ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN

Tesis

Oleh:

Fatma Aini Luberina

20/466767/PPT/01109

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2024

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN

Tesis untuk memperoleh
Derajat Magister dalam Ilmu Peternakan pada
Universitas Gadjah Mada

Dipertahankan di hadapan
Dewan penguji Program Magister Ilmu Peternakan
Fakultas Peternakan
Universitas Gadjah mada

Pada tanggal

Oleh:
Fatma Aini Luberina
20/466767/PPT/01109

Lahir:
Temanggung, 25 Mei 1997

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

HALAMAN PERSETUJUAN

ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN

Dipersiapkan dan disusun oleh:

Fatma Aini Luberina
20/466767/PPT/01109

Telah disetujui Pembimbing

Pada tanggal 14 Juni 2024

Susunan Pembimbing

Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.
Pembimbing Utama

Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., IPM., ASEAN Eng.
Pembimbing Pendamping

Mengesahkan
Dekan / Penanggungjawab Program Magister Ilmu Peternakan
Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada
Tanggal: ……

Prof. Ir. Budi Guntoro, S.Pt., M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN

Dipersiapkan dan disusun oleh:

Fatma Aini Luberina
20/466767/PPT/01109

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

Pada tanggal: 14 Juni 2024

Susunan Dewan Penguji

Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng. _____
Pembimbing Utama

Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., IPM., ASEAN Eng. _____
Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. Ir. Lies Mira Yusiati, SU., IPU., ASEAN Eng. _____
Penguji

Prof. Ir. Nanung Agus Fitriyanto, S.Pt., M.Sc., Ph.D., IPM. _____
Penguji

Tesis ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan
untuk memperoleh gelar Magister

Pada tanggal: .....

Prof. Ir. Budi Guntoro, S.Pt., M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.
Dekan / Penanggungjawab Program Magister Ilmu Peternakan

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

PERNYATAAN BEBES PLAGIASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fatma Aini Luberina

NIM : 20/466767/PPT/01109

Tahun Daftar : 2020- Genap

Program Studi : Magister Ilmu Peternakan

Fakultas : Peternakan

Menyatakan bahwa dalam dokumen ilmiah Tesis ini tidak terdapat bagian dari karya ilmiah lain yang telah diajukan untuk memperoleh gelar akademik di suatu Lembaga Pendidikan Tinggi, dan juga terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang/Lembaga lain, kecuali yang secara tertulis disitasi dalam dokumen ini.

Dengan demikian saya menyatakan bahwa dokumen ilmiah ini bebas dari unsur-unsur plagiasi dari hasil karya penulis lain dan/atau dengan sengaja mengajukan karya atau pendapat yang merupakan hasil karya penulis lain, maka penulis bersedia menerima sanksi akademik dan/atau sanksi hukum yang berlaku.

Yogyakarta, Juni 2024

Fatma Aini Luberina
20/466767/PPT/01109

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa karena telah melimpahkan Rahmat, karunia dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis dengan judul “ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN”. Tesis ini disusun guna memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister of Science (M. Sc.) Program Studi Ilmu Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah mada, Yogyakarta.

Serangkaian proses dan pengerjaan penelitian dan penulisan tesis ini dapat selesai atas bimbingan, pengarahan, dan bantuan dari berbagai pihak, maka dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada:

1. Dekan Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Prof. Ir. Budi Guntoro, S.Pt., M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng. selaku penanggung jawab Program Pascasarjana.
2. Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng. dan Dr. Ir. Chusul Hanim, M.Si., IPM., ASEAN Eng., selaku dosen pembimbing tesis, atas dukungan, kepercayaan, bimbingan dan arahan, sehingga tesis ini dapat selesai dan menjadi lebih baik.
3. Prof. Dr. Ir. Lies Mira Yusiati, SU., IPU., ASEAN Eng., dan Prof. Ir. Nanung Agus Fitriyanto, S.Pt., M.Sc., Ph.D., IPM. sebagai penguji yang telah banyak memberikan banyak saran dan perbaikan.
4. Kepala Program Studi Magister Ilmu Peternakan, Prof. Ir. Nafi’atul Umami, S.Pt., M.Sc., Ph.D., IPM.
5. Semua dosen dan staf pengelola Program Pascasarjana, Program Studi Ilmu Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada.
6. Keluarga tercinta, Bapak Nasro Imami dan Ibu Siti Nurani beserta sanak saudara yang selalu memberikan dukungan moril dan materil serta doa dalam penyelesaian tesis ini.
7. Tim Penelitian Laboratorium Biokimia dan laboran Laboratorium Biokimia Nutrisi (Mba Rina Ispitasari, AMAK, Fadhila Rahma Alifa, Devaki Khamara Ars, Renna Ambar Pratiwi, Siti Athiya Wibowo, Moh Ihsan Zain Muhammad

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Anang Aprianto, dan Hafi Luthfi Sanjaya), serta sahabat Vonny Armelia yang telah memberikan banyak bantuan dan dukungan.

8. Semua teman-teman Pascasarjana Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada dan segenap yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan tesis yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna dan masih banyak memiliki kekurangan, sehingga saran dan masukan yang bermanfaat dari semua pihak sangat penulis harpkan. Semoga tulisan yang sederhana ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan untuk masa depan keilmuan yang lebih baik.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PERSETUJUAN iii
HALAMAN PENGESAHAN iv
PRAKATA vi
DAFTAR ISI viii
DAFTAR TABEL x
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR LAMPIRAN xii
ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN xiii
INTISARI xiv
ABSTRACT xv
PENDAHULUAN 1
Latar Belakang 1
Tujuan Penelitian 3
Manfaat Penelitian 3
TINJAUAN PUSTAKA 4
Proses Fermentasi Pakan dalam Rumen 4
Proses Pembentukan Gas Metan 5
Bakteri Asam Laktat (BAL) 6
Aplikasi BAL untuk Mitigasi Metan dalam Rumen 8
LANDASAN TEORI DAN HIPOTESIS 10
Landasan teori 10
Hipotesis 11
MATERI DAN METODE 12
Waktu dan Tempat Penelitian 12
Materi Penelitian 12
Metode Penelitian 12
Analisis Data 17
HASIL DAN PEMBAHASAN 18
Isolasi Bakteri Asam Latat dari Digesta Sekum Domba 18
Seleksi Isolat BAL Unggul 19
Uji Daya Tumbuh pada pH Rendah 19

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen 21
Hasil Seleksi Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat 23
Identifikasi BAL 24
Pengecatan BAL 24
Uji Katalase 26
Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat 26
Parameter Fermentasi 29
Penentuan nilai μ_{max} dan Ks 30
Derajat Keasaman (pH) rumen 32
Produksi Gas Metan 33
KESIMPULAN DAN SARAN 36
Kesimpulan 36
Saran 36
RINGKASAN 37
SUMMARY 39
DAFTAR PUSTAKA 41
LAMPIRAN 47

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Reaksi pembentukan metan di dalm rumen (Millen et al., 2016)..... 5

Tabel 2. Isolat yang berhasil tumbuh pada media dengan pH 2,5 20

Tabel 3. Daya hambat isolat BAL terhadap bakteri patogen 23

Tabel 4. Koefisien arah pertumbuhan isolat BAL..... 24

Tabel 5. Hasil analisis BLAST identifikasi isolat BAL D-33 sekuens 16s rRNA ... 28

Tabel 6. Hasil Uji Derajat Keasaman (pH) dafa fermentasi secara *in vitro*..... 33

Tabel 7. Produksi gas metan dalam rumen secara *in vitro* 34

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Pengukuran diameter zona bening 22

Gambar 2. Hasil pengecatan Gram Isolat BAL D-33 (Perbesaran 1000x) 25

Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA BAL D-33 27

Gambar 4. Pohon Filogeni sekuen 16s rRNA pada isolat BAL D-33 29

Gambar 5. Kurva Pertumbuhan BAL D-33 menggunakan konsentrasi glukosa yang berbeda 30

Gambar 6. Grafik Ks BAL D-33 31

Gambar 7. Hasil enrichment sumber isolat 47

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Proses pengkayaan atau enrichment sumber isolate 47

Lampiran 2. Protokol ekstraksi DNA dengan Quick-DNA Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research,D6005). 48

Lampiran 3. Protokol pemurnian produk PCR dengan Zymo DNA Clean 50

Lampiran 4. Hasil sekuensing sampel isolat bakteri BAL D-33..... 51

Lampiran 5. Analisis statistik pengaruh level glukosa dan jenis mikroba terhadap pH (derajat keasaman)..... 52

Lampiran 6. Analisis statistik pengaruh level glukosa dan jenis mikroba terhadap produksi metan..... 53

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

%	: persen
mg	: miligram
ml	: milimeter
/	: per
L	: liter
µ	: mikro
^{o}	: derajat
g	: gram
C	: *celcius*
BAL	: bakteri asam laktat
MRS	: *de Man Rogosa Sharpe*
Ks	: konstanta afinitas substrat
CH_4	: metan
H_2	: hidrogen
CO_2	: karbondioksida
$CaCo_3$	: Kalsium Karbonat
pH	: derajat keasaman
L. reuteri	: *Lactobacillus reuteri*
NH_3	: amonia
VFA	: *voltile fatty acids*
Kg	: kilogram
PCR	: *polymerase chain reaction*
DNA	: *deoxyribonucleic acid*
OD	: *optical density*

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN

INTISARI

Fatma Aini Luberina

20/466767/PPT/01109

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh strain Bakteri Asam Laktat (BAL) baru dan unggul yang merupakan hasil isolasi, seleksi, dan identifikasi dari sekum domba untuk mitigasi produksi metan dalam rumen. Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu: Tahap I: Isolasi, seleksi dan identifikasi BAL asal sekum domba. Tahap II: Aplikasi isolat BAL yang diperoleh untuk mitigasi produksi metan melalui fermentasi rumen secara *in vitro*. Prosedur isolasi dilakukan secara anaerob dengan media MRS dan $CaCo_3$. Prosedur seleksi meliputi uji daya tumbuh pada pH rendah, uji daya hambat terhadap bakteri patogen, dan uji kinetika pertumbuhan bakteri. Prosedur identifikasi yaitu dengan pengecatan gram, uji katalase, dan identifikasi secara molekuler dengan menggunakan metode amplifikasi sekuens gen 16S rRNA menggunakan primer universal 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan 1429 R (TAGGGTTACCTTGTTACGACTT). Isolat yang telah teridentifikasi kemudian diaplikasikan pada fermentasi secara *in vitro* dengan *metode Theodorou* untuk mengetahui pengaruhnya terhadap parameter fermentasi pada rumen. Hasil isolasi, seleksi dan identifikasi dianalisis secara deskriptif, sedangkan hasil fermentasi isolat yang diperoleh di rumen secara *in vitro* dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 5x2 dengan 3 ulangan, dimana terdapat 2 faktor perlakuan yaitu faktor pertama adalah level glukosa dengan 5 jenis level glukosa meliputi glukosa 0 Ks, 0,25 Ks, 0,5 Ks, 0,75 Ks, dan 1 Ks. Faktor kedua adalah perlakuan 2 jenis mikroba meliputi mikroba rumen 100% dan mikroba rumen:BAL domba dengan perbandingan 50%:50%. Hasil penelitian isolasi diperoleh 36 isolat BAL. Hasil penelitian seleksi diperoleh 1 isolat unggul yaitu BAL D-33. Hasil identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16s rRNA menunjukkan isolat BAL D-33 teridentifikasi sebagai *Lactobacillus reuteri.* Hasil penelitian pada fermentasi rumen secara *in vitro* menunjukan bahwa interaksi antar perlakuan isolate BAL D-33 dan dengan glukosa tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) derajat keasaman (pH) namun mempengaruhi secara nyata ($P<0,05$) terhadap produksi metan. Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu diperoleh isolat BAL unggul untuk mitigasi produksi metan dalam rumen yang teridentifikasi sebagai *L. reuteri*, yang dapat diaplikasikan dalam fermentasi untuk menurunkan produksi metan.

