.
6. Dapat dikembangbiakkan dengan cepat dan mudah, toleran terhadap panas dan memiliki daya tahan yang tinggi terhadap proses preparasi maupun penyimpanan.



Kriteria probiotik yang efektif antara lain, yaitu memberikan efek menguntungkan bagi induk semang, tidak menyebabkan penyakit dan tidak beracun, mengandung sel hidup lebih dari satu juta sel (10^6), mampu bertahan dan melakukan aktivitas metabolisme dalam saluran pencernaan, tetap hidup dalam selama penyimpanan dan tidak terjadi kekebalan terhadap keberadaan probiotik baru (Sumarsih dkk., 2012). Pada Tabel 2 disajikan beberapa jenis BAL yang dapat digunakan sebagai probiotik.

Tabel 2. Mikroba kelompok Bakteri Asam Laktat (BAL) yang digunakan sebagai probiotik

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infatis</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. johnsonii</i>	
<i>L. paracasei</i>	
<i>L. plantarum</i>	
<i>L. reuteri</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	

Sumber: Senok *et al.*, (2005).

H. Mekanisme Kerja Probiotik

Saluran pencernaan yang paling banyak dihuni bakteri, yaitu usus (Kurniawan, 2011). Oleh karena itu kesehatan sistem saluran pencernaan merupakan hal penting yang senantiasa harus ditahankan. Hal ini disebabkan saluran pencernaan merupakan tempat



lewat dan masuknya berbagai nutrisi yang diperlukan untuk kelangsungan kehidupan tubuh. Selain untuk meningkatkan daya absorpsi terhadap zat makanan, permukaan saluran pencernaan yang luas juga sering terpapar berbagai macam zat atau benda asing, termasuk agen patogen. Keberadaan patogen di dalam saluran pencernaan dapat mengakibatkan berbagai penyakit diantaranya diare (Schiller *et al.*, 2010).

Populasi mikroba patogen dalam saluran pencernaan ternak (broiler) dapat dikendalikan dengan pemberian probiotik. Hal ini terlihat pada populasi *Escherichia coli* dan *Clostridium* spp. pada sekum broiler semakin berkurang setelah diberikan probiotik dibandingkan kontrol, sementara disisi lain kondisi panjang dan lebar vili ileum menjadi lebih baik (Hassan *et al.*, 2014). Suplementasi probiotik terbukti mengurangi populasi *Enterobacteria* pada hari 21 dan 35 dibandingkan tanpa suplemen probiotik (Olnood *et al.*, 2015).

Kondisi vili yang panjang dan *crypt* lebih dalam dapat dijadikan sebagai informasi tentang kondisi kesehatan saluran pencernaan yang lebih baik dari aspek fungsinya. Hal tersebut akan meningkatkan fungsi absorpsi sehubungan dengan bertambahnya daerah permukaan pada vili (Abdel-Reaheem *et al.*, 2012).

Pemberian probiotik dapat meningkatkan respon imunitas pada ayam. Mekanisme probiotik dalam meningkatkan kesehatan tubuh broiler melalui beberapa cara, yaitu memproduksi senyawa antimikroba seperti laktat, asam asetat, korbondioksida, bakteriosin dan senyawa



penghambat bakteri lainnya, berkompetisi dalam pemanfaatan zat makanan dan pada penempelan epitel usus dengan patogen, dan menstimulasi sistem imun (Rogwghani *et al.*, 2007).

Mekanisme kerja probiotik dalam sistem pencernaan melalui beberapa cara, yaitu (Fuller, 1992).

1. Kompetisi untuk Reserptor perlekatan pada mukosa usus

Mikroflora indigenus pencernaan memiliki kemampuan dalam menghambat kolonisasi bakteri yang tidak menguntungkan. Aktifitas ini dikenal sebagai *competitive exclusion* (CE). Prosesnya dapat dijelaskan, yaitu antara indigenus mikroflora (*existing mikroflora*) berkompetisi dengan mikroorganisme patogen yang melekat pada mukosa usus dan memproduksi VFA (*volatile fatty acid*).

2. Kompetisi untuk mendapatkan nutrient

Selain adanya proses perlekatan pada epitel usus, BAL yang tumbuh membentuk koloni juga menggunakan nutrient yang sebenarnya dibutuhkan oleh mikroba patogen. Namun dalam proses ini terjadi kompetisi antara BAL dengan dengan mikroba patogen dalam penggunaan nutrient dalam usus, maka BAL juga akan menghasilkan metabolit yang menghambat pertumbuhan mikroba patogen.

3. Pengaktifan respon imun

Perlindungan imun pada unggas terkonsentrasi dalam kuning telur melepaskan antibodi ke dalam lumen usus dan menjamin



perlindungan unggas muda melawan infeksi 4 hari pertama setelah menetas. Maternal antibodi Immunoglobulin G diperlukan dalam perkembangan ayam namun secara nyata tidak memberikan perlindungan yang signifikan terhadap *salmonella*. Demikian juga, mekanisme imun memiliki pengaruh yang kecil pada awal koloni usus. Penelitian menunjukkan bahwa ternak yang diberikan mikroflora tambahan memiliki immunoglobulin yang lebih besar dan aktifitas pagositik dalam hal ini probiotik dapat mempertinggi kemampuan imunitas.

4. Produksi komponen antimikroba

Komponen penghambatan yang dihasilkan oleh *Lactobacillus* spp. meliputi bakteriosin yang memiliki sifat khusus, yaitu *nisin*, *reuturin*, *acidolin* dan *bulgaricin*. Disamping itu juga dihasilkan substansi antagonis yang lain, seperti hidrogen peroksida dan asam-asam organik (asam laktat, asam asetat, asam butirat, dan asam propionat).

I. Efek Probiotik pada Ternak Unggas

Hasil penelitian probiotik *Lactobacilli* spp. dan *Bacillus* spp. pada ternak monogastrik yang mengalami stres akibat pengaruh lingkungan yang buruk terbukti dapat meningkatkan performa ternak tersebut (Cavazonni *et al.*, 1998 dan Hooge *et al.*, 2004). Pemberian probiotik

di kondisi manajemen dan lingkungan yang baik menunjukkan pengaruh yang kurang signifikan pada performa dan karkas ternak.



Suplemen probiotik pada ternak (broiler) akan lebih efektif jika dilakukan pada lingkungan yang buruk (Karaoglu and Durdag, 2005).

Kelompok BAL seperti *L. acidophilus* yang diberikan secara teratur dapat meningkatkan konversi ransum dan mengurangi bakteri patogen dalam feses broiler (Gunawan dan Sundari, 2003). Rendahnya pH lingkungan saluran pencernaan yang diberikan *L. acidophilus* karena mikroba ini mempunyai kemampuan merombak karbohidrat menjadi asam laktat. Kondisi tersebut menyebabkan patogen tidak dapat berkembang baik di dalam saluran pencernaan (Vicente *et al.*, 2007).

Pemberian probiotik (*Bacillus subtilis*) menunjukkan hasil yang positif karena dapat memperbaiki konversi ransum, bobot badan (Fritts *et al.*, 2000 and Panda *et al.*, 2007), mengurangi mortalitas (Jin *et al.*, 1998), dan meningkatkan viabilitas broiler (Panda *et al.*, 2007). Mortalitas broiler yang rendah mungkin disebabkan tingkat stres pada broiler yang berkurang (Karaoglu and Durdag, 2005). Disamping itu, probiotik mempunyai efektivitas yang sangat nyata mengurangi kontaminasi mikroba pada karkas yang memiliki potensi patogen pada manusia (Fritts *et al.*, 2000). Demikian juga efektif mengurangi jumlah mikroba patogen pada feses broiler (Maruta *et al.*, 1996).

Pemberian bakteri *Bacillus* ssp. dan *Bacillus apiarius* 5 mL/L air minum dengan level 5×10^9 CFU/mL setiap hari maupun secara interval hewani dapat memperbaiki pertumbuhan bobot hidup, konversi ransum dan mortalitas broiler (Kompiang dkk., 2002). Mikroorganisme di dalam



saluran pencernaan juga berperan penting dalam penggunaan lipid (Haddadin *et al.*, 1996). Hal ini terlihat dari pemberian kultur probiotik *Bacillus* spp. dalam ransum dapat mempengaruhi konsentrasi kolesterol dan trigliserida dalam darah ayam petelur. Pemberian kultur probiotik hingga level 4.6×10^6 CFU/g ransum secara nyata mengurangi kolesterol dan trigliserida plasma darah (Mahdavi *et al.*, 2005).

Probiotik dapat memelihara lingkungan mikroba di dalam saluran pencernaan unggas dengan mengurangi sejumlah mikroba patogen. selain itu probiotik juga dapat meningkatkan pencernaan, absorpsi ransum, dan efisiensi pemanfaatan ransum. Penambahan probiotik *Bacillus subtilis* sebanyak 25 mg dan 50 mg ke dalam ransum terbukti dapat memperbaiki performa dan sistem imunitas broiler (Khaksefidi and Ghoorchi, 2006).

Pemberian probiotik (*Bacillus subtilis*) pada ternak dapat dilakukan secara langsung melalui mulut atau pakan. *Bacillus subtilis* dapat menghasilkan enzim subtilin yang berfungsi sebagai antimikrobal. Disamping itu subtilin dan katalase yang dihasilkan *Bacillus subtilis* dapat meningkatkan pertumbuhan mikroba probiotik lain seperti *L. Reuteri* (Hosoi *et al.*, 2000).

Mikroorganisme probiotik di dalam saluran pencernaan dapat mensintesis enzim estrase disamping keberadaan enzim lipase. Enzim ini dapat mengkonversi asam lemak terbang (VFA) ke dalam bentuk esterifikasi yang berbeda dengan trigliserida yang terdapat dalam usus.



Hal ini akan mengurangi absorpsi trigliserida ke dalam plasma (Mahdavi *et al.*, 2005)

Hasil lain dari penelitian pemberian probiotik *Eubacterium* sp. 2.5×10^8 CFU/kg dalam ransum broiler, yaitu dapat meningkatkan bobot jejunum dan sekum dibandingkan yang tidak diberikan (Awad *et al.*, 2006). Menurut Tortuero and Fernandez (1995), bahwa bertambahnya bobot organ pencernaan mempunyai hubungan dengan meningkatnya pencernaan ransum khususnya di dalam usus halus.

Tembolok dan usus pada ternak unggas (ayam) merupakan alat pertahanan terhadap mikroba patogen. Kedua organ tersebut merupakan tempat terjadinya proses fermentasi ransum khususnya pada daerah sekum. Produk fermentasi berupa asam lemak terbang (VFA) yang dihasilkan pada sekum dan asam laktat pada tembolok memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan patogen (Van Der Wielen *et al.*, 2000).

Probiotik *Enterococcus faecium* memberikan efek yang sangat nyata terhadap bobot badan akhir dan pertambahan bobot badan broiler, ketika diberikan dalam bentuk strain tunggal tunggal (Cao *et al.*, 2013). Akan tetapi ketika diberikan probiotik yang mengandung berbagai strain jenis *Lactobacillus* dan bakteri lain, tidak memberikan pengaruh nyata dalam memperbaiki performa broiler. Hal ini menunjukkan, bahwa

memberikan efektivitas yang berbeda terhadap performa broiler (Mayerizadeh *et al.*, 2011).



J. Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) dapat dibagi dalam dua famili, yaitu *Lactobacillaceae* dan *Streptococcaceae* dan delapan genus, yaitu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Corynebacterium* dan *Enterococcus*. BAL tidak membentuk spora, katalase negatif, umumnya motil, Gram positif, berbentuk batang atau bulat (Hariabriansah, 2004).

Konsep nama BAL diberikan, karena kelompok bakteri ini dapat menyebabkan fermentasi dan koagulasi pada susu yang menghasilkan asam laktat dalam bentuk laktosa. BAL telah lama digunakan untuk fermentasi makanan pada manusia (Hardiningsih dkk, 2006 dan Millette *et al.*, 2008). BAL merupakan golongan mikroorganisme yang bermanfaat karena tidak memiliki sifat toksik bagi inang, sehingga BAL disebut juga sebagai mikroorganismse *Generallly Recognize as Safe* (GRAS), artinya mikroorganismse yang tidak beresiko bagi kesehatan. BAL memiliki potensi untuk digunakan sebagai probiotik karena dapat menghasilkan senyawa yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Klaenhammaer, 2001). Bakteri ini dapat berperan sebagai flora normal dalam sistem pencernaan yang memiliki fungsi untuk menjaga keseimbangan asam dan basa sehingga pH dalam kolon konstan (Hardiningsih dkk, 2006). Hasil-hasil

elitian menunjukkan bahwa spesies BAL yang berpotensi sebagai probiotik cukup banyak, diantaranya bakteri *Lactobacillus* *philus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus*



casei, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus salivarius* dan *Streptococcus intermedius* (Tamime, 2005).

Spesies BAL dapat digolongkan dalam dua kelompok berdasarkan metabolismenya, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Kelompok homofermentatif merupakan kelompok BAL yang mampu mengubah glukosa menjadi asam laktat, sedangkan kelompok heterofermentatif merupakan kelompok BAL yang menghasilkan produk fermentasi glukosa lebih dari satu, yaitu asam laktat, asam asetat (etanol) dan CO₂ (Fardiaz, 1992). BAL yang tergolong homofermentatif, yaitu *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Peddiococcus* sp., sedangkan yang tergolong heterofermentatif adalah *Leuconostoc* sp. (McDonald, 2002.)

Berdasarkan sifat tumbuhnya pada berbagai suhu dan pH, BAL dapat dibagi menjadi mesofilik dan termofilik, beberapa dapat tumbuh pada suhu 5⁰C dan tertinggi 45⁰C. BAL dapat bertahan pada pH 3.2 dan pH yang lebih tinggi (9.6) serta beberapa hanya bisa tumbuh pada kisaran pH yang sempit 4.0-4.5 (Wijayanto, 2009)

Lactobacillus merupakan salah satu kelompok BAL yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen, melalui senyawa antimikroba yang dihasilkan, seperti asam organik, hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin (Abdelbasset and Djamilia, 2008). Jenis bakteriosin yang dapat dihasilkan BAL, seperti *acidocin*, *acidophilin*, *lacticin*, *nisin* (Millette *et al.*,). Senyawa-senyawa ini tidak hanya dapat menghambat



pertumbuhan bakteri tetapi dapat mempengaruhi metabolisme bakteri atau produksi toksin (Rolfe, 2000). Bakteriosin adalah komponen ekstraseluler berupa peptida atau senyawa berupa protein antimikroba yang memperlihatkan suatu respon berlawanan terhadap bakteri tertentu. Beberapa genera yang memproduksi bakteriosin adalah *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Propionibacterium* mempunyai aktivitas hambat yang besar terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen (Utami, 2011).

Bakteriosin bisa dianggap sebagai antibiotika, tetapi berbeda dari antibiotika, yaitu: a) bakteriosin disintesis dalam ribosom, b) sel inang kebal terhadap bakteriosin, c) mode aksinya berbeda dari antibiotik, d) daya hambatnya sempit sehingga hanya mampu melawan bakteri yang berhubungan dekat dengan strainnya. Substansi antimikrobal lain yang diproduksi secara luas oleh bakteri asam laktat yaitu hidrogen peroksida, karbon dioksida dan diasetil (Vesterlund and Ouwehand, 2004). Kemampuan Isolat bakteri (genus *Lactobacillus*) dalam menghambat pertumbuhan dan perkembangan beberapa mikroba lain dapat dikategorikan dalam tiga kriteria, yaitu daya hambat moderat dengan diameter 6-9 mm, daya hambat kuat dengan diameter 10-14 mm, dan daya hambat sangat kuat dengan diameter 15-18 mm (Lade, 2006).

Asam laktat yang dihasilkan oleh kelompok BAL juga aktif merusak polisakarida dari membran terluar sel bakteri Gram negatif. Hal ini merupakan faktor tambahan dalam kemampuan antimikroba dari asam



laktat selain dapat menurunkan pH, juga dapat berfungsi sebagai *permeabilizer* pada membran terluar bakteri Gram negatif dan dapat berperan sebagai perangsang (*potentiator*) untuk efek bahan antimikroba yang lain (Alakomi *et al.*, 2000).

Aksi antimikroba hidrogen peroksida (H_2O_2) disebabkan oleh kemampuan oksidasinya yang kuat dan kemampuan merusak komponen seluler terutama membran sel. Beberapa strain BAL mampu memproduksi H_2O_2 yang cukup untuk menyebabkan efek bakteriostatik (6-8 $\mu g/mL$), tetapi jarang berefek bakterisidal (30-40 $\mu g/mL$). Hidrogen peroksida bisa menyerang bakteri, jamur, dan virus (Ray, 2003).

Diasetil diproduksi bakteri asam laktat dalam jumlah besar melalui metabolisme sitrat. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa diasetil mampu melawan sejumlah besar bakteri Gram positif dan Gram negatif. Diasetil yang dikombinasikan dengan panas, maka daya hambatnya akan bertambah. Aktivitas antimikroba diasetil mampu melawan *Bacillus* sp. (Ray, 2003).

BAL berperan penting dalam mengatur ekosistem saluran pencernaan melalui tiga aktivitas, yaitu nutrisi, fisiologi dan efek antimikroba. Aspek nutrisi berupa penyediaan enzim untuk membantu metabolisme komponen makanan (laktase), sintesis beberapa vitamin (K, folat, piridoksin, pantotenat, biotin dan riboflavin) dan menghilangkan metabolit komponen makanan di dalam usus. Aspek fisiologi meliputi kemampuan menjaga keseimbangan komposisi mikroflora usus



dan menstimulasi sistem kekebalan usus. Efek antimikroba yaitu kemampuannya untuk memperbaiki ketahanan terhadap bakteri patogen (Naidu and Clemens, 2000).

K. Isolasi Bakteri Asam Laktat sebagai Kandidat Probiotik

Berbagai penelitian yang telah dilakukan untuk memperoleh mikroba lokal yang berpotensi sebagai kandidat probiotik, seperti penelitian Natalia dan Priadi (2006) yang memanfaatkan mukus sekum ayam dewasa yang sehat. Dari usus ayam sehat berhasil diisolasi berbagai bakteri yang bersifat Gram positif dan non patogen, yaitu *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sporogenes*, *Lactobacillus raffinolactis*, *Bacillus* spp., dan *Streptococcus* sp. Mikroba yang diseleksi tersebut bertujuan untuk memilih probiotik yang dapat digunakan pada ayam secara per oral (dapat juga dicampurkan pada pakan). Probiotik ini diharapkan dapat digunakan untuk mengurangi atau menghilangkan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang masuk melalui mukosa saluran pencernaan seperti *Clostridial necrotic enteritis* (disebabkan oleh *Clostridium perfringens*), *Salmonellosis*, *Colibacillosis* dan sebagainya. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. Dapat melindungi tubuh terhadap infeksi atau masuknya agen patogen ke an pencernaan.



Sumber isolat mikroba kandidat probiotik dari berbagai jenis ayam lokal Indonesia telah diteliti oleh Harimurti dan Rahayu, (2007) pada bagian saluran pencernaan ayam, mulai dari tembolok, gizzard, duodenum, jejunum, ileum, sekum dan kolon. Jenis ayam kampung yang digunakan sebagai sumber isolat, yaitu ayam arab, legund, ayam kedu, ayam kapas dan ayam kampung yang dijual dipasaran. Hasil isolasi mikroba kandidat probiotik yang diperoleh disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Bakteri asam laktat yang diisolasi dari berbagai bagian organ pencernaan ayam kampung

Sumber	Jenis Ayam Kampung	Dugaan Spesies
Tembolok	Arab (Dipasaran)	<i>Lactobacillus murinus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>
Ventrikulus	Kapas	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Usus besar	Legund	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Sekum	Kapas Kedu	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>
	Legund, Arab	<i>Lactobacillus murinus</i>

Sumber: Harimurti dan Rahayu, (2007).

L. Darah

Darah yang terdapat di dalam pembuluh darah yang mengalir ke seluruh bagian tubuh merupakan suatu jaringan khusus pada tubuh manusia (Sugeng, 2001). Darah ialah jaringan yang beredar dalam sistem pembuluh darah yang tertutup (Harper, 1992). Darah terdiri dari sel-sel



yang terdapat dalam plasma. Sel darah terdiri dari tiga macam, yaitu sel darah merah (*eritrosit*), sel darah putih (*leukosit*) dan keping darah (*trombosit*) (Guyton dan Hall, 2008).

Komponen-komponen utama penyusun darah, yaitu sel-sel darah dan komponen lain yang banyak mengandung protein (plasma darah atau plasma protein. Volume darah sebagian besar terdiri dari plasma protein, yaitu sekitar 55% dan sisanya adalah sel-sel darah (Astawan, 2001). Sampel darah yang dibiarkan atau disentrifuse, maka akan terpisah menjadi dua bagian, yaitu (1) elemen seluler yang terdiri dari trombosit, leukosit, eritrosit, dan kadang-kadang sel miselenius dari Retikulum Endoplasmik Sistem (RES), (2) plasma atau fraksi ekstraseluler yang mengandung air, protein, elektrolit, glukosa, enzim dan hormon (Mugi, 2003).

Di dalam tubuh darah berfungsi sebagai alat transportasi berbagai substrat metabolik yang dibutuhkan oleh sel pada seluruh tubuh, seperti oksigen, glukosa, asam amino, asam lemak dan beberapa lipid. Demikian juga sebaliknya darah juga berfungsi dalam membawa keluar beberapa produk metabolit yang dikeluarkan oleh sel, seperti karbondioksida, asam laktat, buangan bernitrogen dari metabolisme protein dan panas (Cunningham, 2002).

Gambaran darah merupakan salah satu parameter dari status kesehatan hewan karena darah merupakan komponen yang mempunyai fungsi penting dalam pengaturan fisiologis tubuh. Fungsi darah secara



umum berkaitan dengan transportasi komponen di dalam tubuh seperti nutrisi, oksigen, karbon dioksida, metabolit, hormon, panas dan imun tubuh. Sedangkan fungsi tambahan dari darah berkaitan dengan keseimbangan cairan dan pH tubuh (Reece, 2006). Fungsi darah dapat terganggu bila parameter darah tidak normal, akibatnya terjadi penyakit atau gangguan pada darah dan fungsi darah yang pada gilirannya dapat menyebabkan gangguan pada organ lain (Astawan dkk., 2011).

Darah memenuhi sekitar 12% dari bobot badan dari anak ayam yang baru menetas dan sekitar 6-8% pada ayam dewasa (Bell, 2002). Schalms *et al.*, dalam tahun 1986 melaporkan, bahwa gambaran normal darah pada ayam, yaitu jumlah sel darah merah $2.5-3.5$ juta/ mm^3 darah; kadar hemoglobin (Hb) $7.0-13$ g/dL, dan nilai hematokrit berkisar 22–35%. Apabila dijumpai penyimpangan dari patokan yang telah ditetapkan, hal tersebut dapat digunakan sebagai petunjuk adanya gangguan fisiologi atau gejala dini dari suatu penyakit (Apsari dkk, 2010). Perubahan fisiologis tersebut dapat berasal dari dalam tubuh sendiri (internal), seperti latihan, stres, perubahan umur, suhu tubuh dan status gizi. Sedangkan yang berasal dari luar (eksternal) dapat disebabkan infeksi kuman dan suhu lingkungan (Guyton dan Hall, 2008).

Hasil penelitian Olivia dkk., (2015) pada broiler selama 26 hari pada sistim kandang tertutup (*closed house*) dengan jenis alas kandang berbeda menunjukkan sel darah merah ($2.75-3.42 \times 10^6/\text{mm}^3$), sel darah putih ($8.78-9.62 \times 10^3/\text{mm}^3$). Sel darah merah pada masing-masing



perlakuan, yaitu *litter* sekam padi $3.37 \times 10^6/\text{mm}^3$, serutan kayu $3.42 \times 10^6/\text{mm}^3$ dan serutan kayu $2.75 \times 10^6/\text{mm}^3$. Sedangkan pada sel darah putih pada masing-masing perlakuan, yaitu *litter* sekam padi yaitu $9.62 \times 10^3/\text{mm}^3$, serutan kayu yaitu $9.01 \times 10^3/\text{mm}^3$ dan jerami padi yaitu $8.78 \times 10^3/\text{mm}^3$. Perbedaan jenis alas kandang (sekam padi, serutan kayu dan jerami padi) tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap jumlah sel darah merah dan sel darah putih.

Ternak dapat mengatasi stres yang terjadi pada dirinya apabila perbandingan antara heterofil dan limfosit dalam kondisi optimal, karena pada perbandingan tersebut ternak mendapatkan kenyamanan (*Welfare*) (Campo *et al.*, 2000). Rasio heterofil dengan limfosit akan meningkat seiring dengan meningkatnya level stres. Rasio heterofil dengan limfosit normal pada ayam, yaitu 0.32 (sturkie, 2000), sedangkan menurut Swenson (1993) sekitar 0.45-0.5.

1. Eritrosit

Unggas memiliki jenis eritrosit berinti dan berukuran lebih besar dari mamalia (Smith *et al.*, 2000). Eritrosit yang sudah dewasa berbentuk elips, inti berada ditengah dan berbentuk oval (Hodges 1997 dan Mugi, 2003). Sedangkan pada mamalia selama pematangan sel tidak bergerak, tidak berinti, mitokondria, kompleks golgi, ribonukleoprotein dan sentriole (Mugi, 2003). Darah ayam mengandung eritrosit sekitar $3 \times 10^6/\text{mm}^3$ (Bell, 1971). Bell dan Freeman dalam tahun 1971 melaporkan, bahwa jumlah



eritrosit pada ayam betina sekitar 2.72 juta sampai 3 juta/mm³, sedangkan pada ayam jantan sekitar 3.24 8 juta/mm³ juta sampai 3.8 juta/mm³.

Hemolisis dapat mempengaruhi jumlah eritrosit yang berada dalam sirkulasi (Meyer and Harvey 2004). Masa hidup eritrosit unggas rata-rata kurang dari 50 hari (Jain 1993). Sedangkan laporan lain menunjukkan Umur eritrosit unggas lebih pendek dari mamalia yaitu berumur 28-45 hari

Fungsi utama eritrosit adalah mengangkut hemoglobin yang selanjutnya hemoglobin ini mengangkut oksigen dari paru-paru ke jaringan (Guyton dan Hall 2008). Faktor yang mempengaruhi jumlah eritrosit dalam sirkulasi antara lain hormon eritropoietin yang berfungsi merangsang eritropoiesis dengan memicu produksi proeritroblas dari sel-sel hemopoietik dalam sumsum tulang. Vitamin B₁₂ dan asam folat mempengaruhi eritropoiesis pada tahap pematangan akhir dari eritrosit. Sedangkan hemolisis dapat mempengaruhi jumlah eritrosit yang berada dalam sirkulasi (Meyer and Harvey, 2004). Volume sel darah merah dapat ditingkatkan oleh hormon androgen (Smith *et al.*, 2000).

2. Hemoglobin

Hemoglobin merupakan zat warna (pigmen) darah yang berupa ikatan kompleks protein terkonjugasi, dibentuk oleh pigmen dan protein sederhana. Protein ini adalah suatu histon yang disebut globin. Warna h dari hemoglobin disebabkan oleh heme, suatu ikatan metalik mengandung sebuah atom besi (Swenson, 1993). Hemoglobin dibawa arah merah dalam proses sirkulasi. Kadar hemoglobin dalam darah



berbanding lurus atau linier terhadap jumlah sel darah merah dalam tubuh. Jadi, peningkatan jumlah sel darah merah yang terjadi di dalam tubuh akan menyebabkan terjadinya peningkatan kadar hemoglobin dalam darah (Olivia dkk, 2015).

Tahap dasar kimiawi pembentukan hemoglobin, yaitu pertama, suksinil-KoA yang dibentuk dalam siklus Krebs berikatan dengan glisin untuk membentuk molekul pirol. Empat pirol bergabung untuk membentuk protopofirin kemudian bergabung dengan besi untuk membentuk molekul heme. Setiap molekul heme bergabung dengan rantai polipeptida panjang (globin) membentuk suatu subunit hemoglobin yang disebut rantai hemoglobin. Produksi hemoglobin dipengaruhi oleh kadar besi (Fe) dalam tubuh karena besi merupakan komponen penting dalam pembentukan molekul heme. Besi diangkut oleh transferin ke mitokondria, tempat di mana heme disintesis. Jika tidak terdapat transferin dalam jumlah cukup, maka kegagalan pengangkutan besi menuju eritoblas dapat menyebabkan anemia hipokromik yang berat, yaitu penurunan jumlah eritrosit yang mengandung lebih sedikit hemoglobin (Guyton dan Hall 2008).

Kadar hemoglobin normal pada ayam yaitu 7.0--13 g/dL (Olivia dkk, 2015) dengan rata-rata 9.0 g/dL (Dharmawan, 2002). Pada berbagai jenis unggas yang normal, hemoglobin menempati sepertiga dari volume sel darah merah (Campbell, 1995). Ketersediaan oksigen yang cukup menyebabkan hemoglobin dalam keadaan normal, hal ini karena salah



satu fungsi hemoglobin adalah mengikat dan mengantar oksigen ke seluruh bagian tubuh (Winters, 2004).

3. Hematokrit

Fraksi sel-sel dalam darah disebut hematokrit yang diperoleh dengan menambahkan antikoagulan pada sejumlah darah kemudian disentrifugasi dalam sebuah tabung. Sel-sel tersebut akan terpisah dengan plasma pada saat dilakukan sentrifugasi, karena lebih berat dibandingkan plasma. Hematokrit terkadang disebut dengan *Packed Cell Volume* (PCV). Sel darah secara normal menyusun 30-50% dari volume darah tergantung dari spesies (Cunningham 2002). Nilai hematokrit normal pada ayam berkisar antara 22%-35% dengan rata-rata 30% (Dharmawan, 2002).

Perubahan volume sel darah merah dan plasma darah yang tidak proposional dalam sirkulasi darah akan mengubah nilai PCV (Swenson, 1993). Pada kasus eksternal hemoragi, walaupun volume total darah berkurang, PCV dan kadar protein plasma tetap normal karena ada keseimbangan dari kehilangan eritrosit dan plasma. PCV dapat meningkat sesaat pada anjing dan kuda akibat kontraksi limpa (Meyer and Harvey 2004).

4. Leukosit

Leukosit merupakan unit yang aktif pada sistem pertahanan tubuh dibentuk pada sumsum tulang dan sebagian di jaringan limfe. Darah



akan membawa Leukosit ke berbagai bagian tubuh untuk digunakan (Guyton dan Hall 2008). Leukosit di dalam darah banyak yang bersifat non-fungsional dan hanya diangkut ke jaringan tubuh tertentu pada saat dibutuhkan (Frandsen, 1993).

Leukosit memiliki bentuk yang khas. Pada keadaan tertentu, inti, sitoplasma, dan organelnya mampu bergerak. Kalau eritrosit bersifat pasif dan melaksanakan fungsinya dalam pembuluh darah, leukosit mampu keluar dari pembuluh darah menuju jaringan dalam melakukan fungsinya. Masa hidup leukosit bervariasi. Jumlah seluruh leukosit jauh dibawah eritrosit dan bervariasi tergantung jenis hewannya. Fluktuasi jumlah leukosit tiap individu cukup besar pada kondisi tertentu, seperti: cekaman/stres, aktivitas fisiologi, gizi, umur, dan lain-lain (Dharmawan 2002).

Leukosit di dalam aliran darah dapat dibagi dalam dua kelas berdasarkan penampakan histologi, yaitu granulosit dan agranulosit. Leukosit granulosit mempunyai nukleus berlobus atau bersegmen dan granula sitoplasma. Leukosit agranulosit memiliki nukleus tidak berlobus dan tidak mempunyai granula sitoplasma. Leukosit granulosit terdiri dari neutrofil/heterofil, basofil dan eosinofil. Leukosit agranulosit meliputi monosit dan limfosit. Sel darah putih yang granulosit dan monosit dibentuk dalam sumsum tulang, sedangkan limfosit diproduksi dalam berbagai jaringan limfogen. Semua sel-sel tersebut bekerja sama memberikan pertahanan yang kuat terhadap infeksi virus, bakteri dan parasit melalui



dua cara, yaitu (1) proses fagositosis, (2) membentuk antibodi dan limfosit yang peka, salah satunya atau keduanya dapat menghancurkan atau membuat tidak aktif penyerbu (Guyton dan Hall, 2008 dan Ganong, 2008).

Jumlah leukosit pada unggas sekitar $20-30 \times 10^3/\text{mm}^3$. Terjadinya peningkatan jumlah leukosit di dalam tubuh dapat menjadi indikator adanya infeksi. Gambaran tersebut dapat dilihat pada deferensiasi leukosit yang memiliki fungsi masing-masing dalam pertahanan tubuh. Berbagai faktor yang dapat mempengaruhi jumlah leukosit, yaitu lingkungan, pakan, umur, obat, penyakit, dan hormon (Swenson, 1993).

M. Organ Limfoid

Beberapa organ yang berperan dalam reaksi tanggap kebal antara lain timus, bursa fabrisius, dan limpa. Organ limfoid primer pada unggas terdiri dari timus dan bursa fabrisius. Kedua organ ini berfungsi mengatur produksi dan diferensiasi limfosit (Tizard, 1988). Penyakit tertentu dan kondisi lain seperti cekaman panas diketahui mempengaruhi perkembangan organ limfoid pada ayam. Kondisi ini biasa disebut immunosupresi, yaitu perubahan reaksi kekebalan ke keadaan negatif, sehingga respon tubuh ternak terhadap masuknya benda asing menjadi berkurang, atau bisa menjadi pemicu serangan berbagai penyakit ke dalam tubuh ternak. Immunosupresi akan ditunjukkan dengan adanya

an, hambatan, atau gangguan pada komponen sistem kekebalan
n, antara lain langsung merusak dan mengganggu pertumbuhan



organ limfoid primer (bursa dan timus), sekaligus organ limfoid sekunder (limpa) (Gregg, 2002).

1. Timus

Timus merupakan organ yang terdapat dalam rongga mediastinal anterior, tetapi pada kuda, sapi, domba, babi dan ayam, meluas ke arah leher sampai sejauh kelenjar tiroid. Timus ayam secara anatomis terletak pada sisi kanan dan kiri saluran pernafasan (trakea). Warnanya pucat kuning kemerah -merahan, bentuknya tidak teratur dan berjumlah 3-8 lobi pada masing-masing leher. Besar timus dapat sangat bervariasi, ukuran relatif yang paling besar pada hewan yang baru lahir sedangkan ukuran absolutnya terbesar pada waktu pubertas (Tizard, 1988).

Setelah dewasa, timus mengalami atrofi dari parenkhima dan korteks diganti jaringan lemak. Timus yang mengalami atrofi cepat merupakan reaksi terhadap stres, sehingga hewan yang mati sesudah menderita sakit yang lama mungkin mempunyai timus yang sangat kecil Timus merupakan regulator sel T yang bekerja pada sel-sel primitif yang berasal dari sumsum tulang dan membuat sel-sel itu mampu secara imunologik bertindak sebagai pembentuk antibodi tubuh (Tizard, 1988). Persentase bobot timus dari bobot hidup adalah 0.18% 0.48% (Toghyani *et al.*, 2010).



2. Bursa Fabrisius

Bursa fabrisius merupakan organ limfoid yang hanya ditemukan pada daerah dorsal di unggas. Bursa fabrisius terdiri dari sel-sel limfoid yang tersusun atas kelompok-kelompok yang disebut folikel limfoid. Pada bagian dalam ditemukan lumen yang dibatasi oleh deretan epitel yang membungkus folikel limfoid. Setiap folikel limfoid terdiri dari korteks yang berisi sel-sel limfosit, sel plasma, dan makrofag, sedangkan bagian medula hanya terdiri dari sel-sel limfosit. Bursa fabrisius berfungsi sebagai tempat pendewasaan dan diferensiasi limfosit B (sel B) dari sistem pembentukan antibodi (Tizard,1988).

Pada saat sel B telah dewasa, maka akan dipindahkan ke dalam sirkulasi dan siap untuk menerima dan memberikan reaksi terhadap benda asing yang masuk kedalam tubuh. Bila antigen memasuki tubuh, pertama-tama antigen akan dikenal sedemikian rupa sehingga dapat dikenali sebagai benda asing. Setelah itu informasi yang diperoleh harus dikirim kesistem pembentuk antibodi dalam hal ini bursa fabrisius. Sistem ini nantinya akan menanggapi dengan membentuk antibodi khusus dan sel yang mampu menyingkirkan antigen. Pada unggas yang terjangkiti bakteri patogen maka bursa fabrisius membentuk antibodi akibatnya akan menyebabkan deplesi dan folikel limfoid menjadi kecil sehingga persentase bobot bursa fabrisius menurun (Tizard, 1988).

Toivanen *et al.*, dalam tahun 1987 melaporkan bahwa bursektomi (ibuangan bursa fabrisius) yang dilakukan pada anak ayam yang baru



menetas dapat mengakibatkan ayam tersebut tidak mampu membentuk antibodi dan lebih rentan terhadap infeksi. Terjadi kematian sebanyak 67% pada ayam yang dibursektomi dan diinfeksi *Salmonella*, sedangkan diinfeksi tanpa bursektomi hanya 8% kematian (Winarsih, 2005)

Bursa fabrisius yang relatif tetap dan membesar seiring peningkatan bobot atau umur ternak, cenderung tahan terhadap berbagai penyakit (Tizard, 1988). Turunnya bobot bursa fabrisius ternyata menurunkan jumlah limfosit (Siegel, 1995). Bursa fabrisius yang sangat kecil mengindikasikan stres yang cukup tinggi, disertai aktifitas melawan mikroba patogen spesifik (Dellman dan Brown, 1992)

Bursa fabrisius mencapai pertumbuhan maksimum pada saat ayam berumur 3-6 minggu (Cross, 1987) pada broiler dan 4-12 minggu (Riddel, 1987) pada ayam petelur. Bursa fabrisius akan mengalami pertumbuhan optimum ketika mencapai kematangan seksual. Handharyani (1994) menyatakan bahwa persentase bobot relative bursa fabrisius pada broiler umur 4 minggu rata-rata 0.19 % dari bobot hidup, sedangkan menurut Toghyani *et al.*, (2010) 0.09% dari bobot hidup.

N. Kerangka Konseptual Penelitian

Broiler merupakan salah satu sumber protein hewani asal ternak yang cukup populer dimasyarakat. Broiler memiliki peran yang strategis dalam penyediaan pangan sumber protein bagi manusia. Seiring kemajuan dalam seleksi genetik, saat ini telah dihasilkan broiler dengan



tingkat pertumbuhan lebih cepat dari sebelumnya. Potensi genetik tersebut akan tercapai apabila didukung oleh kondisi lingkungan dan manajemen yang sesuai. Salah satu faktor penting untuk mencapai potensi genetik tersebut, yaitu penggunaan imbuhan pakan (*feed additive*) baik yang ditambahkan dalam pakan ataupun air minum.

Tujuan pemberian imbuhan pakan agar produktifitas ternak tersebut menjadi optimal. Imbuhan pakan dapat bekerja dengan cara memperbaiki ekosistem saluran pencernaan, seperti menghambat pertumbuhan patogen, khususnya yang berada di daerah usus halus. Keberadaan mikroba patogen yang tak terkontrol tersebut dapat menghasilkan toksin yang berlebihan, sehingga fungsi vili dan *crypt* dapat menurun. Pada akhirnya jumlah absorpsi nutrient dari pakan yang dikonsumsi menjadi berkurang. Hal tersebut dapat menyebabkan kondisi kesehatan atau produktifitas ternak juga menurun, karena kebutuhan nutrient tidak cukup.

Jenis imbuhan pakan yang telah lama digunakan oleh produsen (peternak/industri pakan) ternak unggas, yaitu antibiotika. Imbuhan pakan tersebut terbukti dapat meningkatkan efisiensi penggunaan pakan oleh broiler, sehingga keuntungan produsen (peternak) menjadi lebih baik. Efisiensi pakan yang lebih baik dapat dilihat berdasarkan nilai konversi pakan yang rendah dan berat badan yang optimun.

Salah satu sistem kerja antibiotika dalam saluran pencernaan, yaitu dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen yang menjadi targetnya. Hal tersebut akan menyebabkan kondisi saluran



pencernaan menjadi lebih baik sehingga pada akhirnya meningkatkan jumlah absorpsi zat makanan (*nutrient*). Demikian juga kondisi kesehatan ternak akan lebih baik karena kebutuhan *nutrient* yang cukup.

Beberapa tahun terakhir penggunaan antibiotik pada ternak unggas sebagai perangsang pertumbuhan (*growth promotant*) menjadi perhatian yang serius hampir di seluruh dunia. Hal tersebut sehubungan munculnya kecemasan konsumen terhadap beberapa kasus mikroba patogen yang telah resisten antibiotik dan adanya residu dalam produk ternak.

Keamanan pangan akan semakin menjadi perhatian bagi konsumen sehubungan dengan meningkatnya kesejahteraan mereka, termasuk produk unggas (daging dan telur). Konsumen akan berani membayar lebih mahal asalkan ada jaminan produk pangan yang dibelinya aman. Oleh karena itu perlu dilakukan alternatif pemilihan imbuhan pakan bagi broiler yang lebih aman dan dapat diterima oleh konsumen. Imbuhan pakan tersebut tentunya mendekati kemampuan sistem kerja antibiotika dalam meningkatkan efisiensi penggunaan ransum.

Pemanfaatan mikroba yang bersifat menguntungkan yang berasal dari saluran pencernaan itu sendiri dapat menjadi alternatif untuk mengurangi penggunaan antibiotika. Mikroba tersebut lebih populer dengan istilah probiotik, karena memberikan keuntungan bagi inangnya

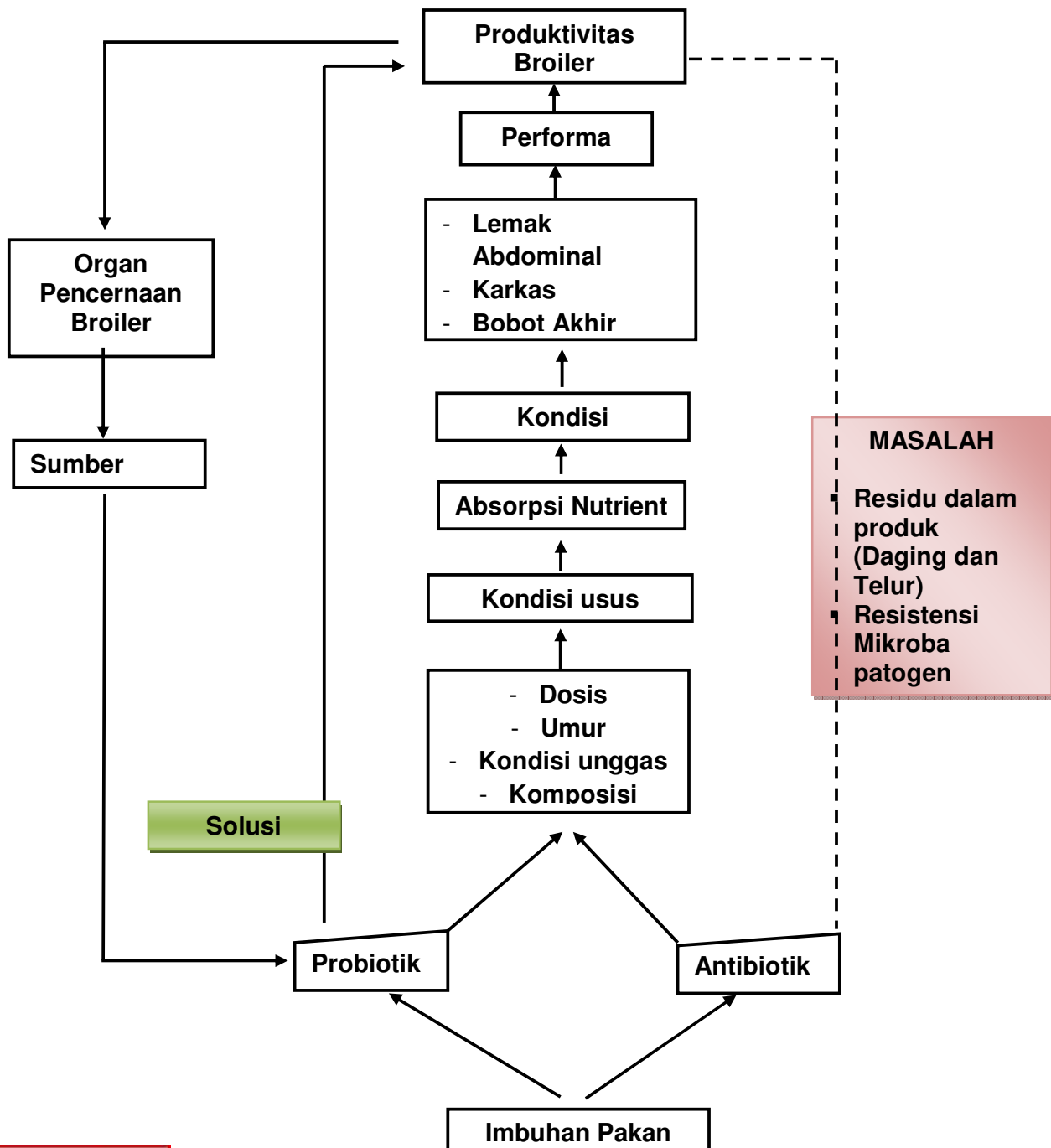
(ak). Pemanfaatan mikroba probiotik terutama kelompok Bakteri asam laktat (BAL) bukanlah suatu hal yang baru bagi manusia, karena hal



tersebut telah lama dimanfaatkan dalam proses pengawetan pangan, seperti pembuatan susu fermentasi. Namun pemanfaatannya sebagai imbuhan pakan, baru populer setelah antibiotika mulai dibatasi bahkan dilarang penggunaannya pada ternak terutama di negara-negara maju.

Saluran pencernaan broiler dihuni oleh mikroba yang bersifat menguntungkan (probiotik) dan merugikan (patogen). Mikroba kelompok BAL asal saluran pencernaan broiler dapat dikembangkan menjadi sumber isolat baru probiotik yang kemudian dibuat dalam bentuk produk cair atau tepung. Mikroba probiotik dalam saluran pencernaan broiler dapat memperbaiki fungsi fisiologi usus halus dan status kesehatan (hematologi) ternak dengan cara menghambat pertumbuhan mikroba patogen, memperbaiki fungsi penyerapan vili dan *crypt* usus halus. Oleh karena itu penemuan isolat BAL asal saluran pencernaan broiler itu sendiri sebagai kandidat probiotik untuk mengurangi penggunaan antibiotik hanya dapat terwujud melalui penelitian yang berkelanjutan. Kerangka penelitian disajikan pada Gambar 1.





Gambar 1. Kerangka konseptual penelitian

O. Hipotesis Penelitian

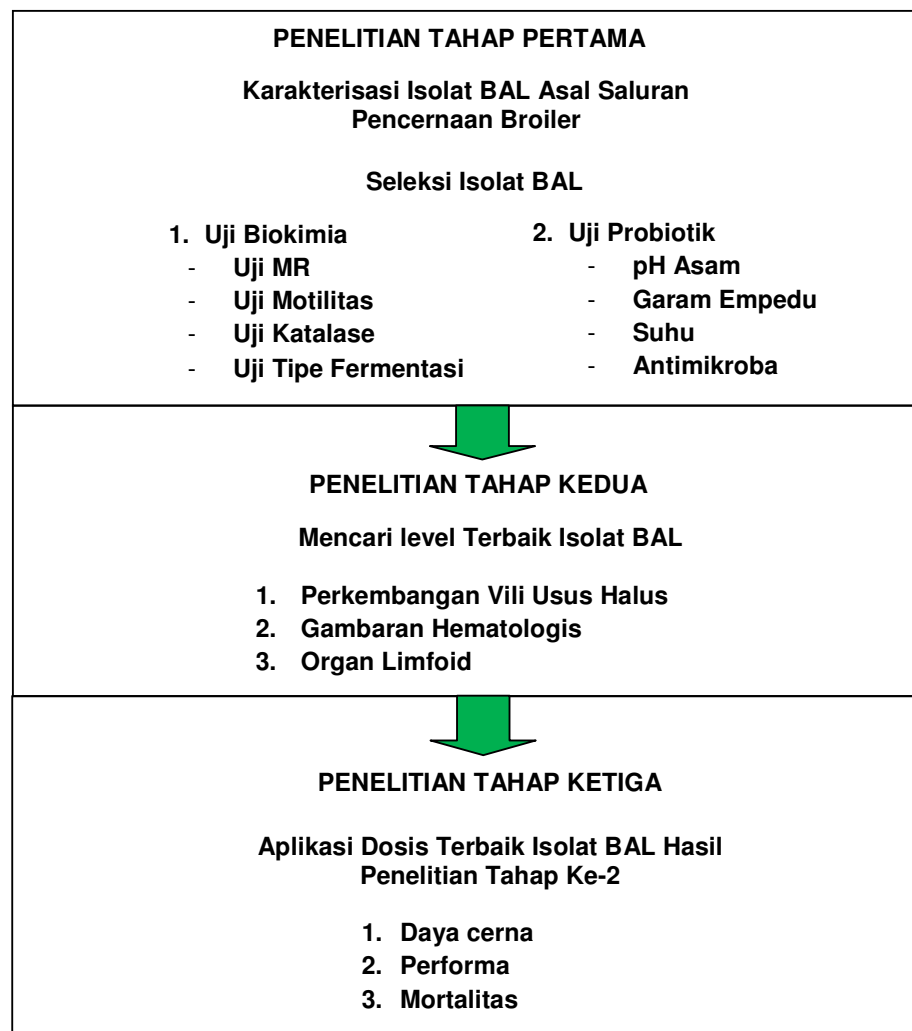
1. Terdapat Isolat bakteri yang memiliki karakteristik BAL yang diisolasi pada saluran pencernaan broiler umur tiga
2. Isolat BAL yang diisolasi pada saluran pencernaan broiler umur tiga hari dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik pada broiler.
3. Terdapat minimal satu level optimum Isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga sebagai kandidat probiotik
4. Isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga sebagai kandidat probiotik dapat memperbaiki histologi vili usus halus, gambaran hematologis, organ limfoid, daya cerna, performa dan mortalitas broiler.
5. Isolat BAL asal saluran pencernaan DOC broiler sebagai kandidat probiotik dapat mengurangi penggunaan antibiotik pada broiler.



BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah dilaksanakan dalam tiga tahap, seperti yang disajikan pada Gambar 2 berikut ini.



Gambar 2. Alur pelaksanaan penelitian



A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Nopember 2016 sampai Desember 2017. Pembuatan probiotik dari BAL yang terpilih dalam bentuk cair dilakukan pada Laboratorium Bioteknologi Pengolahan Susu, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Analisis kandungan nutrisi ransum penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin. Analisis histologi usus halus dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin dan Balai Besar Veteriner (BBVET) Kabupaten Maros. Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Tinggi Teknologi Pertanian, Gowa. Laboratorium *Science Bulding*, Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin, Makassar. Penelitian daya cerna dan performa dilaksanakan di Laboratorium Ternak Unggas Jurusan Ilmu Peternakan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin, Makassar.

B. Prosedur Penelitian

1. Penelitian Tahap Pertama

Tujuan Penelitian

1. Mengisolasi dan mengetahui karakteristik isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari .
2. Mengetahui kemampuan tumbuh isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari yang berpotensi untuk



dikembangkan sebagai kandidat probiotik pada berbagai uji probiotik.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini, yaitu erlenmeyer, inkubator, oven, neraca analitik, pipet tetes, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, mikroskop, gelas objek, *hot plate*, corong, batang pengaduk, tabung Durham, lemari pendingin, penjepit tabung, rak tabung reaksi, spoit, termos, autoklaf, *scalpel*, pastel, dan jangka sorong, *micropipet* (Biohit 0,5-10 μ L; 10-100 μ L; 20-100 μ L) (Biorad 100-1000 μ L), *tip filter*, *vortex*, *waterbath*, tabung *Eppendorf*, *GD column*, *collection tube*, sentrifugasi dingin (MPW-260R), *DNA thermal cycler* (*Applied Biosystems*), elektroforesis+tip supply, perangkat lampu ultraviolet + kamera digital, *microwave*, mikroskop, stopwatch, *freezer -20⁰C*, kaca mata anti UV, Erlenmeyer 250 mL, tabung vial, gegep kayu, sarung tangan.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam isolasi BAL, yaitu saluran pencernaan(usus halus) broiler umur tiga hari, air suling, alkohol 70% dan 95%, medium selektif MRSA (*deMan Ragosa Sharpe Agar*) (ACUMEDIA), MRSB (*deMan Ragosa Sharpe Broth*, reagen H₂O₂, medium MR-VP (*Methyl Red*), medium SIM (*Sulfid Indol Motility*) (MERCK), medium NA (*Nitro Blue Tetrazolium Agar*) (MERCK), KOH 40%, CaCO₃, pewarnaan Gram (Kristal



Violet, lugol, alkohol-aseton, dan safranin), NaCl fisiologis, HCl 0.1 N, garam empedu sintetik (*oxgall*), minyak emersi, kapas, *paper disk*, aquades, kertas lakmus, dan aluminium foil, minyak emersi, Presto mini gDNA *Bacteria Kit* (100 Preps) Gram (+) buffer, *lysozyme*, proteinase K, etanol absolut, larutan GB buffer, larutan *wash buffer*, elution buffer), marker 250 bp, serbuk agarose, etidium bromide, TBE buffer, label, *nuclease free water*, 2x KAPA 2G Fast Ready Mix, gen 16S rRNA *primer forward* 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan *primer reserve* 1387R (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3').

Pelaksanaan Penelitian

1. Isolasi kandidat BAL

Usus halus broiler umur tiga hari dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian dilarutkan dengan air suling dan dihomogenkan dengan *stomacher* selama 30 detik. Usus halus yang sudah dilarutkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril untuk dilakukan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} . Hasil pengenceran 10^{-7} dan 10^{-8} diambil masing-masing 1 mL kemudian diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi media MRSA (Oxoid) yang telah ditambahkan CaCO_3 1%, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam dalam kondisi anaerob. Koloni BAL dapat dikenali dengan terbentuknya zona

yang disekitar koloni.

Morfologi koloni yang terpilih diamati warnanya, tepian koloni, bentuk koloni dan elevasi koloni. Selanjutnya koloni terpilih diisolasi



dengan metode goresan pada cawan petri yang berisi media MRSA yang telah diberi CaCO_3 1%. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pemurnian dilakukan dengan penggoresan berulang pada medium dan kondisi yang sama sehingga didapatkan koloni tunggal.

Isolat murni yang terpilih kemudian diidentifikasi berdasarkan karakteristik BAL, yaitu pengamatan morfologi dan ciri fisiologi yang meliputi bentuk koloni dan pengecatan Gram, serta uji biokimia (*methyl red* (MR), uji motilitas, uji katalase, dan uji tipe fermentasi).

2. Identifikasi karakteristik morfologi secara mikroskopik dengan pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dengan alkohol 96% kemudian difiksasi di atas lampu spiritus, selanjutnya isolat aktif diambil secara aseptik 1 ose dan diletakkan di atas gelas objek lalu diratakan. Difiksasi kembali di atas lampu spiritus. Setelah dingin ditetaskan cat Gram A (kristal violet) 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Setelah itu ditetesi dengan Gram B (Iodium) selama 1` menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Kemudian ditetesi dengan Gram C (Alkohol 96 %) selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Terakhir ditetesi dengan Gram D (Safranin) selama 45 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan kelebihan air dihilangkan dengan kertas serap. Pengamatan ini dilakukan dengan

cat bentuk dan warna sel dibawah mikroskop dengan pembesaran

ntu.



3. Uji biokimia

3.1. Uji MR (*Methyl Red*)

Sebanyak 1 ose isolat bakteri diambil dari stok kultur dan diinokulasikan pada medium MR cair dalam tabung reaksi. Selanjutnya dinkubasi selama 5 x 24 jam pada suhu 37⁰C. Sebanyak 5 tetes MR ditambahkan di atas preparat isolat bakteri. Hasil positif apabila terbentuk kompleks berwarna merah muda sampai merah yang menandakan bahwa mikroba tersebut menghasilkan asam.

3.2. Uji motilitas

Isolat bakteri sebanyak satu ose diambil kemudian diinokulasikan dengan cara ditusuk secara vertikal hingga pertengahan medium SIM (*sulfide indol motility*), lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Motilitas (hasil positif) bakteri ditunjukkan apabila terdapat pertumbuhan pada permukaan medium dan bakteri non motil (hasil negatif) tumbuh sepanjang bekas tusukan.

3.3. Uji katalase

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose pada media MRSA dan ditempatkan pada gelas objek yang bersih. Sampel kemudian ditetesi reagen H₂O₂ 3% dan dibiarkan beberapa saat. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung, dan uji negatif apabila tidak terbentuk

mbung.



3.4. Uji tipe fermentasi

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose untuk dimasukkan kedalam tabung hungate yang berisi 9 mL MRSB dan tabung durham, kemudian diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam pada suhu 37⁰C secara anaerob. Selanjutnya dilakukan pengamatan kedalam tabung Durham untuk melihat munculnya gelembung udara. Apabila terbentuk gelembung udara, maka uji fermentasi berlangsung secara heterofermentatif (positif), sedangkan jika tidak terbentuk gelembung udara, maka uji fermentasi secara homofermentatif (negatif) (AOAC, 1995).

4. Uji probiotik

Setiap koloni tunggal yang berbeda dan terbentuk setelah pemurnian kemudian masing-masing diinokulasikan pada medium MRSA miring untuk persiapan pengujian selanjutnya.

4.1. Uji ketahanan terhadap kondisi pH asam

Sebelum dilakukan uji ketahanan terhadap pH, maka terlebih dahulu dilakukan penyegaran dengan menumbuhkan 1 ose kultur BAL dalam medium MRSB kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi anaerob. Kultur yang telah diremajakan selanjutnya diinokulasikan pada media MRSB yang ditambahkan HCl 0,1 N untuk menurunkan pH dan NaOH untuk menaikkan pH. Selanjutnya diinkubasi selama 24, dan 48, jam suhu 37⁰C. Perhitungan jumlah koloni dilakukan dengan menggunakan metode hitung cawan. Kultur yang telah ditumbuhkan pada



media MRSB yang telah diatur pHnya sesuai perlakuan kemudian dilakukan pengeceran secara bertingkat. Dua pengeceran terakhir diambil 1 mL untuk ditanam (duplo) pada media MRSA dan diinkubasi selama 24 jam. Selisih antara jumlah koloni kontrol (pH 7) dengan pH perlakuan (pH 2, 3, 4, 5, dan 6) merupakan indikator ketahanan isolat terhadap pH asam (Zavaglia *et al.*, 1998; Dewi dan Anggraini, 2012). Jumlah koloni yang tumbuh dihitung berdasarkan rumus berikut.

$$\text{Jumlah koloni} = \sum \text{koloni yang tumbuh pada cawan} \times \frac{1}{\text{Faktor pengeceran}}$$

4.2. Uji ketahanan terhadap garam empedu

Sebelum dilakukan uji ketahanan garam empedu, maka terlebih dahulu dilakukan penyegaran dengan menumbuhkan 1 ose kultur BAL dalam medium MRSB kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam kondisi anaerob. Kultur yang telah diremajakan selanjutnya diinokulasikan pada media MRSB (kontrol) dan MRSB + 0.3% (b/v) garam empedu. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24, dan 48. Dua pengeceran terakhir diambil 1 mL untuk ditanam (duplo) pada media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 dan 48 jam. Selisih antara jumlah koloni yang tumbuh pada media MRSA (kontrol) dengan MRSB + 0,3% garam empedu merupakan indikator ketahanan isolat terhadap garam empedu (Lin *et al.*, 2006). Jumlah koloni yang tumbuh dihitung berdasarkan sama dengan perhitungan pada uji ketahanan asam.



4.3. Uji pertumbuhan suhu optimum

Isolat BAL diambil dari stok sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium MRSB. Selanjutnya medium yang telah berisi isolat diinkubasi pada temperatur 30⁰C, 37⁰C, dan 41⁰C selama 24 dan 48 jam. Kemudian diamati apakah terjadi pertumbuhan bakteri pada medium. Hasil positif jika terjadi pertumbuhan (keruh atau endapan) bakteri pada kisaran temperatur tersebut.

4.4. Uji aktifitas antimikroba

Sebelum dilakukan uji aktivitas antimikroba, maka terlebih dahulu dilakukan penyegaran dengan mengambil satu ose kultur BAL dari media agar miring Nutrien Agar (NA) kedalam dalam medium 10 mL MRSB kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam dalam kondisi anaerob. Biakan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhimurium* dimasukkan sebanyak 0,2 mL pada erlenmeyer yang berisi medium NA 100 mL yang telah dicairkan. Medium NA yang berisi bakteri patogen dituang ke dalam cawan petri sekitar 20 mL yang sebelumnya telah dimasukkan ring. Selanjutnya ring yang telah ditanam ke dalam cawan petri dikeluarkan sehingga terbentuk lubang (sumuran). Isolat BAL kemudian dimasukkan ke dalam lubang sebanyak 50 µL. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 dan 48 jam. Zona bening yang terbentuk disekitar isolat BAL diukur dengan mistar (Garriga *et al.*, 1993).



5. Identifikasi isolat dengan pendekatan molekuler

Sebelum dilakukan uji molekuler, maka terlebih dahulu dilakukan penyegaran isolat dengan menumbuhkan 1 ose kultur BAL dalam medium MRSB kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi anaerob.

5.1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses yang bertujuan memisahkan DNA dengan komponen-komponen sel yang lain. Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengikuti protokol ekstraksi DNA yang terdapat dalam Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit, yaitu preparasi sampel, melisiskan sel, pengikatan DNA (*DNA binding*), pencucian (*Wash*), dan elusi (*Elution*).

1. Preparasi sampel

Bakteri Gram negatif,

Sebanyak 1 ose (1×10^9 sel) sampel bakteri Gram negatif dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 mL kemudian disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 13.900 rpm lalu supernatant dibuang. Ditambahkan 180 μ L *GT buffer* kemudian suspensi ulang pelet sel dengan menggunakan vortex atau pipet. Tambahkan juga 20 μ L proteinase K, inkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit, selama inkubasi setiap 3 menit tabung dibolak-balik untuk menjaga homogenitasnya.



Bakteri Gram positif

Sebanyak 1 ose (1×10^9 sel) sampel bakteri Gram (+) positif di masukkan ke dalam taabung mikrosentrifuge 1,5 mL, kemudian disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 13.900 rpm lalu supernatant dibuang. Masukkan 200 μ L Gram (+) *buffer* ke tabung sentrifuge dan tambahkan *lysozyme* (4 mg/mL) lalu vortex sampai *lysozyme* benar-benar larut. Kemudian di masukkan larutan Gram (+) *buffer* yang telah ditambahkan *lysozyme* ke dalam sampel, kemudian suspensi ulang pelet sel dengan menggunakan vortex atau pipet. Inkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit. Selama inkubasi lakukan pembalikan beberapa kali. Setelah itu, tambahkan 20 μ L proteinase K, kemudian di vortex agar tercampur. Inkubasi pada suhu 60⁰C selama 10 menit, selama inkubasi setiap 3 menit tabung dibolak-balik untuk menjaga homogenitasnya.

2. Melisis sel (*cell lysis*)

Proses selanjutnya, yaitu sampel bakteri (Gram (+) positif dan Gram (-) negatif ditambahkan 200 μ L GB (*Geneaid Buffer*) kemudian divortex sekitar 10 detik. Selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu 70⁰C. selama inkubasi, tabung dibaolak-balikan setiap 3 menit.



3. Pengikatan DNA (*DNA Binding*);

Sampel ditambahkan 200 μL etanol absolut kemudian divortex selama 10 detik. Selanjutnya sampel dipindahkan kedalam GD *column* yang telah terpasang pada *collection tube* (tabung koleksi) dan disentrifuge dengan kecepatan 13.900 rpm selama 2 menit pada suhu 4⁰C.

4. Pencucian (*Wash*);

Selanjutnya dilakukan penggantian tabung koleksi yang baru yang terdapat pada GD *column*. Tabung koleksi baru ditambahkan 400 μL *Wash Buffer* (WB) kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 13.900 rpm selama 30 detik, kemudian cairan dibuang yang terdapat pada tabung koleksi. Selanjutnya ditambahkan 600 μL *Wash Buffer* (WB) kemudian disentrifuge dengan kecepatan 13.9000 rpm selama 30 detik, kemudian cairan dibuang lagi yang terdapat pada tabung koleksi. Dilakukan penggantian tabung koleksi yang terdapat dibawah GD *column* dengan yang baru. Selajutnya disentirufuge kembali dengan kecepatan 13.9000 rpm selama 1 menit sampai *matrix column* kering.

5. Elusi (*Elution*);

GD *Column* dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf* steril ditambahkan 80 μL *elution buffer* (dipanaskan sebelumnya pada suhu 70⁰C) setelah itu di sentifuge dengan kecepatan 13.900 rpm selama 3 menit. Supernatan yang tertampung pada tabung



ependorf disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan sebagai template pada proses amplifikasi DNA dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

5.2. Amplifikasi gen 16S rRNA

Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diisolasi, Sebelumnya dibuat campuran *Master Mix* PCR untuk satu reaksi, yaitu masing-masing $1,25\ \mu\text{L}$ DNA gen 16S rRNA *primer forward* 63F dan $1,25\ \mu\text{L}$ primer reserve 1387R, $1,25\ \mu\text{L}$ 2G KAPA 2G Fast Ready Mix+Dye, $5\ \mu\text{L}$ *nuclease free water* dan $5\ \mu\text{L}$ ekstrak DNA dimasukkan kedalam tabung vial, kemudian akan diamplifikasi pada DNA *thermal cycler* (Hybaid OMIN-E). Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dan setiap siklus terdiri predenaturasi dan denaturasi pada suhu 95°C dengan waktu masing-masing selama 3 menit dan 10 detik (35 siklus), *annealing* pada suhu 55°C selama 10 detik (35 siklus) dan *extending* pada suhu 72°C terdiri dari *extending* selama 30 detik (35 siklus) dan *post extending* 1 menit.

5.3. Deteksi produk PCR (Elektroforesis)

Proses elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarosa. Gel agarosa 1,5% dibuat dengan mencampurkan 1,5 g serbuk agarosa ke dalam 100 mL *Tris Borate EDTA buffer* (TBE) pada erlenmeyer kemudian dipanaskan sampai mendidih dan dihomogenkan dengan *hot plate and* *stirrer*, selanjutnya ditambahkan $8\ \mu\text{L}$ *Ethidium Bromida*. Selanjutnya agarosa dituangkan ke cetakan gel elektroforesis yang telah dipasang



sisir. Setelah agarosa memadat kemudian dimasukkan ke dalam tangki yang berisi *TBE buffer*. Masing-masing 1 μL produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5%. Untuk mengetahui ukuran produk amplifikasi PCR, maka dimasukkan marker 100 bp pada sumur pertama dan diikuti DNA sampel hasil amplifikasi pada sumur kedua dan seterusnya sebagai pemberat. Ditambahkan loding dye sebanyak 2 μL untuk setiap sampel produk amplifikasi DNA, lalu dihomogenkan dengan cara *pipetting*. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 50 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk dipindahkan kedalam alat *gel doc* dan diamati dibawah sinar UV. Hasilnya akan terbaca pada komputer.

5.4. Sekuensing DNA

Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis positif selanjutnya dikirim ke PT. Genetika Indonesia untuk dilakukan sekuensing DNA. Hasil sekuensing urutan nukleotida dari hasil sekuensing gen 16S rRNA dianalisis dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) yang tersedia secara online pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk dilihat tingkat kesesuaian data spesies pada *Gen Bank*.



2. Penelitian Tahap Kedua

Tujuan Penelitian

Mendapatkan level optimum isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik dalam memperbaiki histologi vili usus halus, nilai hematologis dan bobot relatif organ limfoid.

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian tahap kedua, yaitu: termometer, tabung reaksi, pisau, skapel, timbangan, talang, tempat pakan, tempat minum (500 mL), skop, kandang unit percobaan 20 petak, lampu pijar 60 watt (20 buah), pipet eritrosit, mikroskop, *microtome*, hemoglobinometer, mikrohematokrit, *centrifuge*, dan haemositometer.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian tahap kedua, yaitu: Isolat BAL terpilih, broiler umur sehari (DOC) sebanyak 80 ekor dengan jenis kelamin jantan dan betina (campur). Desinfektan (Rodalond dengan komposisi *Cetylpyridium Chloride* 1%, *Cetylpyridium Ammonium Bromide* 2%, dan *Benzalkonium Chloride* 2%), serbuk gergaji, air minum, ransum basal (ransum *starter* dan *finisher*), imbuhan pakan (Isolat BAL asal saluran pencernaan broiler yang terpilih sebagai kandidat probiotik), *Ethylene Diamine Tetra Acetic* (EDTA) larutan Hayem, larutan rees dan Ecker, larutan *Giesma*, *Methanol*, HCL 0,1 N, *crestaseal*, *Buffer Normal Salin* 10% (BNF), Alkohol (70%, 80%, 90%, 95%),, alkohol absolut, *dest*, *xylo*, parafin, pewarna hematoksiklin dan eosin.



Pelaksanaan Penelitian

1. Tahapan Persiapan

1.1. Pembuatan probiotik cair

Kultur Isolat BAL terpilih diaktifkan melalui penyegaran dengan cara ditumbuhkan di dalam media MRSB (*deMann Rogossa Sharpe Broth*) dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kultur isolat kemudian diambil satu ose pada media MRSB dan diinokulasikan pada media MRSA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam untuk mendapatkan kultur stok.

Susu skim direkonstitusi 10% (b/v) dan disterilkan pada suhu 105⁰C selama 5 menit. Setelah campuran dingin pada suhu 40⁰C diinokulasikan kultur kerja sebanyak 3% (Kultur diaktivasi sebelum digunakan sebagai kultur kerja pada media MRS Broth). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Probiotik yang telah dibuat dihitung jumlah koloninya.

1.2. Kandang dan peralatannya

Pada penelitian tahap kedua digunakan 20 unit kandang sistem litter (serbuk gergaji setebal 15 cm) yang berukuran masing-masing 80 x 60 x 50 cm. Setiap unit kandang dilengkapi lampu pijar 60 watt yang (sebagai pemanas), tempat air minum kapasitas 500 mL, tempat pakan (pampas ukuran 15 x 20 cm) dan tempat pakan gantung. Satu minggu sebelum penelitian dilakukan, maka setiap unit kandang dan peralatan lebih dahulu dibersihkan dan didesinfektan (Rodalon dengan komposisi



Cetylpyridium Chloride 1%, *Cetylpyridium Ammonium Bromide* 2%, dan *Benzalkonium Chloride* 2%).

1.3. Ransum dan Air minum

Ransum yang digunakan, yaitu ransum *starter* (umur 1-21 hari) dan *finisher* (umur 22-35 hari). Ransum dan air minum diberikan secara *ad libitum* mulai pada umur satu hari sampai 35 hari.

Tabel 4. Komposisi ransum basal selama penelitian

Jenis Bahan Pakan	<i>Starter</i>	<i>Finisher</i>
Jagung (%)	53	60
Dedak Padi (%)	6	5
Bungkil Kedele (%)	28	21.2
MBM (%)	8	8.3
Minyak Kelapa (%)	3	3.3
CaCO ₃ (%)	0.8	1
DPO (dicalcium phosfat) (%)	0.3	0.2
DL-metionin	0.1	0.2
L-Lysin	0.3	0.5
Vitamiks* (%)	0.5	0.3
Total	100	100
Protein Kasar %	22.75	20.11
Energi metabolisme kkal/kg	3030	3105
Serat Kasar (%)	3.6	3.3
Lemak (%)	6.7	6.9
Posphor (%)	0.79	0.71
Kalsium (%)	1.43	1.43
Metionin (%)	0.35	0.32
Lysin (%)	1,17	1.00

*Setiap 1 Kg Vitamiks mengandung Vitamin A 4000,000 IU, Vitamin D3 800,000 IU, Vitamin E 4,500 mg, Vit K3 450mg, Vitamin B1 450 mg, Vitamin B2 1,350 mg, Vitamin B6 480 mg, Vit B12 6 mg, Ca-dP 2,400 mg, As folate 270 mg, Nicotinic acid 7,200 mg, choline chloride 28,000 mg, DL-Met 28,000 mg, L-Lys 50,000 mg, Fe 8,500 mg, Cu 700 mg, Mg 18,500 mg, Zn 14,000 mg, Co 50 mg, I 70 mg, Se 5 mg, and antioxidants.



2. Rancangan penelitian

Penelitian tahap kedua dilakukan secara eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat empat perlakuan dengan lima ulangan, setiap ulangan diberikan empat ekor broiler. Pada hari ke-1 sampai hari ke-14, probiotik diberikan setiap hari melalui 150 mL air. Pada hari ke-15 sampai hari ke-35, probiotik diberikan setiap hari melalui 250 mL air.

Perlakuan Penelitian

P0 = Ransum basal (kontrol)

P1 = Ransum basal + Probiotik 1 mL/hari

P2 = Ransum basal + Probiotik 3 mL/hari

P3 = Ransum basal + Probiotik 5 mL/hari

Keterangan: Setiap 1 mL mengandung BAL (5.8×10^7 CFU/mL)

3. Pemeliharaan ayam

Day Old Chicken (DOC) ditimbang untuk mengetahui bobot badan awal sebelum diberikan perlakuan. Sebanyak 80 ekor DOC broiler berjenis kelamin jantan dan betina di tempatkan ke dalam kandang unit percobaan yang telah diacak sesuai perlakuan yang diberikan. Pada hari pertama, setiap kandang unit percobaan telah disiapkan air minum larutan gula 2%. Lampu pijar 60 watt digunakan sebagai pemanas buatan selama masa *brooding*. Selepas masa *brooding* lampu pijar hanya digunakan sebagai penerangan pada malam hari pada kandang utama.



Parameter yang diukur

1. Histologi vili usus halus

1.1. Pembuatan preparat histologi

Sebanyak lima ekor broiler dari setiap perlakuan (satu ekor per ulangan) diambil pada hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-35 untuk dilakukan pengamatan dan pengukuran histologi villi usus halus (duodenum, jejunum, dan ileum). Potongan sediaan usus halus bagian duodenum, jejunum, dan ileum diambil dan direndam dalam *Buffer Netral Formalin* (BNF) 10% sebelum dibawa ke Laboratorium.

Potongan sediaan usus halus (duodenum, jejunum, dan ileum) dengan ketebalan sekitar 2 mm dimasukkan ke dalam *tissue basket*, kemudian dilakukan tindakan dehidrasi. Tindakan dehidrasi dilakukan dengan merendam sediaan tersebut secara berturut-turut masing-masing dua jam ke dalam larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 95%. Setelah itu direndam ke dalam alkohol absolut selama dua jam. Selanjutnya dilakukan proses penjernihan dengan *xylol* selama satu jam. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam parafin (proses *infiltrating*) yang berada di dalam inkubator pada suhu 56⁰C selama satu jam. Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam alat pencetak yang diatur susunannya sedemikian rupa dan diisi parafin cair dengan menggunakan *paraffin embedding console*. Setelah itu, sediaan dibiarkan sampai parafin mengeras hingga

untuk dipotong (Gulo, 2013).

Pemotongan jaringan dilakukan dengan mikrotom pada ketebalan μm . Hasil potongan ditempelkan pada gelas objek, kemudian



dikeringkan dan siap untuk diwarnai. Tahap pewarnaan diawali dengan melakukan deparafinisasi dan rehidrasi. Proses tersebut dilakukan dengan cara memasukkan preparat berturut-turut kedalam larutan xilol, alkohol absolut, alkohol 95%, 90%, 80%, 70% dan air masing-masing selama dua menit. Setelah itu, preparat diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air kran mengalir. Setelah itu dimasukkan ke dalam eosin sekitar 20 menit, kemudian aquadest lalu direhidrasi kembali. Akhirnya, preparat ditetesi perekat (entelan), lalu ditutup dengan gelas penutup dan siap untuk dilihat menggunakan mikroskop cahaya (Gulo, 2013). Selanjutnya dilakukan pengukuran tinggi vili, lebar apikal vili, dan lebar basal vili.