Kata kunci: Bakteri asam laktat, Sekum domba, Mitigasi metan rumen

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ISOLATION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF SHEEP CECUM LACTIC ACID BACTERIA FOR MITIGATION OF METHANE PRODUCTION IN RUMEN

ABSTRACT

Fatma Aini Luberina

20/466767/PPT/01

This research aims to obtain new strains of Lactic Acid Bacteria (LAB) to mitigate methane production in the rumen because of isolation, selection and identification from the cecum of sheep. This research consists of two parts, namely: Stage I: Isolation, selection and identification of LAB from the sheep cecum. Stage II: Application of the LAB isolate obtained to mitigate methane production through in vitro rumen fermentation. The isolation procedure was carried out anaerobically with MRS and CaCo3 media. The selection procedure includes a growth test at low pH medium, an inhibition test against pathogenic bacteria, and a bacterial growth kinetics analysis. The identification procedure is by gram staining, catalase test, and molecular identification procedure used the 16S rRNA gene sequence amplification method using universal primers 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and 1429 R (TAGGGTTACCTTGTTACGACTT). The identified isolate was then applied to in vitro fermentation using the Theodorou method to determine its effect on fermentation parameters in the rumen. The results of isolation, selection and identification were analyzed descriptively, while the results of in vitro fermentation were analyzed using a Completely Randomized Design (CRD) with a 5x2 factorial pattern with 3 replications, where there were 2 treatment factors, namely the first factor was glucose level, there are 5 types of glucose levels including glucose 0 Ks, 0.25 Ks, 0.5 Ks, 0.75 Ks, and 1 Ks. Two types of microbes type composition were also used including 100% rumen microbes and rumen microbes with sheep LAB in a ratio of 50%:50%. The results of the isolation research obtained 36 LAB isolates. The results of research on in vitro rumen fermentation showed that the interaction between treatments of BAL D-33 isolate and glucose had no significant effect ($P>0.05$) on the degree of acidity (pH) but had a significant effect ($P<0.05$) on methane production. The conclusion that can be drawn from this research is that a superior LAB isolate was obtained for mitigating methane production in the rumen, identified as L. reuteri, which can be applied in fermentation to reduce methane production. The conclusion that can be drawn from this research is that a LAB isolate was obtained to mitigate methane production in the rumen which was identified as *L. reuteri*, which can be applied in fermentation to reduce methane production in the rumen.

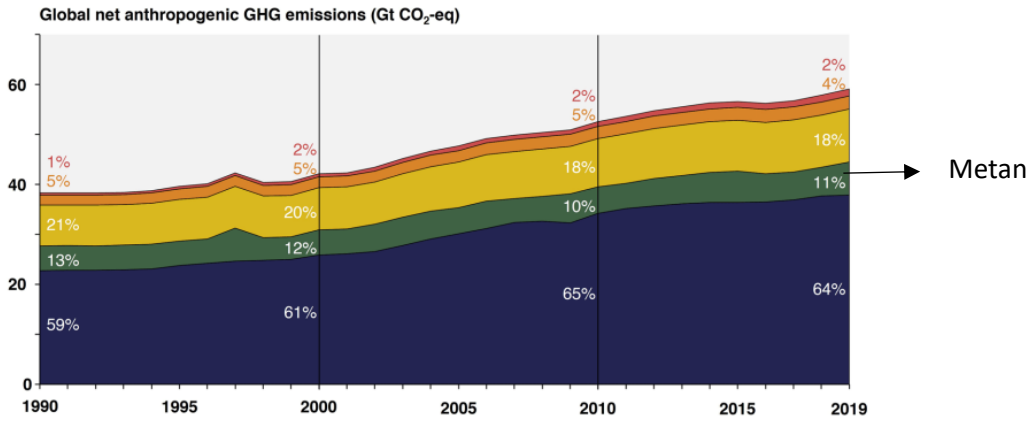
Key words: Lactic acid bacteria, sheep cecum, mitigation of methane in rumen

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Ruminansia merupakan ternak yang dapat memanfaatkan pakan serat menjadi produk yang bernilai ekonomis seperti daging dan susu karena adanya fermentasi enterik yang terjadi di dalam rumen. Namun, fermentasi enterik pada ruminansia menghasilkan gas metan yang berkontribusi dalam pemanasan global. Berdasarkan data dari IPPC (2022) yang disajikan pada Gambar 1, emisi gas metan terus meningkat dari tahun ke tahun, pada tahun 2019 menyumbang sebesar 11% emisi gas rumah kaca dan 22% emisi gas rumah kaca dari sektor pertanian. Menurut Jia *et. al*. (2022) 22% dari emisi gas rumah kaca global tahun 2019 sebagian besar berasal dari pertanian (budidaya tanaman pangan dan peternakan) dan deforestasi. Akhadiarto dan Rofiq (2017) melaporkan fermentasi enterik dari ternak ruminansia merupakan sumber emisi kedua terbesar sekitar 40% dari total emisi Gas Rumah Kaca dari sektor pertanian. Gas metan yang dihasilkan dari proses fermentasi rumen ternak ruminansia menyebabkan peningkatan suhu secara signifikan sehingga berdampak pada pemanasan global. Zhou *et al*. (2011) menjelaskan bahwa gas metan merupakan gas yang sangat kuat dengan potensi pemanasan hampir 25 kali lipat dibandingkan karbondioksida.



Gambar 1. Emisi gas rumah kaca dan sumber emisi gas rumah kaca
Sumber : Data IPCC (2022)

Selain memberikan kontribusi yang kurang baik terhadap lingkungan, produksi gas metan juga merupakan salah satu bentuk hilangnya energi pada

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ternak sehingga dapat menyebabkan efektifitas pemanfaatan pakan terutama enerji pakan menjadi menurun (Eckard *et.al.,* 2010). Pembentukan gas metan yang terjadi di dalam rumen menyebabkan hilangnya karbon yang berarti merupakan bentuk kehilangan energi yang akan mempengaruhi kinerja ternak ruminansia (Bell *et al.,* 2011). Johnson dan Jonshon (1995) menyebutkan bahwa sapi dewasa mengalami kehilangan energi dari pakan sebanyak 2 – 12 % akibat adanya produksi metan. Oleh karena itu mitigasi pembentukan metan perlu dilakukan sehingga dapat mengurangi emisi gas metan pada lingkungan dan dalam waktu yang sama efisiensi pemberian pakan dapat ditingkatkan.

Metan diproduksi oleh bakteri metanogen dalam rumen sebagai bentuk pemanfaatan hidrogen yang dihasilkan dari proses fermentasi pakan. Pakan ruminansia berupa struktur serat tumbuhan yang akan terdegradasi oleh mikroba rumen dalam kondisi anaerob dengan produksi asam lemak terbang (VFA), karbondioksida dan hidrogen. Selama fermentasi, hidrogen dibebaskan ke dalam rumen melalui reoksidasi kofaktor tereduksi (NADH, NADPH dan FADH). Hidrogen dan karbondioksida merupakan substrat utama yang digunakan oleh bakteri metanogen dan sebagai jalur utama dalam pembentukan metan. Produksi metan merupakan salah satu upaya ternak ruminansia untuk mengurangi tekanan parsial hidrogen dalam rumen sehingga fermentasi akan terus berlanjut secara kontinu (Ellis *et al.,* 2016). Produksi metan dapat dikurangi melalui modifikasi metanogenesis dengan menurunkan hidrogen sebagai substrat pembentuk metan atau dengan meningkatkan pemanfaatan hidrogen di dalam rumen untuk sintesis asam lemak volatil atau bahan organik mikroba (Takahashi *et al.,* 2013).

Manipulasi jalur metabolisme yang terlibat dengan hidrogen adalah kunci untuk mengontrol pembentukan metan (Pereira *et al.*, 2015). Salah satu alternatif pendekatan yang mungkin dilakukan adalah menggunakan bakteri asam laktat (BAL). Bakteri tersebut memiliki kesamaan dengan bakteri metanogen yaitu sebagai jalur memanfaatkan hidrogen di dalam rumen. Hidrogen akan digunakan oleh BAL untuk menghasilkan asam laktat melalui piruvat (Offner dan Sauvan, 2006. Selain sebagai jalur pemanfaatan hidrogen, bakteri asam laktat juga dapat menghasilkan bakteriosin yaitu senyawa antimikroba dalam bentuk protein yang disintesis oleh berbagai strain BAL (Reis *et al*., 2012).

BAL dapat diisolasi dari berbagai sumber, salah satunya dari saluran pencernaan ternak ruminansia. Menurut Doyle *et al.* (2019), BAL dapat ditemukan

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

pada saluran pencernaan hewan ruminansia, terutama pada ruminansia muda. Selain itu bahan pakan yang mengandung karbohidrat tinggi juga dapat mendukung perkembangan bakteri asam laktat di saluran pencernaan. Selanjutnya karbohidrat yang tidak dapat dicerna di usus halus akan difermentasi di dalam sekum. Hal ini menunjukkan bahwa BAL akan tumbuh pada sekum ternak ruminansia salah satunya pada ternak domba. Menurut Michelland *et al.* (2009) dalam saluran pencernaan khususnya sekum, terdapat populasi mikroba dengan berbagai ukuran dan kompleksitas, dan dijelaskan lebih lanjut bahwa mikroba yang ada dalam sekum juga merupakan anaerob obligat seperti yang ada pada rumen. Menurut Papova *et al.* (2013) jumlah metanogen yang ada pada sekum domba jauh lebih rendah 10 kali lebih rendah jika dibandingkan jumlah metanogen di dalam rumen.

Atas dasar uraian tersebut, maka perlu diteliti mengenai adanya strain BAL dari sekum domba dan aplikasinya dalam mitigasi proses pembentukan metan dalam rumen yang akan dilakukan secara *in vitro.*

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang ingin dicapai meliputi:

1. Mendapatkan strain baru bakteri asam laktat (BAL) melalui proses isolasi, seleksi, dan identifikasi yang diperoleh dari sumber mikrobia sekum domba.
2. Mengetahui pengaruh penggunaan strain hasil isolasi, seleksi dan identifikasi sekum domba pada mitigasi produksi metan di dalam rumen secara *in vitro.*

Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dan kebaruan bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang peternakan, khususnya mengenai perkembangan dan penemuan strain BAL yang dapat dimanfaatkan untuk mitigasi produksi metan ``ternak ruminansia, sehingga memberikan kontribusi peternakan ramah lingkungan, serta peningkatan efisiensi pemanfaatan energi pakan.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

TINJAUAN PUSTAKA

Proses Fermentasi Pakan dalam Rumen

Ternak ruminansia memiliki sistem pencernaan dengan lambung yang dibagi menjadi 4 kompartemen yaitu rumen, retikulum, omasum dan abomasum. Rumen berperan penting dalam proses fermentasi pakan dalam ternak ruminansia (Yanuartono *et al*., 2018). Rumen memiliki ukuran besar, berperan dalam fermentasi anaerob dengan pH antara 5,6 sampai 6,7, dan suhu 39°C, yang memungkinkan pertumbuhan mikroba untuk memfasilitasi pencernaan dan fermentasi bahan tanaman selulosa (Hungate, 1966).

Pakan yang dicerna oleh ruminansia terdiri dari polisakarida struktural kompleks, pati, gula sederhana, lipid, protein, lignin dan mineral. Polisakarida struktural dapat dikategorikan menjadi selulosa, hemiselulosa dan pektin (Wang dan McAllister, 2002). Proses pencernaan pakan pada ternak ruminansia terutama di dalam rumen sangat bergantung pada populasi mikroba yang tumbuh dan berkembang di dalamnya. Mosoni *et. al.* (2011) menyatakan bahwa pada prinsipnya perombakan bahan pakan yang terjadi di dalam rumen dilakukan oleh kerja enzim yang dihasilkan oleh mikroba yang tumbuh di dalam rumen. Biomassa mikroba yang terdapat di dalam rumen adalah gabungan dari bakteri, protozoa bersilia, protozoa berflagela, jamur, amuba dan bakteriofag (Morgavi *et al.,* 2010). Mikroba rumen akan merombak bahan pakan baik dalam bentuk karbohidrat, lemak maupun protein menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Karbohidrat yang masuk baik dari fraksi serat atau pati nantinya akan dipecahkan menjadi gula sederhana dengan bantuan enzim mikroba ekstraseluler (McDonald *et al*., 2011). Selanjutnya gula sederhana (monosakarida) akan masuk dalam proses glikolisis yang merupakan proses utama dalam pembentukan energi. Glikolisis adalah reaksi pelepasan energi yang memecah satu molekul glukosa (terdiri dari 6 atom karbon) atau monosakarida yang lain menjadi dua molekul asam piruvat (terdiri dari 3 atom karbon), 2 NADH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide H*), dan 2 ATP (Murray *et al*., 2006). Menurut Russell dan Wallace (1997) mikroba rumen memetabolisme lebih dari 90% heksosa (baik dari serat maupun pati) menjadi piruvat yang merupakan titik percabangan pusat di mana jalur yang berbeda mengarah ke pembentukan tiga VFA utama yaitu asetat, propionat dan butirat. VFA terbentuk termasuk asetat (sekitar 65%), propionat

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

(sekitar 20%) dan butirat (sekitar.15%), yang merupakan bagian utama dari asam dalam rumen (Miller, 1979). Itu rasio yang tepat dari VFA tergantung pada umpan dan jalur pembuangan elektron yang aktif dalam mikroba rumen. Selain itu VFA, juga dihasilkan gas dalam bentuk Karbondioksida (CO_2), hidrogen (H_2) dan metan (Kamra, 2005).