1.2. Luas Permukaan Vili

Luas Permukaan usus halus yang diukur pada bagian duodenum, jejunum dan ileum. Luas permukaan per vili dihitung dengan mikroskop pada pembesaran objektif 10 kali dan video mikrometer pada 10 lapang pandang setiap preparat histopatologi. Pengukuran pada tinggi villi, lebar apikal vili, dan lebar basal vili dilakukan. Selanjutnya luas permukaan vili dihitung menurut metode Iji *et al.*, (2001).

$$\text{Luas permukaan per vili} = \frac{(a + b)}{2} \times c$$

a = lebar basal vili

b = lebar apikal vili

c = Tinggi vili



1.3. Kerapatan Vili Usus Halus

Kerapatan vili dihitung pada bagian duodenum, jejunum dan ileum usus halus. Kerapatan vili dihitung berdasarkan jumlah vili pada satu milimeter panjang usus dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran objektif empat puluh kali (4×10) dan video mikrometer. Jumlah vili dihitung pada 10 lapang pandang pada setiap preparat histologi (Iji *et al.*, 2001).

2. Gambaran Hematologis

Pengambilan sampel darah dilakukan pada akhir penelitian pada broiler yang telah diberikan tanda khusus untuk setiap ulangan dalam perlakuan. sampel darah diambil secara langsung dari bagian vena axillaris pada sayap sebanyak 3 cc menggunakan *spoite* yang mengandung antikoagulan.

2.1 Nilai Eritrosit

Jumlah sel darah merah dapat diketahui dengan menggunakan hemasitometer. Darah dihisap dari tabung dengan pipet eritrosit dengan bantuan alat pengisap (aspirator) sampai batas angka 0,5. Kemudian dicampur dengan pelarut Hayem sampai dengan batas 101 yang tertera pada pipet. Isi pipet dikocok selama 30 detik dengan membuat gerakan angka delapan. Kamar hitung dan kaca penutup diletakkan mendatar di atas meja. Cairan yang ada pada batang kapiler dibuang tiga tetes. Setelah itu pipet disentuhkan dengan posisi sekitar 30 derajat dengan menyentuh bagian pinggir kaca penutup pada kamar hitung, dan



diteteskan cairan sampai kamar hitung akan terisi cairan. Setelah kamar hitung terisi penuh, selanjutnya dibiarkan dua menit agar mengendap. Kamar hitung terbagi dalam 25 kotak kecil-kecil. Sel eritrosit dihitung dalam lima kotak, yaitu satu kotak ditengah, dua kotak pojok atas dan dua kotak pojok bawah (ukurannya 1 mm² dengan kedalam 1/10 mm). Cairan dimasukkan ke kamar hitung kemudian dilakukan penghitungan di bawah mikroskop pada pembesaran 40 kali (Ebenebe *et al.*, 2012 dan Winarsih, 2005). Jumlah eritrosit dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Jumlah eritrosit per mm}^3 \text{ darah} = \frac{E}{R} \times \text{Pengeceran (kali)}$$

Keterangan: E = Jumlah sel eritrosit yang dihitung dalam hemositometer

$$\begin{aligned} R &= \text{Jumlah kamar hitung} \times \text{Volume kamar hitung (mm}^3\text{)} \\ &= 5 \times 0.2 \times 0,2 \times 0.1 \\ &= 0.02 \end{aligned}$$

2.2 Nilai Hematokrit

Nilai hematokrit diukur menggunakan metode mikrohematokrit (*microcapillary hematocrit reader*). Pengisian pipa mikrokapiler dilakukan dengan memiringkan tabung yang berisi sampel darah dengan menempatkan ujung mikrokapiler yang bertanda merah atau biru. Pipa diisi sampai mencapai 4/5 bagian pipa kapiler, kemudian ujung pipa disumbat dengan bahan penyumbat (*crestaseal*), selanjutnya pipa mikrokapiler tersebut disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm hingga terbentuk lapisan plasma, lapisan putih abu, dan lapisan merah. Nilai hematokrit ditentukan dengan mengukur persentase



volume eritrosit dari darah dengan menggunakan alat baca mikrohematokrit (*microcapillary hematocrit reader*) (Ebenenbe *et al.*, 2012).

2.3 Kadar Hemoglobin

Tabung Sahli diisi dengan larutan HCl 0.1 N sampai dengan angka 10 (garis paling bawah pada tabung). Darah dihisap menggunakan pipet Sahli beserta aspiratornya sampai batas angka 20 (0.02 mL) secara perlahan-lahan. Ujung pipet dibersihkan dan darah yang ada di dalamnya segera dikeluarkan ke dalam tabung Sahli. Tabung Sahli diletakkan di antara kedua bagian standar warna dalam alat hemoglobinometer. Pencampuran antara darah dan HCl 0,1 N dibiarkan selama 3 menit sampai terbentuk asam hematin yang berwarna coklat. Kemudian setetes demi setetes aquades ditambahkan ke dalam tabung sambil diaduk sampai warnanya sama dengan warna standar. Nilai hemoglobin ditentukan dengan melihat skala jalur g% tinggi permukaan cairan pada tabung Sahli. Nilai yang diperoleh menunjukkan banyaknya hemoglobin dalam gram per 100 mL darah (Sastradipradja dkk., 1989).

2.4 Jumlah leukosit

Jumlah leukosit diperoleh dengan menggunakan metode kamar hitung hemasitometer. Perhitungan jumlah leukosit dilakukan dengan cara dihisap menggunakan pipet leukosit (pipet sel darah putih) dengan menggunakan alat pengisap aspirator hingga tanda 1.0. Setelah itu ujung pipet dibersihkan dengan tisu. Pipet kemudian digunakan untuk mengambil



larutan pengecer *Rees* dan *Ecker* sampai tanda 101 pada ujung lain pipet tersebut. Selanjutnya sampel dimasukkan kedalam kamar hitung (hemasitometer) dan dibiarkan butir-butir darah yang ada mengendap. Jumlah leukosit dihitung dengan bantuan mikroskop pada 5 bidang pandang, yaitu satu kotak ditengah (kotak eritrosit), dua kotak pojok atas dan dua kotak pojok bawah (ukurannya 1 mm² dengan kedalam 1/10 mm). Perhitungan butir darah putih dihitung di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 kali. (Ebenenbe *et al.*, 2012; Sastradipradja, *et al.*, 1989). Jumlah leukosit dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Jumlah leukosit per mm}^3 \text{ darah} = \frac{L}{R} \times \text{Pengeceran (kali)}$$

Keterangan: L = Jumlah sel leukosit yang dihitung dalam hemositometer

$$\begin{aligned} R &= \text{Jumlah kamar hitung} \times \text{Volume kamar hitung (mm}^3\text{)} \\ &= 5 \times 1 \times 1 \times 0.1 \\ &= 0.5 \end{aligned}$$

2.5 Indeks eritrosit

Indeks eritrosit meliputi MCV (*Mean Corpuscular Volume*), MCH (*Mean Corpuscular Haemoglobin*), dan MCHC (*Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration*) dihitung berdasarkan rumus berikut ini (Dienye and Olumuji, 2014).

$$\begin{aligned} \text{MCV (fl)} &= \frac{\text{Hematokrit} \times 10}{\text{Jumlah Eritrosit}} \\ \text{MCH (pg)} &= \frac{\text{Hemoglobin} \times 10}{\text{Jumlah Eritrosit}} \\ \text{MCHC (g/dl)} &= \frac{\text{Hemoglobin} \times 100}{\text{Jumlah Hematokrit}} \end{aligned}$$



3. Pengukuran Organ Limfoid

Pengukuran organ limfoid, yaitu bursa fabrisius, timus dan limpa dilakukan dengan cara broiler dipotong. Selanjutnya organ limfoid dikeluarkan dari tubuh ayam. Persentase bobot relatif bursa fabrisius, timus dan limpa dihitung dengan timbangan analitik .

$$\text{Organ Limfoid} = \frac{\text{Bobot organ limfoid (g)}}{\text{Bobot Potong (g)}} \times 100\%$$

Penelitian Tahap Ketiga

Penelitian tahap ketiga merupakan aplikasi level optimum yang diperoleh pada penelitian tahap kedua.

Tujuan Penelitian

1. Mengkaji pengaruh isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik terhadap daya cerna, performa dan mortalitas broiler.
2. Mengetahui kemampuan isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari sebagai kandidat probiotik untuk mengurangi penggunaan antibiotika pada broiler.

Alat



Alat-alat yang digunakan pada penelitian tahap ketiga, yaitu: mikroskop, termometer, tabung Sahli, sentrifugal, tabung hematokrit,

tabung reaksi, pisau, skapel, timbangan, mistar, talang, tempat pakan dan minum, skop, kandang unit (unit percobaan) 20 petak, dan lampu pijar 60 watt (20 buah).

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian tahap ketiga, yaitu: broiler umur sehari (DOC) sebanyak 100 ekor berjenis kelamin jantan dan betina. Serbuk gergaji, vaksin ND B1 dan ND Lasota, air minum, ransum basal, dan imbuhan pakan (Probiotik dan antibiotik *zinc-bacitracin*), dan Desinfektan Rodalon dengan komposisi *Cetylpyridium Chloride* 1%, *Cetylpyridium Ammonium Bromide* 2%, dan *Benzalkonium Chloride* 2%).

Pelaksanaan Penelitian

1. Tahapan Persiapan

1.1. Pembuatan Probiotik

Sebelum dilakukan pengujian level optimum isolat BAL terpilih sebagai kandidat probiotik hasil penelitian tahap kedua, maka terlebih dahulu dilakukan pembuatan stok probiotik dalam bentuk cair. Probiotik yang akan dibuat mengandung sel hidup minimal 10^7 CFU/mL.

1.2. Kandang dan peralatannya

Pada penelitian tahap kedua digunakan 20 unit kandang sistem litter (serbuk gergaji setebal 15 cm) yang berukuran masing-masing 60 x 50 cm. Setiap unit kandang dilengkapi lamput pijar 60 watt yang sebagai pemanas), tempat air minum dan tempat pakan. Satu minggu



sebelum penelitian dilakukan, maka setiap unit kandang dan peralatan terlebih dahulu dibersihkan dan didesinfektan dengan Rodalon.

1.3.Ransum dan Air minum

Ransum basal dan air minum diberikan secara *ad-libitum* berdasarkan perlakuan. Pada umur satu hari sampai 21 hari, ayam diberikan ransum *starter*. Selanjutnya umur 22 hari sampai 35 hari diberikan ransum *finisher*.

2. Rancangan Penelitian

Penelitian tahap ketiga dilakukan secara eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdapat lima perlakuan dengan lima ulangan, setiap ulangan terdapat empat ekor broiler. Pada hari ke-1 sampai hari ke-14, probiotik diberikan setiap hari melalui 150 mL air minum. Pada hari ke-15 sampai hari ke-35, probiotik diberikan setiap hari melalui 250 mL air minum.

Perlakuan Penelitian

P1 = Ransum basal tanpa antibiotika dan probiotik (Kontrol Negatif)

P2 = Probiotik 3 mL/ hari (1.7×10^8 CFU/mL)

P3 = Antibiotika *Zinc bacitracin* 75 mg/kg ransum) (Kontrol Positif)

P4 = Antibiotika 75 mg/kg ransum (hari ke-1 sampai hari ke-7), dilanjutkan pemberian probiotik 3 mL/hari (hari ke-8 sampai hari ke-35)

P5 = Antibiotika 75 mg/kg ransum (hari ke-1 sampai hari-14) dilanjutkan pemberian probiotik probiotik 3 mL/hari (hari ke-15 sampai hari ke-35)



3. Pemeliharaan ayam

Day Old Chicken (DOC) ditimbang untuk mengetahui bobot badan awal sebelum diberikan perlakuan. Sebanyak 100 ekor DOC broiler berjenis kelamin jantan dan betina di tempatkan ke dalam kandang unit percobaan yang telah diacak sesuai perlakuan yang diberikan. Pada hari pertama, setiap kandang unit percobaan telah disiapkan air minum larutan gula 2%. Lampu pijar 60 watt digunakan sebagai pemanas buatan selama masa *brooding*. Selepas masa brooding lampu pijar hanya digunakan sebagai penerangan pada malam hari pada kandang utama.

Parameter yang diukur

1. Daya cerna

Metode pengukuran kecernaan ransum dilakukan dengan metode koleksi ileal. Sebanyak tiga ekor setiap perlakuan broiler dipuaskan selama 24 jam pada akhir penelitian untuk mengeluarkan sisa ransum dalam saluran pencernaan. Air minum diberikan secara *ad libitum*. Setelah pemuasaan, selanjutnya diberikan ransum perlakuan sebanyak 100 g/ekor. Setelah 14 jam, ayam disembelih untuk mendapatkan sampel digesta pada bagian ileum, yaitu setelah 1 cm dari *Meckel's diverticulum* hingga batas 1 cm sebelum ileum-sekum percabangan. Digesta ileum dikumpulkan kemudian dikeringkan dan digiling untuk dianalisis (Abun, dan Adedokun *et al.*, 2008).



2. Performa broiler

2.1. Konsumsi ransum

Penimbangan ransum dilakukan setiap minggu dan dihitung berdasarkan (North dan Bell, 1990):

$$\text{Konsumsi Ransum} = \frac{\text{Ransum Diberikan (g)} - \text{Ransum Sisa (g)}}{\text{Jumlah Ayam (Ekor)}}$$

2.2. Konsumsi protein

Konsumsi protein dihitung berdasarkan (Khosravi *et al.*, 2008).

$$\text{Konsumsi Protein} = \text{Protein ransum (\%)} \times \text{Konsumsi Ransum (g)}$$

2.3. Rasio energi dan protein

Rasio energi dan protein yang dikonsumsi dihitung berdasarkan rumus berikut.

$$\text{Imbangan konsumsi Energi dan protein} = \frac{\text{Konsumsi energi (g)}}{\text{Konsumsi protein (g)}}$$

2.4. Pertambahan bobot badan

Pertambahan bobot badan diukur setiap minggu dengan cara mengurangi bobot badan yang diperoleh pada akhir minggu dengan bobot badan awal dari minggu sebelumnya (Rasyaf, 2003).

$$\text{Pertambahan Bobot Badan (PBB)} = \text{BB}_2 - \text{BB}_1$$

- Bobot badan ayam setiap akhir minggu (BB_2)
- Bobot badan ayam setiap awal minggu (BB_1)



2.5. Konversi Ransum

Konversi ransum merupakan perbandingan jumlah ransum yang dikonsumsi per ekor dengan penambahan bobot badan per ekor (Tipakorn, 2002).

$$\text{Konversi Ransum} = \frac{\text{Total Konsumsi Ransum Per Ekor (g)}}{\text{Pertambahan Bobot Badan Per Ekor (g)}}$$

2.6 Persentase Bobot Karkas

Setiap perlakuan diambil enam ekor untuk dihitung persentase bobot karkasnya dengan rumus (Bundy and Diggins, 1960).

$$\text{Bobot Karkas} = \frac{\text{Bobot Karkas (g)}}{\text{Bobot Ayam Hidup (g)}} \times 100 \%$$

2.7 Persentase Lemak Abdominal

Persentase Lemak abdominal dapat dihitung dengan cara mengambil lemak sekitar empedal, usus membentang sampai kloaka (*os ischium*), sekitar bursa fabrisius dan rongga perut, dipisahkan dari karkas kemudian ditimbang. Persentase lemak abdominal dihitung sebagai berikut (Waskito, 1983).

$$\text{Lemak Abdominal} = \frac{\text{Bobot Lemak Abdominal (g)}}{\text{Bobot Karkas (g)}} \times 100 \%$$



3. Persentase Ayam Hidup

Persentase ayam hidup merupakan perbandingan jumlah ayam hidup sampai akhir penelitian dengan jumlah ayam pada awal penelitian (Tipakorn, 2002).

$$\text{Persentase Ayam Hidup} = \frac{\text{Jumlah Ayam Hidup (ekor)}}{\text{Jumlah Awal Ayam (ekor)}} \times 100 \%$$

C. Analisis data

Data pada penelitian tahap pertama dianalisis secara deskriptif. Sedangkan data hasil penelitian tahap kedua dan ketiga diolah secara sidik ragam. Apabila perlakuan berpengaruh nyata, maka dilanjutkan uji wilayah berganda Duncan (Gasperz, 1994) untuk melihat adanya perbedaan diantara perlakuan dengan model matematika sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan: Y_{ij} = Hasil pengamatan dari peubah pada penggunaan bahan aditif untuk ke-i dengan ulangan ke-j

μ = Rata-rata pengamatan

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Tahap Pertama

A. Isolasi dan Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL)

1. Karakteristik morfologi, ciri fisiologi dan sifat biokimia isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari.

Dalam penelitian telah berhasil diisolasi bakteri asam laktat (BAL) dari saluran pencernaan (usus halus) broiler umur tiga hari sebanyak empat isolat. Seluruh isolat yang diperoleh bersifat Gram positif, katalase negatif, non motil, tiga isolat bersifat homofermentatif dan satu isolat bersifat heterofermentatif. Terdapat satu isolat berbentuk kokus (*coccus*) dan tiga isolat berbentuk batang (*bacilli*). Hal ini sejalan dengan pernyataan Suardana dkk., (2007), bahwa isolat BAL memiliki ciri-ciri Gram positif, morfologi sel berbentuk bulat atau batang, katalase negatif serta mampu menghasilkan asam pada media MRS.

Medium MRSA yang digunakan dalam penelitian ini merupakan medium yang direkomendasikan untuk menumbuhkan BAL. Penambahan CaCO_3 1% pada medium MRSA bertujuan untuk membendakan koloni dengan bakteri lain yang tumbuh. Menurut Djide dan Sartini (2008), selama BAL dalam pertumbuhan akan menghasilkan asam laktat, sehingga CaCO_3 yang ditambahkan dalam medium akan bereaksi dengan



asam laktat membentuk kalsium laktat yang larut dalam medium. Hasil reaksi tersebut terlihat setelah diinkubasi yang ditandai dengan terbentuknya daerah bening disekitar koloni.

Identifikasi isolat BAL asal usus halus broiler umur tiga hari berdasarkan pengamatan karakteristik morfologi sel, ciri fisiologi dan sifat biokimia (uji katalase, uji *methyl red*, uji motilitas, dan uji fermentasi) disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil identifikasi isolat BAL yang diisolasi dari saluran pencernaan broiler umur tiga hari

Kode Isolat	Morfologi Sel	Sifat Gram	Uji Katalase	Uji MR	Uji Motilitas	Uji Fermentasi
H2	Bulat	Positif	-	+	Non Motil	Homofermentatif
H3	Batang	Positif	-	+	Non Motil	Homofermentatif
H5	Batang	Positif	-	+	Non Motil	Homofermentatif
H7	Batang	Positif	-	+	Non Motil	Heterofermentatif

2. Pewarnaan Gram

Prinsip pewarnaan Gram, yaitu kemampuan dinding sel mengikat zat warna ungu (kristal violet) setelah pencucian dengan alkohol 95%.

Hasil pewarnaan Gram menunjukkan semua isolat (H2, H3, H5, dan H7)

sifat Gram positif. Hal ini ditandai dengan kemampuan isolat yang diuji mempertahankan warna ungu pada selnya. Sedangkan sel-sel yang melepaskan warna ungu dan mengikat safranin sehingga berwarna



merah muda disebut bakteri Gram negatif. Hal ini sesuai pernyataan Sari (2013), bahwa dalam pewarnaan Gram, sel-sel yang tidak dapat melepaskan warna ungu setelah dibilas dengan alkohol 95% disebut bakteri Gram positif. Sedangkan sel-sel yang dapat melepaskan warna ungu dan mengikat safranin sehingga berwarna merah muda disebut bakteri Gram negatif.

Kemampuan bakteri Gram positif untuk mengikat warna ungu, karena adanya peptidoglikan yang mampu mengikat warna ungu tersebut. Oleh karena itu perbedaan komposisi penyusun dinding sel bakteri Gram positif dan negatif menyebabkan adanya perbedaan respon terhadap zat warna yang diberikan. Menurut Syulasmi dkk., (2005), bakteri Gram positif mengandung peptidoglikan lebih banyak dan lemak lebih sedikit dibandingkan bakteri Gram negatif. Selanjutnya Trisna (2012), menyatakan bahwa dinding sel bakteri Gram positif bersifat kompak dan kurang permeabel sehingga pada saat pemberian warna ungu, maka zat warna tersebut memasuki dinding sel dan saat dibilas dengan alkohol, warna ungu yang telah terikat tersebut tidak bisa keluar lagi, sehingga warna safranin tidak bisa lagi mewarnai bakteri gram positif. Berbeda dengan dinding sel bakteri Gram negatif, dinding selnya kurang kompak dan lebih permeabel, sehingga pada saat pemberian warna ungu, maka zat warna tersebut akan larut pada saat dibilas dengan alkohol, dan saat pemberian safranin maka zat warna tersebutlah yang mewarnai bakteri Gram negatif.



Berdasarkan hasil pewarnaan Gram yang dilakukan, maka semua isolat yang diperoleh bersifat Gram positif. Selanjutnya isolat memiliki dua bentuk, yaitu isolat H2 berbentuk bulat (*coccus*) dan isolat H3, H5 dan H7 berbentuk batang (*bacilli*).

3. Uji katalase

Salah satu parameter yang diukur pada penelitian ini, yaitu aktifitas enzim katalase pada isolat uji. Bakteri yang memiliki enzim katalase akan memiliki kemampuan untuk mengkatalisis hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan oksigen O_2 . Senyawa hidrogen peroksida memiliki kemampuan untuk mengganggu fungsi enzim lain yang ada dalam sel. Uji katalase penting dilakukan untuk mengetahui sifat bakteri terhadap kebutuhan akan oksigen.

Uji katalase dalam penelitian ini menunjukkan seluruh isolat (H2, H3, H5, dan H7) tidak terbentuk gelembung (gas) pada gelas objek setelah ditetesi dengan larutan hidrogen peroksida (H_2O_2). Hal ini menjelaskan bahwa seluruh isolat bersifat negatif terhadap H_2O_2 , karena tidak memiliki kemampuan untuk memecah senyawa tersebut untuk melepaskan oksigen. Parameter yang dapat dijadikan indikator adanya aktivitas katalase, yaitu terbentuknya gelembung (gas) yang merupakan oksigen.

BAL memiliki kemampuan untuk memproduksi hidrogen peroksida melalui transport aktif dengan bantuan enzim flavin. Senyawa tersebut dapat mengganggu fungsi membran lipid pada sel dan meningkatkan



permeabilitas membran. BAL yang memiliki senyawa hidrogen peroksida dapat bersifat bakterisidal dengan cara mengoksidasi sel bakteri dan menyebabkan kerusakan asam nukleat dan protein sel (Naidu and Clemens, 2000; Ray, 2003). Selanjutnya Yulistiani (2008) menyatakan, bahwa hidrogen peroksida terbentuk pada saat metabolisme aerob.

Bakteri anaerob fakultatif tidak memiliki katalase, tetapi peroksidase yang dapat mengkatalisis H_2O_2 dengan senyawa organik menghasilkan senyawa organik teroksidasi dan H_2O (Ali, 2005). Selanjutnya Hutkins (2006) menyatakan, bahwa umumnya BAL bersifat katalase negatif. Oleh karena seluruh isolat yang diperoleh dalam penelitian ini dapat digolongkan sebagai bakteri anaerob fakultatif.

4. Uji *Methyl Red* (MR)

Uji *Methyl Red* (MR) dapat digunakan untuk menentukan jenis asam yang diproduksi oleh suatu mikroba. Uji MR pada semua isolat dalam penelitian ini menunjukkan hasil positif. Hal tersebut ditandai dengan terjadinya perubahan medium dari berwarna kuning menjadi berwarna merah setelah ditetesi reagen MR (indikator merah). Pada penelitian Sari (2009), diketahui bahwa isolat BAL yang diperoleh dari beberapa sumber menunjukkan hasil positif terhadap uji MR yang ditandai dengan adanya perubahan warna medium dari kuning menjadi merah. Hal

berarti bahwa isolat tersebut dapat memfermentasikan karbohidrat
menghasilkan asam.



Bila suatu bakteri memfermentasikan glukosa didalam medium MR, asam campuran yang dihasilkan umumnya berupa asam laktat, asam asetat, asam format, dan asam suksinat. Menurut Alcamo (2001), hasil uji dinyatakan negatif apabila tidak terbentuk cincin merah atau medium berubah menjadi warna merah dan mengindikasikan bahwa sangat sedikit atau tidak ada asam organik yang tersisa di medium.

5. Uji motilitas

Kemampuan suatu organisme untuk bergerak sendiri disebut motilitas (Volk, 1988 dan Prado, 2008). Sifat motilitas pada bakteri dapat diamati dengan adanya pertumbuhan yang menyebar disekeliling tempat penusukan kultur atau adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi, yang berarti bakteri ini memiliki flagel (Fardiaz, 1992).

Motilitas isolat diuji dengan menusukkan medium SIM (*Sulfid Indol Motility*) agar tegak, lalu di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Pada pengujian ini pertumbuhan bakteri hanya pada bekas tusukan sehingga menunjukkan hasil negatif. Berdasarkan hasil pengamatan maka semua isolat BAL (H2, H3, H5, dan H7) dalam penelitian ini merupakan bakteri non-motil. Hal ini berdasarkan tidak terbentuknya rambatan–rambatan pada bekas tusukan jarum ose dalam media.

Menurut Surono (2004) bakteri probiotik memiliki kemampuan sintesis yang sangat terbatas, sehingga bersifat non-motil. Sumber energinya hanya bergantung pada metabolisme secara fermentatif yang



dilakukan pada tempatnya. Pada saat isolat menunjukkan ciri positif (motil) maka medium akan menjadi keruh dan jika gerak negatif (non-motil), bakteri hanya hidup pada daerah tusukan saja. Oleh karena itu uji motilitas merupakan salah satu ciri identifikasi bakteri. Pergerakan yang dimaksud, yaitu kemampuan bakteri untuk dapat berpindah tempat dengan menggunakan salah satu bagian tubuhnya. Menurut Tarashima *et al.*, (2008), flagela bakteri adalah organel berserat yang mendorong pergerakan sel. Mereka mendorong sel-sel dalam cairan (berenang) atau pada permukaan (mengerumuni) sehingga sel-sel dapat bergerak ke arah lingkungan yang menguntungkan

6. Tipe fermentasi

Hasil pengujian isolat (H2, H3, H5, dan H7) terhadap tipe fermentasi menunjukkan, terdapat tiga isolat yang termasuk tipe homofermentatif, yaitu isolat H2, H3, dan H5. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara pada media uji tipe fermentasi. Sedangkan pada isolat H7 termasuk heterofermentatif, karena terbentuknya gelembung udara dalam tabung durhan.

Kelompok BAL dapat dikelompokkan menjadi dua bagian, yaitu bersifat homofermentatif dan heterofermentatif. BAL yang hanya menghasilkan asam laktat dikategorikan homofermentatif. Sedangkan

yang memiliki kemampuan untuk memfermentasikan karbohidrat menjadi beberapa jenis produk, seperti asam laktat, alkohol dan karbon dioksida (CO₂) dikategorikan bersifat heterofermentatif. Menurut



Astuti (2014), genus *Lactobacillus* selain dapat tumbuh pada suhu 45⁰C, bakteri ini juga dapat menghasilkan asam laktat dari berbagai sumber karbon, seperti galaktosa, laktosa, maltosa, sukrosa, glukosa, fruktosa dan sorbitol.

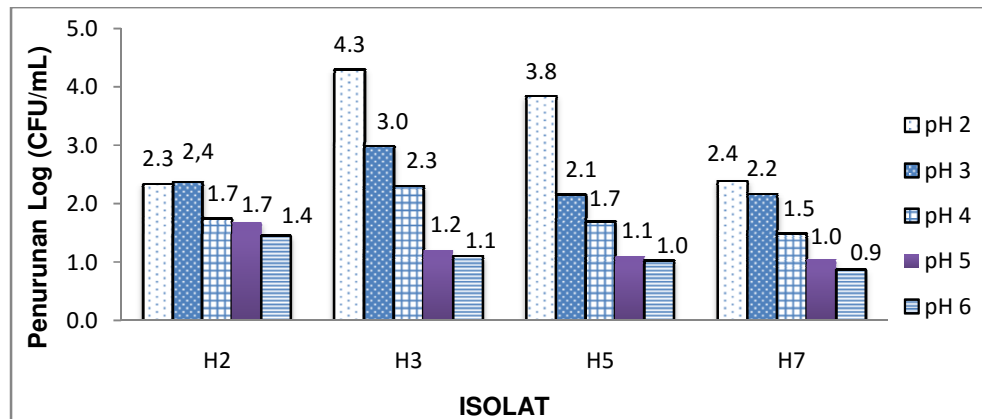
B. Seleksi BAL sebagai kandidat probiotik

1. Ketahanan isolat terhadap berbagai kondisi pH

Seluruh isolat BAL yang diperoleh dari saluran pencernaan broiler umur tiga memiliki kemampuan yang berbeda terhadap berbagai kondisi pH perlakuan. Penurunan jumlah koloni yang terendah pada pH 2, yaitu 2.3 log CFU/mL (isolat H2), sedangkan penurunan jumlah koloni tertinggi pada 4.3 log CFU/mL (Isolat H3). Penurunan jumlah koloni yang terendah pada pH 3, yaitu 2.1 log CFU/mL (isolat H5), sedangkan penurunan jumlah koloni tertinggi pada 3.0 log CFU/mL (Isolat H3). Pada perlakuan pH 4 penurunan jumlah koloni terendah, yaitu 1.5 log CFU/mL (isolat H7), sedangkan penurunan koloni tertinggi pada 2.3 log CFU/mL hingga (Isolat H2). Pada perlakuan pH 5 penurunan jumlah koloni terendah pada 1.5 log CFU/mL (isolat H7), sedangkan yang tertinggi pada 1.7 log CFU/mL (isolat H2). Selanjutnya pada perlakuan pH 6 penurunan jumlah koloni terendah pada 0.9 log CFU/mL (isolat H7), sedangkan yang tertinggi pada 1.4 log CFU/mL (isolat H2). Hasil pengujian ketahanan

BAL terhadap berbagai kondisi pH disajikan pada Gambar 3.





Gambar 3. Ketahanan Isolat BAL terhadap berbagai kondisi pH asam

Kemampuan tumbuh isolat BAL pada berbagai kondisi pH perlakuan dapat dijadikan sebagai indikator ketahanan isolat tersebut terhadap kondisi asam. Nilai penurunan log yang terkecil menunjukkan, bahwa isolat memiliki ketahanan yang kuat terhadap asam. Pada Gambar 3 disajikan, bahwa tidak ada isolat yang mengalami penurunan kurang dari satu log (< 1 log) pada pH 2, pH3, pH 4 dan pH 5, kecuali Isolat H7 yang mengalami penurunan kurang dari satu log (< 1 log) pada pH 6.

Nilai penurunan log pada perlakuan pH 3, pH 4, pH 5, dan pH 6 pada semua isolat (H2, H3, H5, dan H7) dalam penelitian ini dikategorikan resisten, karena memiliki penurunan populasi antara 1-3.5 log CFU/mL. Pada perlakuan pH 2, isolat yang resisten hanya isolat H2 dan H7, sedangkan isolat H3 dan H5 tidak resistensi, karena memiliki penurunan

populasi lebih dari 3,5 log cfu/mL. Pengkategorian tingkat resistensi suatu bakteri terhadap asam lambung berdasarkan pada pernyataan Evanikastri (2013), bahwa kemampuan ketahanan BAL terhadap asam lambung



dapat dikelompokkan dalam tiga kategori, yaitu dianggap sangat resistensi jika penurunan populasi <1 log, resistensi 1.5-3.5 log dan tidak resistensi jika penurunannya >3.5 log.

Uji keasaman dilakukan pada isolat BAL bertujuan untuk melihat kemampuan isolat tersebut tumbuh pada berbagai kondisi keasaman saluran pencernaan broiler. Kondisi pH terendah pada saluran pencernaan broiler pada bagian ventrikulus, yaitu sekitar 2-3.5. Kemampuan bakteri untuk bertahan terhadap kondisi keasaman ventrikulus (lambung) merupakan hal yang penting untuk dipertimbangkan bagi suatu bakteri untuk dijadikan sebagai kandidat probiotik pada unggas. Bakteri yang masuk kedalam ventrikulus akan mengalami penurunan populasi, karena adanya pengaruh asam klorida (HCl) pada ventrikulus. HCl merupakan asam kuat dan komponen utama dalam asam lambung. Menurut Booth and Kroll (1989), asam kuat seperti HCl menyebabkan enzim-enzim yang terdapat pada permukaan sel terdenaturasi oleh pH rendah sehingga menurunkan pH sitoplasma akibat peningkatan permeabilitas proton pada gradien pH yang besar.

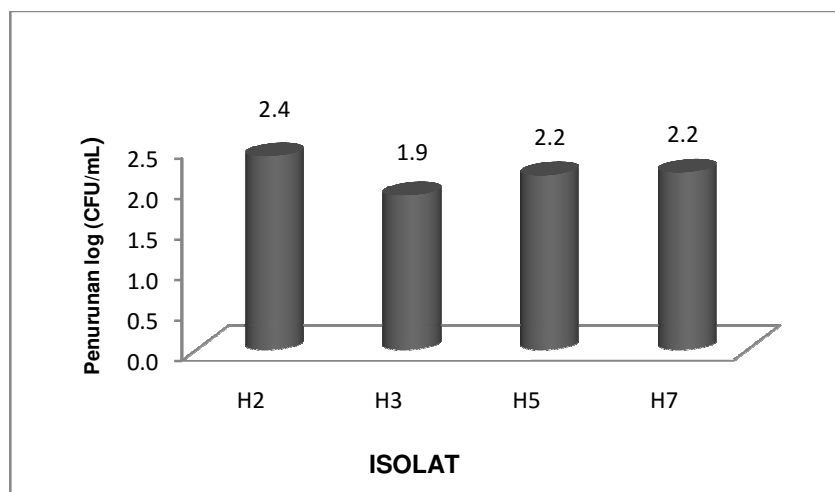
Dalam penelitian ini seluruh isolat yang diuji memiliki kemampuan tumbuh yang bervariasi terutama pada pH rendah (2 dan 3). Menurut Siegumfeldt *et al.*, (2000), kemampuan BAL untuk bertahan hidup pada pH rendah, karena pH intraseluler dapat menyesuaikan diri dengan penurunan pH ekstraseluler, sehingga tidak menyebabkan terjadinya aliran proton yang besar. Selanjutnya Surono (2004), menyatakan,



bahwa selain BAL mengalami pertumbuhan yang lambat pada pH rendah, sel BAL juga dapat mengalami kerusakan akibat asam dan hilangnya viabilitas. Tiap galur memiliki ketahanan yang berbeda terhadap asam atau pH rendah. Menurut Hutkins and Nannen (1993), ada beberapa kemungkinan mekanisme bagaimana bakteri mengatur pH internal, tetapi yang paling penting adalah translokasi proton oleh enzim ATP-ase.

2. Ketahanan terhadap garam empedu

Hasil pengujian ketahanan isolat BAL terhadap garam empedu disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Ketahanan isolat BAL terhadap garam empedu

Bakteri yang berhasil melewati berbagai variasi keasaman saluran pencernaan sebelum usus halus, selanjutnya masuk ke bagian awal usus, yaitu duodenum. Pada bagian ini menurut Surono (2004), bakteri menghadapi ketersediaan oksigen (O_2) rendah, garam empedu dan



terjadi kompetisi dengan mikroba lain yang terdapat di usus untuk mendapatkan sumber energi. Oleh karena itu salah satu syarat yang juga harus diperhatikan untuk pengujian bakteri kandidat probiotik, yaitu memiliki ketahanan terhadap garam empedu.

Uji ketahanan terhadap garam empedu merupakan pengujian selanjutnya pada empat isolat BAL (H2, H3, H5 dan H7) yang sebelumnya telah diuji ketahanan terhadap kondisi asam (pH). Konsentrasi garam empedu yang digunakan pada penelitian ini 0.3% (b/v). Hal ini didasarkan pada pernyataan Zavaglia *et al.*, (1998), bahwa konsentrasi garam empedu di dalam duodenum setara dengan 0.3%.

Garam empedu yang terdapat di dalam usus disintesis di dalam hati dengan cara mengkonjugasi steroid heterosiklik yang berasal dari kolesterol dan disalurkan ke usus melalui usus dua belas jari. Garam empedu kemudian akan diserap kembali dari ileum bagian bawah dan kembali ke hati untuk disekresikan lagi ke empedu. Lamanya bakteri di dalam usus sekitar 4-6 jam. Bakteri yang telah melewati garam empedu harus mampu mengkolonisasi pada saluran usus bagian bawah agar dapat dikatakan bakteri probiotik (Surono, 2004).

Gambar 4 menunjukkan, bahwa seluruh isolat BAL yang diperoleh dari saluran pencernaan DOC broiler memiliki kemampuan ketahanan yang bervariasi terhadap garam empedu perlakuan. Secara berturut-turut urutan jumlah koloni mulai yang terendah hingga tertinggi, yaitu 1.9 log CFU/mL (isolat H3), 2.2 log CFU/mL (isolat H5 dan isolat H7), dan 2.4



log CFU/mL (Isolat H2). Walaupun terjadi penurunan jumlah koloni pada semua isolat, akan tetapi pada dasarnya semua isolat masih memiliki ketahanan terhadap garam empedu, karena memiliki penurunan populasi antara 1-3.4 unit log CFU/mL.

Penurunan populasi isolat BAL pada penelitian ini disebabkan oleh kemampuan garam empedu untuk merusak sel BAL. Menurut Begley *et al.*, (2005) dan Lebeer *et al.*, (2008), menyatakan bahwa garam empedu merupakan molekul amfipatik (*amphipathic*) yang memiliki fungsi biologis sebagai detergen yang mengemulsifikasi dan melarutkan lipid, namun disisi lain memiliki potensi sifat antimikroba dengan cara merusak membran sel bakteri.