Proses Pembentukan Gas Metan

Metan adalah gas yang dihasilkan oleh fermentasi dalam rumen oleh bakteri metanogenik rumen melalui proses metanogenesis. Gas metan terutama dihasilkan dari pencernaan polisakarida dalam rumen, seperti selulosa, hemiselulosa, dan pati. Polisakarida ini dihidrolisis menjadi glukosa dan heksosa dan pentosa lainnya dan kemudian dimetabolisme menjadi CO_2 dan mudah menguap asam lemak (VFA) seperti asetat, propionat, dan butirat. Dalam proses metabolisme ini hidrogen dilepaskan, kemudian mereduksi CO_2 menjadi CH_4 melalui jalur hidrogenotropik oleh bakteri metanogenik (Beauchemin *et al*., 2020). Selain itu, gas metana juga dapat diproduksi di rumen dengan memanfaatkan gugus metil dan jalur asetat (Huws *et al*., 2018). Beberapa reaksi lain dalam pembentukan metan menurut Millen *et al*. (2016) terlampir pada Tabel 1.

Tabel 1. Reaksi pembentukan metan di dalm rumen (Millen et al., 2016)

Jenis Substrat	Reaksi		
Mayor			
H_2 dan CO_2	$4H_2+CO_2$	➔	CH_4+2H_2O
Format	$4HCOOH$	➔	$CH_4+3CO_2+2H_2O$
Minor			
Metanol	$4CH_3OH$	➔	$3CH_4+CO_2+2H_2O$
Metilamin	$4CH_3NH_2Cl+2H_2O$	➔	$3CH_4+CO_2+4NH_4Cl$
Dimetillamin	$2(CH_3)_2NHCl+2H_2O$	➔	$3CH_4+CO_2+4NH_4Cl$
Trimetilamin	$4(CH_3)_3NHCl+2H_2O$	➔	$3CH_4+CO_2+4NH_4Cl$
Asetat	CH_3COOH	➔	CH_4+CO_2

Jalur hidrogenotropik melalui reduksi CO_2 oleh hidrogen merupakan jalur utama pembentukan metan. Pemanfaatan hidrogen di dalam rumen untuk membentuk gas metan sangat tinggi. Hal ini terjadi karena bakteri metanogen memiliki afinitas yang sangat tinggi terhadap hidrogen sehingga hidrogen tersedia sedikitpun dapat langsung dimanfaatkan oleh bakteri metanogen untuk

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

menghasilkan metan. Selain itu reaksi yang terjadi pada rumen untuk pembentukan metan oleh bakteri metanogen melalui jalur reduksi CO_2 dengan hidrogen memiliki perubahan energy Gibbs yang lebih negatif ($\Delta G^\circ = -231.4$) dibandingkan bakteri asetogenik untuk menghasilkan asetat ($\Delta G^{\circ\prime} = -147.2$), dan bakteri asam laktat dengan memanfaatkan hidrogen dan piruvat menjadi laktat ($\Delta G^\circ = -64.9$) (Offner dan Sauvant, 2006). Spesies menggunakan jalur dengan perubahan energi Gibbs yang lebih negatif akan selalu mendominasi lingkungan (Janssen, 2010).

Adanya dominasi bakteri metanogen untuk menggunakan hidrogen dalam rumen membuat ternak ruminansia menghasilkan metan yang cukup tinggi. Metanogenesis sebenarnya merupakan proses penting dalam rumen, proses ini mencegah akumulasi hidrogen yang akan menyebabkan penghambatan aktivitas dehidrogenase. Namun, jika laju metanogenesis tidak dikendalikan, jumlah metan akan dilepaskan ke lingkungan dalam jumlah yang besar (Martin *et al*., 2010). Produksi metan di dunia peternakan menyumbang lebih dari 5% emisi gas greenhouse di dunia, emisi ini diketahui merupakan hasil dari aktivitas metanogen di dalam saluran pencernaan ruminansia (Greening *et al,* 2019).

Bakteri metanogenik rumen memiliki berbagai jenis, misalnya *Methanobrevibacter gottschalkii* dan *Methanobrevibacter ruminantium* (Henderson *et al*., 2015), jenis bakteri tersebut memenuhi 74% dari total bakteri metanogen di rumen (Greening *et al,* 2019). Dinding selnya mengandung pseudomurein dan memiliki kesamaan dengan yang ditemukan pada bakteri Gram positif sehingga sensitif terhadap agen antimikroba (Varnava *et al*., 2017). Bakteri metanogenik berinteraksi dengan bakteri pengurai serat kasar yang menghasilkan asetat dan hidrogen untuk menyediakan prekursor metana (Gamayanti *et al*., 2012). Bakteri metanogenik juga tidak terlepas dari simbiosisnya dengan protozoa sehingga menghasilkan metanogenik H2 yang akan dimanfaatkan oleh bakteri kemudian diubah menjadi CH4 (Francissco *et al.,* 2019).

Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri yang dapat menghasilkan produk utama berupa asam laktat dari hasil akhir fermentasi karbohidrat. Secara umum bakteri asam laktat memiliki karakteristik antara lain merupakan kelompok bakteri gram positif, bersifat anaerobik, tidak berspora, memiliki bentuk bulat atau batang, katalase-negatif, dan toleran terhadap asam (Khalid, 2011). Bakteri asam

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

laktat dapat hidup diberbagai habitat, salah satunya pada saluran pencernaan ternak (Chotiah dan Rini, 2018). Pada saluran pencernaan hewan ruminansia, BAL terdapat di dalam rumen (Bureenok *et al*., 2011). Strain BAL yang terdapat dalam rumen memiliki kemampuan untuk meningkatkan aktivitas mikroba rumen sehingga degradabilitas rumen meningkat (Weinberg, 2003). Beberapa strain yang paling umum dari Bakteri asam laktat yang ditemukan di usus adalah *Lactobacillus sp., Bifidobacterium sp., Streptococcus sp., Lactococcus sp., Enterococcus sp., Pediococcus sp., Leuconostoc sp.* (Dordevic *et al*., 2021). Berdasarkan banyak penelitian yang telah dilakukan, penggunaan BAL dianggap aman, dan beberapa spesies digunakan sebagai probiotik karena memiliki efek menguntungkan pada inangnya (Plavec dan Ales, 2020).

Berdasarkan proses biokimia dan hasil akhir fermentasi BAL dibedakan menjadi 2 kelompok yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. BAL homofermentatif mengubah heksosa menjadi piruvat kemudian menghasilkan produk akhir berupa asam laktat. Produk akhir asam laktat digunakansebagai energi dan penyeimbang redoks. Sedangkan pada BAL heterofermentatif degradasi heksosa menjadi heksosa menjadi beberapa macam produk antara lain seperti asetat, asetoin, etanol, karbon dioksida dan beberapa senyawa aromatik (Reis *et al*., 2012). Kelompok BAL yang bersifat homofermentatif meliputi *Pediococcus, Streptococcus*, beberapa strain dari *Lactococcus* serta beberapa strain dari *Lactobacillus*. Sedangkan genus BAL yang bersifat heterofermentatif meliputi *Weisella, Leuconosto*c dan beberapa strain dari genus *Lactobacillus* (Forsythe, 2000).

BAL berperan dalam proses fermentasi karbohidrat sederhana menjadi asam laktat sebagai produk utama. Karena kemampuannya menghasilkan asam, pertumbuhan BAL ditandai dengan penurunan pH lingkungan sehingga bakteri patogen dan pembusuk bakteri tidak dapat bertahan hidup. Selain produksi asam laktat, beberapa galur BAL juga menghasilkan varietas senyawa antimikroba lainnya seperti asam organik, etanol, hidrogen peroksida, enzim dan bakteriosin (Reis *et al*., 2012). Bakteriosin adalah senyawa yang disintesis oleh ribosom yang diproduksi selama fase pertumbuhan primer dan menghasilkan antibiotik sebagai metabolit sekunder (Zacharof *et al*., 2012).

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Aplikasi BAL untuk Mitigasi Metan dalam Rumen

BAL dapat berpotensi untuk menurunkan metan di dalam rumen melalui beberapa mekanisme menurut Doyle *et al*. (2019) yaitu antara lain pertama, penggunaan BAL dapat menggeser fermentasi rumen terutama melalui mekanisme pemanfaatan hidrogen untuk menghasilkan produk lain sehingga terjadi penurunan produksi metan. Kedua, penggunaan BAL atau metabolitnya dapat secara langsung menghambat bakteri metanogen di dalam rumen. Ketiga, penggunaan BAL atau metabolitnya dapat menghambat bakteri rumen tertentu yang dapat menghasilkan hidrogen atau senyawa yang mengandung metil sebagai substrat untuk pembentukan metan (metanogenesis).

Jalur pemanfaatan hidrogen (*hydrogen sink*) di dalam rumen selain dimanfaatkan untuk pembentukan metan juga dapat dimanfaatkan untuk membentuk produk tertentu antara lain oksaloasetat menjadi malat, fumarat menjadi suksinat, dan piruvat menjadi laktat (Ungerfeld, 2020). Laktat terbentuk dari reduksi piruvat dengan hidrogen oleh BAL. Laktat dapat diaktifkan secara intraseluler untuk laktil-KoA, yang kemudian didehidrasi menjadi akrilil-KoA. Akrilil-KoA kemudian direduksi menjadi propionyl-CoA dengan flavoprotein tereduksi (Gottschalk, 1986) atau NADH (Hackmann *et al*., 2017). Laktat juga dapat diekskresikan dan dimanfaatkan oleh mikroba lain dan diubah menjadi asetat, propionat atau butirat (Chen *et al*., 2019).

Selain sebagai jalur pemanfaatan hidrogen BAL juga dapat menghasilkan metabolit yang diketahui dapat menurunkan produksi metan. Senyawa metabolit yang dihasilkan BAL merupakan produk hasil fermentasi antara lain asam organik dan hidrogen peroksida serta peptida yang disintesis oleh ribosom yang dikenal sebagai bakteriosin (Cotter *et al*., 2013). Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL telah diteliti dan diketahui dapat menurunkan produksi metan di dalam rumen. Renuka *et al*. (2013) menguji bakteriosin dari *Pediococcus pentosaceus* 34 dan *Enterococcus faecium* 99, uji produksi gas dilakukan secara *in vitro* menggunakan jerami gandum dan campuran konsentrat. Bakteriosin pediosin yang diproduksi oleh Pediococcus pentosaceus 34 ditunjukkan untuk mengurangi produksi CH_4 secara *in vitro* sebesar 49%.

Penelitian mengenai BAL untuk menurunkan produksi metan juga dilakukan oleh Jeyanathan *et al*. (2016) pada penelitian ini digunakan 45 bakteri, termasuk strain BAL, *bifidobacteria*, dan *propionibacteria*, selama 24 jam dalam

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

inkubasi rumen *in vitro* untuk melihat kemampuan bakteri tersebut untuk mengurangi laju metanogenesis. Setelah penyaringan beberapa strain bakteri dipilih, salah satunya yang merupakan spesies bakteri asam laktat (Lactobacillus pentosus D31). Pengujian in vivo ini bakteri dilakukan pada 12 ekor domba, dosis bakteri asam laktat yang diberikan adalah 6×10^{10} (cfu/ekor/hari). Setelah 4 minggu, kinerja Lactobacillus pentosus D31 menunjukkan penurunan dalam produksi CH_4 (CH_4/kg/DMI) sebesar 13%. Berdasarkan hasil tersebut, ditemukan bahwa bakteri Strain yang digunakan dapat bertahan hidup di lingkungan rumen.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

LANDASAN TEORI DAN HIPOTESIS

Landasan teori

Pembentukan metan merupakan bentuk pemanfaatan akumulasi hidrogen di dalam rumen. Bakteri metanogen merupakan salah satu bakteri yang memanfaatkan hidrogen yang digunakan untuk mereduksi karbondioksida menjadi metan. Hidrogen di dalam rumen akan terus menerus dibentuk sebagai hasil dari pembentukan ATP melalui proses glikolisis. Selain menghasilkan ATP, glikolisis juga menghasilkan produk berupa piruvat dan NADH. Proses glikolisis agar terus berjalan secara terus menerus atau kontinu, yang merupakan sumber pembentukan ATP pada fermentasi anaerobik, maka diperlukan proses daur ulang dari NADH menjadi NAD kembali oleh karenanya pelepasan hidrogen terjadi secara terus menerus pula dan pemanfaatan hidrogen menjadi penting untuk dilakukan.

Salah satu upaya untuk menurunkan produksi gas metan adalah dengan modifikasi proses pembentukan metan yaitu dengan rekayasa hidrogen atau meningkatkan pemanfaatan hidrogen sebagai substrat oleh bakteri lain di dalam rumen. Manipulasi jalur pemanfaatan hidrogen salah satunya dapat dilakukan oleh bakteri asam laktat (BAL). BAL merupakan salah satu bakteri yang dapat menghasilkan produk asam laktat melalui fermentasi karbohidrat. BAL dapat membentuk asam laktat dengan mereduksi piruvat oleh hydrogen, sehingga terjadi daur ulang dari NADH menjadi NAD. Kemampuan BAL menggunakan hidrogen untuk membentuk asam laktat dapat menjadi alternatif jalur pemanfaatan hidrogen (*hydrogen sink*) di dalam rumen. Asam laktat yang di produksi oleh BAL selanjutnya akan dimanfaatkan oleh mikroba lain untuk membentuk VFA seperti asetat, propionat dan butirat. Selain sebagai salah satu jalur pemanfaatan hidrogen, BAL juga diketahui dapat menghasilkan metabolit berupa asam laktat, hidrogen peroksida dan bakteriosin yang dapat menjadi antimikroba bagi mikroorganisme lain.

BAL dapat hidup di berbagai kondisi dan lingkungan. Sehingga proses isolasi yang bertujuan untuk mendapatkan BAL dapat dilakukan salah satunya dari sumber digesta pada saluran pencernaan ternak ruminansia. Sekum merupakan salah satu saluran cerna yang memiliki fungsi hampir sama dengan pencernaan yang ada di rumen, dan diketahui bahwa jumlah produksi gas metan relatif rendah

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

jika dibandingkan di dalam rumen. Pada sekum ruminansia pakan akan dicerna secara anaerob dengan bantuan berbagai mikroba yang tumbuh di dalamnya salah satunya adalah BAL. Oleh karena itu BAL yang dapat bersaing dengan metan dalam pemanfaatan hidrogen diduga terdapat pada sekum ruminansia khususnya domba. Namun perlu dilakukan seleksi dan identifikasi pada BAL yang akan menghasilkan produk fermentasi yang optimal.

Hipotesis

Penelitian ini memiliki hipotesis yang diharapkan yaitu :

1. Bakteri Asam Laktat (BAL) pengguna hidrogen yang berpotensi untuk mitigasi metan di dalam rumen dapat diisolasi, seleksi dan identifikasi dari digesta sekum domba.
2. Penggunan strain BAL dalam fermentasi secara *in vitro* dapat menurunkan produksi gas metan di dalam rumen.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakanakan bulan Februari sampai dengan Juni 2022 di Laboratorium Biokimia Nutrisi, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan PT Genetika Science Indonesia.

Materi Penelitian

Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah inkubator, *waterbath*, *hot pan and magnetic stirer*, pH meter, orp meter, termometer, lemari pendingin, *centrifuge*, oven, *petridish, autoclave*, timbangan analitik, *vortex*, *laminar air flow*, pipet, tabung reaksi, tabung falcon, erlenmeyer, *hungate tube*, spuit, botol serum, bunsen, rak tabung, pengaduk, gelas piala, *spektrofotometer*, dan blender.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah sampel digesta sekum dari kelinci, medium *deMan Rogosa and Sharpe* (MRS) *Broth*, sistein-HCl, resazurin, akuades, pakan basal(rumput gajah dan pollard), gas CO_2 dan gas N_2. Medium *gas test* yang terdiri atas mineral mikro ($CaCl_2.H_2O$, $MnCl_2.4H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$, $FeCl_3.6H_2O$), Buffer ($NaHCO_3$, $(NH_4)HCO_3$), mineral makro (Na_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$), pereduksi (NaOH, $Na_2S.7H_2O$), resazurin, dan akuades. Medium rumen yang terdiri atas cairan rumen, akuades, glukosa, sukrosa, amilum, xilosa, sistein-HCl, resazurin, Na_2CO_3, *mineral solution* I (K_2HPO_4), dan *mineral solution* II (KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, $MgSO_4$, dan $CaCl_2$). Bahan untuk analisis asam laktat meliputi TCA 10%, $CuSO_4$ 20%, $CuSO_4$ 4%, $Ca(OH)_2$, H_2SO_4 pekat, p-hidroksibiphenil.

Metode Penelitian

Penelitian ini meliputi 3 tahapan, yaitu Tahap I. Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat (BAL). Tahap II. Identifikasi BAL, dan Tahap III. Aplikasi BAL untuk mitigasi metan secara *in vitro*.

Prosedur Preparasi

Sterilisasi alat. Peralatan yang akan digunakan seperti *petridish*, gelas piala, gelas ukur, dan lainya dibungkus dengan kertas payung atau aluminium foil

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

dan plastik pembungkus. Setelah itu alat-alat tersebut dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121^{0}C tekanan udara 15 psi selama 15 menit. Laminar air flow (LAF) sebelum digunakan disterilisasi dengan alkohol 70%. Setelah itu laminar air flow disterilisasi dengan sinar UV selama 30 menit.

Pengkayaan sumber isolat (*enrichment*). Sampel berupa digesta sekum domba diperoleh dari RPH Kentungan Yogyakarta kemudian dibawa di Laboratorium Biokimia Nutrisi Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada dan dipreparasi serta dilakukan pengkayaan (enrichment) dengan cara ditumbuhkan pada media MRS dengan digesta sekum sebanyak 10% (V/V) dari volume media.

Tahap 1. Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi BAL

Prosedur Isolasi BAL

Pembuatan media pertumbuhan bakteri. Media MRS, CaCO3 dan agar. Campuran dihomogenkan dan dipanaskan pada *hot plate* dan *magnetic stirer*. Pemanasan dilakukan sebanyak 3 kali dengan selang waktu 10 menit pada setiap pemanasan agar homogen. Setelah pemanasan selesai media ditambahkan dengan rezarsurin dan sistein-HCL sambil dialirkan gas CO_2 selama kurang lebih 15 menit untuk membuat kondisi anaerob. Media yang telah siap ditutup dengan kapas dan plastik kemudian dilakukan sterilisasi pada autoclaf.

Pengenceran bertingkat sampel (*serial dilution*). Teknik pengenceran bertingkat sampel dilakukan dengan mengambil 1 ml sampel isolat BAL sekum domba yang telah dilakukan pengkayaan sebagai sumber BAL. Sampel kemudian dimasukan ke dalam tabung hunget berisi 9 ml aqudest seteril (tabung no 1) dan dicampur dengan baik. Sampel tersebut berarti telah mengalami pengenceran 10^1. Langkah berikutnya dengan mengambil 1 ml dari tabung no 1 dan masukan ke tabung berisi 9 ml aqudest seteril (tabung no 2) dan dihomogenkan dengan baik, hal ini berarti sampel telah mengalami pengenceran 10^2. Langkah tersebut dilakukan pengenceran (seperti di atas) sampai pengenceran yang dikehendaki. Proses pengenceran dilakukan di *Laminar air flow* dengan memperhatikan metode aseptis dan dilakukan secara anaerob.

Inokulasi sumber bakteri ke media MRS. Masing-masing serial pengenceran bertingkat tersebut diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan pada media MRS agar yang telah ditambah dengan $CaCO_3$. Petridish kemudian dimasukkan dalam anaerojar besama dengan anaerogen dan juga indikator anaerobik, selanjutnya inkubasi dilakukan pada oven suhu 37°C

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

selama 24 sampai 48 jam. Koloni bakteri yang digunakan koloni yang tumbuh benar-benar terlihat jelas antara bakteri asam laktat dan non-asam laktat berdasarkan zona bening serta hal tersebut dapat didasarkan juga pada syarat koloni yang tumbuh yang antara 25 sampai 250 dalam perhitungan TPC (*Total Plate Count*).

Pemurnian bakteri asam laktat (*purification*). Isolat yang tumbuh dan membentuk zona bening pada MRS agar dan kenampakan berbeda diisolasi dan dilakukan pemurnian dengan metode goresan (*spread plate*) pada media dan kondisi yang sama yaitu secara anaerobik dengan cara patridish dimasukan ke dalam anaerojar besama dengan anaerogen dan juga indikator anaerobic, selanjutnya inkubasi dilakukan pada oven suhu 37°C selama 24 sampai 48 jam. Perlakuan dilakukan dan diulangi sebanyak 3 kali sehingga diperoleh isolat murni. Isolat murni kemudian dapat ditumbuhkan pada media MRS cair untuk selanjutnya dilakukan seleksi. Bakteri hasil isolasi yang diperoleh kemudian diberi kode BAL D-1, BAL D-2, BAL D-3 dan seterusnya.

Prosedur Seleksi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Uji Daya Tumbuh pada pH Rendah. Uji daya tumbuh pada pH dilakukan dengan menumbuhkan bakteri asam laktat pada medium dengan pH 4,5. Medium MRS agar di atur pHnya sampai 4,5 dengan penambahan asam asetat 0,2 M.

Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen. Seleksi terhadap daya hambat bakteri patogen dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur agar atau metode sumuran. Sampel BAL yang tumbuh pada medium cair di sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan dimasukan ke dalam eppendorf 1,5 mL. Pengujian dilakukan dengan menggunakan bakteri patogen yaitu *Escherichia coli*. Sebanyak 50 µl inokulan bakteri disuspensikan dalam 20 ml media agar, kemudian dituang pada cawan petri steril, dibiarkan dingin dan membeku. Setelah membeku kemudian dibuat sumur dengan diameter 0,5 cm. Sebanyak 50 µl supernatan bebas sel dimasukkan ke dalam sumur. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening yang terbentuk kemudian diukur diameternya.

Uji kinetika pertumbuhan Bakteri. Uji pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengamati nilai *Optical Density* (OD). BAL yang akan diuji ditumbuhkan pada medium MRS cair dan medium tertentu (*define medium*) untuk menghitung nilai afinitas terhadap sumber karbon. BAL diinkubasi pada suhu 37°C selama 12

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

jam. Pertumbuhan bakteri diamati setiap jam melalui nilai OD menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

Prosedur Identifikasi BAL

Pengecatan Gram. Pengecatan Gram dilakukan pada kultur bakteri umur 24 jam yang ditumbuhkan pada medium MRS. Pengecatan dilakukan dengan menambahkan cat pada kultur pada gelas objek yaitu cat kristal violet , selanjutnya iodine. Selama proses pengecatan dilakukan fiksasi (pemanasan), cat pewarna akan hilang pada waktu diberi cat peluntur, selanjutnya diberi cat penutup (safranin) yang berwarna merah. Pengamatan dilakukan pada mikroskop perbesaran 400x.

Uji Katalase. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan kurang lebih 2 tetes H_2O_2 3% pada kultur yang berumur 24 jam. Reaksi positif uji katalase ditunjukkan dengan membentuk gelembung-gelembung yang berarti ada pembentukkan gas oksigen (O_2) sebagai hasil pemecahan H_2O_2 oleh enzim katalase yang diproduksi oleh bakteri tersebut.