Aktifitas garam empedu sebagai antimikroba bekerja dengan cara mengganggu fungsi dinding sel dan membran sel bakteri. Salah satu senyawa penyusun dinding sel dan membran sel bakteri, yaitu lipid dan turunannya. Garam empedu memiliki kemampuan untuk bekerja pada senyawa lipid tersebut, sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada dinding sel dan membran sel. Menurut Kusumawati (2003) dan Mourad and Karam, (2006), bahwa garam empedu bersifat sebagai senyawa aktif pada permukaan sel, sehingga dapat menembus dan bereaksi dengan sisi membran sitoplasma yang selanjutnya menyebabkan perubahan dan kerusakan struktur membran. Keragaman struktur asam lemak pada membran sel bakteri menyebabkan perbedaan permeabilitas dan diduga mempengaruhi ketahanan bakteri terhadap garam empedu.



BAL yang mampu bertahan terhadap garam empedu menurut Moser and Savage (2001), karena memiliki enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) yang diatur gen BSH. Enzim ini mampu mengubah secara fisika-kimia garam empedu, sehingga tidak bersifat toksik bagi BAL. Aktifitas enzim BSH terhadap garam empedu telah diteliti Begley *et al.*, (2006), yang menunjukkan kemampuan enzim BSH menguraikan asam empedu terkonjugasi (saling berikatan) menjadi asam empedu tidak terkonjugasi, hal tersebut menyebabkan terjadinya pelepasan asam amino glisin atau taurin.

3. Suhu pertumbuhan optimum

Salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan, perbanyakan dan daya tahan bakteri, yaitu suhu. Oleh karena itu, pengujian selanjutnya pada Isolat BAL yang diperoleh dalam penelitian ini, yaitu kemampuan tumbuh pada berbagai suhu perlakuan. Uji suhu pertumbuhan optimal terhadap isolat BAL disajikan pada Tabel 6.

Seluruh isolat (H2, H3, H5 dan H7) dapat tumbuh pada suhu 37⁰C dan 41⁰C setelah diinkubasi 24 jam. Demikian juga pada suhu 30⁰C isolat H5 dan H7 menunjukkan pertumbuhan setelah diinkubasi 24 jam, kecuali Isolat H2 dan H3 tidak ada pertumbuhan. Selanjutnya setelah seluruh isolat diinkubasi selama 48 jam menunjukkan adanya pertumbuhan yang

didai dengan terbentuknya endapan pada dasar tabung.



Tabel 6. Kemampuan tumbuh isolat BAL asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari pada berbagai suhu ($^{\circ}\text{C}$)

Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Isolat							
	H2		H3		H5		H7	
	24 Jam	48 Jam	24 Jam	48 Jam	24 J Am	48 Jam	24 Jam	48 Jam
30	-	+	-	+	+	+	+	+
37	++	++	++	++	++	++	++	++
41	+	+	+	++	++	++	++	++

Keterangan: Tidak tumbuh (-); Tumbuh (+)

Setiap spesies bahkan strain bakteri dapat memiliki suhu terbaik yang berbeda untuk pertumbuhan (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Suhu merupakan faktor fisik yang berpengaruh terhadap reaksi kimia dan stabilitas struktur molekul protein bakteri, sehingga akan berpengaruh pada laju pertumbuhan. Reaksi kimia akan meningkat dengan meningkatnya suhu, karena peningkatan suhu menyebabkan peningkatan energi kinetik reaktan. Pertumbuhan pada hakekatnya adalah hasil metabolisme, suatu reaksi kimia terarah yang berlangsung di dalam sel yang dikatalisis oleh enzim. Maka peningkatan suhu akan menyebabkan peningkatan pertumbuhan hingga suatu saat peningkatan suhu tidak diikuti dengan meningkatnya pertumbuhan (Elias *et al.*, 2014 dan Subagyo *et al.*, 2015).

Suhu merupakan salah satu faktor penting bagi pertumbuhan dan fisiologi bakteri, karena masing-masing spesies bakteri



mempunyai suhu optimum untuk pertumbuhannya (Waluyo, 2007). Dalam penelitian ini isolat H2 dan H3 tidak menunjukkan pertumbuhan pada suhu 30°C setelah diinkubasi 24 jam. Hal ini mungkin disebabkan kedua isolat tersebut mengalami fase adaptasi yang lebih lama terhadap suhu lingkungannya.

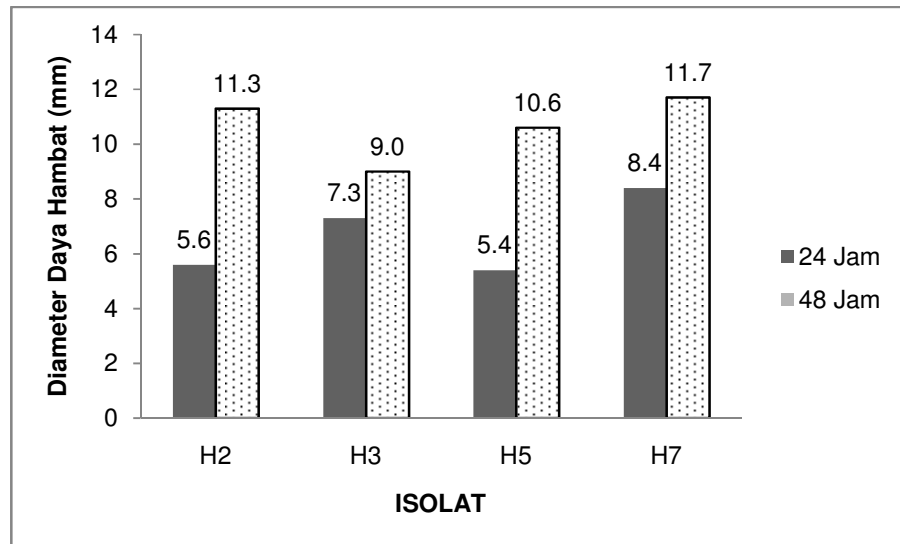
Apabila suhu naik, kecepatan metabolisme naik dan pertumbuhan dipercepat, dan sebaliknya, sedangkan apabila suhu turun kecepatan metabolisme juga turun dan pertumbuhan diperlambat merupakan dua cara pengaturan atau mekanisme suhu dalam mempengaruhi mikroorganisme. Menurut Cempirkova (2007) dan Perko (2011), bahwa berdasarkan hubungan antara suhu dan pertumbuhan, maka mikroorganisme dapat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu (1) Psikrofil, kelompok bakteri yang tumbuh pada kisaran suhu 0-20°C, (2) Mesofil, kelompok bakteri yang tumbuh pada kisaran suhu 25-40°C, dan (3) Termofil, kelompok bakteri yang tumbuh pada suhu di atas 50°C.

4. Aktifitas Antimikroba

Salah satu syarat mikroba dapat digunakan sebagai probiotik, yaitu memiliki aktivitas antimikroba terhadap patogen (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus hirae*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*) yang diuji secara *in vitro* (Sami *et al.*, 2014).



Hasil pengujian aktifitas antimikroba isolat BAL terhadap bakteri patogen *Salmonella typhimurium* (Gram negatif) disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Diameter daya hambat isolat BAL terhadap patogen *Salmonella typhimurium* (Gram negatif)

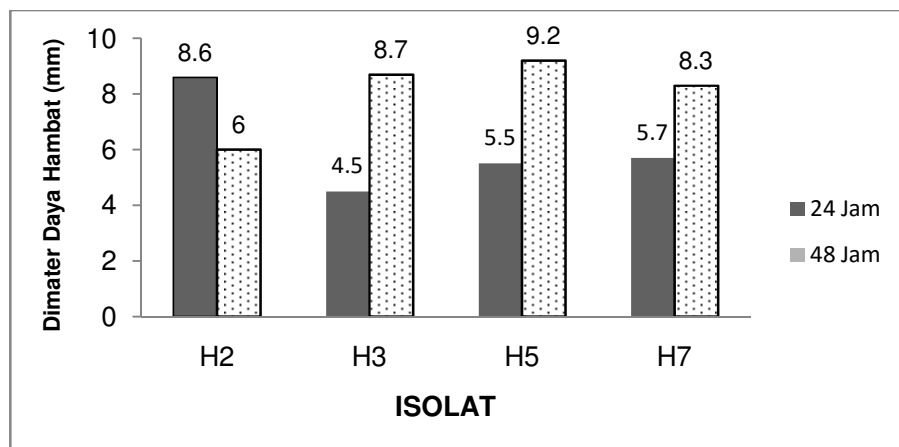
Aktifitas antimikroba isolat H2 dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhimurium* setelah diinkubasi 24 jam, yaitu sebesar 5.6 mm dan setelah diinkubasi 48 jam terjadi peningkatan penghambatan sebesar 11.2 mm. Pada isolat H3 kemampuan daya hambat terhadap *Salmonella typhimurium* setelah diinkubasi 24 jam, yaitu 7.3 mm dan sedikit bertambah setelah diinkubasi 48 jam menjadi 9.0 mm. Isolat yang tidak mampu mempertahankan kemampuan daya hambatnya terhadap patogen



setelah diinkubasi 48 jam dapat digolongkan memiliki aktivitas antimikroba yang bersifat bakteriostatik.

Uji aktifitas antimikroba terhadap bakteri patogen Gram negatif *Salmonella typhimurium*, diameter daya hambat terbesar setelah diinkubasi 24 jam, yaitu isolat H7 (8.4 mm) dan setelah diinkubasi 48 jam menjadi 11.7 mm. Diameter daya hambat terkecil terhadap bakteri patogen *Salmonella typhimurium* setelah diinkubasi 24 jam terdapat pada isolat H5 (5.4 mm) dan setelah diinkubasi 48 jam terdapat pada isolat B (9.0 mm).

Hasil pengujian aktifitas antimikroba isolat BAL terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* (Gram positif) disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Diameter daya hambat isolat BAL terhadap patogen *Staphylococcus aureus* (Gram positif)



Aktifitas antimikroba isolat terhadap bakteri patogen Gram positif *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan daya hambat yang bervariasi. Diameter daya hambat terbesar setelah diinkubasi 24 jam, yaitu isolat H2 (8.6 mm) dan setelah diinkubasi 48 jam pada isolat H5 (9.2 mm). Diameter daya hambat terkecil terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* setelah diinkubasi 24 jam terdapat pada isolat H3 (4.5 mm) sedangkan setelah diinkubasi 48 jam terdapat pada isolat H1 (6.0 mm).

Seluruh isolat (H2, H3, H5, dan H7) yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki aktifitas antimikroba dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen Gram negatif dan Gram positif yang diujikan. Aktifitas antimikroba isolat terhadap patogen dapat diamati pada terbentuknya zona bening disekitar lubang (ring) yang telah diisi dengan isolat yang ada. Zona bening yang terbentuk digunakan sebagai indikator tidak ada bakteri patogen yang tumbuh pada daerah tersebut. Menurut Pan *et al.*, (2009) besaran diameter zona hambat terhadap bakteri patogen dapat dikelompokkan berdasarkan tiga kategori, yaitu diameter zona hambat 0-3 mm menunjukkan aktivitas antimikroba rendah, >3-6 mm berarti aktivitas antimikroba sedang dan diameter zona hambat >6 mm menunjukkan aktivitas antimikroba tinggi

Aktifitas antimikroba isolat bakteri asam laktat pada penelitian ini ternyata lebih besar pada bakteri Gram negatif dibandingkan bakteri Gram positif. Perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram negatif dan



bakteri Gram positif mungkin dapat menjadi salah satu alasan perbedaan kemampuan tumbuh bakteri tersebut terhadap senyawa antimikroba yang dihasilkan isolat bakteri asam laktat dalam penelitian ini. Hal ini sejalan dengan penelitian (Musikasang *et al.*, 2009) yang menggunakan isolat bakteri asam laktat asal saluran pencernaan ayam lokal Thailand menunjukkan aktifitas antimikroba dari isolat tersebut umumnya lebih kuat terhadap bakteri Gram negatif (*Escherchia coli* dan *Salmonella typhimurium*) dibandingkan bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*).

Ketahanan bakteri Gram positif terhadap aktifitas senyawa antimikroba karena memiliki dinding selnya yang lebih tebal dibandingkan Gram negatif. Menurut Yulistiani (2008), dinding sel bakteri Gram positif lebih tebal karena mengandung 90% peptidoglikan dan lapisan tipis yang merupakan asam teikoat, sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif hanya mengandung 5-20% peptidoglikan dan lapisan lain terdiri dari protein, lipolisakarida, dan lipoprotein. Selanjutnya menurut Dwiyana dan Gobel (2011), lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri Gram positif memiliki ketebalan 20-80 nm dengan komposisi terbesar *teichoic*, asam *teichuroni* dan berbagai macam polisakarida. Polisakarida dan asam amino pada lembar peptidoglikan bersifat sangat polar sehingga pada bakteri jenis ini memiliki dinding sel yang tebal sehingga dapat bertahan dari aktifitas cairan empedu di dalam usus, sebaliknya lembar peptidoglikan rentan terhadap lisozim sehingga dapat dirusak oleh senyawa bakterisidal. Sedangkan pada dinding sel bakteri Gram negatif



memiliki lapisan peptidoglikan setebal 5-10 nm dengan komposisi utama lipoprotein, membran luar dan lipopolisakarida.

Lapisan peptidoglikan yang dimiliki oleh bakteri Gram positif juga mempengaruhi ketahanan bakteri terhadap asam. Peptidoglikan merupakan molekul besar yang disusun oleh senyawa gula dan asam amino. Dua gula penyusunnya adalah *N-acetylglucosamin* (NAG) dan *N-acetylmuramic acid* (NAM). Lapisan peptidoglikan tunggal saling berikatan dengan lapisan lainnya melalui bagian rantai asam aminonya, sehingga membentuk suatu ikatan silang yang kuat menutupi seluruh sel. Masuknya asam ke dalam sel dapat melalui beberapa cara antara lain melalui asam teikoat yang hanya ditemui pada dinding sel dan membran dinding sel bakteri Gram positif. Asam teikoat diketahui mempunyai muatan negatif sehingga dapat membatasi macam substansi yang akan diikat dan diteruskan dalam sel. Selain itu dapat melalui absorpsi yang mempengaruhi permeabilitas dan porositas dinding sel yang menyebabkan terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel. Keadaan ini menyebabkan sel bakteri mudah mengalami lisis apalagi bakteri Gram negatif yang kandungan peptidoglikannya lebih sedikit bila dibandingkan dengan bakteri Gram positif, sehingga pada akhirnya akan mengakibatkan kematian sel (Surono, 2004).



Dalam penelitian ini tidak diidentifikasi senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh setiap isolat yang diperoleh, akan tetapi beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri asam laktat dapat memproduksi senyawa antimikroba yang dapat menghambat mikroba lain. Kemampuan isolat pada penelitian ini dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen menunjukkan, bahwa bakteri asam laktat yang diperoleh memiliki senyawa antimikroba. Selama masa pertumbuhannya, bakteri asam laktat dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktifitas antimikroba. Senyawa-senyawa metabolit tersebut menurut Vasiljevic and Shah, (2008), diantaranya asam organik, hidrogen peroksida, bakteriosin, dan komponen lainnya. Bakteriosin merupakan suatu peptida antimikroba yang dihasilkan selama fase pertumbuhan eksponensial. Dalam jumlah yang cukup dapat membunuh (bakterisidal) atau menghambat (bakteristatik) bakteri lain yang berkompetisi dalam ekologi yang sama.

Hasil penelitian menunjukkan isolat H7 memiliki kemampuan yang daya hambat yang lebih besar terhadap bakteri Gram negatif. Isolat H7 merupakan jenis bakteri asam laktat heterofermentatif yang menghasilkan senyawa beragam dalam proses fermentasi karbohidrat (glukosa), yaitu asam laktat, etanol dan karbondioksida. Menurut Sari dkk., (2013), Aktifitas penghambatan senyawa antimikroba terhadap sel-sel mikroba patogen dapat dilihat dari terbentuknya zona bening disekitar isolat yang

Secara umum mekanisme kerja dari suatu senyawa antimikroba dilakukan dengan cara mengganggu atau merusak penyusun



dinding sel, bereaksi dengan membran sel yang menyebabkan peningkatan permeabilitas seluler, inaktivasi enzim-enzim esensial, dan destruksi atau inaktivasi fungsi dari materi genetik.

C. Pilihlah Isolat Sebagai Kandidat Probiotik untuk Uji *In Vivo*

Hasil uji *in vitro* yang dilakukan pada semua isolat dalam penelitian menunjukkan, bahwa tidak semua memiliki potensi sebagai kandidat probiotik pada unggas. Setiap isolat memiliki kemampuan pertumbuhan yang berbeda terhadap pH asam dan garam empedu. Demikian juga kemampuan tumbuh isolat BAL pada berbagai suhu dan aktifitas antimikroba. Oleh karena itu isolat diurutkan (ranking) berdasarkan kemampuan tumbuh yang paling besar ketertinggal, seperti yang disajikan pada Tabel 7.

Setelah diurutkan berdasarkan kemampuan tumbuh pada kondisi pH asam, garam empedu, suhu optimum, dan aktifitas antimikroba, maka isolat H7 memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik untuk broiler. Berdasarkan buku pedoman *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, maka karakteristik isolat H2 memiliki kesamaan dengan genus *Enterococcus* sedangkan isolat H3, H5 dan H7 memiliki kesamaan genus *Lactobacillus*. Karakteristik biokimia isolat BAL H7 dengan sistem VITEK versi 8.01 disajikan pada Tabel 8. Untuk memastikan

spesies isolat H7 (*Lactobacillus*), maka dilakukan identifikasi melalui ekatan molekuler.





urutan isolat BAL (H2, H3, H5, dan H7) sebagai kandidat probiotik berdasarkan uji pH asam, garam empedu, suhu pertumbuhan optimum dan aktifitas antimikroba

Urutan	pH Asam					Garam Empedu	Suhu °C			Aktifitas Antimikroba	
	2	3	4	5	6		30	37	41	<i>S.typhi</i>	<i>S.aureus</i>
1	H2	H5	H2	H7	H7	H3	H5,H7	H2,H3,H5,H7	H5,H7	H7	H5
2	H7	H2,H7	H7	H3,H5	H5	H5, H7	H3,H2		H5	H2	H3
3	H5	H3	H5	H2	H3	H2			H3	H5	H7
4	H3		H3		H2					H3	H2

Tabel 8. Hasil pengujian biokimia isolat BAL H7 dengan sistem VITEK 2 versi 08,01

No.	Jenis Pengujian	Hasil	No.	Jenis Pengujian	Hasil
1	β -xylosidase	+	31	D-Mannitol	-
3	L-Lysine-Arylamidase	-	32	D-Mannose	+
4	L-Aspartate Arylamidase	+	34	D-Melezitose	+
5	Leucine Arylamidase	+	36	N-Acetyl-D-Glucosamine	+
7	Phenylalanine Arylamidase	+	37	Palatinose	+
8	L-Proline Arylamidase	-	39	L-Rhamnose	+
9	β -Galactosidase	-	41	β -Glukosidase	-
10	L-Pyhrrolidonyl- Arylamidase	-	43	β -Mannosidase	-
11	α -Galactosidase	+	44	Phosphoryl choline	-
12	Alanine Arylamidase	+	45	Pyruvate	+
13	Tyrosine Arylamidase	+	46	α -Glucosidase	-
14	β -N-Acetyl-Gluocosaminidase	+	47	D-Tagatose	-
15	Ala-Phe-Pro Arylamidase	-	48	D-Trehalose	+
18	Cyclodextrine	-	50	Inulin	-
19	D-Galactose	+	53	D-Glucose	+
21	Glycogene	-	54	D-Ribose	+
22	Myo-Inositol	-	56	Putrescine assimilation	-
24	Methyl-A-D-Glucopyranoside acidification	+	58	Growth in 6.55 NaCl	-
25	Ellman	-	59	Kanamycin Resistance	-
26	Methyl-D-Xyloside	+	60	Oleandomycin Resistance	+
27	α -Mannosidase	-	61	Esculin hydrolyse	+
	Maltotriase	+	62	Tetrazolium Red	+
	Glycine Arylamidase	-	63	Polymyxin_B Resistance	-

Legenda: Positif (+), Negatif (-)

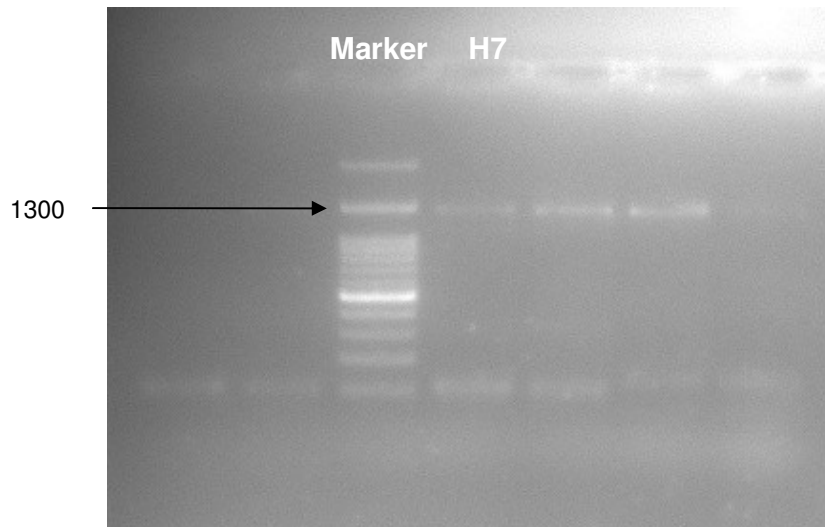


D. Identifikasi Isolat BAL (H7) sebagai Kandidat Probiotik Melalui Pendekatan Molekuler Analisis Gen 16S rRNA

Identifikasi isolat H7 dilakukan melalui pendekatan molekuler melalui analisis gen 16S rRNA. Analisis gen 16S rRNA untuk identifikasi suatu mikroorganisme terdiri empat proses, yaitu isolasi DNA (ekstraksi), PCR, elektroforesis, dan sekuensing. Hasil ekstraksi DNA diamplifikasi dengan metode PCR yang bertujuan untuk melipat gandakan pita DNA secara *in vitro*. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus selama \pm 2 jam menggunakan primer universal gen 16S rRNA, yaitu *Primer Forward* 63F (5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan *Primer Reserve* 1387R (3'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-5').

Hasil amplikasi DNA yang telah diperoleh (isolasi), selanjutnya divisualisasikan pada elektroforesis untuk dilihat panjang *base pair* (bp) yang dan dihasilkan. Hasil elektroforeseis pada Gambar 7 menunjukkan pita DNA isolat H7 sejajar sekitar 1300 bp pada *marker* (penanda) yang digunakan. Hasil PCR diperoleh kemudian disekuensing di PT. Genetika Indonesia. Analisis klaster dilakukan dengan progam BLAST dari NCBI secara *online* untuk mengkonfirmasi spesies.





Gambar 7. Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan Primer 63F dan 1387R

Berdasarkan analisis program BLAST dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>), maka hasil kesesuaian (homolog) isolat H7 pada Tabel 10 menunjukkan tingkat kemiripan paling besar dengan *Lactobacillus paracasei*. Menurut Tannock, (1999), apabila suatu hasil sekuens DNA memiliki tingkat kesamaan (homolog) lebih 97% dengan DNA spesies bakteri yang tersedia pada NCBI, maka spesies bakteri hasil sekuens tersebut sesuai yang terdapat pada NCBI.

Lactobacillus paracasei merupakan anggota mikrobiota normal usus manusia dan hewan yang digunakan secara luas dalam industri pangan sebagai kultur starter untuk produk susu atau sebagai probiotik (Kvina *et al.*, 2013). Hasil penelitian pada broiler strain ross umur 42 hari menggunakan pendekatan analisis PCR real-time menunjukkan,



bahwa jumlah *Lactobacillus* spp. lebih tinggi pada tembolok, proventrikulus, rempela, duodenum, jejunum, ileum, dan rektum daripada yang ada di sekum ($P < 0.05$). Pada penelitian tersebut menunjukkan jumlah *Lactobacillus paracasei* tertinggi pada bagian rempela (1.97%), duodenum (1.76%), proventrikulus (1.39%), jejunum dan ileum (1.35%), tembolok (1.35%), dan sekum (0.07%) (Wang *et al.*, 2014).

Tabel 9. Hasil BLAST Gen 16S rRNA

Isolat	Deskripsi Spesies	Query Cover	Identity	Nomor Akses
H7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain NBRC 15906	95%	99%	NR 041054.1
	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain R094	95%	99%	NR 025880.1
	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain NBRC 15889	95%	99%	NR 113337.1
	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain ATCC 25302	95%	99%	NR 117987.1

Isolat H7 yang diperoleh pada penelitian tahap pertama yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus paracasei* selanjutnya digunakan pada penelitian tahap kedua.



Penelitian Tahap kedua

A. Gambaran Histologi Vili Usus Halus

Usus halus merupakan organ utama saluran pencernaan unggas untuk proses pencernaan dan absorpsi yang terdiri dari tiga bagian, yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Pada usus halus terdapat tonjolan kecil yang disebut dengan vili yang memiliki fungsi dalam proses absorpsi. Fungsi usus halus sebagai tempat pencernaan dan absorpsi zat-zat makanan dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya tinggi vili, luas permukaan vili dan kerapatan vili.

Gambaran hasil pengukuran histologi usus halus broiler umur 7 hari, 14 hari dan 35 hari yang diberikan perlakuan *Lactobacillus paracasei* (isolat H7) melalui air minum disajikan pada Tabel 10 (tinggi vili), Tabel 11 (luas permukaan vili) dan Tabel 12 (kerapatan vili).

1. Tinggi vili

Rataan tinggi vili terbesar duodenum umur 7 hari dan 14 hari terdapat pada perlakuan 3 mL/hari (1.514 mm dan 1.645 mm) dan terkecil pada perlakuan kontrol (1.509 dan 1.639 mm). Selanjutnya tinggi vili terbesar pada umur 35 hari terdapat pada perlakuan 5 mL/hari (1.698 mm).

Rataan tinggi vili terbesar jejunum umur 7 hari terdapat pada perlakuan 3 mL/hari (1.225 mm) dan terkecil pada perlakuan kontrol (1.16 mm). Sedangkan pada umur 14 hari, tinggi vili terbesar terdapat



pada perlakuan 5 mL/hari (1.363 mm) dan terkecil pada perlakuan kontrol (1.330 mm). Selanjutnya pada umur 35 hari, tinggi vili terbesar terdapat pada perlakuan 5 mL/hari (1.493 mm) dan terkecil pada perlakuan 0 mL/hari (1.354 mm). Rataan tinggi vili pada setiap bagian usus halus broiler umur tujuh hari disajikan pada Tabel 10.

Rataan tinggi vili terbesar ileum umur 7 hari dan 14 hari terdapat pada perlakuan 5 mL/hari (0.58 dan 0.66 mm) dan terkecil pada perlakuan kontrol (0.57 mm dan 0.59 mm). Selanjutnya pada umur 35 hari, tinggi vili terbesar terdapat pada P3 (0.76 mm) dan terkecil pada P1 dan P2 (0.64 mm).

Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap tinggi vili pada duodenum umur 7 hari, 14 hari dan 35 hari, demikian juga pada tinggi vili jejunum dan ileum umur 7 hari dan 14 hari. Perlakuan hanya berpengaruh nyata ($P<0.05$) terhadap tinggi vili pada jejunum dan ileum umur 35 hari.

Tinggi vili usus halus pada duodenum, jejunum dan ileum cenderung meningkat seiring bertambahnya level pemberian *Lactobacillus paracasei* pada semua umur pengamatan. Ukuran tinggi vili duodenum relatif lebih besar dibandingkan vili jejunum dan ileum. Ukuran tinggi vili usus halus tertinggi pada bagian duodenum, jejunum dan ileum umur 7 hari terdapat pada perlakuan 3 mL/hari. Demikian juga pada umur 14 hari

an tinggi vili terpanjang pada duodenum dan ileum terdapat pada perlakuan 3 mL/hari, sedangkan pada jejunum terdapat pada perlakuan



5 mL/hari. Selanjutnya ukuran tinggi vili terpanjang pada umur 35 hari pada duodenum dan jejunum terdapat pada perlakuan 5 mL/hari, sedangkan pada ileum terdapat pada perlakuan 3 mL/hari.

Tabel 10. Tinggi vili usus (mm) halus broiler umur 7 hari, 14 hari dan 35 hari

Parameter	Perlakuan Probiotik				P-Nilai
	Kontrol	1 mL/hari	3 mL/hari	5 mL/hari	
Duodenum					
7	1.509 ± 0.03	1.519 ± 0.02	1.514 ± 0.01	1.512 ± 0.01	0.99
14	1.639 ± 0.02	1.641 ± 0.05	1.645 ± 0.02	1.642 ± 0.03	1.00
35	1.652 ± 0.03	1.674 ± 0.02	1.695 ± 0.03	1.698 ± 0.03	0.20
Jejunum					
7	1.206 ± 0.03	1.201 ± 0,03	1.225 ± 0,01	1.211 ± 0.03	0.90
14	1.330 ± 0.02	1.351 ± 0.06	1.358 ± 0.02	1.363 ± 0.02	0.90
35	1.354 ^a ± 0.02	1.405 ^{ab} ± 0.04	1.460 ^b ± 0.02	1.493 ^b ± 0.03	0.02
Ileum					
7	0.57 ± 0.01	0.57 ± 0,01	0.58 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.97
14	0.59 ± 0,01	0.62 ± 0,01	0.66 ± 0,01	0.65 ± 0.02	0.11
35	0.64 ^a ± 0.01	0.65 ^a ± 0.01	0.76 ^b ± 0.02	0.74 ^b ± 0.02	0.02

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perlakuan berbeda nyata ($P < 0.05$).

Hasil penelitian Awad *et al.*, (2009) melaporkan, bahwa tinggi vili duodenum pada broiler yang dipelihara selama 35 hari tidak menunjukkan perbedaan ($P > 0.05$) antara kontrol dan probiotik. Namun berbeda dengan hasil penelitian Ashayerizadeh *et al.*, (2016) pada broiler



umur 10 hari yang ditantang dengan *Salmonella* menunjukkan adanya perbedaan ($P < 0.05$) ukuran tinggi vili pada duodenum, jejunum dan ileum antara kontrol dan probiotik (0.15%). Terdapat kecenderungan ukuran tinggi vili pada semua bagian usus halus lebih besar pada perlakuan probiotik dibandingkan kontrol. Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan oleh vili yang di ukur tidak memiliki umur yang sama.

Ukuran tinggi vili ileum pada umur 35 hari nyata ($P < 0.05$) meningkat dengan pemberian *Lactobacillus paracasei* dibandingkan kontrol. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Beski and Al-Sardary, (2015) yang melaporkan bahwa pemberian probiotik multi strain (*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium*, dan *Saccharomyces cerevisiae*) pada broiler yang dipelihara selama 42 hari nyata meningkatkan panjang vili ileum dibandingkan kontrol.

Fungsi vili usus halus akan meningkat dengan bertambahnya ukuran tinggi vili jejunum dan ileum (Ruttanavut and Yamauchi, 2010). Oleh karena itu, berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini perlakuan 3 mL/hari akan memiliki jumlah absorpsi zat makanan lebih banyak dibandingkan perlakuan yang lain.

Vili ileum yang lebih panjang pada broiler yang diberikan probiotik mungkin disebabkan adanya asam-asam organik berantai pendek yang diproduksi oleh probiotik (Beski and Al-Sardary, 2015). Meningkatnya aman saluran pencernaan akan memberikan efek positif, karena t mengurangi pertumbuhan bakteri patogen, mengurangi kolonisasi



bakteri di usus dan menurunkan proses infeksi sehingga proses peradangan berkurang pada mukosa usus (Loddi *et al.*, 2004). Asam organik berantai pendek sebagai produk fermentasi bakteri akan merangsang proliferasi sel epitel usus (Ichikawa *et al.*, 1999). Oleh karena itu, selain kejadian infeksi yang lebih rendah, disisi lain akan terjadi peningkatan penyerapan nutrisi yang tersedia, sehingga secara langsung mempengaruhi pemulihan usus mukosa dan meningkatkan tinggi villi (Iji and Tivey, 1998).

Mekanisme lain probiotik bakteri asam laktat dalam memperbaiki kondisi saluran pencernaan (vili), yaitu melalui kemampuan bakteri tersebut untuk berkompetisi dengan mikroba lain yang bersifat patogen untuk melekat pada permukaan vili usus halus. Keberadaan mikroba patogen pada usus dapat mengganggu perkembangan dan fungsi vili melalui senyawa toksin yang diproduksi. Menurut Zhang *et al.*, (2005), bahwa ukuran vili pada usus dapat menjadi pendek dan *crypts* lebih dalam karena disebabkan oleh toksin yang diproduksi mikroba patogen pada saluran pencernaan. Selanjutnya Yang *et al.*, (2012), menyatakan bahwa probiotik dapat menjaga mikroflora usus yang bermanfaat, meningkatkan daya tahan tubuh terhadap enterik patogen, seperti *Salmonella*, *Campylobacter*, dan menghasilkan lingkungan gastrointestinal yang sehat sehingga fungsi usus menjadi lebih baik.

Lapisan mukosa yang menutupi permukaan intestinal bertindak sebagai penghalang terhadap translokasi bakteri. Usus ayam



mengandung beragam populasi bakteri yang berinteraksi dengan lapisan mukosa. Perubahan populasi bakteri usus dengan penggunaan probiotik atau antibiotika dapat mempengaruhi proses biosintesis musin dan/atau degradasi musin. Biosintesis musin dipengaruhi oleh kondisi atau agen yang mempengaruhi diferensiasi sel prekursor menjadi sel goblet matang dan/atau kondisi agen yang melepaskan proses glikosilasi dan sintesis protein, atau yang mempengaruhi sintesis protein (Smirnov *et al.*, 2005).

Bagian saluran pencernaan dianggap paling banyak menjadi faktor pembatas terhadap performa broiler. Oleh karena itu, kondisi kesehatan saluran pencernaan merupakan bagian yang penting harus dijaga. Karena vili-vili pada usus memiliki peranan penting dalam proses absorpsi zat-zat makanan. Terdapat hubungan yang kuat antara perubahan histologi vili usus terhadap bobot badan unggas. Jumlah absorpsi zat makanan akan lebih banyak ketika terjadi peningkatan lebar vili dan panjang vili.

2. Luas Permukaan vili

Luas permukaan vili duodenum yang terbesar pada umur 7 hari, yaitu perlakuan 3 mL/hari (0.32 mm^2) dan terkecil pada perlakuan kontrol dan 1 mL/hari (0.29 mm^2). Sedangkan pada umur 14 hari terbesar pada perlakuan 3 mL/hari (0.35 mm^2) dan terkecil pada perlakuan kontrol (0.31 mm^2) demikian juga pada umur 35 hari terbesar pada perlakuan 3 mL/hari (0.35 mm^2) dan terkecil pada perlakuan kontrol ($0,29 \text{ mm}^2$).

Luas permukaan vili jejunum yang terbesar umur 7 hari pada perlakuan 3 mL/hari dan 5 mL/hari (0.21 mm^2) dan terkecil pada perlakuan



kontrol (0.19 mm^2), sedangkan pada umur 14 hari terbesar pada perlakuan 3 mL/hari (24 mm^2) dan terkecil pada perlakuan kontrol dan 1 mL/hari (0.20 mm^2). Selanjutnya luas permukaan vili jejunum yang terbesar pada umur 35 hari terdapat pada perlakuan 3 mL/hari (0.29 mm^2) dan terkecil pada perlakuan kontrol (0.23 mm^2).

Luas permukaan vili ileum yang terbesar pada umur 7 hari terdapat pada perlakuan 1 mL/hari (0.10 mm^2) dan terkecil pada perlakuan kontrol, 3 mL/hari, dan 5 mL/hari (0.09 mm^2). Sedangkan pada umur 14 hari terbesar pada perlakuan 1 mL/hari, 3 mL/hari dan 5 mL/hari (0.12 mm^2) dan terkecil pada perlakuan kontrol (0.10 mm^2). Selanjutnya pada umur 35 hari terbesar pada perlakuan 3 mL/hari (0.19 mm^2) dan terkecil pada perlakuan kontrol (0.11 mm^2).

Luas permukaan vili usus yang terbesar pada duodenum dan jejunum umur 7 hari dan 14 hari terdapat pada perlakuan 3 mL/hari. Sedangkan pada bagian ileum umur 7 hari terdapat pada perlakuan 1 mL/hari dan umur 14 hari terdapat pada perlakuan 1 mL/hari, 3 mL/hari, dan 5 mL/hari. Selanjutnya luas permukaan vili yang terbesar pada umur 35 hari, jejunum dan ileum terdapat pada perlakuan 3 mL/hari, sedangkan pada duodenum terdapat pada perlakuan 3 mL/hari dan 5 mL/hari.

Luas permukaan vili pada semua bagian usus halus (duodenum, jejunum dan ileum) cenderung meningkat seiring bertambahnya dosis pemberian probiotik *Lactobacillus paracasei* pada semua umur samatan. Ukuran luas permukaan vili duodenum relatif lebih besar



dibandingkan luas permukaan vili pada jejunum dan ileum. Menurut Winarsih (2005), probiotik (*Bacillus* sp.) yang diberikan pada ayam dapat meningkatkan luas permukaan usus, sehingga penyerapan nutrient lebih efektif. Disisi lain probiotik dapat menekan mikroorganisme yang merugikan, sehingga zat-zat nutrisi yang terdegradasi lebih sedikit.

Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap luas permukaan vili duodenum pada semua umur pengamatan. Demikian juga luas permukaan vili jejunum dan ileum pada umur 7 hari dan 14 hari. Selanjutnya perlakuan berpengaruh nyata ($P<0.05$) terhadap luas permukaan vili jejunum dan ileum pada umur 35 hari. Hasil pengukuran luas permukaan vili usus halus broiler disajikan pada Tabel 11.

Hasil uji wilayah berganda Duncan pada luas permukaan jejunum umur 35 hari menunjukkan tidak ada perbedaan ($P>0,05$) antara perlakuan kontrol dengan 1 mL/hari, demikian juga antara perlakuan 1 mL/hari, 3 mL/hari dan 5 mL/hari, akan tetapi perlakuan kontrol berbeda nyata ($P>0,05$) dengan perlakuan 3 mL/hari dan 5 mL/hari. Selanjutnya luas permukaan vili ileum umur 35 hari tidak menunjukkan perbedaan ($P>0,05$) antara perlakuan kontrol dengan 1 mL/hari, demikian juga antara perlakuan 3 mL/hari dengan 5 mL/hari, akan tetapi perlakuan kontrol dan 1 mL/hari berbeda nyata ($P<0,05$) dengan perlakuan 3 mL/hari dan 5 mL/hari.