Identifikasi BAL secara molekuler

Identifikasi dilakukan pada isolat BAL terbaik yang telah terseleksi. Identifikasi dilakukan secara molekuler menggunakan sekuen gen 16S rRNA menggunakan metode PCR yang dilanjutkan dengan proses sekuensing. Identifikasi bakteri dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia. Hasil sekuensing kemudian diolah dengan program *software* Mega X. Hasil pengolahan data dikonfirmasi kemiripannya dengan program BLAST *Nucleotide* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Hasil kemudian dibuat konstruksi pohon filogeninya.

Isolasi DNA. Ekstraksi DNA genom dilakukan mengikuti protokol ekstraksi DNA dengan *Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, D6005)*. Hasil isolasi DNA kemudian dilanjutkan pada proses amplifikasi gen 16s rRNA.

Amplifikasi gen 16s rRNA. Amplifikasi gen 16s rRNA menggunakan *primer universal* universal 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan 1429 R (TAGGGTTACCTTGTTACGACTT) yang komplementer dengan ujung gen 16s rRNA dari semua strain dan menghasilkan pita tunggal dengan panjang 1500 bp. Prosedur ini dikerjakan pada DNA sampel yang telah diisolasi dengan membuat bahan yang digunakan untuk PCR berupa campuran 12,5 µl *MyTAq HS Red Mix* dan masing-masing 1 µl *primer forward* 27F dan *primer reverse* 1492R serta H2O

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

9 µl. Tabung berisi sampel yang akan diamplifikasi dan diisi dengan bahan campuran reaksi PCR sebanyak 24 µl. Masing-masing tabung kemudian ditambahkan 1 µl ekstrak DNA. Amplifikasi dilakukan terdiri dari predenaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit untuk mengaktifkan enzim polymerase, selanjutnya amplifikasi 35 siklus meliputi denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, anealling pada suhu 52° selama 15 detik, *extention* pada suhu 72°C selama 45 detik dan *cooling* pada suhu 4°C. Produk PCR kemudian divisualisasikan dengan cara 1 µl hasil produk PCR dielektroforesis dengan 0,8% TBE agarosa.

Sekuensing DNA. Hasil produk PCR sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis positif yang ditandai dengan adanya pita tunggal berukuran sekitar 1500 bp dilanjutkan proses sekuensing DNA oleh PT. Genetika Science Indonesia dengan metode *Bi-directional Sequencing*. Hasil sekuensing kemudian diolah dengan program *software* Mega X, data dikonfirmasi kemiripannya dengan program BLAST *Nucleotide* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Tahap 2. Aplikasi BAL untuk mitigasi metan secara *in vitro*

Penentuan nilai K s dan µ max bakteri asam laktat menggunakan glukosa terbatas. Nilai afinitas terhadap glukosa berbeda masing-masing strain bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan nilai afinitas terhadap glukosa, yaitu nilai K s dan µ max. Hasil pengamatan optical density (OD) pada pertumbuhan bakteri asam laktat dengan berbagai variasi kadar karbohidrat sebagai sumber karbon dan energi, dilakukan setiap jam sampai bakteri mencapai fase stasioner. Laju pertumbuhan bakteri diukur dengan menghubungkan dan sehingga didapatkan persamaan baru, Y=bx+a. Persamaan ini dapat digunakan untuk menghitung nilai K s dan µ max.

Fermentasi *in vitro*. Fermentasi secara *in vitro* dilakukan dengan metode Theodorou (1994) dengan perlakuan isolat BAL hasil isolasi dan penambahan glukosa dengan konsentrasi 0 Ks, 0,25 Ks, 0,5 Ks, 0,75 Ks, dan 1 Ks. Nilai Ks diperoleh dari Botol serum ukuran 100 ml diisi dengan bahan pakan sebanyak 300mg yang terdiri dari rumput gajah dan pollard dengan perbandingan 60:40. Botol yang telah berisi sampel kemudian diisi dengan medium buffer sebanyak 15 ml dan diinkubasi pada suhu 39°C selama semalam. Cairan rumen sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam botol yang berisi medium setelah diinkubasi. Lalu

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ditambahkan inokulan BAL yang teridentifikasi serta glukosa dengan konsentrasi 0 Ks, 0,25 Ks, 0,5 Ks, 0,75 Ks, dan 1 Ks sebanyak 5 ml ke dalam masing-masing sesuai dengan perlakuan. Botol kemudian diinkubasi kembali pada suhu 39°C selama 24 jam. Hasil fermentasi selama 24 jam digunakan untuk analisis keragaman metanogenik dan produk fermentasi.

Variabel Fermentasi

Pengukuran nilai pH. Pengujian derajat keasaman (pH) hasil fermentasi dilakukan pada akhir proses fermentasi. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi pada pH 4,0 dan 7,0.

Pengukuran Produksi Metan. Pengukuran produksi gas metan dilakukan dengan mengalikan kadar metan didalam gas dengan total volume produksi gas. Kadar metan dianalisis dengan menggunakan gas chromatography (GC) dengan merk Shimadzu u (model GC-8A, Kyoto, Japan, 2010) yang telah dilengkapi dengan flame ionization detector (FID) dan recorder dengan merk C-R61 dan kolom Porapak-Q.

Analisis Data

Data isolasi dan seleksi bakteri asam laktat disajikan secara deskriptif, untuk selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel atau gambar (Steel dan Torrie, 1995). Data yang diperoleh dari identifikasi molekuler diinterprestasikan secara deskriptif menggunakan pohon filogeni. Data parameter fermentasi meliputi pH dan produksi gas metan, dianalisis menggunakan pola faktorial, kemudian bila ada perbedaan nyata karena perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan’s New Multiple Range Test (Astuti, 2007).

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Asam Latat dari Digesta Sekum Domba

Isolasi bakteri asam laktat (BAL) dilakukan dengan inokulasi sampel hasil pengkayaan (*enrichment*) dari digesta sekum domba. Suspensi yang digunakan kemudian dilakukan pengenceran berseri (serial dilution) sebanyak 10^{-6}. Tujuan dilakukan pengenceran berseri untuk mengurangi jumlah mikrobia yang tersuspensi sehingga dapat dihitung dan menghasilkan koloni terpisah secara baik. Restuati *et al*. (2012) menjelaskan bahwa terdapat proses pengenceran yang dilakukan untuk mendapatkan koloni tunggal bakteri sehingga masing-masing dapat dipisahkan dan dijadikan sebagai isolate murni. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh dan dapat dihitung antara 25 sampai 250. Hasil yang diperoleh bahwa jumlah koloni total bakteri sebanyak 36 koloni isolat, yang kemudian dipilih secara acak mengenai bakteri yang menghasilkan zona bening disekitar koloni.

Hasil isolasi diperoleh sebanyak 36 koloni kandidat BAL yang dipilih secara acak ditunjukkan dengan adanya luasan zona bening terbaik di sekitar koloni yang tumbuh. Isolasi bakteri penghasil asam laktat dilakukan dengan media MRS agar ditambahkan $CaCO_3$ 1% dan menggunakan Teknik pourplate. Bakteri asam laktat (BAL) memiliki salah satu sifat yaitu mampu tumbuh pada keadaan kondisi oksigen yang minim sehingga dengan menggunakan teknik inokulasi pourplate mampu untuk mencampurkan inokulum sampel ke seluruh bagian media. Selain itu koloni bakteri yang ditumbuhkan dapat merata, seragam dengan meminimalisir kompetisi pengambilan nutrisi serta mikrobia baik aerob maupun anaerob memiliki kesempatan untuk tumbuh. Laily *et al*. (2013) melaporkan bahwa bakteri asam laktat pada beberapa genus umumnya memiliki sifat anerobik fakultatif hingga mikroaerofilik. Hal ini berarti bahwa bakteri asam laktat mampu untuk tumbuh pada keadaan dengan ketersediaan oksigen yang cukup minim, sedangkan apabila terdapat oksigen dalam jumlah banyak cenderung bersifat toksik dan terjadi penghambatan pertumbuhan bagi bakteri tersebut.

Zona bening menunjukkan bahwa koloni bakteri yang tumbuh mampu menghasilkan asam yang kemudian dapat menetralkan CaCO3 (kalsium karbonat) pada media sehingga warna media di samping atau sekitar koloni menjadi jernih/bening. Risna (2021) menambahkan dalam proses isolasi bakteri dapat dilakukan proses pemilihan secara acak dengan melihat bentuk morfologi koloni

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

yang mirip atau seragam dengan bentuk bundar, warna berkisar putih, memiliki permukaan cembung, tepian rata atau serabut dan permukaan mengkilat. Widodo *et al*. (2017) menjelaskan bahwa MRS merupakan media yang biasa digunakan untuk menumbuhkan BAL, namun sifat dari media ini adalah non-selektif sehingga bakteri selain BAL juga mampu untuk tumbuh. Agussalim (2020) menyatakan bahwa proses isolasi serta pendugaan adanya bakteri asam laktat dapat ditambahkan dengan kalsium karbonat, senyawa tersebut mempunyai nilai kelarutan yang rendah dalam air sehingga dapat berperan menetralkan asam laktat serta penyangga pH. Klare *et al*. (2005) menambahkan bahwa proses isolasi BAL yang memiliki sifat umum anaerob juga dapat dengan memperkaya media menggunakan L-cysteine. Senyawa tersebut berperan dalam mengarur kondisi anaerob dengan menurunkan nilai potensial redoks. Isolat yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan metode gores pada media MRS agar. Proses pemurnian dilakukan sebanyak 3 kali atau hingga diperoleh isolat yang benar-benar murni. Isolat BAL murni yang diperoleh selanjutnya diberi kode isolat Bal-D 1 sampai Bal-D 36. Isolat tersebut kemudian digunakan sebagai sampel untuk uji berikutnya.

Seleksi Isolat BAL Unggul

Uji Daya Tumbuh pada pH Rendah

Proses pengujian pH rendah dapat dikatakan salah satu syarat utama dalam pengujian untuk mendapatkan BAL unggul. Isolat yang mampu bertahan terhadap pH rendah menjadi gambaran awal bahwa isolat tersebut dapat melewati kondisi asam yang berada pada lambung baik pada manusia maupun hewan. Pratama (2013) menjelaskan bahwa lambung memiliki pH berkisar 2 sampai 3. Pengujian dilakukan menggunakan menggunakan media MRS dengan pH yang telah disesuaikan menjadi pH 2,5 dengan menggunakan HCl 0,1 N. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C. Hasil analisis ketahanan isolat terhadap pH rendah 2,5 pada waktu inkubasi 24 jam dapat diamati pada Tabel 2.

Hasil penelitian ditunjukkan pada Tabel 2 yaitu terdapat 24 isolat yang berhasil hidup pada media pertumbuhan dengan pH rendah. Isolat BAL yang terisolasi dapat tumbuh pada kondisi pH rendah yaitu 2,5. Uji ketahanan hidup pada keasaman tinggi atau pH rendah dilakukan dengan mengacu pada metode yang digunakan Priadi *et al*. (2020) dengan mengambil 0,1 ml suspense bakteri

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

kandidat probiotik dari media MRS cair dan diinokulasikan ke dalam 2 ml MRS pH 2,5. Pengaturan pH media menggunakan HCl 0,1 N. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C dalam inkubator. Isolat yang berhasil tumbuh pada penelitian ini dilakukan screening tahap selanjutnya.