Tabel 11. Luas permukaan vili (mm^2) usus halus broiler umur 7 hari, 14 hari dan 35 hari

Parameter	Perlakuan Probiotik				P-Nilai
	Kontrol	1 mL/hari	3 mL/hari	5 mL/hari	
Duodenum					
7	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0,01	0.32 ± 0,02	0.31 ± 0.02	0.52
14	0.31 ± 0.10	0.32 ± 0.08	0.35 ± 0.13	0.34 ± 0.05	0.39
35	0.29 ± 0.10	0.33 ± 0.08	0.34 ± 0.13	0.34 ± 0.05	0.35
Jejunum					
7	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22
14	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.06
35	0.23 ^a ± 0.03	0.25 ^{ab} ± 0.02	0.29 ^b ± 0.02	0.28 ^b ± 0.02	0.01
Ileum					
7	0.09 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.51
14	0.10 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.02	0.07
35	0.11 ^a ± 0.05	0.12 ^a ± 0.01	0.19 ^b ± 0.06	0.16 ^b ± 0.02	0.01

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perlakuan berbeda nyata ($P < 0.05$).

Luas permukaan vili jejunum pada broiler yang diberikan *Lactobacillus paracasei* menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$) dengan kontrol, akan tetapi masih lebih kecil dibandingkan hasil penelitian Aliakbarpour *et al.*, (2012) pada broiler yang diberikan probiotik (*Bacillus subtilis* dan BAL) selama 42 hari menunjukkan tidak ada perbedaan

(0.05) dengan kontrol. Namun demikian luas permukaan vili jejunum perlakuan probiotik *Bacillus subtilis* (0.336 mm^2) dan probiotik multi bahan dasar BAL (0.367 mm^2) lebih besar dibandingkan kontrol



(0.291 mm²). Perbedaan kedua hasil penelitian tersebut dapat disebabkan umur broiler yang digunakan untuk pengambilan sampel usus halus (vili) yang tidak sama.

Berdasarkan pada Tabel 10 dan 11, maka perlakuan 3 mL/hari merupakan level yang terbaik memberikan respon optimum terhadap perkembangan histologi vili usus halus yang meliputi tinggi vili dan luas permukaan vili.

3. Kerapatan vili

Kerapatan vili duodenum yang terbesar pada umur 7 hari, yaitu pada perlakuan 3 mL/hari (6.83) dan terkecil pada perlakuan kontrol dan 5 mL/hari (6.81). Pada umur 14 hari, kerapatan vili terbesar pada perlakuan 5 mL/hari (6.75) dan terkecil pada perlakuan 1 mL/hari (6.71). Selanjutnya pada umur 35 hari kerapatan vili terbesar pada perlakuan 1 mL/hari (6.63) dan terkecil pada perlakuan kontrol (6.54).

Kerapatan vili jejunum terbesar umur 7 hari terdapat pada perlakuan 3 mL/hari (7.85) dan terkecil pada perlakuan kontrol dan 1 mL/hari (7.78), Demikian juga pada umur 14 hari, kerapatan vili terbesar terdapat pada perlakuan 3 mL/hari (7.69) dan terkecil pada perlakuan kontrol (7.49). Selanjutnya kerapatan vili jejunum terbesar pada umur 35 hari terdapat pada perlakuan 3 mL/hari (7.43) dan terkecil pada perlakuan kontrol (7.24).

Kerapatan vili ileum yang terbesar pada umur 7 hari terdapat pada perlakuan 5 mL/hari (9.15) dan terkecil pada perlakuan kontrol (8.91).



Demikian juga pada umur 14 hari, kerapatan vili terbesar terdapat pada perlakuan 3 mL/hari (8.99) dan terkecil pada perlakuan 1 mL/hari (8.67). Selanjutnya pada umur 35 hari kerapatan vili terbesar pada perlakuan 3 mL/hari (8.60) dan terkecil pada perlakuan kontrol (7.87). Hasil pengukuran kerapatan vili usus halus broiler disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12. Kerapatan vili (buah) usus halus broiler umur 7 hari, 14 hari dan 35 hari

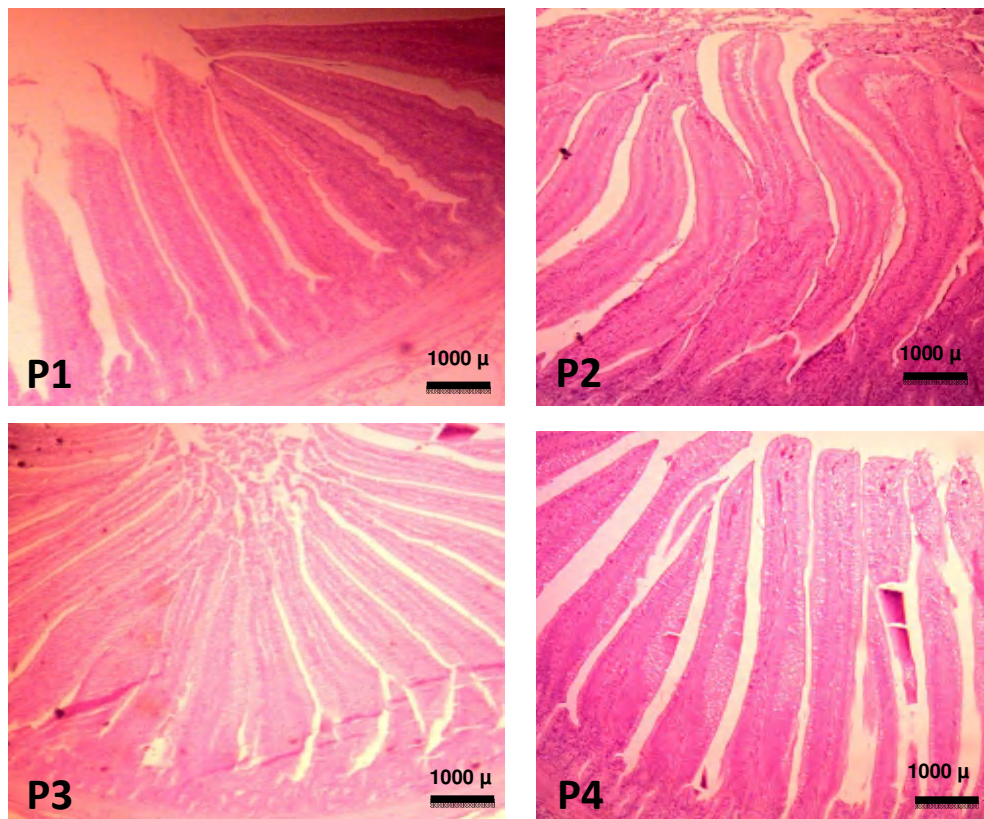
Parameter	Perlakuan Probiotik				P-Nilai
	Kontrol	1 mL/hari	3 mL/hari	5 mL/hari	
Duodenum					
7	6.81 ± 0.02	6.81 ± 0.1	6.83 ± 0.1	6.82 ± 0.1	0.98
14	6.72 ± 0.2	6.71 ± 0.1	6.72 ± 0.1	6.75 ± 0.2	0.99
35	6.54 ± 0.2	6.63 ± 0.2	6.60 ± 0,1	6.62 ± 0,2	0.98
Jejunum					
7	7.78 ± 0.1	7.78 ± 0.1	7.85 ± 0,1	7.82 ± 0.1	0.84
14	7.49 ± 0.2	7.63 ± 0.1	7.69 ± 0.1	7.67 ± 0.1	0.69
35	7.24 ± 0.05	7.30 ± 0.1	7.43 ± 0.1	7.41 ± 0.04	0.17
Ileum					
7	8.91 ± 0.1	8.90 ± 0.1	9.10 ± 0.1	9.15 ± 0.2	0.15
14	8.71 ± 0.1	8.67 ± 0.1	8.99 ± 0.1	8.94 ± 0.1	0.07
35	7.87 ^a ± 0.1	7.89 ^a ± 0.1	8.60 ^b ± 0,2	8.48 ^b ± 0,2	0.00

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perlakuan berbeda nyata ($P < 0.05$).

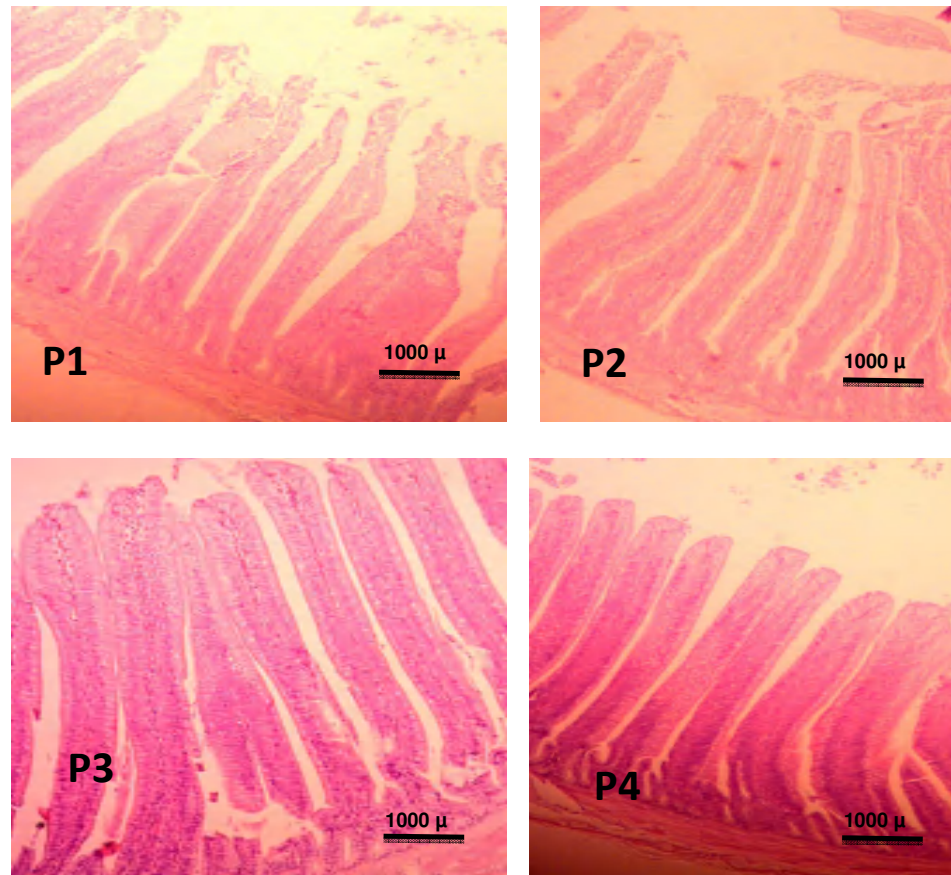
Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap kerapatan vili pada duodenum, jejunum dan ileum umur 7 hari dan 14 hari, tetapi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) pada kerapatan



ileum umur 35 hari. Hasil uji lanjut wilayah berganda Duncan menunjukkan tidak ada perbedaan ($P>0.05$) kerapatan vili ileum antara perlakuan kontrol dengan perlakuan 1 mL/hari, kecuali dengan perlakuan 3 mL/hari dan 5 mL/hari. Demikian juga tidak ada perbedaan ($P>0,05$) antara perlakuan 3 mL/hari dengan 5 mL/hari. Kerapatan vili pada bagian duodenum, jejunum dan ileum disajikan pada Gambar 8, 9 dan 10.



Gambar 8. Vili Duodenum broiler, P1 (kontrol), P2 (probiotik 1 mL/hari), P3 (probiotik 3 mL/hari), dan P4 (probiotik 5 mL/hari). Pewarnaan H&E dengan Pembesaran 4×10 . Skala bar 1000 μ .

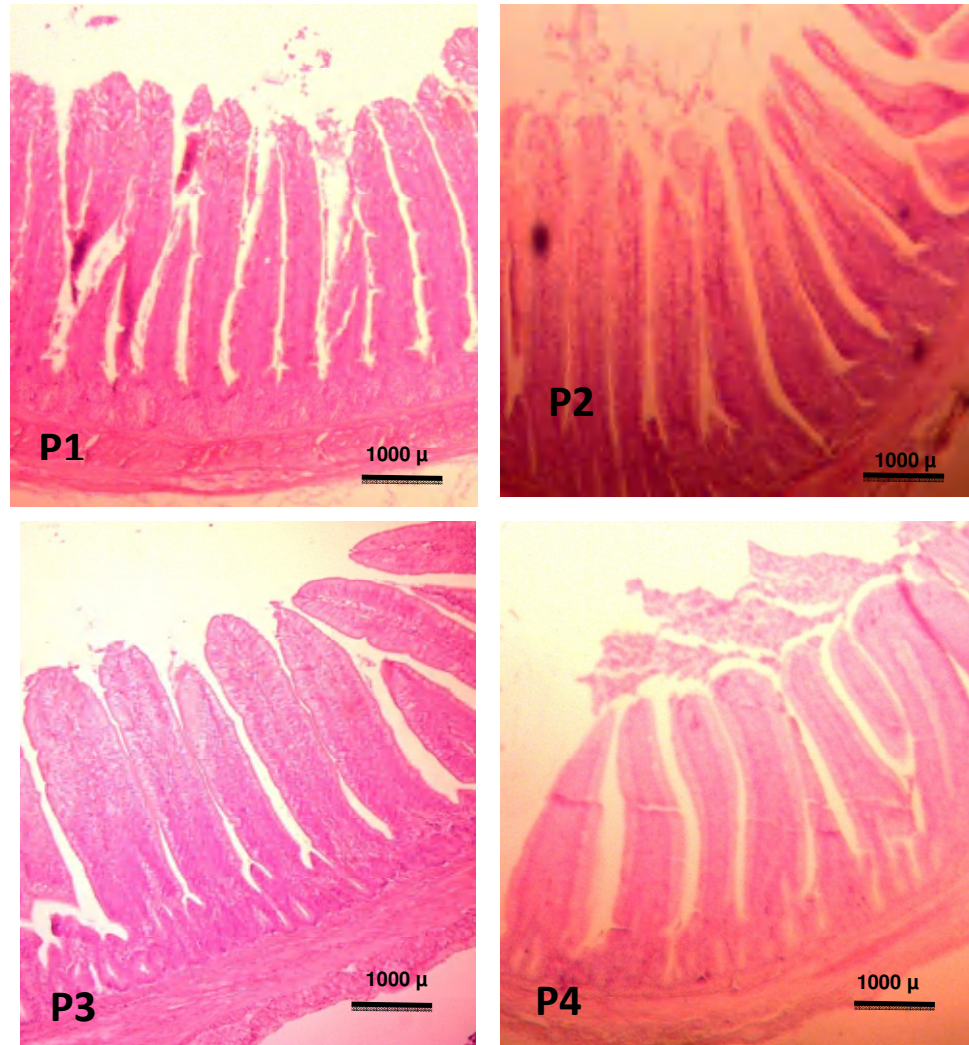


Gambar 9. Vili jejunum broiler, P1 (kontrol), P2 (probiotik 1 mL/hari), P3 (probiotik 3 mL/hari), dan P4 (probiotik 5 mL/hari). Pewarnaan H&E dengan Pembesaran 4×10 . Skala bar 1000 μ .

Hasil penelitian pada Tabel 12. menunjukkan, bahwa kerapatan vili (jumlah vili/mm) pada setiap bagian usus (duodenum, jejunum dan ileum) semakin berkurang seiring bertambahnya umur broiler. Kerapatan vili yang memiliki jumlah paling sedikit terdapat pada bagian duodenum dan yang banyak pada bagian ileum. Efektivitas perlakuan *Lactobacillus casei* 3 mL/hari dan 5 mL/hari terhadap kerapatan vili terlihat pada ileum umur 35 hari. Hal ini menunjukkan, bahwa kemungkinan



Lactobacillus paracasei tersebut berkolonisasi pada bagian ileum sehingga dapat memberikan efek terhadap perkembangan vili.



Gambar 10. Vili ileum broiler, P1 (kontrol), P2 (probiotik 1 mL/hari), P3 (probiotik 3 mL/hari), dan P4 (probiotik 5 mL/hari). Pewarnaan H&E dengan Pembesaran 4x10. Skala bar 1000 μ.

Kerapatan dan ukuran vili pada usus halus dapat memberikan gambaran terhadap tingkat perubahan absorpsi pada luas permukaan vili (Ferrer *et al.*, 1995). Karena hal tersebut menunjukkan hubungan dengan kapasitas absorpsi dari unggas (Silva *et al.*, 2007).

B. Gambaran Hematologis

Penyimpangan terhadap gambaran normal hematologis (darah) dapat dijadikan sebagai indikasi adanya gangguan fisiologi dalam tubuh ternak, karena darah berperan sebagai media homeostatis. Kondisi hematologis pada hewan dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti umur, jenis kelamin, bangsa, penyakit, temperatur lingkungan, keadaan geografis, kebuntingan, dan kegiatan fisik (Sturkie, 2000). Gambaran normal darah pada ayam (*Gallus gallus domesticus*), yaitu jumlah sel darah merah (eritrosit) 2.5-3.5 juta/mm³, nilai hemoglobin (Hb) 7.0-13 g/dL dan nilai hematokrit berkisar 22–35%, MCV (*Mean Corpuscular Volume*) normal ayam berkisar antara 90-140 fl, MCH (*Mean Corpuscular Haemoglobin*) normal berkisar antara 33-47 pg, dan MCHC (*Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration*) normal ayam berkisar antara 26%35% (Wakenell, 2010). Nilai hematologis broiler yang diberikan *Lactobacillus paracasei* melalui air minum selama 35 hari disajikan pada Tabel 13.





Gambaran hematologis broiler yang dipelihara selama 35 hari

Parameter	Perlakuan Probiotik				Nilai Standar ¹	P-Nilai
	Kontrol	1 mL/hari	3 mL/hari	5 mL/hari		
Eritrosit (juta/mm ³)	2.50 ± 0.06	2.52 ± 0.06	2.62 ± 0.09	2.67 ± 0.09	2.5-3.5	0.39
Haemoglobin (g/dL)	8.44 ± 0.3	8.58 ± 0.2	8.84 ± 0.2	8.72 ± 0.4	7-13	0.90
Hematokrit (%)	27.40 ± 0.8	28.00 ± 0.4	28.40 ± 0.5	29.20 ± 0.5	22-35	0.16
Leukosit (10 ³ /mm ³)	18.40 ± 0.3	18.60 ± 0.6	20.70 ± 0.8	21.10 ± 0.87	12-30	0.49
MCV (fl)	109.82 ± 4.6	111.53 ± 4.4	109.17 ± 4.9	109.77 ± 4.5	90-140	1.00
MCH (Pg)	33.74 ± 0.9	34.11 ± 0.9	33.91 ± 1.3	32.77 ± 2.0	33-47	0.90
MCHC (%)	30.92 ± 1.4	30.67 ± 0.7	31.14 ± 0.8	29.96 ± 1.9	26-35	0.92

Keterangan: ¹ Wakenell (2010).

1. Eritrosit

Terdapat kecenderungan terjadi peningkatan jumlah eritrosit seiring bertambahnya dosis perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei*. Nilai eritrosit yang terendah diperoleh pada penelitian ini terdapat pada perlakuan kontrol ($2.5 \times 10^6/\text{mm}^3$) dan tertinggi pada perlakuan 5 mL/hari ($2.67 \times 10^6/\text{mm}^3$). Nilai-nilai tersebut masih dalam kisaran normal eritrosit ayam, yaitu 2.5-3.5 juta/ mm^3 . Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap nilai eritrosit.

Probiotik *Lactobacillus paracasei* yang diberikan sebagai perlakuan pada penelitian ini mampu membantu memperbaiki gambaran hematologis broiler. Hal tersebut terlihat pada nilai eritrosit yang meningkat seiring bertambahnya dosis pemberian *Lactobacillus paracasei*. Oleh karena itu *Lactobacillus paracasei* secara tidak langsung berkontribusi dalam penyerapan zat-zat makanan yang dibutuhkan dalam pembentukan eritrosit (sel darah merah), seperti mineral besi (Fe). Namun demikian nilai eritrosit pada penelitian masih rendah dibandingkan hasil penelitian Beski and Al-Sardary (2015) pada broiler umur 42 hari yang diberikan probiotik multi strain menunjukkan nilai eritrositnya $2.9 \times 10^6/\text{mm}^3$. Perbedaan kedua hasil penelitian tersebut menunjukkan, bahwa umur broiler dan jumlah strain (mikroba probiotik) yang digunakan berpengaruh terhadap nilai jumlah eritrosit pada broiler.



Sampel darah yang diambil sebelum proses eritrosit terbentuk sempurna dapat menjadi salah satu faktor nilai eritrosit yang diperoleh akan lebih rendah dari nilai normalnya. Menurut Sturkie (2000), bahwa salah satu faktor yang mempengaruhi nilai hemtologis pada hewan, yaitu umur. Jain (1993) menyatakan, bahwa masa hidup eritrosit unggas rata-rata kurang dari 50 hari. Selanjutnya Sturkie (2000) menyatakan, bahwa masa hidup eritrosit unggas rata-rata 28 sampai 35 hari.

2. Hemoglobin

Hemoglobin merupakan bagian terpenting pada eritrosit karena mengisi sepertiga dari komponen eritrosit setelah air dan stroma (Reece, 2006). Hemoglobin di dalam eritrosit berfungsi mengangkut oksigen serta menyebabkan timbulnya warna merah pada darah. Nilai hemoglobin terendah pada penelitian, yaitu pada perlakuan kontrol (8.44 g/dL) dan tertinggi pada perlakuan 3 mL/hari (8.84 g/dL). Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap nilai hemoglobin. Nilai hemoglobin pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Beski and Al-Sardary (2015) pada broiler yang diberikan probiotik multi strain selama 42 hari, yaitu 9.7 g/dL.

Hemoglobin merupakan alat transportasi oksigen yang terletak di dalam eritrosit, sehingga penurunan jumlah hemoglobin dapat terjadi jika terdapat adanya gangguan pembentukan eritrosit (eritropoesis). Hal ini sebelumnya telah dijelaskan bahwa nilai eritrosit dalam penelitian ini pada perlakuan *Lactobacillus paracasei* masih berada dalam kisaran normal.



Oleh karena itu peningkatan jumlah hemoglobin pada perlakuan *Lactobacillus paracasei* juga masih dalam kisaran normal. Apabila nilai eritrosit, nilai hematokrit dan nilai hemoglobin dalam keadaan normal, maka itu menunjukkan bahwa ternak secara fisiologis dalam keadaan sehat.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Alkhalaf *et al.*, (2010) yang menunjukkan tidak ada perbedaan ($P>0.05$) antara kontrol dengan pemberian probiotik *Pediococcus acidilactici* 10^9 CFU/g terhadap nilai hemoglobin dan hematokrit pada broiler umur 1 minggu, 4 minggu dan 6 minggu.

3. Hematokrit

Persentase nilai hematokrit cenderung meningkat seiring meningkatnya dosis perlakuan *Lactobacillus paracasei*. Nilai hematokrit terendah terdapat pada perlakuan kontrol (27.4%) dan tertinggi pada perlakuan 5 mL/hari (29.2%). Nilai-nilai tersebut masih berada dalam kisaran normal. Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap nilai hematokrit.

Peningkatan nilai hematokrit berkaitan dengan peningkatan nilai eritrosit. Nilai hematokrit berkorelasi positif dengan ukuran eritrosit, tetapi berkorelasi negatif dengan konsentrasi cairan dalam tubuh ayam. Menurut

ingham (2002), peningkatan nilai hematokrit memiliki manfaat yang
it karena viskositas (kekentalan) darah akan meningkat kemudian



akan memperlambat aliran darah pada kapiler dan meningkatkan kerja jantung.

Penurunan nilai hematokrit dapat dijumpai pada kondisi anemia, yaitu akibat kekurangan produksi eritrosit, kerusakan eritrosit, dan ukuran eritrosit (Wardhana *et.al.*, 2001). Pada kondisi kekurangan cairan darah, akan menyebabkan meningkatnya nilai hematokrit. Sebaliknya, apabila ayam pada kondisi cairan yang berlebih, seperti kelebihan penambahan antikoagulan dan peningkatan kadar plasma darah dapat menyebabkan penurunan nilai hematokrit (Ulupi dan Ihwantoro, 2014).

Pada penelitian ini, walaupun terjadi peningkatan nilai hematokrit seiring dengan bertambahnya dosis pemberian *Lactobacillus paracasei*. Akan tetapi tidak memberikan pengaruh yang buruk terhadap kondisi fisiologis unggas, karena nilai tersebut masih berada dalam kisaran normal ayam (22–35%).

4. Leukosit

Nilai leukosit terendah dalam penelitian ini terdapat pada perlakuan kontrol ($18.4 \times 10^3/\text{mm}^3$) dan tertinggi pada perlakuan 5 mL/hari ($21.1 \times 10^3/\text{mm}^3$). Namun demikian nilai-nilai tersebut masih dalam kisaran normal nilai leukosit ayam, yaitu 12-30 ($10^3/\text{mm}^3$). Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$)

terhadap nilai leukosit.



Terjadinya peningkatan nilai leukosit seiring dengan bertambahnya dosis pemberian *Lactobacillus paracasei* menunjukkan, bahwa isolat yang diperoleh pada penelitian ini dapat berfungsi sebagai imunomodulator. Menurut Gibson and Roberfroid (1995), probiotik bakteri asam laktat merupakan salah satu imunomodulator yang berperan dalam meningkatkan mekanisme tubuh baik secara spesifik maupun nonspesifik

Jumlah leukosit dapat dipengaruhi oleh stres, pemberian estrogen, penyakit, obat (Swenson, 1993), dan umur (Talebi, *et al.*, (2005). Rataan jumlah leukosit pada penelitian ini cenderung meningkat seiring bertambahnya dosis pemberian *Lactobacillus paracasei*, namun tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) secara statistik. Hasil penelitian Nyamagonda *et al.*, (2009) yang menggunakan probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan probiotik komersial multi strain juga menunjukkan jumlah leukosit lebih tinggi pada perlakuan probiotik *Lactobacillus acidophilus* $18.96 (10^3/\text{mm}^3)$ dibandingkan kontrol $15.39 (10^3/\text{mm}^3)$. Demikian juga hasil penelitian (Chuka, 2014), yang membandingkan pemberian probiotik (*Saccharomyces cerevisiae*) $18.45 (10^3/\text{mm}^3)$ dengan enzim komersil (*Zyme*[®]) $13.22 (10^3/\text{mm}^3)$ serta kombinasinya menunjukkan jumlah leukosit lebih tinggi dibandingkan kontrol.

Leukosit merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh yang dapat bergerak. Leukosit ini dibentuk sebagian di sumsum tulang dan bagian lagi di jaringan limfa. Leukosit mempunyai dua fungsi, yaitu menghancurkan agen penyerang dengan proses fagositosis dan



membentuk antibodi (Guyton dan Hall 2008). Umumnya sel-sel darah putih di dalam aliran darah bersifat non fungsional dan akan ditransport ke bagian jaringan disaat dibutuhkan serta ditempatkan dimana leukosit tersebut diperlukan (Frandsen, 1993).

5. Indeks eritrosit (MCV, MCH dan MCHC)

Indeks eritrosit merupakan indikator yang dapat digunakan untuk mengetahui kondisi kesehatan diantaranya untuk mengetahui terjadinya penyakit anemia, sehingga dapat dihubungkan dengan penyebab anemia tersebut. MCV sebagai indikator anemia berdasarkan ukuran eritrosit. Nilai MCH digunakan untuk mengetahui kondisi anemia ternak berdasarkan massa hemoglobin. Adapun MCHC untuk mengetahui kondisi anemia yang berdasarkan konsentrasi hemoglobin (Guyton dan Hall, 2008).

Nilai MCV pada penelitian ini berada pada kisaran 109.82-111.53 fl. Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap nilai MCV. Nilai MCV pada semua perlakuan pada penelitian ini masih berada dalam kisaran normal. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wakenell (2010), bahwa rata-rata nilai MCV 90-140 fl. Oleh karena itu kebutuhan nutrisi pada broiler dalam penelitian ini cukup tersedia untuk pembentukan eritrosit. Menurut Fauci *et al.*, (2008), MCV bernilai tinggi saat terjadi anemia yang menandakan defisiensi asam sementara MCV yang lebih rendah saat anemia menandakan defisiensi zat besi.



Nilai MCH pada penelitian ini berada pada kisaran normal 32.77–34.11 Pg. Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap nilai MCH. Menurut Wakenell (2010), rata-rata nilai MCH pada ayam, yaitu 33-47 Pg. Hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan laporan hasil penelitian Talebi *et al.*, (2005) yang menunjukkan nilai MCH broiler strain Cobb umur 35 hari, yaitu 53 (Pg). Menurut Bashar *et al.*, (2011), eritrosit yang besar (makrositik) biasanya memiliki nilai MCH yang tinggi dan sebaliknya eritrosit yang kecil memiliki nilai MCH yang rendah.

Nilai MCHC merupakan ukuran massa hemoglobin yang terdapat didalam eritrosit atau banyaknya haemoglobin per eritrosit. Nilai MCHC pada penelitian ini berada pada kisaran 29.96%-31.14%. Nilai tersebut masih berada dalam kisaran normal. Hal ini sesuai laporan Wakenell (2010), bahwa nilai MCHC yang normal, yaitu 26%-35%.

Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap nilai MCHC. Nilai MCHC yang diperoleh pada penelitian dapat menjadi indikator, bahwa broiler memiliki konsentrasi hemoglobin yang sesuai dengan jumlah eritrositnya dalam cairan darah. Artinya hemoglobin melakukan fungsinya dengan baik, yaitu jumlah hemoglobin yang mengangkut oksigen (O_2) dari paru-paru atau dalam peredaran darah, yang dibawa oleh eritrosit untuk kebutuhan jaringan kupa, serta membawa karbon dioksida (CO_2) dari jaringan ke paru-



paru. Kondisi ini tentunya membantu aktivitas metabolisme tubuh lebih baik (Wakenell, 2010).

Kondisi hematologis ternak akan mengalami perubahan seiring dengan perubahan fisiologisnya secara internal dan eksternal. Perubahan secara internal dapat disebabkan oleh penambahan umur, status gizi, kesehatan, panas tubuh, serta stres. Perubahan secara eksternal dapat disebabkan penyakit mikroorganisme dan perubahan suhu lingkungan (Guyton dan Hall, 2008). Parameter hematologi yang diukur dalam penelitian ini, yaitu eritrosit, hemoglobin, hematokrit, leukosit dan indeks eritrosit secara keseluruhan menunjukkan kondisi yang normal. Oleh karena itu perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei* yang digunakan dalam penelitian memberikan respon positif terhadap fisiologi darah, sehingga dapat dikatakan kondisi kesehatan broiler yang baik.

C. Organ Limfoid

Persentase bobot bursa fabrisius terbesar terdapat pada perlakuan 5 mL/hari (0.194%) dan terkecil pada perlakuan kontrol (0.152%). Demikian juga persentase bobot limpa terbesar terdapat pada perlakuan 1 mL/hari dan 5 mL/hari (0.20%) dan terendah pada perlakuan kontrol (0.17%). Selanjutnya persentase bobot timus terbesar terdapat pada perlakuan 3 mL/hari (0.32%) dan terkecil pada perlakuan 1 mL/hari (0.17%). Hasil analisis sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap persentase bobot bursa fabrisius,



timus dan limpa. Persentase bobot organ limfoid broiler dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 14.

Tabel 14. Persentase bobot organ limfoid pada broiler umur 35 hari

Parameter	Perlakuan Probiotik				P-Nilai
	Kontrol	1 mL/hari	3 mL/hari	5 mL/hari	
BF (%)	0.152 ± 0.04	0.186 ± 0.03	0.186 ± 0.04	0.194 ± 0.03	0.17
Timus (%)	0.31 ± 0.09	0.30 ± 0.06	0.32 ± 0.09	0.31 ± 0.05	0.99
Limpa (%)	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.62

Keterangan: BF (Bursa Fabricius)

Perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei* yang digunakan dalam penelitian ini cenderung memiliki nilai persentase bobot bursa fabricius dan limpa lebih tinggi dibandingkan kontrol. Oleh karena itu secara keseluruhan perlakuan *Lactobacillus paracasei* memiliki persentase organ limfoid (bursa fabricius dan limfa) lebih besar dibandingkan kontrol.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Zhang *et al.*, (2012) yang menemukan bahwa bobot relatif bursa fabricius tidak dipengaruhi pemberian probiotik *Bacillus subtilis* (10^8 CFU/kg). Demikian juga hasil penelitian Sikandar *et al.*, (2017) menunjukkan tidak ada perbedaan ($P > 0.05$) pemberian probiotik *Bacillus subtilis* (2×10^{10} CFU/g ransum) terhadap berat relatif bursa fabricius, kecuali pada organ timus dan limpa menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$).



Bursa fabrisius merupakan organ limfoid yang hanya ditemukan pada unggas. Organ ini terletak pada daerah dorsal kloaka. Bursa fabrisius terdiri dari sel-sel limfoid yang tersusun atas kelompok-kelompok yang disebut folikel limfoid. Pada bagian dalam ditemukan lumen, lumen dibatasi oleh deretan epitel yang membungkus folikel limfoid. Setiap folikel limfoid terdiri dari korteks yang berisi sel-sel limfosit, sel plasma, dan makrofag, sedangkan bagian medula hanya terdiri dari sel-sel limfosit (Riddel, 1987).

Bursa fabrisius mempunyai tugas untuk memproduksi dan mendewasakan sel limfosit B. Selanjutnya sel B dipindahkan ke dalam sirkulasi dan siap untuk menerima dan memberikan reaksi terhadap benda asing yang masuk kedalam tubuh. Bila antigen memasuki tubuh, pertama-tama antigen akan dikenal sedemikian rupa sehingga dapat dikenali sebagai benda asing. Setelah itu informasi yang diperoleh harus dikirim kesistem pembentuk antibodi dalam hal ini bursa fabrisius. Sistem ini nantinya akan menanggapi dengan membentuk antibodi khusus dan sel yang mampu menyingkirkan antigen. Pada unggas yang terjangkiti bakteri patogen maka bursa fabrisius membentuk antibodi akibatnya akan menyebabkan deplesi dan folikel limfoid menjadi kecil sehingga persentase bobot bursa fabrisius menurun (Tizzard, 1988).

Unggas yang mempunyai berat relatif bursa fabrisius lebih besar lebih tahan terhadap berbagai penyakit. Bursa fabrisius mencapai mbuhan maksimum pada saat ayam berumur 3-6 minggu untuk



ayam broiler (Cross, 1987) dan umur 4-12 minggu (Riddel, 1987) untuk ayam petelur. Bursa fabrisius akan mengalami pertumbuhan optimum ketika mencapai kematangan seksual. Hasil penelitian Handharyani (1994) menunjukkan persentase bobot relatif bursa fabrisius ayam broiler umur 4 minggu rata-rata 0.19% dari bobot hidup, sedangkan menurut Toghyani *et al.*, (2010), 0.098%

Imunosupresi akan ditunjukkan dengan adanya tekanan, hambatan, atau gangguan pada komponen sistem kekebalan tubuh, antara lain langsung merusak dan mengganggu pertumbuhan organ limfoid primer (bursa fabrisius dan timus), sekaligus organ limfoid sekunder (limpa) (Gregg, 2002). Organ limfoid primer maupun sekunder yang sangat kecil merupakan reaksi terhadap kasus imunosupresi yang berlangsung dalam jangka waktu lama. Ternak yang memiliki bobot relatif limfoid yang besar, cenderung tahan terhadap berbagai penyakit (Sturkie, 2000). Limpa yang relatif kecil mengindikasikan nafsu makan yang rendah. Limpa yang letaknya menempel pada lambung membantu mendistribusikan nutrisi, karena memproduksi juga eritrosit (Fauci *et al.*, 2008). Limpa akan berkembang pesat saat serangan penyakit yang meradang (gejala klinis). Persentase bobot limpa dari bobot hidup adalah 0.18% (Putnam, 1991 dan Toghyani *et al.*, 2010). Persentase bobot timus adalah 0.48% (Toghyani *et al.*, 2010).

Hasil penelitian pada tahap kedua tentang pemberian probiotik *Lactobacillus paracasei* yang diisolasi dari saluran pencernaan broiler tiga



hari pada berbagai level yang berbeda menunjukkan, bahwa *Lactobacillus paracasei* dapat memperbaiki kondisi histologi usus halus yang meliputi tinggi vili, luas permukaan vili dan kerapatan vili. Demikian juga kondisi kesehatan broiler yang digunakan selama penelitian tidak terganggu berdasarkan indikator kondisis hematologis dan persentase bobot organ limfoid. Berdasarkan hal tersebut, maka perlakuan *Lactobacillus paracasei* yang memberikan respon terbaik terdapat pada level 3 mL/hari (1.7×10^8 CFU/mL) . Selanjutnya *Lactobacillus paracasei* level 3 mL/hari diaplikasikan pada penelitian tahap ketiga untuk melihat potensinya dalam mengurangi dan/atau menggantikan fungsi antibiotika sebagai imbuhan pakan pada broiler.

Penelitian Tahap Ketiga

A. Daya cerna

Kecernaan protein pada penelitian berkisar antara 72.6%-78.1%, sedangkan kecernaan serat kasar berkisar antara 34.1%-39.9%. Daya cerna protein tertinggi terdapat pada P3 (78.1), sedangkan terendah pada P1 (72.6). Selanjutnya daya cerna serat kasar tertinggi terdapat pada pada P5 (39.9) dan terendah pada P1 (34.7). Perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei* dan antibiotika *zinc bacitracin* cenderung memiliki nilai kecernaan protein dan serat kasar yang lebih tinggi dibandingkan

ol.



Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap daya cerna protein dan serat kasar. Hasil penelitian tentang daya cerna protein kasar dan serat kasar disajikan pada Tabel 15. Perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei* (P2) memiliki pencernaan protein yang lebih tinggi dibandingkan kontrol (P1), namun lebih rendah dibandingkan perlakuan antibiotika (P3), perlakuan antibiotika umur 1-7 hari dan dilanjutkan pemberian probiotik *Lactobacillus paracasei* umur 8-35 hari (P4), dan perlakuan antibiotika umur 1-14 hari dilanjutkan pemberian probiotik *Lactobacillus paracasei* 15-35 hari (P5). Tingkat pencernaan protein yang lebih tinggi pada perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei* dibandingkan kontrol karena disebabkan oleh kemampuan probiotik tersebut memperbaiki kondisi histologi vili usus halus, seperti tinggi vili, luas permukaan vili dan kerapatan vili, sehingga tingkat absorpsi protein yang lebih besar.

Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan Knap *et al.*, (2011) yang menunjukkan, bahwa ransum broiler yang ditambahkan dengan probiotik (*Bacillus subtilis*) secara signifikan memperbaiki pencernaan ileum protein kasar dan retensi nitrogen. Demikian juga hasil penelitian Bhatt *et al.*, (2016) pada kelinci *Chinchilla* yang menggunakan probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactococcus lactis* menunjukkan perlakuan probiotik memiliki pencernaan protein yang lebih tinggi, yaitu *Lactobacillus acidophilus* (82.7%) dan *Lactococcus lactis* (82.6%) dibandingkan kontrol (78.5%). Selanjutnya Mahmoud *et al.*, (2017) menunjukkan bahwa



suplementasi probiotik (*Bacillus subtilis*) dapat meningkatkan pencernaan protein kasar (2.9 g/100 g) dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 15. Daya cerna protein kasar (%) dan serat kasar (%)

Parameter	Perlakuan					P-Nilai
	P1	P2	P3	P4	P5	
Protein kasar	72.6 ± 1.2	75.2 ± 1.9	78.1 ± 0.9	75.3 ± 1.9	76.8 ± 0.3	0.15
Serat Kasar	34.7 ± 2.7	37.1 ± 1.4	38.8 ± 1.8	38.3 ± 0.6	39.9 ± 0.4	0.28

Keterangan: P1 (Kontrol), P2 (Probiotik), P3 (Antibiotika), P4 (Antibiotika hari ke-1 sampai ke-7, Probiotik hari ke-8 sampai ke-35), P5 (Antibiotika hari ke-1 sampai ke-14, Probiotik hari ke-15 sampai ke-35, standar error (\pm))

Kecernaan protein pada perlakuan antibiotika *zinc bacitracin* (P3) lebih tinggi (78,1 %) dibandingkan perlakuan yang lain. Beberapa hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan hal yang sama, seperti hasil penelitian Mountzouris *et al.*, (2010) yang menggunakan antibiotika *avilamycin* menunjukkan pencernaan protein lebih tinggi (77.5%) dibandingkan perlakuan probiotik multi strain (*Lactobacillus reuteri* DSM 16350, *Enterococcus faecium* DSM 16211, *Bifidobacterium animalis* DSM 16284, *Pediococcus acidilactici* DSM 16210 dan *Lactobacillus salivarius* DSM 16351), dengan dosis perlakuan 10^8 CFU/kg pakan (72.8%), 10^9 CFU/kg pakan (73.4%) dan 10^{10} CFU/kg pakan (70.7%) dan kontrol (72.8%). Namun berbeda dengan laporan Hossain *et al.*, (2015) yang menunjukkan pencernaan protein lebih tinggi ($P < 0.05$) pada perlakuan probiotik (*Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* dan *Lactobacillus*



acidophilus), yaitu 69.49 % dan 71.93 % dibandingkan perlakuan antibiotika *enramycin* (69.21 %), antibiotik *avilamycin* (68.03 %) dan kontrol (68.43 %).

Penggunaan *Antibiotic Growth Promotant* (AGP) dapat meningkatkan pencernaan nutrisi karena AGP melalui mekanisme penekanan aktivitas pertumbuhan dan metabolisme dari mikroflora usus, perubahan pertumbuhan usus, morfologi, dan fungsi seperti pengurangan ketebalan epitel usus dan regenerasi sel epitel. Berkurangnya populasi mikroflora akan menyebabkan kompetisi dalam pemanfaatan nutrisi dengan tubuh ternak berkurang, sehingga menghasilkan nutrisi yang lebih banyak tersedia untuk absorpsi dan pertumbuhan ternak (Barton, 2000 dan Miles *et al.*, 2006). Di sisi lain, probiotik memiliki konsep yang berbeda dari AGP, tujuan pemberian probiotik untuk memodulasi lingkungan usus dan meningkatkan fungsi pertahanan usus melalui fortifikasi mikroflora usus yang menguntungkan, berkompetisi dengan patogen, dan stimulasi sistem kekebalan tubuh (Koenen *et al.*, 2004; (Dalloul *et al.*, 2005; Farnell *et al.*, 2006; Chichlowski *et al.*, 2007; Mountzouris *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2008; dan Mountzouris *et al.*, 2009). Selanjutnya menurut Abaza *et al.*, (2008) bahwa pemberian probiotik (*Bacillus subtilis*) dapat memberikan respon positif terhadap pencernaan protein karena dapat dikaitkan dengan mekanisme probiotik but dalam regulasi lingkungan mikroba usus, mengurangi gangguan



pencernaan, menghambat patogen pada usus dan meningkatkan efisiensi ransum.

B. Performa Broiler

Mekanisme mikrobiota mempengaruhi performa broiler bervariasi antara bagian usus. Pada usus halus sebagian besar nutrisi, seperti karbohidrat, asam amino dan vitamin akan diabsorpsi. Oleh karena itu, setiap kelainan di usus halus cenderung berhubungan langsung dengan performa. Pada usus halus bagian proksimal (duodenum, jejunum), jumlah bakteri lebih rendah daripada di usus halus bagian distal (ileum) (Apajalahti and Vienola, 2016). Performa broiler yang diukur dalam penelitian ini meliputi konsumsi ransum, penambahan bobot badan, konversi ransum, bobot badan akhir, persentase lemak abdominal dan persentase bobot karkas.

Dalam penelitian ini pengamatan terhadap konsumsi ransum, penambahan bobot badan dan konversi ransum broiler dilakukan sebanyak tiga kali, yaitu fase *starter* (umur 1-21 hari), fase *grower* (umur 22-35 hari) dan selama fase pemeliharaan (umur 1-35 hari). Pembagian fase pemeliharaan broiler dalam penelitian ini sesuai dengan pernyataan Dagher (1998), bahwa pemeliharaan broiler dapat dibagi dalam tiga fase, yaitu fase *starter* umur nol sampai tiga minggu, fase *grower* umur 3

hingga sampai 6 minggu dan fase *finisher* umur 6 minggu hingga dipasarkan. Data konsumsi ransum, penambahan bobot badan, dan konversi ransum disajikan pada Tabel 16.





Konsumsi ransum, penambahan bobot badan, dan konversi ransum

Parameter	Umur (hari)	Perlakuan					P-Nilai
		P1	P2	P3	P4	P5	
Konsumsi ransum (g)	1-21	859 ± 17	864 ± 13	887 ± 7	897 ± 20	885 ± 9	0.30
	22-35	1633 ± 21	1619 ± 44	1700 ± 29	1617 ± 23	1715 ± 41	0.13
	1-35	2492 ± 20	2483 ± 52	2587 ± 33	2513 ± 41	2599 ± 36	0.12
Pertambahan bobot badan (g)	1-21	600 ± 8	609 ± 9	629 ± 9	628 ± 8	629 ± 0	0.89
	22-35	755 ^a ± 5	827 ^b ± 9	897 ^c ± 6	826 ^b ± 14	880 ^c ± 5	0.00
	1-35	1354 ^a ± 5	1436 ^b ± 7	1527 ^d ± 7	1456 ^c ± 5	1510 ^d ± 6	0.00
Konversi Ransum	1-21	1.43 ± 0.04	1.42 ± 0.03	1.40 ± 0.02	1.43 ± 0.03	1.41 ± 0.03	0.96
	22-35	2.17 ^a ± 0.03	1.96 ^b ± 0.04	1.89 ^b ± 0.02	1.96 ^b ± 0.04	1.95 ^b ± 0.06	0.00
	1-35	1.84 ^a ± 0.02	1.73 ^b ± 0.08	1.69 ^b ± 0.05	1.72 ^b ± 0.03	1.72 ^b ± 0.02	0.01

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perlakuan berbeda nyata ($P < 0.05$): P1 (Kontrol), P2 (Probiotik), P3 (Antibiotika), P4 (Antibiotika hari ke-1 sampai ke-7, Probiotik hari ke-8 sampai ke-35), P5 (Antibiotika ahari ke-1 sampai ke-14, Probiotik hari ke-15 sampai ke-35, standar error (\pm))

1. Konsumsi ransum

Hasil penelitian menunjukkan konsumsi ransum pada broiler yang diberikan perlakuan *Lactobacillus paracasei* (probiotik) pada umur 8 hari untuk menggantikan pemberian antibiotika (P4) memiliki konsumsi ransum tertinggi pada periode fase *starter*. Demikian juga pemberian probiotik pada umur 15 hari untuk menggantikan pemberian antibiotika (P5) memiliki konsumsi ransum paling tinggi pada fase *grower* dan selama fase pemeliharaan (umur 1-35 hari). Tingginya konsumsi ransum pada perlakuan P4 dan P5 menunjukkan, bahwa *Lactobacillus paracasei* dapat digunakan untuk menggantikan antibiotika pada umur tertentu dan tidak menurunkan konsumsi ransum.

Aplikasi probiotik *Lactobacillus paracasei* asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari dalam air minum sebagai kandidat probiotik dan antibiotika *zinc bacitracin* tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap konsumsi ransum pada semua fase pemeliharaan selama penelitian. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi konsumsi ransum, yaitu ransum yang diberikan memiliki kandungan energi dan protein sama.

Konsumsi ransum yang tidak berbeda diantara perlakuan dalam penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hosseini *et al.*, (2013) yang menyatakan, bahwa pemberian probiotik bakteri asam laktat (*Streptococcus* dan *Bifidobacterum*) selama masa pertumbuhan pada broiler tidak menunjukkan perbedaan ($P>0,05$) dengan kontrol. Bahkan ada kecenderungan konsumsi ransum lebih rendah



seiring dengan meningkatnya dosis probiotik. Demikian juga penelitian Olhood *et al.*, (2015) yang menunjukkan tidak ada perbedaan ($P>0.05$) konsumsi ransum antara pemberian antibiotika *zinc bacitracin*, probiotik bakteri asam laktat *Lactobacillus johnsonii* dan kontrol pada fase *starter* dan *grower*. Akan tetapi berbeda dengan hasil penelitian Mazhari *et al.*, (2016) yang menunjukkan pengaruh yang nyata ($P<0.05$) pemberian probiotik (protexin) dan antibiotika *virginiamycin* terhadap konsumsi ransum broiler pada fase *starter* (umur 1-10 hari), fase *finisher* (26-42 hari). Perbedaan kedua hasil penelitian tersebut menunjukkan, bahwa strain broiler dan jenis probiotik yang digunakan dapat mempengaruhi konsumsi ransum broiler.

Pada awal pemeliharaan broiler diharapkan memiliki konsumsi ransum yang tinggi karena akan merangsang perkembangan sistem organ pencernaan. Sehingga pada tahap-tahap selanjutnya akan mempengaruhi pertumbuhan dan performa broiler. Pada penelitian ini konsumsi ransum pada perlakuan yang diberikan imbuhan pakan probiotik *Lactobacillus paracasei* dan antibiotika *zinc bacitracin* pada umur 1-21 hari memiliki konsumsi ransum yang lebih tinggi dibandingkan kontrol, walaupun secara statistik perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap konsumsi ransum. Oleh karena itu pemberian probiotik pada awal pemeliharaan broiler merupakan salah satu strategi untuk memperbaiki konsumsi ransum. Disamping itu probiotik yang diberikan lebih awal pada pemeliharaan broiler akan mempengaruhi komposisi ekosistem mikroflora



saluran pencernaan. Menurut Sjojfan (2010) probiotik di dalam saluran pencernaan membentuk koloni dan menggeser kedudukan mikroba patogen, sehingga keseimbangan populasi mikroba dan ekosistem saluran pencernaan tetap terjaga dengan didominasi mikroba non patogen.

Lactobacillus paracasei yang diberikan pada broiler dalam penelitian ini merupakan mikroorganisme hidup yang tentunya membutuhkan nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangannya dalam sistem pencernaan. Kebutuhan nutrisi tersebut dapat dipenuhi dari ransum yang dikonsumsi broiler. Oleh karena itu, akan terjadi kompetisi antara mikroba probiotik, tubuh ternak dan mikroba patogen untuk mendapat sumber energi. Akan tetapi, mikroba probiotik memiliki mekanisme kerja dapat membatasi pertumbuhan dan perkembangan mikroba patogen dalam sistem pencernaan, hal tersebut menyebabkan populasi mikroba probiotik lebih dominan. Dengan demikian zat-zat makanan yang seharusnya digunakan mikroba patogen sebagai sumber energinya akan dimanfaatkan oleh mikroba probiotik. Sehingga pada akhirnya tidak akan mengganggu kebutuhan nutrisi tubuh broiler.

Menurut Apajalahti *et al.*, (2004), kebutuhan energi untuk reproduksi dan pertumbuhan bakteri di saluran cerna sebagian besar diperoleh dari nutrisi yang tahan terhadap serangan gastrointestinal atau absorpsi dengan sangat lambat, sehingga ternak akan bersaing dengan bakteri untuk pemanfaatannya. Bakteri yang hidup di usus halus mungkin



akan menggunakan 10 sampai 20% karbohidrat dan asam amino yang bisa juga dimanfaatkan oleh tubuh ternak.

Jumlah Konsumsi ransum merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan ternak. Broiler sebagai unggas yang diciptakan untuk tujuan penghasil daging membutuhkan jumlah konsumsi ransum yang cukup agar potensi genetiknya dapat tercapai. Hal ini sesuai dengan pernyataan North dan Bell (1978), bahwa kecepatan pertumbuhan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya jumlah konsumsi ransum.

2. Pertambahan bobot badan

Pertambahan bobot badan tertinggi pada umur 1-21 hari pada P3 dan P5 (629 g) dan terendah pada P1 (600 g). Sedangkan pada umur 22-35 hari tertinggi pada P3 (897 g) dan terendah pada P1 (755 g). Demikian juga pada umur 1-35 hari pertambahan bobot badan tertinggi pada P3 (1527 g) dan terendah pada P1 (1354 g). Pertambahan bobot badan broiler yang diberikan perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei* dan antibiotika *zinc bacitracin* selama penelitian disajikan pada Tabel 16.

Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap pertambahan bobot badan pada umur 1-21 hari. Akan tetapi, pada saat umur 22-35 hari dan umur 1-35 hari perlakuan menunjukkan pengaruh yang nyata ($P<0.05$).

Hasil uji wilayah berganda Duncan terhadap pertambahan bobot badan pada umur 22-35 dan menunjukkan perbedaan ($P<0,05$) antara P1 dan P2, P3, P4, dan P5. Demikian juga antara P2 dengan P3 dan P5.



Sedangkan antara perlakuan P2 dan P4 serta antara P3 dan P5 tidak menunjukkan perbedaan ($P>0.05$). Selanjutnya pada umur 1-35 hari pertambahan bobot badan menunjukkan perbedaan ($P<0.05$) antara P1 dengan P2, P3, P4 dan P5. Demikian juga antara P2 dengan P3, P4, dan P5, serta antara P4 dengan P3 dan P5. Sedangkan P3 dan P5 tidak menunjukkan perbedaan ($P>0.05$).

Pertambahan bobot badan pada umur 1-21 secara statistik tidak berbeda. Hal ini menunjukkan, bahwa probiotik *Lactobacillus paracasei* dan antibiotika *zinc bacitracin* belum mampu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertambahan bobot badan broiler pada fase *starter*. Walaupun pada umur tersebut perlakuan yang diberikan probiotik dan antibiotika memiliki pertambahan bobot badan yang lebih tinggi dibandingkan kontrol.

Respon broiler terhadap pemberian probiotik dan antibiotika mulai terlihat pada fase *grower* (umur 22-35 hari) dan selama fase pemeliharaan (umur 1-35 hari). Pertambahan bobot badan tertinggi pada fase *grower* dan selama fase pemeliharaan terdapat pada perlakuan antibiotika (P3). Namun tidak menunjukkan perbedaan secara statistik ($P>0.05$) dengan perlakuan pemberian probiotik umur 15 hari sebagai pengganti antibiotika (P5).

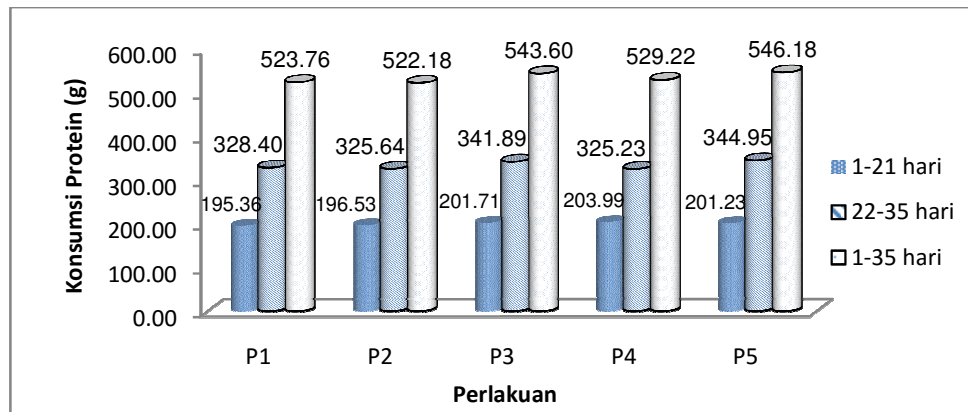
Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Siadati *et al.*, (2017) membandingkan pemberian probiotik komersial dengan *Lactobacillus* pada puyuh, secara signifikan meningkatkan pertambahan



bobot selama fase *starter*, fase *finisher*, dan total fase pemeliharaan (umur 1- 35 hari). Namun berbeda dengan hasil penelitian Bai *et al.*, (2013) yang menunjukkan peningkatan penambahan bobot badan dan efisiensi ransum pada broiler yang diberikan probiotik *Lactobacillus fermentum* JS (1×10^7 CFU/g) dan *Saccharomyces cerevisiae* (2×10^6 CFU/g) lebih baik dibandingkan dengan kontrol negatif dan perlakuan kontrol positif (antibiotika *chlortetracycline* 100 mg/kg ransum) pada fase starter (umur 1-21 hari). Perbedaan hasil penelitian ini dapat disebabkan jenis kelamin, strain dan jenis probiotik serta antibiotika yang digunakan. Pada penelitian ini, broiler yang digunakan merupakan campuran jenis kelamin jantan dan betina, sedangkan pada penelitian Bai *et al.*, (2013) menggunakan jenis kelamin jantan.

Pertambahan bobot badan merupakan salah satu ukuran yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan. Pertambahan bobot badan dapat diartikan sebagai kemampuan broiler untuk mengubah nutrisi dalam ransum menjadi daging. Salah satu nutrisi yang penting dalam pertumbuhan bobot badan broiler, yaitu protein. Tingginya pertumbuhan bobot badan pada perlakuan probiotik dan antibiotika disebabkan karena jumlah konsumsi protein yang juga tinggi pada perlakuan tersebut, walaupun tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan perlakuan kontrol (P1) seperti yang disajikan pada Gambar 11.





Gambar 11. Konsumsi protein (g) pada broiler yang dipelihara selama 35 hari.

3. Konversi ransum

Konversi ransum tertinggi umur 1-21 hari pada P1 dan P4 (1.43), dan terendah pada P3 (1.40). Konversi ransum tertinggi umur 22-35 hari pada P1 (2.17) dan terendah pada P3 (1.89). Konversi ransum tertinggi umur 1-35 hari pada P1 (1.84) dan terendah pada P3 (1.69). Konversi ransum pada broiler selama penelitian disajikan pada Tabel 16.

Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap konversi ransum pada umur 1-21 hari. Akan tetapi, perlakuan menunjukkan pengaruh yang nyata ($P < 0.05$) terhadap konversi ransum pada umur 22-35 hari dan umur 1-35 hari. Hasil uji wilayah berganda Duncan terhadap konversi ransum pada umur 22-35 hari dan umur 1-35 hari menunjukkan perbedaan ($P < 0.05$) antara P1 dengan P2, P4, dan P5. Sedangkan antara perlakuan P2, P3, P4 dan P5 tidak menunjukkan perbedaan ($P > 0.05$).



Efisiensi pemanfaatan ransum pada broiler dapat dilihat pada nilai konversi ransum. Nilai konversi ransum berkaitan erat dengan pertambahan bobot badan sehingga faktor-faktor yang berpengaruh pada konsumsi ransum dan pertambahan bobot badan akan berpengaruh juga pada konversi ransum. Dalam penelitian ini perlakuan tidak menunjukkan pengaruh yang nyata ($P>0.05$) terhadap konversi ransum pada fase *starter* (umur 1-21 hari), namun setelah masuk fase *grower* (umur 22-35 hari) dan selama fase pemeliharaan (umur 1-35 hari) menunjukkan pengaruh yang nyata ($P<0.05$).

Pemberian probiotik dan anitibiotika dalam penelitian ini memiliki efisiensi penggunaan ransum lebih baik dibandingkan kontrol. Hal tersebut dapat mengurangi biaya ransum yang dikeluarkan dalam produksi broiler. Oleh karena itu penggunaan imbuhan pakan, terutama yang berfungsi sebagai promotor pertumbuhan pada broiler merupakan alternatif untuk mencapai tujuan tersebut.

Selama masa awal pertumbuhan broiler, kolonisasi mikroba yang menguntungkan dalam sistem pencernaan broiler belum stabil. Sehingga sangat rentan terpapar patogen dari lingkungan sekitarnya. Pemberian probiotik pada masa awal pertumbuhan dapat menjadi alternatif untuk memodulasi kolonisasi mikroba dalam sistem pencernaan broiler. Karena probiotik diharapkan akan hidup dalam sistem pencernaan tersebut secara permanen, sehingga akan menentukan pola kolonisasi bakteri selama masa awal kehidupan broiler. Menurut Hooper *et al.*, (2001)



kolonisasi awal sangat penting bagi tubuh ternak karena bakteri dapat memodulasi ekspresi gen di sel epitel. Oleh karena itu, secara tidak langsung mikroba probiotik dalam sistem pencernaan memiliki peran dalam meningkatkan efisiensi penggunaan ransum. Mikroba probiotik yang mampu membentuk kolonisasi dalam sistem pencernaan khususnya pada bagian usus halus akan membuat kondisi vili-vili menjadi lebih baik. Mekanisme ini dapat dipahami melalui kompetisi mikroba probiotik dengan beberapa patogen yang melekat pada vili. Keberadaan patogen pada vili dapat mengganggu fungsi absorpsi, karena patogen dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang menutupi bagian permukaan vili. Saat patogen melekat pada mukosa usus, maka fungsi usus sangat kuat dipengaruhi (Droleskey *et al.*, 1994) dan sistem kekebalan tubuh terancam (Neish, 2002).

Menurut Apajalahti *et al.*, (2004), terdapat bukti meningkatnya hubungan antara energi metabolis yang nyata dari komposisi ransum dan mikrobiota di usus karena beberapa komponen dalam ransum dapat dikonversi langsung menjadi metabolit berenergi tinggi oleh bakteri khusus. Oleh karena itu akan memberi lebih banyak energi untuk tubuh yang dapat diukur sebagai efisiensi konversi ransum yang lebih baik. Sedangkan menurut Rahman (2009), konversi ransum yang lebih baik pada pemberian probiotik, mungkin disebabkan oleh mikroflora normal dengan probiotik mengubah metabolisme dengan meningkatkan tingkat enzim pencernaan dan tingkat pencernaan nutrisi energi.



Tujuan pemberian imbuhan pakan pada broiler, yaitu untuk meningkatkan performa ternak tersebut. Berbagai laporan hasil penelitian telah menunjukkan efektifitas bakteri asam laktat sebagai probiotik dalam meningkatkan performa broiler. Menurut Muir *et al.*, (2000) dan Yamazaki *et al.*, (2012), bahwa kehadiran beberapa bakteri asam laktat *Lactobacillus* di saluran pencernaan ayam telah digambarkan sangat penting untuk mengembangkan imunitas usus dan meningkatkan kesehatan ayam.

Terdapat dua mekanisme dasar probiotik bekerja di dalam sistem pencernaan, yaitu berkompetisi (*competition exclusive*) dan kombinasi dengan bakteri menguntungkan. Kompetisi untuk substrat, menghasilkan metabolit antimikroba yang menghambat pertumbuhan patogen, dan persaingan untuk melekat pada vili usus (Mokhtari *et al.*, 2015). Suplemen probiotik khususnya spesies *Lactobacillus* memiliki efek positif terhadap resistensi agen infeksius karena dapat menurunkan populasi *Salmonella*, *Campylobacter* spp. dan *Clostridium perfringens*. Sedangkan disisi lain terjadi peningkatan *Lactobacillus* pada broiler yang disuplementasi probiotik dibandingkan yang tidak diberikan perlakuan probiotik (Murry *et al.*, 2006).

Banyak laporan hasil penelitian juga menunjukkan pemberian probiotik pada broiler tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap performa. Hal ini menunjukkan, bahwa probiotik tidak memberikan hasil yang konsisten terhadap performa broiler. Efektifitas



probiotik dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya metode pemberian (Hopper *et al.*, 2001) dan waktu pemberian (Timmerman *et al.*, 2006).

4. Lemak abdominal dan bobot karkas

Lemak abdominal tertinggi pada P3 (2.8 %), sedangkan terendah pada P1 (2.2 %). Bobot karkas tertinggi terdapat pada P3 (70.62 %) dan terendah pada perlakuan P1 (66.97%). Hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap lemak abdominal dan persentase bobot karkas. Persentase lemak abdominal dan bobot karkas broiler yang diberikan perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei* dan antibiotika *zinc bacitracin* selama penelitian disajikan pada Tabel 17.

Tabel 17. Persentase lemak abdominal (LA) dan persentase bobot karkas (BK) broiler

Parameter	Perlakuan					P-Nilai
	P1	P2	P3	P4	P5	
LA (%)	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.4	2.8 ± 0.2	2.3 ± 0.5	2.4 ± 0.4	0.09
BK (%)	66.9 ± 0.9	68.5 ± 0.7	70.6 ± 1.3	68.9 ± 0.7	69.5 ± 2.5	0.07

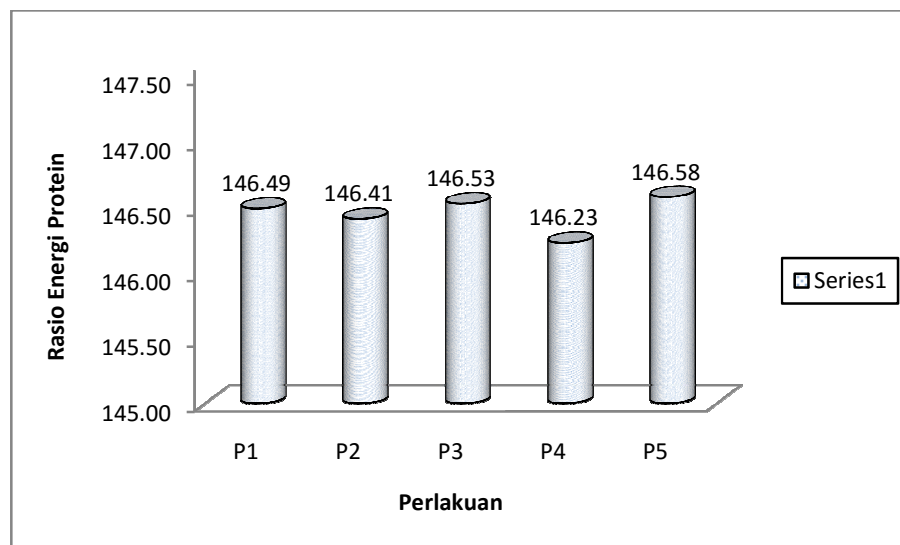
Keterangan: P1 (Kontrol), P2 (Probiotik), P3 (Antibiotika), P4 (Antibiotika hari ke-1 sampai ke-7, Probiotik hari ke-8 sampai ke-35), P5 (Antibiotika hari ke-1 sampai ke-14, Probiotik hari ke-15 sampai ke-35), Standar error (\pm)

4.1 Lemak abdominal

Lemak abdominal merupakan lemak yang terdapat di sekeliling ikulus, usus, otot daerah perut, bursa fabrisius dan kloaka. Rata-rata kandungan lemak abdominal dalam penelitian ini tidak berbeda secara



statistik ($P > 0.05$). Perlakuan kontrol (P1) memiliki kandungan lemak abdominal paling rendah dibandingkan perlakuan P2, P3, P4 dan P5. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kandungan lemak abdominal, yaitu kulit ransum. Tidak adanya perbedaan secara statistik kandungan lemak abdominal diantara perlakuan dalam penelitian disebabkan ransum yang dikonsumsi memiliki rasio energi dan protein yang sama. Akan tetapi terdapat kecenderungan persentase lemak abdominal pada perlakuan probiotik dan antibiotika lebih tinggi. Pada Gambar 12 disajikan rasio energi dan protein dalam ransum yang dikonsumsi pada masing-masing perlakuan.



Gambar 12. Rasio energi dan protein dalam ransum yang dikonsumsi pada broiler yang dipelihara selama 35 hari



Rasio energi dan protein dalam ransum yang dikonsumsi juga dapat mempengaruhi kandungan lemak abdominal pada broiler. Semakin meningkat rasio antara energi dan protein, maka akan diikuti secara linear dengan peningkatan kandungan lemak abdominal. Hasil analisis statistik menunjukkan perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap rasio energi dan protein dalam ransum yang dikonsumsi.

Broiler yang diberikan ransum dengan kandungan protein tinggi (23%) akan memiliki kandungan lemak abdominal yang lebih tinggi dibandingkan dengan diberikan ransum protein rendah (Lubis, 1992). Tujuan biologis utama dari penyimpanan lemak pada broiler, yaitu sebagai cadangan energi yang diperoleh pada saat jumlah konsumsi energi ransum melimpah. Lebih dari 85% dari total lemak tubuh disimpan dalam jaringan adiposa (subkutan, intermuskular, dan lemak abdominal) sebagai pasokan energi (Leenstra, 1986). Lemak abdominal dapat digunakan sebagai parameter untuk menilai keseluruhan kandungan lemak tubuh karena terkait langsung dengan kandungan total lemak tubuh (Becker *et al.*, 1979 dan Thomas *et al.*, 1983). Sekitar 2% sampai 3% dari berat hidup broiler merupakan lemak abdominal (Leenstra, 1986).

Mikroorganisme dalam sistem pencernaan memiliki peran dalam proses pembentukan lemak abdominal broiler. Hasil penelitian Kalavathy *et al.*, (2003) menunjukkan efek *Lactobacillus* terhadap lemak abdominal profil lipid pada broiler. Pada penelitian tersebut digunakan *Lactobacillus* multi strain 0.1% (12 strain) yang ditambahkan dalam



ransum broiler umur 14 sampai 42 hari secara signifikan menunjukkan penurunan kadar trigliserida serum dan lemak abdomen. Demikian pula juga Homma and Shinohara, (2004) melaporkan, bahwa penambahan probiotik *Bacillus cereus toyoi* dalam ransum burung puyuh jantan dari umur 27 sampai 55 hari selama empat minggu secara signifikan mengurangi akumulasi lemak abdominal. Sedangkan pada hasil penelitian ini pemberian perlakuan probiotik tidak menunjukkan pengaruh yang nyata ($P>0.05$). Perbedaan hasil ini menunjukkan bahwa jumlah strain dan jenis mikroba probiotik yang digunakan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap persentase lemak abdominal broiler.

4.2 Persentase Bobot Karkas

Salah satu parameter yang dapat digunakan untuk menilai produksi broiler, yaitu persentase bobot karkasnya. Dalam penelitian ini persentase bobot karkas tidak menunjukkan perbedaan secara statistik. Namun demikian perlakuan pemberian aditif pakan probiotik dan antibiotik umumnya memiliki persentase bobot karkas lebih tinggi dari kontrol. Persentase bobot karkas tertinggi pada perlakuan P3 (70.62%) dan terendah pada P1 (66.97). Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Sarangi *et al.*, (2016) yang menunjukkan tidak ada perbedaan ($P>0.05$) persentase karkas antara perlakuan probiotik dengan kontrol. Namun berbeda dengan hasil penelitian Boostani *et al.*, (2013), bahwa terjadi peningkatan performa, kualitas karkas, dan efisiensi ransum pada broiler diberikan *yoghurt* dan probiotik *Lactobacillus* melalui air minum.



Menurut Lubis (1992), persentase bobot karkas tidak selalu berkorelasi secara linear dengan berat hidup, artinya jika berat hidup rendah tidak selamanya persentase bobot karkas semakin rendah. Menurut (Kalavathy *et al.*, 2003), pemberian kultur *Lactobacillus* pada broiler dapat mengurangi lemak abdominal dan memperbaiki kualitas karkas dengan mengurangi lemak karkas.

5. Persentase Ayam Hidup

Persentase ayam hidup selama penelitian disajikan pada Tabel 18. Hasil penelitian menunjukkan, bahwa broiler yang dipelihara pada umur 1-21 hari tidak terjadi kematian pada semua perlakuan. Namun setelah broiler berumur 22-35 hari terjadi kematian sebanyak satu ekor pada perlakuan P1 (kontrol). Tidak adanya kematian pada perlakuan P2, P3, P4 dan P5 yang diberikan imbuhan pakan menunjukkan bahwa broiler pada perlakuan tersebut mungkin memiliki kondisi kesehatan yang lebih baik dibandingkan perlakuan kontrol. Salah satu mekanisme probiotik dan antibiotika dalam sistem pencernaan, yaitu menghambat pertumbuhan dan perkembangan mikroba patogen yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan pada broiler.

Angka mortalitas dapat menjadi acuan untuk melihat adanya masalah dalam pemeliharaan broiler. Untuk mencegah tingkat kematian pemeliharaan broiler, maka dapat dilakukan dengan pemberian vaksin, obat-obatan, dan memperbaiki kondisi kandang dan lingkungan sekitarnya. Selama ini industri perunggasan, khususnya pada broiler



melakukan upaya untuk mengurangi tingkat mortalitas dengan pemberian antibiotika.

Tabel 18. Persentase ayam hidup broiler yang dipelihara selama 35 hari

Umur (hari)	Perlakuan					P-Nilai
	P1	P2	P3	P4	P5	
1-21	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	0.94
22-35	97.5 ± 0.01	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	0.43

Keterangan: P1 (Kontrol), P2 (Probiotik), P3 (Antibiotika), P4 (Antibiotika hari ke-1 sampai ke-7, Probiotik hari ke-8 sampai ke-35), P5 (Antibiotika hari ke-1 sampai ke-14, Probiotik hari ke-15 sampai ke-35, standar error (\pm))

Antibiotika adalah zat kimia produk yang diperoleh dari jenis mikroorganisme tertentu pada konsentrasi rendah yang bisa menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain, dan bahkan bisa menyebabkan kematian mikroorganisme tersebut. Pada masa lalu, penggunaan antibiotik dalam makanan, sebagai pengobatan dan baik pada tingkat perawatan yang lebih rendah (seperti promotor pertumbuhan) tersebar luas.

Pemberian imbuhan pakan probiotik *Lactobacillus paracasei* dan antibiotika *zinc bacitracin* dalam penelitian ini dapat mencegah atau mengurangi tingkat mortalitas. Tingkat mortalitas yang tinggi merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi indeks produksi pemeliharaan

er. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Khan *et al.*, (2011)

menunjukkan persentase kematian pada broiler yang diberikan antibiotik tidak signifikan ($P=0.99$), tingkat mortalitas lebih rendah pada



perlakuan kelompok probiotik, yaitu proteksin (2.00%), biovet (1.75%), dan *yoghurt* (1.50%) dibandingkan kelompok kontrol (3.92%) pada akhir percobaan. Presentase kematian broiler pada penelitian yang terdapat pada P1 (1%) masih berada pada kisaran yang lebih rendah dari satandar kelayakan keberhasilan pemeliharaan broiler, yaitu 5%.

D. Pembahasan Umum

Kondisi saluran pencernaan broiler sebelum menetas masih steril dari spesies mikroba. Akan tetapi beberapa saat setelah menetas dan terjadi kontak dengan udara luar, maka secara cepat spesies mikroba dalam saluran pencernaan mulai berkembang biak. Menurut Stanley *et al.*, (2013), mikrobiota pada ayam dapat berasal dari lingkungan saat menetas, pakan dan pekerja yang menangani saat penetasan. Apajalahti *et al.*, (2004) melaporkan, bahwa satu hari setelah menetas kepadatan bakteri mencapai 10^8 per gram digesta ileum dan 10^{10} per gram digesta sekum broiler. Kemudian terjadi peningkatan jumlah mikroba mencapai 10^9 per gram digesta ileum dan 10^{11} per gram digesta sekum selama tiga hari pertama setelah menetas dan tetap relatif stabil selama 30 hari berikutnya. Selanjutnya menurut Sjöfyan (2010), mikroflora dalam sistem pencernaan ayam setelah beberapa jam menetas ditemukan *Lactobacillus* (tembolok), *Enterococcus faecalis* (duodenum sampai sekum), dan asuki hari ketiga, *Lactobacillus* mulai terdapat di usus bersama an *Clostridia*, *Coliform* dan *Enterococci*.



Spesies mikroba dalam saluran pencernaan ayam dapat dibagi dalam dua kelompok, yaitu bersifat menguntungkan dan juga merugikan (patogen). Mikroba yang menguntungkan terutama dari kelompok bakteri asam laktat (BAL) dapat dikembangkan sebagai probiotik untuk unggas itu sendiri. *Lactobacillus* merupakan salah satu spesies mikroba yang telah berkembang pada awal kehidupan broiler, yaitu hari ketiga setelah penetasan. Menurut Bjerrum *et al.*, (2006), berdasarkan studi molekuler menunjukkan bahwa populasi *Lactobacillus* dalam ileum, yaitu 70%.