Tabel 2. Isolat yang berhasil tumbuh pada media dengan pH 2,5

Kode Isolat	Koloni
BAL D-1	-
BAL D-2	+
BAL D-3	-
BAL D-4	-
BAL D-5	-
BAL D-6	-
BAL D-7	-
BAL D-8	-
BAL D-9	-
BAL D-10	-
BAL D-11	+
BAL D-12	-
BAL D-13	+
BAL D-14	-
BAL D-15	+
BAL D-16	-
BAL D-17	+
BAL D-18	+
BAL D-19	+
BAL D-20	+
BAL D-21	+
BAL D-22	+
BAL D-23	+
BAL D-24	+
BAL D-25	+
BAL D-26	+
BAL D-27	+
BAL D-28	+
BAL D-29	+
BAL D-30	+
BAL D-31	+
BAL D-32	+
BAL D-33	+
BAL D-34	+
BAL D-35	+
BAL D-36	+

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

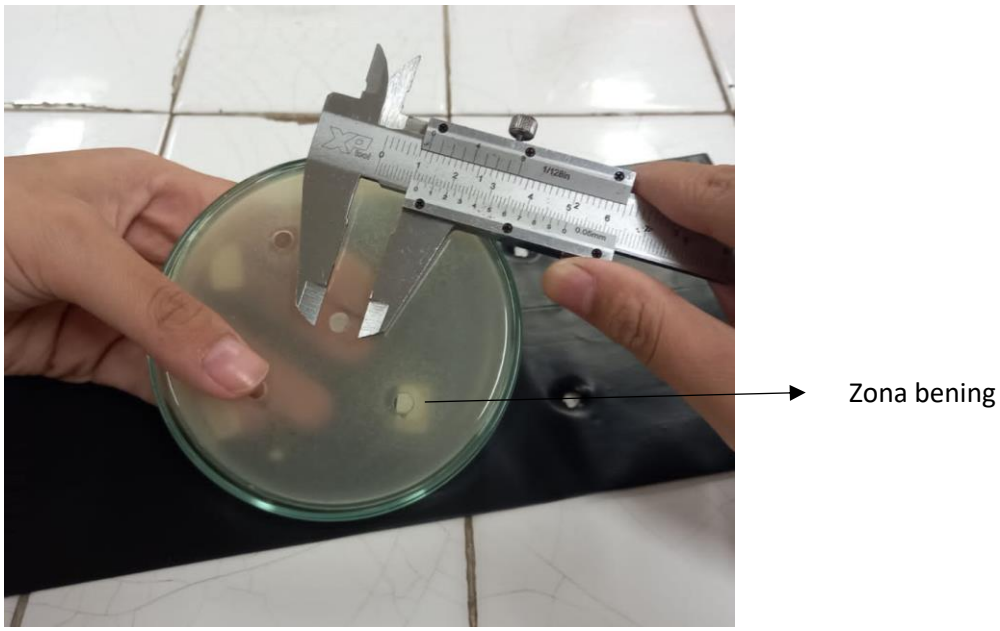
Isolat bakteri sebagai BAL unggul harus memiliki kemampuan dalam berkompetisi terhadap bakteri lain yang terdapat di dalam saluran pencernaan, khususnya adalah bakteri yang bersifat patogen. Isolat BAL unggul juga dapat memanipulasi ekosistem microflora yang ada dalam saluran pencernaan sehingga bakteri yang bersifat patogen mampu dihambat pertumbuhannya sedangkan bakteri yang bermanfaat bagi inang memiliki pertumbuhan secara maksimal. Hal ini disebabkan pH rendah memberikan efek denaturasi enzim pada permukaan sel, menyebabkan kerusakan lipopolisakarida dan membran luar serta menyebabkan penurunan pH sitoplasma melalui peningkatan permeabilitas membran. Widodo *et al*. (2017) menyatakan bahwa perubahan jumlah sel pada uji ketahanan pH rendah yang berbeda-beda menunjukkan bahwa kemampuan bertahan hidup bakteri terhadap asam berbeda dan bersifat strain-dependent. Faktor kondisi lingkungan asal bakteri dan adanya perbedaan spesies serta galur spesifik juga berpengaruh terhadap daya tahan tersebut (Guo *et al*., 2015).

Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen

Isolat bakteri sebagai BAL unggul harus memiliki kemampuan dalam berkompetisi terhadap bakteri lain yang terdapat di dalam saluran pencernaan, khususnya adalah bakteri yang bersifat patogen. Isolat sebagai kandidat probiotik juga dapat memanipulasi ekosistem microflora yang ada dalam saluran pencernaan sehingga bakteri yang bersifat patogen mampu dihambat pertumbuhannya sedangkan bakteri yang bermanfaat bagi inang memiliki pertumbuhan secara maksimal. Pengujian aktivitas antimikrobia dilakukan dengan metode difusi sumuran dan besarnya aktivitas penghambatan dilakukan pengukuran terhadap zona bening. Pan *et al*. (2009) sebelumnya telah membagi kemampuan penghambatan (diameter zona hambat) terhadap bakteri patogen menjadi beberapa kategori yaitu 0 mm berarti tidak ada penghambatan (-), diameter 0-3 mm yang berarti penghambatan lemah, 3-6 mm berarti penghambatan sedang dan >6 mm yang berarti penghambatan kuat terhadap bakteri patogen.Pengukuran diameter zona bening pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 1. Bakteri tantang atau bakteri patogen yang digunakan dalam

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

pengujian adalah *Escherichia coli*, yang merupakan koleksi Laboratorium Biokimia Nutrisi, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada.



Gambar 1. Pengukuran diameter zona bening

Hasil penelitian ditunjukkan pada Tabel 3 bahwa terdapat 11 isolat yang memiliki daya penghambatan kuat terhadap bakteri patogen, dan 13 isolat lain memiliki penghambatan lemah hingga sedang. Widodo *et al*. (2017) menyatakan bahwa strain dari spesies yang sama memiliki kemampuan aktivitas penghambatan patogen yang berbeda, dengan demikian dapat dikatakan bersifat strain-dependent. Berdasarkan data di atas tersebut maka dapat diperoleh 11 isolat bakteri yang memiliki daya hambat yang kuat terhadap bakteri pathogen khususnya *Escherichia coli*.

Bakteri asam laktat (BAL) mampu menghambat pertumbuhan bakteri dikarenakan mampu memproduksi senyawa metabolit yang bersifat antimikrobia antara lain seperti asam organik asam laktat, asam asetat, CO_2, H_2O_2, bakteriosin dan senyawa lain yang akumulasinya mampu menekan pertumbuhan patogen baik bersifat bakteriostatik maupun bakterisidal. Asam laktat sebagai contoh akan menurunkan kondisi pH sehingga pertumbuhan patogen terhambat. Sumual *et al*. (2019) menyatakan bahwa mekanisme senyawa antibakteri BAL berupa bakteriosin akan mencegah sintesis peptidoglikan sehingga dinding sel yang dimiliki oleh bakteri cenderung lemah dan kemudian mengalami lisis sehingga

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

dengan demikian diketahui juga faktor yang mempengaruhi efektivitas zona penghambatan antara lain adalah jenis, jumlah dan umur bakteri serta sedikit banyaknya konsentrasi zat antibakteri (Anggita *et al*., 2018).

Table 3. Daya hambat isolat BAL terhadap bakteri patogen

Kode Isolat	Zona Bening	R (mm)	Daya Penghambatan (Pan *et al*., 2009)
BAL D-2	+	7,19	Kuat
BAL D-11	+	4,15	Sedang
BAL D-13	+	7,84	Kuat
BAL D-15	+	8,08	Kuat
BAL D-17	+	3,49	Sedang
BAL D-18	+	5,48	Sedang
BAL D-19	+	5,99	Sedang
BAL D-20	+	7,67	Kuat
BAL D-21	+	7,42	Kuat
BAL D-22	+	9,39	Kuat
BAL D-23	+	5,65	Sedang
BAL D-24	+	4,45	Sedang
BAL D-25	+	6,41	Kuat
BAL D-26	+	9,50	Kuat
BAL D-27	+	5,47	Sedang
BAL D-28	+	4,31	Kuat
BAL D-29	+	3,29	Sedang
BAL D-30	+	1,90	Lemah
BAL D-31	+	4,66	Sedang
BAL D-32	+	9,32	Kuat
BAL D-33	+	9,39	Kuat
BAL D-34	+	3,99	Sedang
BAL D-35	+	6,78	Kuat
BAL D-36	+	5,44	Sedang

Hasil Seleksi Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat

Pengujian dilakukan untuk melihat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan spektofotometer Optical density (OD) pada absorbansi λ= 600 nm.

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan Isolat BAL yang telah terpilih. Isolat ditumbuhkan pada media MRS selama 12 jam dan dilakukan pengamatan setiap 1 jam. Fase pertumbuhan bakteri terdiri dari empat fase, yaitu fase lag, fase pertumbuhan eksponensial, fase stasioner, dan fase penurunan. Nilai OD merupakan pendekatan yang dapat dikorelasikan langsung dengan konsentrasi sel. Pengukuran OD menghitung jumlah cahaya yang hilang karena hamburan dan penyerapan pada satu panjang gelombang (McBirney *et al*., 2016).

Tabel 4. Koefisien arah pertumbuhan isolat BAL

Jenis Isolat BAL	Slope
BAL D-2	$0{,}0623^{ab}$±0.00267
BAL D-11	$0{,}0484^{a}$±0.00300
BAL D-15	$0{,}0560^{a}$±0.00051
BAL D-20	$0{,}0610^{ab}$±0.00087
BAL D-21	$0{,}0606^{ab}$±0.00630
BAL D-22	$0{,}0732^{ab}$±0.04371
BAL D-25	$0{,}0560^{a}$±0.00728
BAL D-26	$0{,}0636^{ab}$±0.00319
BAL D-32	$0{,}0653^{ab}$±0.00359
BAL D-33	**$0{,}0995^{b}$±0.00117**
BAL D-36	$0{,}0677^{ab}$±0.00356

Hasil penelitian ditunjukan pada Tabel 4, Isolat BAL yang berbeda ditumbuhkan pada media yang sama memberikan koefisien arah (slope) yang berbeda. Slope diperoleh melalui perhitungan regresi linier dari kurva pertumbuhan bakteri berdasarkan OD dan waktu pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Umniyati *et al*. (2009) yang menyatakan bahwa koefisien pertumbuhan bakteri dapat diperoleh dengan persamaan regresi linier Y = ax + b, semakin besar nilai yang didapat maka bakteri memiliki kecepatan tumbuh yang baik. Isolat BAL D-33 memiliki nilai slope yang paling tinggi diantara 11 isolat lainya. Isolat BAL D33 dipilih untuk diidentifikasi ke tahap selanjutnya.

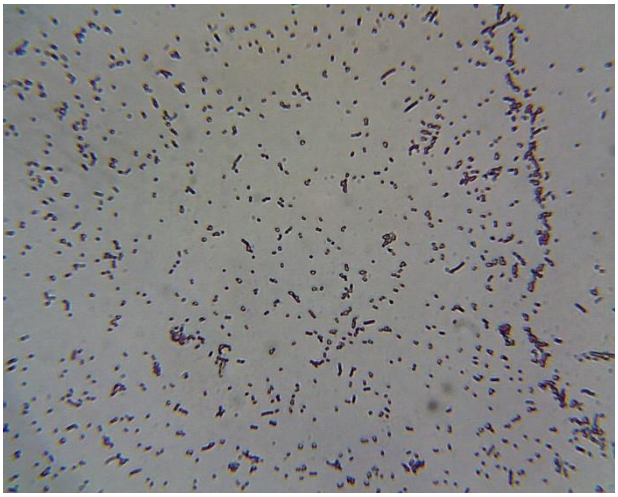
Identifikasi BAL

Pengecatan BAL

Isolat BAL D-33 yang diperoleh dari hasil seleksi kemudian dilakukan identifikasi tahap awal secara fisik melalui pengecatan Gram (Gram staining) untuk

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

mengetahui klasifikasi BAL yang diperoleh termasuk dalam Gram positif atau negatif. Berdasarkan hasil pengecatan Gram yang dilakukan, BAL D-33 menghasilkan warna ungu, yang menandakan bahwa BAL D-33 termasuk ke dalam bakteri Gram positif. Hasil pengecatan gram terhadap BAL D-33 ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil pengecatan Gram Isolat BAL D-33 (Perbesaran 1000x)

Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan lebih tebal, sedangkan bakteri Gram negatif lapisan peptidoglikan lebih tipis. Bakteri Gram positif akan mengalami denaturasi protein pada dinding selnya saat pencucian dengan alkohol. Protein akan menjadi keras dan kaku, pori-pori mengecil, permeabilitas kurang sehingga kompleks ungu kristal iodium dipertahankan dan sel bakteri tetap berwarna ungu. Bakteri Gram negatif pada struktur lipidnya akan larut selama pencucian dengan alkohol, pori-pori pada dinding sel akan membesar, permeabilitas dinding sel menjadi besar sehingga zat warna yang sudah diserap mudah dilepaskan dan sel bakteri menjadi tidak berwarna (Tortora et al., 2013).

Berdasarkan hasil pengecatan Gram yang tersaji pada Gambar 2, isolat BAL D-33 juga dapat diidentifikasi secara morfologi bentuk isolat BAL D-33 memiliki bentuk bentuk sel yaitu batang. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Simanjuntak dan Naibaho (2023) yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif, ada yang berbentuk batang dan bulat, dan bersifat non motil. Ray (2004) menyatakan bahwa *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri yaitu bentuk selnya berbentuk batang, beberapa berbentuk batang yang sangat panjang dan beberapa berbentuk batang bulat.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Uji Katalase

Hasil pengamatan pada uji katalase isolate BAL D-33 menunjukan tidak ada gelembung udara Ketika isolate ditetesi dengan H_2O_2. Hasil tersebut menunjukkan tidak terbentuknya gelembung udara (O_2) dikarenakan BAL D-33 tersebut tidak mempunyai enzim katalase yang mampu memecah H_2O_2 sehingga dapat dikatakan BAL tersebut termasuk jenis katalase negatif. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Simanjuntak dan Naibaho (2023) BAL merupakan katalase negatif, tidak membentuk spora, tidak mempunyai cytochrome, aerotoleran, anaerobik hingga mikroaerofilik, membutuhkan nutrisi yang kompleks.

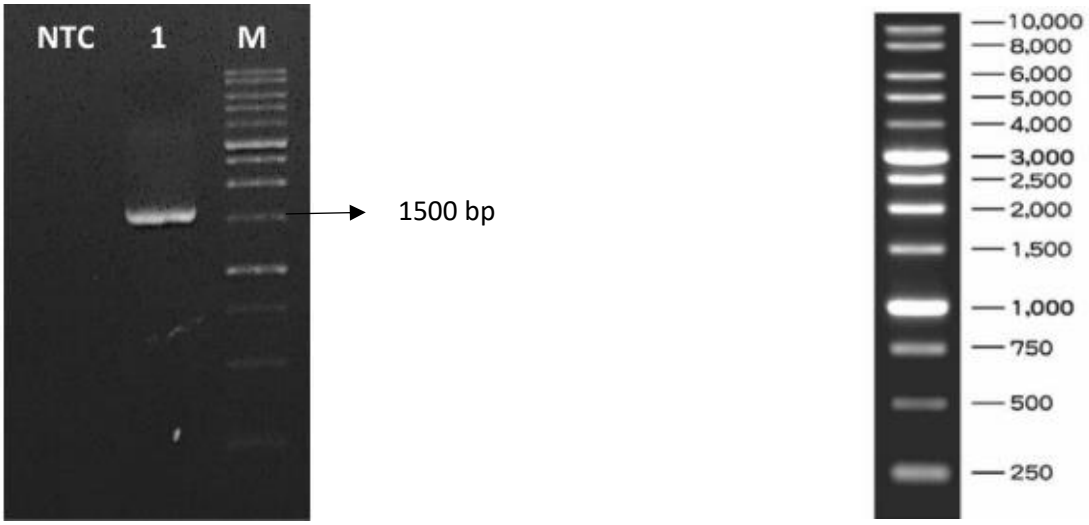
Hasil katalase negatif juga menandakan bahwa isolate BAL D-33 bersifat anaerob. Jenis bakteri aerob dan dan fakultatif anaerob dapat mengkonversi H_2O_2 menggunakan enzim superoksida dismutase, yang lebih lanjut akan dipecah oleh enzim katalase. Bakteri obligat anaerob tidak memiliki enzim superoksida dismutase dan katalase sehingga tidak dapat toleransi terhadap adanya oksigen (Hogg, 2018). Spesies bakteri dengan genus *Lactobacillus* secara umum memiliki sifat katalase negatif, meskipun terdapat beberapa strain yang dapat mendekomposisi peroksida yaitu yang bersifat pseudokatalase (Fugelsang dan Edward, 2007).

Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat

Isolat BAL D-33 yang diperoleh berdasarkan hasil seleksi kemudian juga dilakukan identifikasi secara molekuler. Identifikasi dilakukan secara molekuler untuk memperoleh hasil akurat yang didasarkan pada kesamaan genotipik. Markiewicz *et al*. (2008) melaporkan bahwa pendekatan secara molekuler berbasis sekuen nukleotida gen 16s rRNA bisa digunakan untuk proses identifikasi dan pengelompokkan bakteri asam laktat dengan lebih tepat dan akurat. Widodo *et al*. (2017) menjelaskan juga bahwa untuk melakukan identifikasi secara molekuler berbasis 16s rRNA meliputi tahapan antara lain adalah proses penumbuhan BAL terpilih, isolasi DNA, amplifikasi dengan PCR, sekuensing atau pensejajaran dan analisis sekuen nukleotida yang ada pada data yang telah ada (GenBank).

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Proses awal yang dilakukan untuk pengujian BAL secara molekuler yaitu dengan melalukan penumbuhan BAL D-33 pada medium MRS selama 24 jam. Proses selanjutnya yaitu isolasi DNA yang bertujuan untuk memisahkan antara genom DNA dengan molekul-molekul lain di dalam sel. DNA yang telah terisolasi dan diekstraksi kemudian diamplifikasi dengan PCR (Polymerase Chain Reaction) menggunakan primer universal gen 16s rRNA yaitu 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan 1429 R (TAGGGTTACCTTGTTACG ACTT). Widyadiyana *et al*. (2015) melaporkan bahwa primer tersebut sudah banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat (BAL). Osborne *et al*. (2006) menyatakan bahwa primer tersebut memungkinkan proses amplifikasi yang hampir keseluruhan pada gen 16S rRNA serta sudah dikaji untuk mempelajari berbagai bakteri beserta habitatnya. Berdasarkan visualisasi hasil elektroforesis (Gambar 3) menunjukkan pita tunggal hasil amplifikasi gen 16s rRNA isolat terpilih berukuran sekitar 1500 bp. Gen yang berukuran tersebut dapat dikatakan sudah menunjukkan sifat yang diinginkan dalam identifikasi molekuler dan sesuai dengan gen target yang diinginkan. Janda dan Abbot (2007) menyatakan bahwa gen 16S rRNA hampir terdapat pada kebanyakan bakteri, fungsi gen 16S rRNA cenderung tetap dan tidak berubah pada kurun waktu tertentu, serta berukuran cukup panjang (1.500 bp).



Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA BAL D-33

Hasil yang diperoleh dari proses amplifikasi pada isolat BAL D-33 kemudian dilakukan proses sekuensing. Sekuensing merupakan suatu proses

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

pengurutan basa nukleotida pada DNA yang kemudian dari hasil sekuensing diketahui sekuen basa untuk melihat kemiripan atau kecocokan berdasarkan proses BLAST (Basic Logic Allignment Search Tool). Proses sekuensing dilakukan dengan metode Bi-directional sequencing oleh PT. Genetika Science Indonesia. Suatu gen yang telah diketahui sekuen urutan basa nukleotidanya kemudian dapat ditentukan identitasnya dengan membandingkan dengan data pada GenBank di National Center for Biotechnology Information (NCBI). Hasil dari proses BLAST memberikan informasi mengenai bakteri yang memiliki kesamaan dengan isolat sampel.

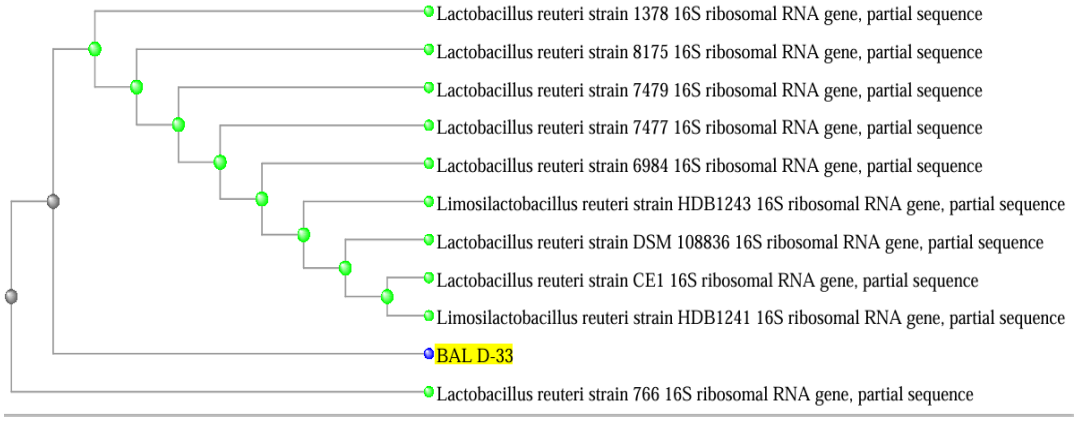
Tabel 5. Hasil analisis BLAST identifikasi isolat BAL D-33 sekuens 16s rRNA

16S rRNA	Nomer Akses NCBI
Lactobacillus reuteri strain 766 99,93%	MT585493.1
Lactobacillus reuteri strain 1378 99,93%	MT573800.1
Lactobacillus reuteri strain 8175 99,93%	MT538923.1
Lactobacillus reuteri strain 7479 99,93%	MT516105.1
Lactobacillus reuteri strain 7477 99,93%	MT516103.1
Lactobacillus reuteri strain 6984 99,93%	MT464031.1
Limosilactobacillus reuteri strain HDB1243 99,93%	MT322927.1
Lactobacillus reuteri strain DSM 108836 99,93%	MN537548.1
Lactobacillus reuteri strain CE1 99,93%	MK602697.1
Limosilactobacillus reuteri strain HBD1241 99,93%	MK564724.1

Berdasarkan hasil analisis BLAST yang disajikan pada Tabel 5 menunjukkan bahwa hasil amplifikasi DNA genom dengan primer 16s rRNA, BAL D-33 teridentifikasi sebagai bakteri *Lactobacillus reuteri* dengan kemiripan mencapai 99.93% terhadap sekuen parsial dari beberapa strain *Lactobacillus reuteri.* Menurut Claverie dan Notredame (2007) sekuen dapat dikategorikan homolog dengan sekuen yang lain jika nukleotida menunjukan kemiripan lebih dari 70%. Sekuen homolog dan accession number dari beberapa strain BAL hasil BLAST kemudian digunakan sebagai konstruksi pohon filogeni.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Konstruksi pohon filogeni yang menunjukan kekrabatan isolat BAL D-33 dengan beberapa sekuen parsial dari beberapa strain *Lactobacillus reuteri* ditunjukkan pada Gambar 4. Pohon filogeni dibuat menggunakan metode neighbour-joining (Saitou dan Nei, 1987) dengan menggunakan program MEGA X. Sekuen acuan yang digunakan adalah sekuen parsial *Lactobacillus reuteri* strain 766, 1378, 8175, 7479, 7477, 6984, HDB1243, DSM 108836, CE1, dan HBD1241 sebagaimana yang telah tertera pada Tabel 5.



Gambar 4. Pohon Filogeni berdasarkan sekuen 16s rRNA pada isolat BAL D-33

Berdasarkan hasil keseluruhan identifikasi terhadiap isolat BAL D-33 dapat dijelaskan bahwa isolat BAL D-33 memiliki kemiripan atau homolog dengan *Lactobacillus reuteri*. Zheng *et al*. (2020) melaporkan bahwa baru-baru ini dalam proses studi genom yang telah dilakukan taksonomi mengenai *Lactobacilaceae* baru saja dievaluasi dalam penggunaan penyebutan nama *Lactobacillus* telah diubah menjadi *Limosilactobacillus.* Kristjansdottir *et al*. (2015), menyatakan bahwa *Lactobacillus reuteri* merupakan Bakteri Asam laktat heterofermenter yang dapat digunakan sebagai agen probiotik. Hou *et al*. (2015) menyatakan bahwa *Lactobacillus reuteri* dapat banyak ditemukan pada hewan vertebrata antara lain manusia, babi, ayam, kelinci, dan tikus.