Dalam penelitian ini telah berhasil diisolasi empat isolat BAL (H2, H3, H5, dan H7) asal usus halus broiler umur tiga hari. Seluruh isolat yang diperoleh bersifat Gram positif, katalase negatif, non motil, tipe fermentasi homofermentatif dan heterofermentatif. Berdasarkan buku pedoman *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, maka karakteristik isolat H2 memiliki kesamaan dengan genus *Enterococcus* sp. sedangkan isolat H3, H5 dan H7 memiliki kesamaan genus *Lactobacillus* sp.

Hasil uji probiotik (pH asam, garam empedu, suhu dan aktifitas antimikroba terhadap patogen) secara *in vitro* pada semua isolat (H2, H3, H5, dan H7) menunjukkan, bahwa tidak semua memiliki potensi sebagai kandidat probiotik pada unggas. Setiap isolat memiliki kemampuan pertumbuhan yang berbeda terhadap pH asam dan garam empedu, dan suhu serta aktifitas antimikroba terhadap patogen. Oleh

na itu isolat diurutkan (ranking) berdasarkan kemampuan tumbuh dan as antimikroba paling besar keterkecil. Berdasarkan hal tersebut,



maka isolat H7 memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik untuk unggas.

Isolat H7 yang telah diidentifikasi sebagai genus *Lactobacillus* sp. berdasarkan buku pedoman *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* selanjutnya diidentifikasi dengan pendekatan molekuler melalui analisis gen 16S rRNA. Berdasarkan analisis program BLAST dari NCBI, maka hasil kesesuaian (homolog) isolat H7 menunjukkan tingkat kemiripan paling besar dengan *Lactobacillus paracasei*.

Aplikasi isolat H7 sebagai kandidat probiotik terhadap kondisi histologi vili usus halus berpengaruh baik terhadap tinggi vili, luas permukaan vili, dan kerapatan vili. Dosis 3 mL/hari (1.7×10^8 CFU) merupakan level optimum dalam memberikan respon yang baik terhadap kondisi histologi usus halus. Kondisi vili yang baik akan meningkatkan jumlah absorpsi zat-zat makanan dari ransum yang dikonsumsi. Hal ini memberikan efek yang menguntungkan pada kebutuhan broiler akan zat-zat makanan, seperti pada proses pembentukan darah (hematologis) dan organ limfoid.

Gambaran nilai hematologis broiler pada penelitian ini tidak menunjukkan respon yang buruk setelah diberikan perlakuan Isolat H7 (*Lactobacillus paracasei*). Demikian juga terhadap kondisi organ limfoid (bursa fabrisius, limpa, dan timus) yang diukur. Hasil penelitian ini

menunjukkan bahwa broiler yang diberikan perlakuan *Lactobacillus paracasei* (probiotik) memiliki respon kekebalan tubuh dan resistensi



penyakit yang lebih baik dibandingkan perlakuan kontrol. Menurut El-Azeem *et al.*, (2015), bahwa peningkatan dalam bobot relatif organ limfoid dianggap sebagai indikasi kemajuan imunologi. Selanjutnya dikatakan, bahwa pengukuran bobot organ imun merupakan metode umum untuk mengevaluasi status kekebalan tubuh pada ayam.

Dalam penelitian ini persentase bobot relatif bursa fabrisius cenderung lebih tinggi seiring meningkatnya dosis pemberian isolat H7 (probiotik). Persentase bobot relatif bursa fabrius terkecil pada perlakuan kontrol (0.154 %) dan terbesar pada perlakuan yang diberikan probiotik, yaitu P4 (0.195 %). Hasil penelitian ini menunjukkan, bahwa perlakuan probiotik dapat meingkatkan persentase bobot relatif broiler yang dipelihara selama 35 hari dibandingkan kontrol. Hasil penelitian tersebut lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Al-khaf *et al.*, (2010) pada broiler (strain ross) umur empat minggu (28 hari) yang diberikan perlakuan probiotik (*Pediococcus acidilactic* 10^9 cfu/g), yaitu kontrol (0.219 %) dan probiotik (0.243-0.265 %). Namun setelah memasuki umur 6 minggu (42 hari), persentase bobot relatif bursa fabrisius menunjukkan penurunan, yaitu kontrol (0.05%) dan probiotik (0.056%-0.059%). Selanjutnya hasil penelitian El-Azeem *et al.*, (2015) pada broiler (*strain Cobb*) umur 36 hari yang diberikan probiotik menunjukkan persentase bobot relatif bursa fabrisius pada perlakuan probiotik campuran *Enterococcus faecium* (%), probiotik campuran *Bacillus subtilis* (0.11%), probiotik *haromyces cerevisiae* (0.12 %), dan kontrol (0.08%). Berdasarkan



hasil-hasil penelitian tersebut, perlakuan probiotik cenderung memiliki persentase bobot relatif bursa fabrisus lebih tinggi dibandingkan kontrol. Oleh karena isolat H7 yang teidentifikasi sebagai *Lactobacillus paracasei* (probiotik) dapat digunakan sebagai salah satu alternatif imunomodulator pada broiler.

Produktifitas broiler dapat dipengaruhi oleh kemampuan sistem saluran pencernaan dalam mencerna zat makanan pada ransum yang dikonsumsi. Kecernaan protein kasar dan serat kasar pada penelitian ini tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) secara statistik. Namun demikian, broiler yang diberikan perlakuan imbuhan pakan *Lactobacillus paracasei* dan *zinc bacitracin* menunjukkan tingkat kecernaan yang lebih baik dibandingkan kontrol. Salah satu faktor yang menyebabkan tingginya tingkat kecernaan pada perlakuan yang diberikan imbuhan pakan, yaitu kondisi vili usus halus yang lebih baik (P1). Menurut Barton (2000) dan Milles *et al.*, (2006), bahwa antibiotika yang diberikan pada ternak dapat menekan aktifitas pertumbuhan dan metabolisme mikroflora usus, sehingga secara tidak langsung akan menyebabkan perubahan pada usus, seperti pengurangan ketebalan vili usus dan regenerasi sel. Disisi lain ketersediaan zat-zat makanan yang diabsorpsi lebih banyak, sehingga jumlah absorpsi zat-zat makanan akan meningkat. Sedangkan mekanisme mikroba probiotik dalam meningkatkan kecernaan menurut Abaza *et al.*,

3) karena dapat mempengaruhi perubahan lingkungan mikroba usus sehingga pertumbuhan mikroba patogen tidak berkembang. Hal tersebut



menyebabkan jumlah hasil metabolisme patogen (toksin) yang dapat mengganggu fungsi usus berkurang. Dengan demikian menurut Abdel-Reaheem *et al.*, (2012) kondisi vili akan menjadi lebih baik, sehingga fungsi absorpsi zat-zat makanan akan meningkat.

Kebutuhan protein dan energi dari ransum yang dikonsumsi harus dipenuhi secara seimbang. Apabila terjadi kekurangan salah satu dari zat makanan tersebut, maka fisiologi broiler dapat terganggu. Kecernaan protein dan serat kasar yang rendah akan menyebabkan kebutuhan protein dan energi tidak tercukupi. Disisi lain broiler tidak dapat memanfaatkan energi secara efisien, sehingga pertumbuhan menjadi terlambat.

Komposisi dan pencernaan ransum memiliki dampak besar pada mikrobiota usus, karena zat-zat yang berasal dari ransum merupakan substrat yang penting untuk pertumbuhan mikroba. Kecernaan protein dan serat kasar yang tinggi pada perlakuan probiotik *Lactobacillus paracasei* dan antibiotika *zinc bacitracin* dalam penelitian ini memberikan dampak terhadap pertumbuhan populasi mikroba probiotik, baik yang diberikan sebagai perlakuan maupun yang telah ada dalam saluran pencernaan. Meningkatnya populasi mikroba probiotik dalam saluran pencernaan akan menyebabkan kondisi vili-vili pada usus halus berkembang baik. Hal tersebut menyebabkan jumlah absorpsi zat-zat

makanan meningkat. Oleh karena itu mikroba probiotik yang berkembang di saluran pencernaan memainkan peran penting dalam kesehatan



dan performa broiler. Selain itu menurut Kumprecht *et al.*, (1984), mikroba probiotik dapat meningkatkan efisiensi pemanfaatan zat makanan dari ransum yang diperoleh karena dapat merangsang pencernaan zat makanan yang tidak dapat dicerna, seperti selulosa, hemiselulosa, dan selobiosa dalam sistem pencernaan.

Seiring bertambahnya umur broiler, maka mikroba dalam saluran pencernaan juga semakin kompleks dan terjadi kompetisi dalam memanfaatkan sumber energi antara bakteri patogen dan non-patogen. Pada kondisi tersebut imbuhan pakan (probiotik dan antibiotika) sangat berperan penting untuk menekan pertumbuhan patogen. Probiotik dapat mempertahankan lingkungan saluran pencernaan yang sehat dan meningkatkan fungsi usus yang diupayakan melalui asupan jumlah mikroorganisme hidup yang cukup dan bermanfaat.

Aplikasi probiotik *Lactobacillus paracasei* (isolat BAL H7) asal saluran pencernaan broiler umur tiga hari dan antibiotika *zinc bacitracin* tidak menunjukkan perbedaan ($P>0.05$) terhadap konsumsi ransum pada semua fase pemeliharaan broiler. Respon broiler terhadap pemberian probiotik *Lactobacillus paracasei* dan *zinc bacitracin* terlihat setelah broiler berumur 22-35 hari dan selama periode pemeliharaan (umur 1-35 hari). Hal ini terlihat pada nilai penambahan bobot badan dan konversi ransum yang lebih baik dibandingkan kontrol. Demikian juga tidak terjadi mortalitas pada perlakuan *Lactobacillus paracasei*.



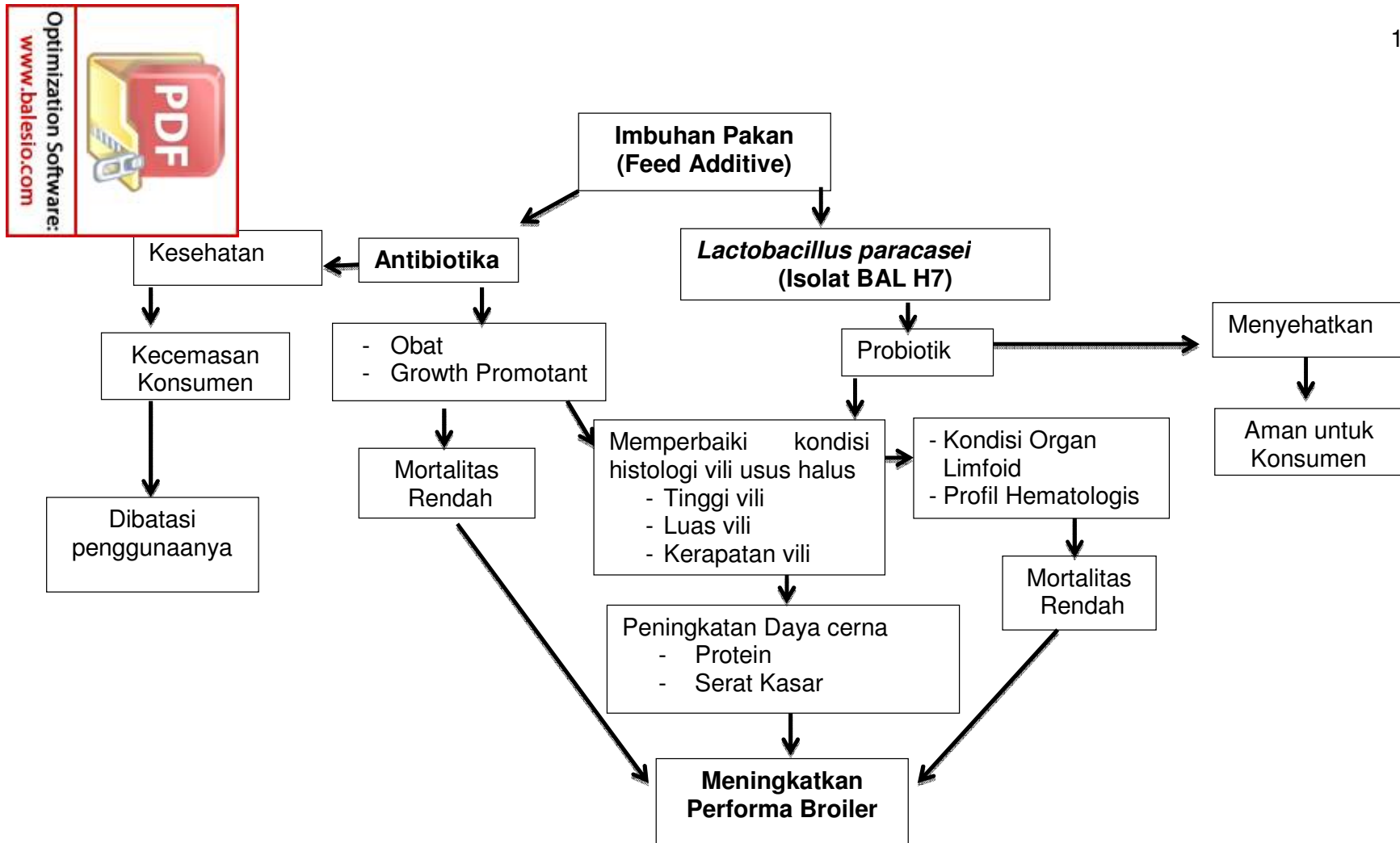
Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan pada tahap ketiga, maka probiotik *Lactobacillus paracasei* yang diperoleh belum dapat menggantikan fungsi antibiotika yang digunakan sebagai imbuhan pakan pada broiler. Akan tetapi pada perlakuan yang diberikan antibiotika sampai satu minggu (tujuh hari) dan dua minggu (14 hari) kemudian dihentikan dan selanjutnya digantikan dengan pemberian *Lactobacillus paracasei* menunjukkan hasil performa ayam broiler yang cukup baik. Oleh karena itu ada peluang untuk dipertimbangkan dalam manajemen penggunaan antibiotika, terutama setelah broiler berumur dua minggu (15-35 hari).

Perlakuan probiotik yang diberikan melalui air minum dalam penelitian ini mungkin dapat menjadi salah satu faktor efektifitas *Lactobacillus paracaesi* tidak optimum. Oleh karena itu, perlakuan probiotik yang diberikan mungkin akan lebih baik apabila diaplikasi melalui metode yang lain seperti pemberian secara langsung melalui mulut (*per oral*), sehingga jumlah koloni mikroorganisme yang diberikan atau masuk kedalam sistem pencernaan akan lebih sesuai jumlah yang diinginkan sebagai probiotik. Selanjutnya pada pengukuran nilai hemtologis yang dilakukan secara manual, sebaiknya menggunakan *haematology analyzer*, sehingga informasi data yang diperoleh lebih akurat. Pada pengukuran persentase organ limfoid tidak dilakukan amatan terhadap histopatologi, sehingga informasi yang diperoleh lengkap terhadap perkembangan bursa fabrisius, timus dan limpa.



Secara ringkas respon biologis ayam broiler terhadap pemberian isolat H7 (*Lactobacillus paracasei*) sebagai kandidat probiotik disajikan pada Gambar 12.





Gambar 12. Respon broiler terhadap pemberian *Lactobacillus paracasei* (Isolat H7)

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan beberapa hal terkait isolat BAL yang diperoleh:

1. Karakteristik isolat BAL yang diperoleh, yaitu terdapat satu isolat berbentuk bulat, tiga isolat berbentuk batang, tiga isolat bersifat homofermentatif, satu isolat bersifat heterofermentatif, dan seluruh isolat bersifat Gram positif serta katalase negatif.
2. Isolat H7 yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus paracasei* memiliki kemampuan tumbuh pada pH asam, garam empedu serta aktifitas antimikroba rata-rata lebih baik dari isolat yang lain, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik pada broiler.
3. Respon terbaik terhadap perkembangan histologi vili usus halus, nilai hematologis dan bobot relatif organ limfoid yang diberikan *Lactobacillus paracasei* terdapat pada perlakuan level 3 mL/hari (1.7×10^8 CFU/mL)
4. *Lactobacillus paracasei* level 3 mL/hari (1.7×10^8 CFU/mL), tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap daya cerna protein dan serat kasar, konsumsi ransum, persentase lemak abdominal, persentase



bobot karkas dan mortalitas. Tetapi berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap pertambahan bobot badan dan konversi ransum

5. *Lactobacillus paracasei* sebagai kandidat probiotik dapat digunakan untuk mengurangi penggunaan antibiotika pada broiler

Saran

1. *Lactobacillus paracasei* yang diisolasi pada saluran pencernaan (usus halus) broiler umur tiga hari dapat direkomendasikan sebagai alternatif imbuhan pakan untuk mengurangi penggunaan antibiotika pada broiler.
2. Perlu dilakukan pengkajian lanjutan tentang efektifitas pemberian isolat BAL *Lactobacillus paracasei* dalam bentuk sediaan tepung tereskapsulasi melalui ransum broiler.
3. Perlu dilakukan kajian lanjutan efektifitas *Lactobacillus paracasei* dalam bentuk kultur campuran melalui air minum dan ransum broiler.
4. Perlu dilakukan kajian BAL yang efektif dalam penghambatan bakteri patogen Gram positif.



DAFTAR PUSTAKA

- Aazami, N., G. S. Jouzani, Z. Khodaei, A. Meimandipour, M. Safari and M. Goudarzvand. 2014. Characterization of Some Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains Isolated from Iranian Native Chickens. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 60(6): 215–221.
- Abaza, I., M.A Shehata. M.S. Shoib and I.I. Hassa. 2008. Evaluation of Some Natural Feed Additive in Growing Chicks Diets. *Int. J. Poult. Sci.*, 7(9): 872-879.
- Abdel-Fattah. S. A., M. H. El-Sanhoury, N. M. El-Mednay and F. Abdel-Azeem. 2008. Thyroid Activity, Some Blood Constituents, Organs Morphology and Performance of Broiler Chicks Fed Supplemental Organic Acids. *Int. J. Poult. Sci.*, 7(3): 215-222.
- Abdel-Raheem, S.M., S.M. A. Abd-Allah and K.M. Hassanein. 2012. The Effect of Prebiotic, Probiotic and Synbiotic Supplementation on Intestinal Microbial Ecology and Histomorphology of Broiler Chickens. *Int.J. Agro Vet.. Med. Sci.*, 6(4): 277-289.
- Abdelbasset, M. and K. Djamila, 2008. Antimicrobial Activity of Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Traditional Fermented Milk “Raïb”. *Afr. J. Biotechnol.*, 7(16): 2908-2914.
- Abdel-Rahman., M.A., Y. Tashiro and K. Sonomoto. 2013. Recent Advances In Lactic Acid Production By Microbial Fermentation Processes. *Biotechnol. Adv.* 31: 877–02.
- Abun. 2007. Pengukuran Nilai Kecernaan Ransum yang Mengandung Limbah Udang Windu Produk Fermentasi pada Ayam Broiler (Makalah Ilmiah).Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Adedokun, S.A., O. Adeola, C. M. Parsons, M. S. Lilburn and T. J. Applegate. 2008. Standardized Ileal Amino Acid Digestibility of Plant Feedstuffs in Broiler Chickens and Turkey Poults Using a Nitrogen-Free or Casein Diet. *Poult. Sci.*, 87(12): 2535- 2548.
- ad, I. 2006. Effect of Probiotics on Broiler Performance. *Int. J. Poult. Sci.*, 5(6): 593-597.



- Alakomi, H. L., E. Skytta, M. Saarela, T. M. Sandholm, K. L. Kala and I. M. Helander. 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (5): 2001-2005
- Aliakbarpour, H. R., M. Chamani, G. Rahimi, A. A. Sadeghi and D. Qujeq. 2012. The *Bacillus subtilis* and Lactic Acid Bacteria Probiotics Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 25 (9): 1285 – 1293.
- Alcamo, I. E. 2001. *Fundamental of Microbiology*. Jones and Barlett Boston.
- Alkhalif, A., M. Alhaj and I. Al-Homidan. 2010. Influence of Probiotic Supplementation on Blood Parameters and Growth Performance in Broiler Chickens. *Saudi J. Biol. Sci.*, 17(3): 219–225.
- Anastiawan. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik yang Berasal dari Usus Itik Pedaging (Skripsi). Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Anggorodi, H. R. 1979. *Ilmu Makanan Ternak Umum*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- AOAC, 1995. *Official Methode of Analysis: The Association of Official Analytical and Chemists*. 16th Ed. Arlington. Aoac Inc, Virginia.
- Apajalahti, J., A. Kettunen, and H. Graham. 2004. Characteristics of the Gastrointestinal Microbial Communities, with Special Reference to the Chicken. *World's Poult. Sci. J.*, 60(2): 223–232.
- Apajalahti, J. and K. Vienola, 2016. Interaction Between Chicken Intestinal Microbiota and Protein Digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 221: 323–330.
- Apsari, I. D. P. dan I. S. Arta. 2010. Gambaran Darah Merah Ayam Buras yang Terinfeksi Leucocytozoon. *J. Vet.*, 11(2) : 114-118
- Ashayerizadeh, A., N. Dabiri, Kh. Mirzadehand, M. R. Ghorbani. 2011. Effects of Dietary Inclusion of Several Biological Feed Additives on Growth Response of Broiler Chickens. *Cell Anim. Biol.*, 5(4): 61-5.



- Ashayerizadeh, O., B. Dastar, F. Samadi, M. Khomeiri, A. Yamchi and S. Zerehdaran. 2016. Effects of Hematology *Lactobacillus*-Based and Intestinal Probiotic Morphology in on Performance, Young Broiler Gut Chickens Challenged with *Salmonella typhimurium* Microflora. *Poult. Sci. J.*, 4(2): 157-165
- Astawan. M., T. Wresdiyati, I. I. Arief dan E. Suhesti. 2011. Gambaran Hematologi Tikus Putih (*Ra Us Norvegicus*) yang Diinfeksi *Escherichia coli* Enteropatogenik dan Diberikan Probiotik. *Media Peternakan*, 7-13.
- Astuti. 2015. Isolation, Characterization, and Identification Lactic Acid Bacteria from Chicken Fish Waste Faeces that Potential as Probiotics. *Int. J. Current. Res.*, 7(7): 18076-18086.
- Atapattu, N. S. B. M. and C. J. Nelligaswatta. 2005. Effect of Citric Acid on the Performance and Utilization of Phosphorous and Crude Protein in Broiler Chickens Fed Rice by Products Based Diets. *Int. J. Poult. Sci.*, 4(12): 990-993.
- Awad, W. A., K. Chareeb, S. Nitch, S. Pasteiner, S. A. Raheem, and J. Bohm. 2006. Effect of Dietary Inclusion of Probiotic, Prebiotic and Symbiotic on Intestinal Glucose Absorbtion of Broiler Chickens. *Int. J. Poult. Sci.*, 7(1): 688-691.
- Awad, W. A., K. Chareeb, S. Abdel-Raheem and J. Bohm. 2009. Effects of Dietary Inclusion of Probiotic and Symbiotic on Growth Performance, Organ Weight and Intestinal Histomorphology of Broiler Chickens. *Poult. Sci.*, 88(1): 49-56.
- Aziza, R. Z. 2010. *Gambaran Histomorfologi Hati, Usus Halus, dan Limpa pada Tikus Hiperglikemia yang Diberi Ekstrak Sambiloto* (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Bai, S.P., A. M. Wu, X. M. Ding, Y. Lei, J. Bai, K.Y. Zhang and J. S. Chio. 2013. Effects of Probiotic-Supplemented Diets on Growth Performance and Intestinal Immune Characteristics of Broiler Chickens. *Poult. Sci.*, 92(3): 663–670.
- Banks, W. J. 1993. *Applied Veterinary Histology. 3rd Edit.* Marcell Dekker Inc., New York.

osa, T. M., C. R. Serra, R. M. La Ragione, M. J. Woodward and A. O. Henriques. 2005. Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2): 968-978.



- Barton, M. D. 2000. Antibiotic Use in Animal Feed and its Impact on Human Health. *Nutr. Res. Rev.*, 13: 279-299.
- Bashar, Y., H. M. Tukur, A. A. Sekoni and W. A. Hassan. 2011. Nutrient Retention and Haematological Indices of Broiler Starters Fed Lablab Seed Meal as the Source of Protein. *Niger. J. Basic Appl. Sci.*, 18(2): 285-291.
- Bates, J. J., J. Z. Jordens and D. T. Griffiths. 1994. Farm Animal as a Putative Reservoir for Vancomycin-Resistant Enterococcal Infection in Man. *J. Antimicrob. Chemother.*, 34(4): 507-514.
- Becker, W. A., J. V. Spencer, L. W. Mirosh and J. A. Verstrate. 1979. Prediction of Fat and Fat Free Live Weight in Broiler Chickens Using Back Skin Fat, Abdominal Fat and Live Body Weight. *Poult. Sci.*, 58(4): 835-842.
- Begley, M., C. G. M. Gahan and C. Hill. 2005. The Interaction Between Bacteria and Bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29(4): 625-651.
- Bell, D. D. 2002. *Anatomy of the Chicken*. In: Bell D. D and Weaver Jr W. D, editor. *Commercial Chicken Meat and Egg Production*. 5th Ed. Springer Science Business Media, Inc., USA.
- Bell, D. J. and B. M. Freeman. 1971. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. Vol. 1. Academic Press, New York
- Benjamin, M. M. 1978. *Out Line of Veterinary Chemical Pathology*. 3rd Ed. The IOWA State University Press. Ames, USA.
- Beski, S. S. M. and S. Y. T. Al-Sardary. 2015. Effects of Dietary Supplementation of Probiotic and Synbiotic on Broiler Chickens Hematology and Intestinal Integrity. *Int. J. Poult. Sci.*, 14(1):31-36.
- Bhatt, R. S., A. R. Agrawal and A. Sahoo. 2016. Effect of Probiotic Supplementation on Growth Performance, Nutrient Utilization and Carcass Characteristics of Growing Chinchilla Rabbits. *J. Appl. Anim. Res.*, 45(1): 304-309.
- Bjerrum, L., R.M. Engberg, T.D. Leser, B.B Jensen, K. Finster and K Pedersen. 2006. Microbial Community Composition of the Ileum and Cecum of Broiler Chickens as Revealed by Molecular and Cellular-Based Techniques. *Poult. Sci.*, 85: 1151 –1164.

ly, J. dan D. H. Bade. 1994. *Ilmu Peternakan*. Edisi keempat. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. Indonesia.



- Boostani, A., F. H. R. Mahmoodian, A. Ashayerizadeh and M. Aminafshar. 2013. Growth Performance, Carcass Yield and Intestinal Microflora Populations of Broilers Fed Diets Containing Thepax and Yogurt. *Rev. Bras. Cienc. Avicola*, 15(1): 1–6.
- Booth, I. R. and E. G. Kroll. 1989. The Preservation of Food by Low Ph. In: Gould, G.W. (Ed.). Mechanism of Action of Food Preservation Procedures. Elsevier Applied Science, London.
- Bundy, C. E., and R. V. Diggins. 1960. *Poultry Production*. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Campo, J. L., M.G. Gil, I. Munoz and M. Alonso. 2000. Relationship Between Bilateral Asymmetry and Tonic Immobility Reaction or Heterofil to Limfosit Ratio in Five Breed of Chickens. *Poult. Sci.*, 79: 453-459.
- Cao, G. T., X. F. Zeng, A. G. Chen, L. ZhouL, L. Zhang and Y.P. Xiao. 2013. Effects of a Probiotic, *Enterococcus faecium*, on Growth Performance, Intestinal Morphology, Immune Response, and Cecal Microflora in Broiler Chickens Challenged with *Escherichia coli* K88. *Poult. Sci.*, 92 (11): 2949–55.
- Campbell T.W. 1995. *Avian Hematology and Cytology*. Iowa State University Press, Iowa.
- Cavazonni, V., A. Adami and C. Castrovilli. 1998. Performance of Broiler Chickens Supplemented with *Bacillus coagulans* as Probiotic. *Br. Poult. Sci.*, 39(4): 526-529.
- Cempirkova, R. 2007. Contamination of Cow's Raw Milk by Psychrotrophic and Mesophilic Microflora in Relation to Select Factors. *Czech J. Anim. Sci.*, 52(11):387-393.
- Chichlowski, M., J. Croom, B.W. McBride, L. Daniel, G. Davis and M. D. 2007. Direct-Fed Microbial Primalac and Salinomycin Modulate Whole-Body and Intestinal Oxygen Consumption and Intestinal Mucosal Cytokine Production in the Broiler Chick. *Poult. Sci.*, 86 (6): 1100–1106.
- Chou, L. S. and B. Weimer. 1999. Isolation and Characterization of Acid and Bile Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 82(1): 23-31.



- Chuka, E. 2014. Comparative Study of the Effects of Probiotic and Commercial Enzyme on Growth Rate, Haematology and Serum Biochemistry of Broiler Chicken. *J. Food Process. Technol.*, 5: 1–5.
- Chusniati, S. 2000. Residu *Zinc Bacitracin* dalam Daging, Hati dan Ginjal Ayam yang diberi *Feed Additive Zinc Bacitracin* Selama 6 Minggu. *Media Kedokteran Hewan*, 1 (2).
- Coles, E. H. 1980. *Veterinary Clinical Pathology 3rd Ed.* W.B. Saunder Company, Philadelphia.
- Cunningham, J. G. 2002. *Textbook of Veterinary Physiology.* Saunders Company, USA.
- Cross, G. M. 1987. The Lymphatic System. Proceeding of Workshop on Avian Histopathology, Aust. *Vet. Poult. Assoc.*, 122-123.
- Daghir, N. J. 1998. *Poultry Production in Hot Climates.* Second Edition. CAB International, Wallingford. New York.
- Dalloul, R. A., H. S.Lillehoj, N. M. Tamim, T. A. Shellem and J. A. Doerr. 2005. Induction of Local Protective Immunity to *Eimeria acervulina* By A *Lactobacillus*-Based Probiotic. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 28(5-6): 351–361.
- Dehghani, N. and R. Jahanian. 2012. Effects of Dietary Organic Acid Supplementation on Immune Responses and Some Blood Parameters of Broilers Fed Diets With Different Protein Levels. *World's Poult. Sci. J.*, 39: 569–575.
- Dellmann, H. D. dan E. M. Brown. 1992. *Buku Teks Histologi Veteriner, Edisi ke-3.* Penerjemah: Hartono, R.,; Handayani T.H, editor. Jakarta (ID): UI Press, Jakarta.
- Denbow, D.M. 2000. *Gastrointestinal Anatomy and Physiology.* in: *Sturkie's Avian Physiology.* Whittow, G. C. (Editor). Academic Press, London.
- Dewi, S. S. dan H. Anggraini. 2012. *Viabilitas Bakteri Asam Laktat Asal Asi terhadap pH Asam.* Seminar Hasil-Hasil Penelitian – LPPM UNIMUS, Semarang.

mawan, N. S. 2002. *Pengantar Patologi Klinik Veteriner, Hematologi Klinik.* Universitas Udayana, Denpasar.



- Dienye, H.E. and O.K. Olumuji. 2014. Growth Performance and Haematological Response of African Mud Cutfish *Clarias Gariepinus* Fed Dietary Level of Moringa Oleifera Leaf Meal. *Net. J. Agri. Sci.* 2(2);79-88.
- Djide, M. N. dan Sartini, 2008, Isolasi, Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Kol *Brassica oleracea* L. dan Potensinya sebagai Antagonis *Vibrio harveyi* in Vitro. *Torani.*, 18(3) : 211-216.
- Doyle, M. E. 2001. Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry. Food Research Insitutut University of Wiconsin-Medison, Madison.
- Doyle, M. P. and M. P. Erickson. 2006. Reducing the Carriage of Foodborne Pathogens in Livestock and Poultry. *Poult. Sci.*, 85(6): 960-973.
- Droleskey, R. E., B. A. Oyofu, B. M. Hargis, D. E. Corrier and J. R. Deloach. 1994. Effect of Mannose on *Salmonella typhimurium* Mediated Loss of Mucosal Epithelial Integrity in Cultured Chick Intestinal Segments. *Avian Dis.*, 38(2): 275–281.
- Dwiyana, Z. dan R. B. Gobel. 2011. *Mikrobiologi Umum*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Ebenebe, C. I., C. O. Umegechi, Aniebo and B. O. Nweze. 2012. Comparison of Haematological Parameters and Weight Changes of Broiler Chicks Fed Different Levels of *Moringa oleifera* Diet. *Int. J. Agric. Biosci.*, 1(1): 23-25.
- Edelman, S., S. Leskela, E. Ron, J. Apajalahti and T.K. Korhonen. 2003. In Vitro Adhesion of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 Strain to Surface of the Chiken Intestinal Tract and Ileal Mucus. *Vet. Microbiol.*, 91(1): 41-56.
- Elias, M., G. Wiczorek, S. Rosenne and D. S. Tawfik, 2014. The Universality of Enzymatic Rate Temperature Dependency. *Trends Biochem. Sci.*, 39(6): 1-7.
- Evanikastrri. 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Sampel Klinis yang Berpotensi sebagai Probiotik* [tesis]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

az, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan* I. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.



- Farnell, M. B., A. M. Donoghue, D. L. Santos, F. Solis, P. J. Blore, B. M. Hargis, G. Tellez, and D. J. Donoghue. 2006. Upregulation of Oxidative Burst and Degranulation in Chicken Heterophils Stimulated with Probiotic Bacteria. *Poult. Sci.*, 85(11): 1900–1906.
- Fauci, B., K. Hauser, Longo, and Jameson. 2008. *Principles of Internal Medicine*. 17th Ed. McGraw Hill Companies, New York.
- Ferrer, R., J. M. Planas and M. Moreto. 1995. Cell Apical Surface Area in Enterocytes from Chicken Small and Large Intestine During Development. *Poult. Sci.*, 74(12), 1995–2002.
- Franson, R. D. 1993. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Penerjemah B. Srigandono dan K. Praseno. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Fritts, C. A., J. H. Kersey, M. A. Motl, E. C. Kroger, F. Yan, J. Si, Q. Jiang, M. M. Campos, A. L. Waldroup and P.W. Waldroup. 2000. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) Improves Live Performance and Microbiological Status of Broiler Chickens. *J. Appl. Poult. Res.*, 9 (2): 149-155.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animal. *J. Appl. Bacteriol.*, 66(5): 365-378.
- Ganong, W. F. 2008. *Fisiologi Kedokteran (Review of Medical Physiology)*. Edisi Ke-22. Diterjemahkan Adji Dharma. Penerbit Buku Kedokteran, EGC, Jakarta.
- Garbutt J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. London: Arnold.
- Gaspersz, V. 1994. *Metode Perancangan Percobaan untuk Ilmu-Ilmu Pertanian, Ilmu-Ilmu Teknik, dan Biologi*. Edisi Ke-2. Penerbit CV. Armico, Bandung.
- Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.*, 125(6): 1401–1412.
- Gregg, J. C. 2002. *Immunity Commercial Chicken Meat and Egg Production*. 5th Ed. Springer Science and Business Media, New York.



- Gsianturi. 2002. *Probiotik dan Prebiotik untuk Kesehatan*. <http://www.gizi.net/zrsip/arc0-2002.html-26k>. (Diakses 9 September 2015).
- Gulo, F.D.K. 2013. *Gambaran Histologis Proventrikulus, Duodenum, dan Hati Ayam Broiler yang diberi Ekstrak Temulawak Plus Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Gunal, M., G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan dan O. Sulak. 2006. The Effect of Antibiotics Growth Promotor, Probiotic or Organic Acid Supplementation on Performance, Intestinal Microflora and Tissue of Broilers. *Int. J. Poult. Sci.*, 5(2): 149-155.
- Gunawan dan M. M. S. Sundari. 2003. Pengaruh Penggunaan Probiotik dalam Ransum Terhadap Produktivitas Ayam. *Wartazoa*, 13(3): 92-98.
- Guyton, A. C., dan J. E. Hall. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi ke-11. Penerjemah Irawati S, LMA Ken Ariata T, dan Alex S Terjemahan dari: Textbook of Medical Physiology. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Haddadin, M. S. Y., S. M. Abdulrahim, E. A. R. Hashlamoun and R. K. Robinson. 1996. The Effect of *Lactobacillus acidophilus* on the Production and Chemical Composition of Hen Eggs. *Poult. Sci.*, 75(4): 491-494.
- Hammes, W. P. and C. Hertel. 2002. Research Approach for Pre and Probiotics: Challenges and Outlook. *Food Res. Int.*, 35(2-3): 165-170.
- Handharyani, E. 1994. *Perbandingan Pengaruh Infeksi Escheria coli dan Vaksin ND Galur La Sota Terhadap Bursa Fabricius Anak Ayam Pedaging* (Tesis). Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hariabriansah, K. 2004. *Prospek Probiotik Golongan Bakteri Asam Laktat sebagai Immunomodulator* (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hardiningsih, R., R. N. R. Napitupulu dan T. Yulinery. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* sp. pada Ph Rendah. *Biodiversitas*, 7 (1): 15-17.



- Harimurti, S., E. S. Rahayu, Nasroedin dan Kurniasih. 2007. Bakteri Asam Laktat dari Intestin Ayam sebagai Agensi Probiotik. *Anim. Prod.*, 9 (2): 82-91
- Harimurti, S dan E. S. Rahayu. 2009. Morfologi Usus Ayam Broiler yang Disuplementasi dengan Probiotik Strain Tunggal dan Campuran. *Agritech.* ,29(3): 179-183.
- Harper, H. A., V. W. Rodwell and P. A. Mayes. 1992. *Biokimia*. Lange Medical Publication, Los Altos, California.
- Hassan. H.M.A., A.W.Youssef, E.F. El-Daly, N.A. A. El-Azeem, E. R. Hassan and M.A. Mohamed. 2014. Performance, Cecum Bacterial Count and Ileum Histology of Broiler Fed Different Direct-Fed Microbial. *Asian J. Poult. Sci.*, 8(4): 106-114.
- Higgins, S.E., J. P. Higgins, A.D. Wolfenden, S.N. Henderson, A. Torres-Rodriguez, G. Tellez and B. Hargis, 2008. Evaluation of a *Lactobacillus*-Based Probiotic Culture for the Reduction of *Salmonella enteritidis* on Neonatal Broiler Chicks. *Poult. Sci.*, 87(1): 27–31.
- Holzapfel, W. H., P. Harberer, R. Geisen, J. Bjokroth and U. Schilinger. 2001. Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganism in Food and Nutrition. *Amer. J. Clin. Nut.*, 73(2): 365-373.
- Holzapfel, W. H. and U. Schilinger. 2002. Introduction to Pre-and Probiotics. *Food Res. Int.*, 35(2-3): 109-116.
- Homma, H. and T. Shinohara. 2004. Effects of Probiotic *Bacillus cereus* Toyoi on Abdominal Fat Accumulation in the Japanese Quail (*Coturnix Japonica*). *Anim. Sci. J.*, 75(1): 37–41.
- Hooge, D. M., H. Ishimaru and M.D. Sims. 2004. Influence of Dietary *Bacillus subtilis* C-3102 Spores on Live Performance of Broiler Chickens in Four Controlled Pen Trials. *J. Appl. Poult. Res.*, 13(2): 222-228.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk and J. I. Gordon. 2001. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science*, 291(5505): 881-884.