Parameter Fermentasi

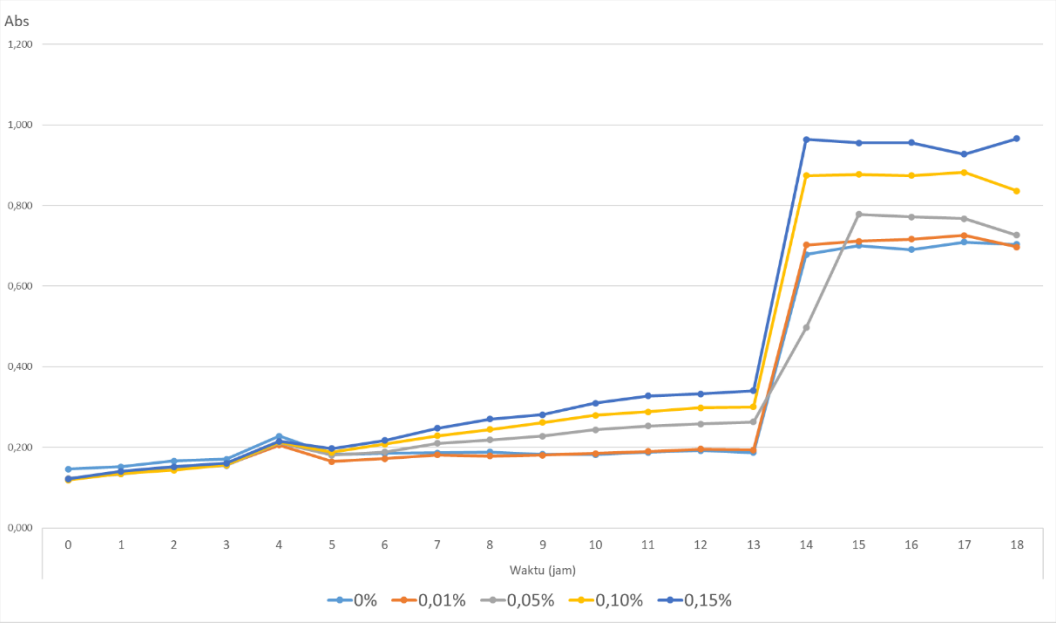
Fermentasi enteric pada ruminansia merupakan proses pencernaan dimana mikroba yang ada pada saluran pencernaan khususnya rumen memecah bahan tanaman menjadi nutrisi yang dapat digunakan hewan untuk produksi protein bernilai tinggi seperti susu, daging dan produk kulit (Doyle *et al*., 2019). Inokulan hasil pengkayaan dari bakteri yang telah teridentifikasi yaitu BAL D-33 akan diuji secara *in vitro* untuk melihat produk hasil fermentasi yang dihasilkan.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan metode Theodorou (1994). Parameter fermentasi yang diuji pada penelitian ini meliputi pH dan produksi metan.

Penentuan nilai μ_{max} dan Ks

Pertumbuhan bakteri asam laktat diamati dengan menggunakan substrat glukosa terbatas yaitu 0%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, dan 0,15%. Pengamatan pertumbuhan bakteri asam laktat dilakukan hingga fase stasioner. Grafik pertumbuhan BAL D-33 tersaji pada Gambar 5.



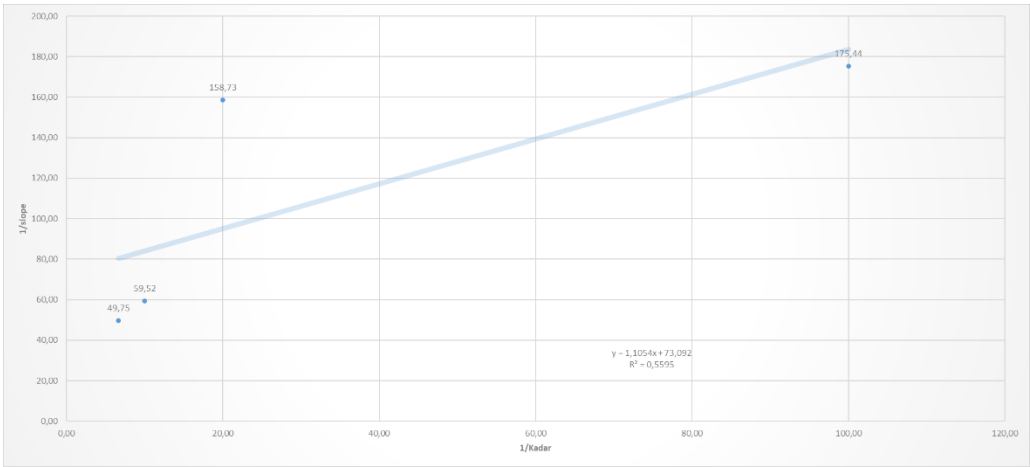
Gambar 5. Kurva Pertumbuhan BAL D-33 menggunakan konsentrasi glukosa yang berbeda

Berdasarkan kurva pertumbuhan BAL D-33 yang tersaji pada gambar 5 menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri dari fase lag (adaptasi) sampai fase stasioner berlangsung dari jam 0 sampai jam ke 18. Risna *et al.* (2022) menyatakan bahwa terdapat 4 fase pertumbuhan bakteri yang meliputi fase lag, fase eksponensial, fase stationer dan fase kematian. Fase lag merupakan fase awal atau penyesuaian bakteri untuk tumbuh, pada fase lag pertumbuhan bakteri masih sangat rendah. Fase lag pada BAL D-33 terjadi pada jam ke 0 sampai jam ke 5. Fase pertumbuhan selanjutnya yaitu fase eksponensial dimana pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat. Berdasarkan Table 4 fase eksponensial terjadi pada jam ke 5 hingga jam ke 14 dan konsentrasi glukosa yang

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

berbeda memberikan kecepatan tumbuh yang berbeda pula pada BAL D-33. Beberpa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan pada fase ini antara lain kondisi suhu, pH, nutrient dalam media dan sifat genetik mikroba (Volk dan Wheeler, 1993). Fase stasioner merupakan fase dimana jumlah sel bakteri yang hidup sama dengan yang mati. Fase kematian merupakan fase dimana jumlah sel bakteri yang mati jumlahnya lebih banyak daripada yang hidup. Pada fase ini sel bakteri mengalami kekurangan nutrien, selain itu juga terjadi akumulasi senyawa metabolit primer dan sekunder yang dapat menghentikan pertumbuhan sel bakteri.

Berdasarkan pertumbuhan bakteri asam laktat tersebut, maka dapat ditentukan pula nilai μ_{max} dan Ks. Isolat BAL unggul yang terseleksi diuji nilai μ_{max} dan Ks untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan bakteri dan dapat menunjukkan efisiensi bakteri dalam memanfaatkan substrat. Nilai μ_{max} dan Ks BAL terseleksi dapat dilihat pada analisis grafik Gambar 6.



Gambar 6. Grafik Ks BAL D-33

Berdasarkan grafik yang tersaji pada Gambar 5, diperoleh persamaan y= ax+b dengan nilai y = 1,1054x + 73,092. Nilai tersebut kemudian digunakan untuk perhitungan nilai μ_{max} dan Ks. Hasil perhitungan diperoleh nilai μ_{max} dan Ks pada BAL D-33 berturut-turut yaitu 0,013/jam dan 0,015 gram/100 ml. Penelitian Paradhipta *et al.* (2014) menyebutkan bahwa bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* memiliki nilai Ks terendah 0,03 gram/100ml dengan nilai µ max tertinggi 0,09 /jam. Nilai Ks dan µ max yang berbeda dipengaruhi oleh jenis strain bakteri dan substrat yang digunakan, karena masing-masing strain bakteri memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam memanfaatkan substrat maupun dalam

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

beradaptasi. Hasil penelitian yang diperoleh BAL D-33 memiliki nilai μ_{max} dan Ks yang lebih rendah jika dibandingkan dengan BAL *Lactobacillus plantarum* pada penelitian Paradhipta *et al.* (2014) artinya BAL D-33 lebih optimal dalam memanfaatkan glukosa sebagai substrat. Pertumbuhan BAL D-33 membutuhkan substrat yang lebih sedikit dibandingkan *Lactobacillus plantarum* dengan dengan waktu pertumbuhan yang relative pendek, hal ini menunjukkan kecepatan pertumbuhan BAL D-33 yang optimal.

Pertumbuhan yang optimal akan menghasilkan asam organik dan penurunan pH yang optimal. Nilai Ks yang rendah memberikan indikasi bahwa bakteri asam laktat akan memanfaatkan substrat yang diberikan secara efisien, kemudian menghasilkan produk yang baik yaitu menghasilkan produk fermentasi yang memiliki pH rendah dan kadar asam laktat yang tinggi. Nilai μ_{max} dan Ks menggambarkan kinetika pertumbuhan bakteri. Setiap bakteri asam laktat menghasilkan nilai μ_{max} dan Ks yang berbeda-beda. Nilai μ_{max} dan Ks di dasarkan pada persamaan Monod (Robinson dan Tiedje, 1983). Pertumbuhan sel pada hakikatnya merupakan fungsi dari jumlah nutrien yang dikonsumsi dan jumlah prduk yang dihasilkan, kedua faktor tersebut akan berpengaruh terhadap pertumbuhan suatu mikroorganisme, antara lain keterbatasan substrat dalam medium dan penimbunan senyawa toksik yang terdapat dalam medium sebagai senyawa yang diproduksi oleh mikroorganisme, sehingga kecepatan tumbuh mikroorganisme pada saat tertentu akan berhenti (Bachruddin, 2014).

Derajat Keasaman (pH) rumen

Derajat keasaman (pH) pada rumen merupakan parameter yang penting dalam proses fermentasi karena berpengaruh terhadap pertumbuhan dan populasi mikroba dalam rumen. Kondisi pH yang sesuai akan membuat proses pertumbuhan dan metabolisme mikroba akan semakin cepat sehingga proses pencernaan pakan semakin optimal (Purbowati *et al*., 2014). Data hasil penelitian terhadap nilai pH tersaji pada Tabel 6.

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Tabel 6. Hasil Uji Derajat Keasaman (pH) dafa fermentasi secara *in vitro*

Level Glukosa	Jenis Mikroba	
	Rumen	Rumen:Domba
0 Ks	7,52±0,24[b]	6,95±0,09[a]
0,25 Ks	7,36±0,05[b]	6,99±0,08[a]
0,5 Ks	7,51±0,21[b]	6,92±0,05[a]
0,75 Ks	7,54±0,29[b]	6,89±0,02[a]
1Ks	7,27±0,10[b]	6,91±0,03[a]

[a,b,c] Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa jenis mikroba berpengaruh nyata terhadap pH rumen secara *in vitro* (P<0,05) namun interaksi antara level glukosa dan jenis mikroba yang diberikan tidak berpengaruh nyata (P>0,05) terhadap pH cairan rumen hasil fermentasi secara *in vitro*. Perlakuan level glukosa dan jenis mikroba terhadap kondisi pH dalam rumen masih kisaran normal, hal ini diduga karena saliva buatan yang digunakan sebagai buffer mampu menjaga kestabilan kondisi di dalam rumen. *McDolald et al*. (2002) menyatakan bahwa nilai derajat keasaman pada fermentasi rumen sebesar 6,0 – 7,0 pada keadaan normal. Nilai pH yang normal tersebut menggambarkan proses fermentasi didalam rumen yang stabil.

Nilai pH berperan penting untuk mendukung pertumbuhan mikroba dan produk yang dihasilkan selama proses fermentasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Wanapat *et al.* (2014) menyatakan bahwa nilai pH yang normal didukung oleh penggunaan saliva buatan sebagai buffer yang mampu menjaga kestabilan proses fermentasi di dalam rumen. Faktor yang mempengaruhi nilai pH dalam rumen adalah saliva buatan sebagai buffer, proses fermentasi serta produk yang dihasilkan selama proses fermentasi (Orskov, 1998).

Produksi Gas Metan

Gas metan merupakan produk fermentasi yang dihasilkan oleh ternak ruminansia. Gas metan dibentuk oleh kelompok archae metanogenik dalam rumen dengan menggunakan Hidrogen (H_2) dan senyawa yang mengandung metil yang dihasilkan sebagai produk akhir fermentasi. Gas metan kemudian dilepaskan ke atmosfer melalu aktivitas bersedawa dan dihembuskan dari paru-paru melalui

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

pernapasan hewan (Doyle *et al*., 2019). Hasil penelitian produksi gas metan dengan perlakuan penambahan BAL dan level glukosa yang berbeda tersaji dalam