- Hosoi, T., A. Ametani, K. Kiuchi and S. Kaminogawa. 2001. Improved Growth and Viability of *Lactobacilli* in the Presence of *Bacillus subtilis* (Natto), Catalase, or Subtilisin. *Can. J. Microbiol.*, 46(10): 892-897.
- Hossain, M. M., M. Beghum and I. H. Kim. 2015. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Meat Quality, Relative Organ Weight, Microbial Shedding and Excreta Noxious Gas Emission in Broilers. *Vet. Med.*, 60(2): 77–86
- Hosseini, Z., H. N. Moghadam, and H. Kermanshahi. 2013. Effect of Probiotic Supplementation on Broiler Performance at Starter Phase. *Intl. J Agri. Crop Sci.*, (11): 1221-1223.
- Hutkins, R. W. and N. L. Nannen. 1993. Ph Homeostatis in Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.*, 76(8): 2354-2365.
- Huyghebaert, G. 2005. *Alternatives for Antibiotics in Poultry*. Proceedings of the 3rd Mid-Atlantic Nutrition Conference. March 23-24, 2005. Timonium, Maryland.
- Ichikawa, H., T. Kuroiwa, A. Inagaki, R. Shineha, T. Nishihira, S. Satomi and T. Sakata. 1999. Probiotic Bacteria Stimulate Gut Epithelial Cell Proliferation in Rat. *Dig. Dis. Sci.*, 44(10): 2119–2123.
- Iji, P. A., R. J. Hughes, M. Choet, and D. R. Tivey. 2001. Intestinal Structure and Function of Broiler Chickens on Wheat-Based Diets Supplemented with a Microbial Enzym. *Asian-Aust.J. Anim. Sci.*, 14(1): 54-60.
- Iji, P. A. and D. R. Tivey, 1998. Natural and Synthetic Oligosaccharides in Broiler Chicken Diets. *Worlds Poult. Sci. J.*, 54(2): 129–143.
- Incharoen, T. 2013. Histological Adaptations of the Gastrointestinal Tract of Broilers Fed Diets Containing Insoluble Fiber from Rice Hull Meal. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*, 8(2): 79-88.
- Jain, N. C. 1993. *Essential of Veterinary Hematology*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Jey, J. S. 1999. Use of Competitive Exclusion Products for Poultry. Cooperative Extension, University Of California. *Poult. Fact Sheet*. 30.



- Jones, F. T., and S. C. Ricket. 2003. Observation on the History of the Development of Antimicrobials and Floor-Pen Experiment with Chickens. *Exp.Parasitol.* 28(4): 30-36.
- Kalavathy, R., N. Abdullah, S. Jalaludin and Y. W. Ho. 2003. Effects of *Lactobacillus* Cultures on Growth Performance, Abdominal Fat Deposition, Serum Lipids and Weight of Organs of Broiler Chickens. *Br. Poult. Sci.*, 44(1): 139–144.
- Karaoglu, M., and H. Durdag. 2005. The Influence of Dietary Probiotic (*Saccharomyces cerevisea*) Supplementation and Different Slaughter Age on the Performance, Slaughter and Carcass Properties of Broiler. *Int. Poult. Sci.* 4(5):309-316.
- Khaksefidi, A., and T. Ghoorchi. 2006. Effect of Probiotic on Performance and Immunocompetence in Broiler Chicks. *Poult. Sci.*, 43(3): 296-300.
- Khan, S. H., B. Yousaf, A. A. Mian, A. Rehman and M. S. Farooq. 2011. Assessing the Effect of Administering Different Probiotics in Drinking Water Supplement on Broiler Performance, Blood Biochemistry and Immune Response. *J. Appl. Anim. Res.*, 39(4): 418–428.
- Klaenhammer, T. R. 2001. *Probiotic and Prebiotic*. In: Doyle, M.P., R. Larry, Beuchat, Thomas, J. Montvillee. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* 2th Ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Klurfeld, D. M., 1999. Nutritional Regulation of Gastrointestinal Growth. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, 4: 299-302.
- Knap, I., A. B. Kehlet and T. L. Bente. 2011. *B. subtilis* - Improved Protein Digestibility and Equal Performance in Energy-Reduced Diets for Broilers [Conference Poster]. *Rech. Avic. Tours Fr.* 29(30) 349–352.
- Koenen, M. E., J. Kramer, R. van der Hulst, L. Heres, S.H.M. Jeurissen and W. J. A. Boersma. 2004. Immunomodulation by Probiotic *Lactobacilli* in Layer- and Meat-Type Chickens. *Br. Poult. Sci.*, 45(3): 355–366.
- Piang, I. P., D. Zaenuddin dan Supriyati. 2002. Pengaruh Suplementasi *Bacillus apiarius* atau *Torulaspora delbrueckii* terhadap Penampilan Ayam Pedaging. *JITV.*, 7(3): 139-143.



- Kos, B., J. Suskovic, S. Vukovic, M. Simpraga, J. Frece and S. Matosic. 2003. Adhesion and Aggregation ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.*, 94(6): 981-987.
- Koustsos, E. A. and V. J. Arias. 2006. Instestinal Ecology: Interactions Among the Gastrointestinal Tract, Nutrition, and the Microflora. *J. Appl. Poult. Res.*, 15(1): 161-173.
- Kurniawan, W. 2011. Peran obat hewan dalam keamanan produk ternak. (Online) <http://www.majalahinforet.com/2007/10/peran-obat-hewan-dalam-keamanan-produk.html>. (Diakses 14 Oktober 2015).
- Kusumawati, N., B. S.L. Jenie, S. Setyahadi dan R.D. Hariyadi. 2010. Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenus sebagai Galur Probiotik dengan Kemampuan Menurunkan Kolesterol. *Microbiol. Indones.* 8(2).
- Lade, H., 2006. Studies on Some Properties of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus* Species Isolated from Agricultural Waste. *Int. J. Microbiol.*, 2(1): 1-8.
- Lan, P. T. N., M. Sakamoto dan Y. Benno. 2004. Effect of Two Probiotic *Lactobacillus* Strains on Jejunal and Fecal Microbiota of Broiler Chicken Under Acute Heat Stress Condition as Revealed by Molecular Analysis of 16s rRNA Genes. *Microbiol. Immunol.* 48(12): 917-929.
- Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker. 2008. Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72(4): 728-764.
- Leenstra, F. R. 1986. Effect of Age, Sex, Genotype and Environment on Fat Deposition in Broiler Chickens—a Review. *Worlds Poult. Sci. J.*, 42(1): 12–25.
- Lin, W. H., C. F. Hwang, L. W. Chen and H. Y. Tsen. 2006. Viable Counts, Characteristic Evaluation for Commercial Lactic Acid Bacteria Products. *J. Food Microbiol.*, 23(1): 74-81.
- Loddi, M. M., V. M. B. Maraes, I. S. O. Nakaghi, F. Tucci, M. Hannas and J. A. Ariki. 2004. Mannan Oligosaccharide and Organic Acids on Performance and Intestinal Morphometric Characteristics of Broiler Chickens. In 'Proceedings of the 20th Annual Symposium on Computational Geometry. Brooklyn, New York.



- Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer and M. D. Lee. 2003. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(11): 6816-6824.
- Lubis, D. A. 1992. Ilmu Makanan Ternak. PT. Pembangunan, Jakarta
- Mahdavi, A. H., H. R. Rahman and J. Pourreza. 2005. Effect of Probiotic Supplements on Egg Quality and Laying Hen's Performance. *Int. J. Poult. Sci.*, 4(7): 488-492.
- Mahmoud, K. Z., B. S. Obeidat, M. Z. Al-Sadi, and S. R. Hatahet. 2017. Effect of *Bacillus subtilis* Supplementation and Dietary Crude Protein Level on Growth Performance and Intestinal Morphological Changes of Meat Type Chicken. *Livest. Sci.*, 195: 99–104.
- Maruta, K., H. Miyazaki, S. Masuda, M. Takahashi, T. Marubashi, Y. Tandano and H. Takahashi. 1996. Exclusion of Intestinal Pathogens by Continuous Feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its Influence on the Intestinal Microflora in Broiler. *Anim. Sci. Tech.*, 67(1-2): 273-280.
- Mc Donald, P., R. A. Edwards, J. F. D.G. Halgh and C. A. Morgan. 2002. *Animal Nutrition*. Six Ed. Longman Singapura Publishers (Pte) Ltd, Singapura.
- Mc Ewen, S.A., and P.J. Fedorka-Cray. 2002. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clin. Infect. Dis.*, 34(3): 393-3106.
- Meyer, D. J and J. W. Harvey. 2004. *Veterinary Laboratory Medicine Interpretation dan Diagnosis*. Third Ed. Saunders, USA.
- Miles, R. D., G. D. Butcher, P. R. Henry and R. C. Littell. 2006. Effect of Antibiotic Growth Promoters on Broiler Performance, Intestinal Growth Parameters, and Quantitative Morphology. *Poult. Sci.*, 85(3): 476-485.
- Millette, M., F. M. Luquet, M. T. Riuz and M. Lacroix. 2008. Characterization of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains. *Dairy Sci. Technol.*, 88(6): 695–705.

ari, M., O, Esmailipour., R, Mirmahmoudi and Y, Badakshan. 2016. Comparison of Antibiotic, Probiotic and Great Plantain (*Plantago major* L.) on Growth Performance, Serum Metabolites, Immune Response and Ileal Microbial Population of Broilers. *Poult. Sci. J.*, 4(2): 97–105.



- Mokhtari, R., A. Yazdani, and H. Kashfi. 2015. The Effects of Different Growth Promoters on Performance and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *J. Vet. Med. Anim. Health.*, 7(20): 271–277.
- Moser, S.A., and D.C. Savage. 2001. Bile Salt Hydrolase Activity and Resistance to Toxicity of Conjugated Bile Salts are Unrelated Properties in *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8): 3476–3480.
- Mountzouris, K. C., C. Balaskas, I. Xanthakos, A. Tzivinikou and K. Fegeros. 2009. Effects of a Multi-Species Probiotic on Biomarkers of Competitive Exclusion Efficacy in Broilers Challenged with *Salmonella enteritidis*. *Br. Poult. Sci.*, 50(4): 467–478.
- Mountzouris, K. C., P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr and K. Fegeros. 2007. Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition And Metabolic Activities. *Poult. Sci.*, 86(2): 309–317.
- Mountzouris, K. C., P. Tsirtsikos, I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzmayr and K. Fegeros. 2010. Effects of Probiotic Inclusion Levels in Broiler Nutrition on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Plasma Immunoglobulins, and Cecal Microflora Composition. *Poult. Sci.*, 89(1): 58–67.
- Mourad, K., and N. E. Karam. 2006. In Vitro Preselection Criteria for Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains of Fermented Olives Origin. *Int. J. Pro. Pre.*, 1(1): 27–32.
- Mugi, H. M. 2003. *Jumlah Eritrosit, Kadar Hemoglobin dan Nilai Hematokrit Ayam Broiler yang Diberi Probiotik B.Mix.* (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Muir, W. I., W. L. Bryden and A.J. Husband. 2000. Immunity, Vaccination and the Avian Intestinal Tract. *Dev. Comp. Immunol.*, 24(2): 325–342.
- Murry, A. C., A. J. Hinton and R. J. Buhr. 2006. Effect of Botanical Probiotic Containing *Lactobacilli* on Growth Performance and Populations of Bacteria in the Ceca, Cloaca, and Carcass Rinse of Broiler Chickens. *Int. J. Poult. Sci.*, 5(4): 344-350.



- Musikasang, H., A. Tani, A. H-kittikun, and S. Maneerat, 2009. Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Chicken Gastrointestinal Digestive Tract. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(8): 1337–1345.
- Naidu, A. S. and R. A. Clemens. 2000. Probiotics. in: Natural Food Antimicrobial Systems. Naidu A.S. (Ed). CRC Press, LLC, USA.
- Naim, R. 2008. Jangan Sampai Terjadi Super Infeksi, (Online), Majalah Infonet Peternakan dan Kesehatan Hewan. http://www.jangan.sampai.terjadi.super_infeksi.htm, (Diakses tanggal 15 September 2015).
- Nakazawa, Y. And A. Hosono. 1992. *Functions of Fermented Milk: Challenges for the Health Science and Technology*. Elsevier Science Publisher B. V., NewYork.
- Natalia, L dan A. Priadi. 2006. *Sifat Lactobacilli yang Diisolasi dari Usus Ayam Sebagai Probiotik*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Jakarta
- Neish, A. S., 2002. The Gut Microflora and Intestinal Epithelial Cells: a Continuing Dialogue. *Microb. Infect.*, 4(3): 309–317.
- North, M. O and D.D. Bell. 1987. *Commercial Chiken Production Manual*. 3rd Ed. The Avi Publishing Company, Inc. West Port, Connecticut, USA.
- Nunez, M. C., J. D. Bueno, M. V. Ayudarte, A. Almendros, A. Rios, M.D. Suarez and A. Gil. 1996. Dietary Restriction Induces Biochemical and Morphometric Changes in the Small Intestine of Nursing Piglets. *J. Nutr.*, 126(4): 933–944.
- Nyamagonda, H., M. N. Swamy, T. Veena, H. D. N. Swamy, and K. Jayakumar. 2009. Effect of Prebiotic, Probiotic and G-probiotic SPL® on Certain Haematological Parameters In Broiler Chickens. *Vet. World.*, 2(9): 344–346.
- Olivia, M., M. Hartono and V. Wanniatie. 2015. Pengaruh Jenis Bahan Litter terhadap Gambaran Darah Broiler yang Dipelihara di *Closed House*. *J. Ilmiah Peternakan Terpadu* 3(1): 23-28.

od, C. G., S. S. M. Beski, P. A. Iji and M. Choct. 2015. Delivery Routes for Probiotics: Effects on Broiler Performance, Intestinal Morphology and Gut Microflora. *Anim. Nutr.*, 1(3): 192–202.



- Olnood, C. G., S. S. M. Beski, M. Choct, and P. A. Iji. 2015. Novel Probiotics: Their Effect on Growth Performance, Gut Development, Microbial Community and Activity of Broiler Chickens. *Anim. Nutr.*, 1(3): 184-191.
- Panda, A.K., M.R. Reddy, S.V.R. Rao and N.K. Praharaj. 2007. The Role of Yeast Culture *Saccharomyces cerevisiae*, (Online), <http://www.Poultvet.com/poultry/feed.additive/index.php.31>, diakses tanggal 9 September 2015.
- Pan, X., F. Chen, T. Wu, H. Tang, and Z. Zhao. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control.*, 20(6): 598-602.
- Pelczar, M. J dan E. C. S. Chan. 2008. *Dasar-dasar mikrobiologi II*. Terjemahan: R.A. Hadioetomo, T.Imas, S.S.Tjitrosomo, S.L.Angka. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Perko, B. 2011. Effect of Prolonged Storage and Microbiological Quality of Raw Milk. *Mljekarstvo.*, 61(2): 114-124.
- Phillips, I. 1999. The Use of Bacitracin as A Growth Promoter in Animals Produces No Risk to Human Health. *J. Antim. Chem.*, 44(6): 725-728.
- Piliang, W. G., dan S. D Al Haj. 2006. *Fisiologi Nutrisi Volume I*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu hayat Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Pot, B., W. Ludwig, K. Kersers and Schiefer. 1994. *Taxonomy of Lactic Acid Bacteria*. in: L. De Vuyst dan E.J. Vandamme. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetic dan Application. Blackie Academic, London.
- Prado. F. C., J. L. Parada, A. Pandey and C. R. Soccol, C. R. 2008. Trends in Non-Dairy Probiotic Beverages. *Food Res. Int.*, 41(2): 111-123.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2014. Buletin Konsumsi Pangan. Vol. 5. No. 1. Jakarta.
- am, P. A. 1991. *Handbook of Animal Science*. CAB International, London.



- Raditya, I. G. I., I. B. K. Ardana, dan P. Suastika. 2013. Tebal Struktur Histologis Duodenum Ayam Pedaging yang Diberi Kombinasi Tylosin dan Gentamicin. *Indonesia Medicus Veterinus*, 2(5) : 546 – 552.
- Rahimi, S., J. L. Grimes, O. Fletcher, E. Oviedo and B. W. Sheldon. 2010. Effect of a Direct-Fed Microbial (Primalac) on Structure and Ultrastructure of Small Intestine in Turkey Poults. *Poult. Sci.*, 88(3): 491-503.
- Rahman, A. U., S. Khan, D. Khan, M. Hussain, S. Ahmad, M. Sohali, I. Ahmed, I. U. Haq and Z. Shah. 2009. Use of Probiotic in Broiler Feed at Starter Phase. *Sarhad. J. Agric.*, 25(3): 469-473
- Rasyaf, M. 2002. *Manajemen Beternak Ayam Pedaging*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Ray, B. 2003. *Fundamental Food Microbiology*. 3rd Ed. CRC Press, New York.
- Reece, W. O. 2006. *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. 3rd Edition. Blackwell Publishing, USA.
- Refdanita, Maksum, A. Nurgani dan P. Endang. 2004. Pola Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotika di Ruang Rawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Timur Tahun 2001-2002. *Makara Kesehatan*. 8: 41-48.
- Reyes-Herrera, I., M. J. Schneider, M.B. Farnell, P. J. Blore and D. J. Donoghue, 2005. Concentrations of Antibiotics Residues Vary Between Edible Muscle Tissue in Poultry. *J. Food Protein.*, 68(10): 2217-2219.
- Riddel, C. 1987. *Avian Histopathology*. American Association of Avian Pathologists University of Pennsylvania, New Boston Centre Pennsylvania.
- Rolfe, R. D. 2000. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *J. Nut.*, 130(2): 396-402.
- P., A. S. Dhillon, L. H. Lauerman, D. M. Schaberg, D. Bandli and S. Johson. 2002. Result of *Salmonella* Isolation from Poultry Products, Poultry Environment, and Other Characteristics. *Avian. Dis.*, 46(1): 17-24.



- Rusiana. 2007. Hethly Life. Thursday March 22, 2007 (Online) <http://healthy-medicine.blogspot.com.007.03.mengerikan-sebanyak-85-daging-ayam.html>. (Diakses tanggal 9September 2015).
- Ruttanavut, J and K. Yamauchi. 2010. Growth Performance and Histological Alterations of Intestinal Villi in Broilers Fed Dietary Mixed Minerals. *Asian. J. Anim. Sci.*, 4(3): 96-106.
- Samanya, M and K. Yamauchi. 2002. Histological Alterations of Intestinal Villi in Chickens Fed Dried *Bacillus subtilis* Var. natto. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 133 (1): 95–104.
- Samli, H. E., N. Senkoylu, F. Koc, M. Kanter and A. Agma. 2007. Effects of *Enterococcus faecium* and Dried Whey on Broiler Performance, Gut Histomorphology and Intestinal Microbiota. *Arch. Anim. Nutr.*, 61(1): 42–49.
- Sarangi, N. R., L. K. Babu, A. Kumar, C. R. Pradhan, P. K. Pati and J. P. Mishra. 2016. Effect of Dietary Supplementation of Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic on Growth Performance and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *Vet. World.*, 9(3): 313–319.
- Sari, Y. N. M., S. Syukur, dan Jamsari. 2013. Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis. flavicarpa*). *J. Kimia Unand.*, 2 (2): 81-91.
- Sastradipradja, D., S. H. S. Sikar, R. Wijayakusuma, T. Ungerer, A. Maad, H. Nasution, R. Suriawinata, dan Hamzah. 1989. *Penuntun Praktikum Fisiologi Veteriner*. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati, Bogor
- Savkovic, S.D., J. Villanueva, J.R. Turner, K.A. Mathowskyj, and G. Hecht. 2005. Mouse Model of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. *Infect. Immunol.*, 73 (2): 1161–70.
- Schiller, L. R., and J. H. Sellin 2010. *Diarrhea*. in: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, Editor: Sleisengernd Fordtran's Gastrointestinal and Liver disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Saunders Elsevier; Philadelphia.

k, A. C., A. Y. Ismaeel and G. A. Botta. 2005. Probiotics: Facts and Myths. Review. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 11(12): 958-966.



- Siadati, S., Y. Ebrahimnezhad, G. S. Jouzani and J. Shayegh. 2017. Evaluation of Probiotic Potential of Some Native *Lactobacillus* Strains on the Growth Performance and Serum Biochemical Parameters of Japanese Quails (*Coturnix Coturnix Japonica*) during Rearing Period. *Rev. Bras. Cienc. Avicola*, 19(3): 399–408.
- Siegel, H. S. 1995. Stress, Strain, and Resistance. *Brit. Poult. Sci.*, 36(1): 3-22.
- Siegmundfeldt, H., K. Bjorn Rechinger and M. Jakobsen. 2000. Dynamic Changes of Intracellular pH in Individual Lactic Acid Bacterium Cells in Response to A Rapid Drop in Extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6): 2330–2335.
- Sikandar, A., H. Zaneb, M. Younus, S. Masood, A. Aslam, M. Shah and H. Rehman. 2017. Growth Performance, Immune Status and Organ Morphometry in Broilers Fed *Bacillus subtilis*-Supplemented Diet. *South Afr. J. Anim. Sci.*, 47(3): 378–388.
- Silva, A. V. F. da., A. Maiorka, S. A. Borges, E. Santin, I. C. Boleli and M. Macari. 2007. Surface Area of the Tip of the Enterocytes in Small Intestine Mucosa of Broilers Submitted to Early Feed Restriction and Supplemented with Glutamine. *Int. J. Poult. Sci.*, 6(1): 31-35.
- Smirnov, A., D. Sklan, and Z. Uni. 2004. Mucin Dynamics in the Chick Small Intestine are Altered by Starvation. *J. Nutr.*, 134(4): 736–742.
- Smirnov, A., R. Perez, E. Amit-Romach, D. Sklan and Z. Uni. 2005. Mucin Dynamics and Microbial Populations in Chicken Small Intestine are Changed by Dietary Probiotic and Antibiotic Growth Promoter Supplementation. *J. Nutr.*, 135(2): 187–192.
- Smith, F. M., N. H. West and D. R. Jones. 2000. The Cardiovascular System. In: Whittow GC, editor. *Sturkie's Avian Physiology*. Fifth Ed. AcademicPress, USA.
- Stamer. J. 1979. *The Lactid Acid Bacteria* : Microbes of Diversity; Food Technology. Vol 1;60-65.
- Stanley, D., M.S. Geier, S.E. Denman, V.R. Haring T.M. Crowley R.J. Hughes and R.J. Moore. 2013. Identification of Chicken Intestinal Microbiota Correlated with the Efficiency of Energy Extraction from Feed. *Vet. Microbiol.* 164: 85-92.



- Stern, N. J., N. A. Cox, J. S. Bailey, M. E. Berrang and M. T. Musgrove. 2001. Comparison of Mucosal Competitive Exclusion and Competitive Exclusion Treatment to Reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. Colonization in Broiler Chickens. *Poult. Sci.*, 80(2): 156–160.
- Sturkie, P. D. 2000. *Avian physiology*. 15th Ed. Springer-Verlag, New York Inc. United State of America.
- Suardana, I. W., I.N. Suarsana dan K. G. Wiryawan. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali Sebagai Kandidat Biopreservatif. *Jurnal Veteriner.*, 8(4): 155-159.
- Subagyo., S.Magino, Triyanto dan W.A. Setyati. 2015. Pengaruh pH, Suhu Dan Salinitas Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asam Organik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. *Ilmu Kelautan.*, 20(4): 187-194.
- Sugito, W. M., D. A. Astuti, E. Handharyani dan Chairul. 2007. Morfometrik Usus dan Performan Ayam Broiler yang Diberi Cekaman Panas dan Ekstrak N-Heksana Kulit Batang 'Jaloh' (*Salix Tetrasperma* Rozb). *Media Peternakan*, 30(3): 198-206.
- Sumarsih, S. B., C. I. Sulistiyanto, Sutrisno dan E.S. Rahayu. 2012. Peran Probiotik Bakteri Asam Laktat Terhadap Produktivitas Unggas. *J. Litbang Provinsi Jawa Tengah*, 10: 1–5.
- Sun, X. 2004. *Broiler Performance and Intestinal Alteration When Feed Drug-Free Diets* (Thesis). Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia.
- Suprijatna, E., U. Atmomarsono, dan R. Kartasudjana. 2008. *Ilmu Dasar Ternak Unggas*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Surono, I. S. 2004. Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan. Tri Cipta Karya, Jakarta
- Susanto, E. 2014. *Escherichia coli yang Resisten Terhadap Antibiotik yang Diisolasi dari Ayam Broiler dan Ayam Lokal di Kabupaten Bogor* (Tesis). Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Johnson, M. J. 1993. *Physiological Properties and Celluler and Chemical Constituent of Blood in Dukes Physiology of Domestic Animals*. 11th Ed. Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press Ithaca and London.



- Syulasmu, A., Y. Hamdiyati dan Kusnadi. 2005. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi*. Fakultas MIPA. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Talebi, A., S. Rezaei, R. Roshe-Chai., and R, Shahraei. 2005. Comparative Studies on Haematological Values of Broiler Strains (Ross, Cobb, Arbor-acres and Arian). *Int. J. Poult. Sci.*, 4(8): 573-579.
- Tamime, A.Y. 2005. *Probiotic Dairy Product*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Tannock, G. W. 1999. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Mol. Biol.*, 1(1-2): 53-64.
- Tantina. 2014. Residu Antibiotik Fluorokuinolon pada Daging Ayam Broiler di Wilayah Jakarta Timur (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Teo, A. Y. and H. M. Tan. 2005. Inhibition of *Clostridium pefringens* by A Novel Strain of *Bacillus subtilis* Isolated From the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8): 4185-4190.
- Thomas, V. G., S.K. Mainguy and J. P. Prevett. 1983. Predicting Fat Content of Geese from Abdominal Fat Weight. *J. Wildl. Manag.*, 47(4): 1115–1119.
- Timmerman, H. M., A. Veldman, E. Van Den Elsen, F.M. Rombouts and A. C. Beynen. 2006. Mortality and Growth Performance of Broilers Given Drinking Water Supplemented With Chicken-Specific Probiotics. *Poult. Sci.*, 85(5): 1383–1388.
- Tipakorn N. 2002. *Effect of Andrograpis paniculata* (Burm.F) *Nees on Performance, Mortality and Coccidiosis in Broiler Chickens*. [Disertasi]. Faculty of Agricultural Sciences, Institute of Animal Physiology and Animal Nutrition, Thailand
- Tizard, I. R. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Edisi Ke-2. Terjemahan: M. Partodiredjo. Airlangga University Press, Surabaya.

yani, M., M. Tohidi, A. A. Gheisari, and S. A. Tabeidian. 2010. Performance, Immunity, Serum Biochemical and Hematological Parameters in Broiler Chicks Fed Dietary Thyme as Alternative for an Antibiotic Growth Promoter. *Afr. J. Biotechnol.*, 9(40): 6819-6825.



- Tortuero, F and E. Fernandez. 1995. Effects of Inclusion of Microbial Cultures in Barley-Based Diets Fed To Laying Hens. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 53(3): 255–265.
- Trisna, W.N. 2012. Identifikasi Molekuler dan Pengaruh Pemberian Probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) Asal Dadih dari Kabupaten Sijunjung Terhadap Kadar Kolestrol Daging pada Itik Pitalah Sumber Daya Genetic Sumatra Barat. *Artikel. Pascasarjana Universitas Andalas. Padang.*
- Ulupi, N dan T. T. Ihwantoro. 2014. Gambaran Darah Ayam Kampung dan Ayam Petelur Komersial pada Kandang Terbuka di Daerah Tropis. *J. Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan.*, 2(1): 219-223
- Uni, Z., S. Ganot and D. Siklan. 1998. Posthatch Development of Mucosal Function in the Broiler Small Intestine. *Poult.Sci.*, 77(1): 75-82
- Utami, D. E. 2011. Karakterisasi Molekular Bakteri Asam Laktat (BAL) Probiotik dengan Gen 16s RNA yang Berpotensi Menghasilkan Bakteriosin dari Fermentasi Sirsak (*Annona maricata* .L) di Sumatera Barat (Tesis). Program Pascasarjana Universitas Andalas, Padang.
- Van Der Wielen, P. W., D. A. Keuzankamp, L. J. Lipman, F. Van Knapen and S. Biesterveld. 2002. Spatial and Temporal Variation of The Intestinal Bacterial Community in Commercially Raised Broiler Chickens During Growth. *Microb. Ecol.*, 44(3): 286-293.
- Vasiljevic, T., and N. P. Shah, 2008. Probiotics—From Metchnikoff to Bioactives. *Int. Dairy J.*, 18(7): 714–728.
- Vesterlund, S. dan A. C. Ouwehand. 2004. *Antimicrobial Components From Lactic Acid Bacteria.* in : S. Salminen dan A. VonWright (Eds). *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspect.* Marcel Dekker, Inc. London.
- Vicente, J., S. Higgins, L. Bielke, G. Tellez, D. Donoghue and Hargis, B. 2007. Effect of Probiotic Culture Candidates on *Salmonella* Prevalence in Commercial Turkey Houses. *J. Appl. Poult. Res.* 16(3): 471-476.
- S. A., F. Margaretha dan F Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar* . Erlangga. Jakarta.



- Wardhana, 2001. Pengaruh Pemberian Sediaan Patikaan Kebo (*Euphorbia hirta* L) terhadap Jumlah Eritrosit, Kadar Hemoglobin dan Nilai Hematokrit pada Ayam yang Diinfeksi dengan *Eimeria tenella*. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner*. 6(2): 126-133.
- Waskito, A. B. 1983. *Pengaruh Berbagai Faktor Lingkungan Terhadap Gala Tumbuh Ayam Broiler*. Disertasi. Universitas Padjajaran, Bandung.
- Wakenell, P.S. 2010. Hematology of Chickens and Turkeys. in. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th Ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. USA.
- Widjajakusuma, R., S. H. S. Sikar, D. Sastradipradja, T. Ungerer, A. Maad, R. Surlawinata dan R. Hamzah. 1989. *Penuntun Praktikum Fisiologi Veteriner*. Depatemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Ilmu hayat, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wijayanto, U. 2009. *Analisis in Vitro Toleransi Isolat Bakteri Asam Laktat Asal Daging Sapi Terhadap pH Lambung, pH Usus dan Garam Empedu sebagai Kandidat Probiotik* (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Winarsih, W. 2005. *Pengaruh Probiotik dalam Pengendalian Salmonellosis Subklinis pada Ayam: Gambaran Patologis dan Performan*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wiryawan, K. G., A. S. Tjakradidjaja, R. R. A. Maheswari and E. D. Janingrum. 2009. *Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Antimikroba*. Pusat Studi Ilmu Hayati, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Winters, J. L. 2004. Adventorial. P.T. Supreme Indo Pertiwi. Available at (Online)<http://www.sip-mlm.com/adventorial.htm>.(Diakses pada 9 September 2015).
- Wu, Q.J., Y. M. Zhou, Y. N. Wu, and T. Wang. 2013. Intestinal Development and Function of Broiler Chickens on Diets Supplemented with Clinoptilolite. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 26 (7): 987-994.



- Yalcin, S., H. Ozkul, S. Ozkan, R. Gous, I. Yasa, and E. Babacanoglu. 2010. Effect of Dietary Protein Regime on Meat Quality Traits and Carcase Nutrient Content of Broilers From Two Commercial Genotypes. *Br. Poult. Sci.*, 51(5): 621-628.
- Yamazaki, M., H. Ohtsu, Y. Yakabe, M. Kishima, H. Abe. 2012. In Vitro Screening of Lactobacilli Isolated from Chicken Excreta to Control *Salmonella enteritidis* and *typhimurium*. *Br. Poult. Sci.*, 53(2): 183–9.
- Yang, C.M., Cao, G.T., Ferket, P.R., Liu, T.T., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y.P., and Chen, A.G., 2012. Effects of Probiotic, *Clostridium butyricum*, On Growth Performance, Immune Function, and Cecal Microflora in Broiler Chickens. *Poult. Sci.*, 91(9): 2121–2129.
- Yao, Y., T. Xiaoyan, X. Haibo, K. Jincheng, X. Ming and W. Xiaobing. 2006. Effect of Choice Feeding On Performance Gastrointestinal Development and Feed Utilization of Broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 19(1): 91-96.
- Yulistiani R. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Pangan*. Yayasan Humaniora, Klaten.
- Zavaglia, A. G., G. Kociubinski, P. Perez, and G. De Antoni. 1998. Isolation and Characterization of Bifidobacterium Strains for Probiotic Formulation. *J. Food Prot.*, 61(7): 865–873.
- Zhang, A. W., B. D. Lee, S. K. Lee, K. W. Lee, G. H. An, K. B. Song, and C.H. Lee. 2005. Effect of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cell Components on Growth Performance, Meat quality, and Ileal Mucosa Development of Broiler Chicks. *Poult. Sci.*, 84(7): 1015-1021.
- Zhang, Z. F., T. X. Zhou, X. Ao, and I. H. Kim. 2012. Effects of β -glucan and *Bacillus Subtilis* On Growth Performance, Blood Profiles, Relative Organ Weight and Meat Quality in Broilers Fed Maize–soybean Meal Based Diets. *Livest. Sci.*, 150(1): 419–424.



RIWAYAT HIDUP

Muhammad Nur Hidayat. Dilahirkan di Kabupaten Pinrang pada Tanggal 9 September 1975 dari pasangan Abdul Hamid (Alm.) dan Iguna (Alm.). Merupakan anak kesembilan dari Sembilan bersaudara. Menamatkan pendidikan SD, SMP, dan SMA di Kabupaten Pinrang. Pada Tahun 1995-2001 menempuh pendidikan sarjana (S1) pada Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Tahun 2004 menjadi supervisor pada PT. Adirama Multi Breeding Tbk. Unit Bali. Tahun 2006-2008 menempuh pendidikan Magister (S2) pada Program Studi Sistem-Sistem Pertanian konsentrasi Peternakan Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Pada akhir tahun 2009 penulis diterima sebagai dosen tetap pada Jurusan Ilmu Peternakan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin. Tahun 2010-2012 diberikan amanah sebagai sekretaris Jurusan dan tahun 2013-2015 dipercayakan sebagai Ketua Jurusan Ilmu Peternakan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar. Pada tahun 2013 penulis mendapat izin belajar untuk melanjutkan pendidikan kejenjang S3 pada Program Studi Ilmu Pertanian Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Sebagai tenaga pengajar, matakuliah yang diampu, yaitu Ilmu Ternak Unggas, Ilmu Nutrisi Unggas, Manajemen Ternak Unggas, Teknologi Fermentasi, Pembibitan dan Penetasan. Penulis juga aktif melakukan penelitian dan pengabdian kepada masyarakat serta aktif dalam berbagai pertemuan ilmiah. Buku teks yang telah ditulis dan diterbitkan, yaitu Ilmu Dasar Nutrisi Ternak. Beberapa publikasi yang telah dilakukan antara lain, Effect of *Lactobacillus* sp. on intestinal histology, *Escherichia coli* in excreta and broiler performance (Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture, 2018),



Characteristics Isolate Bacteria Lactic Acid of Origin Digestive Tract of Broiler as Probiotic Candidate for Poultry (International Journal Scientific & Engineering Research, 2018), Abdominal Fat Percentage and Carcass Quality of Broiler Given Probiotics *Bacillus* spp. (Scientific Research Journal, 2016), Respon Biologis Broiler Terhadap Pemberian Berbagai Level Tepung cangkang Kepiting (JiiP, 2017), Potensi Bahan Baku Lokal untuk Ternak Unggas di Indonesia (Buletin Keswan Sul-Sel, 2014), Memperbaiki Kualitas Daging Unggas Melalui Pengaturan Imbangan Protein dan Energi Ransum (Jurnal Teknosains, 2016), Uji Daya Hambat Ramuan Herbal Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhimurium* (JiiP, 2015), Evaluasi Kandungan Nutrisi Onggok yang Difermentasi dengan Cairan Isi Rumen Sapi pada Level yang Berbeda (Seminar Nasional Berkelanjutan 6 Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran, 2014), Rekayasa Komposisi Kimia Dedak Padi dan Aplikasinya sebagai Ransum Ayam Buras (Conference: Seminar Nasional "Optimalisasi Sumberdaya Lokal Pada Peternakan Rakyat Berbasis Teknologi" Universitas Hasanuddin, 2014), Persentase Lemak Abdominal dan Kualitas Karkas Ayam Ras Pedaging yang Diberikan Probiotik (Seminar Nasional Jurusan Kimia UIN Alauddin Makassar, 2013), Efektivitas probiotik *Bacillus* spp. Terhadap Performa Ayam Ras Pedaging (Jurnal Teknosains, 2013),



Optimization Software:
www.balesio.com

DISERTASI

POTENSI ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT YANG DIISOLASI DARI SALURAN PENCERNAAN BROILER SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK PADA BROILER

Disusun dan diajukan oleh

MUHAMMAD NUR HIDAYAT
Nomor Pokok P0100313010

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi

pada tanggal 27 Desember 2018

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penguji,

Prof. Dr. drh. Ratmawati Malaka, M.Sc
Promotor

Prof. Dr. Ir. Laily Agustina, M.S.
Ko-Promotor

Dr. Ir. Wempie Pakiding, M.Sc
Ko-Promotor

Ketua Program Studi
niam

Darmawan Salman, M.S.

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.

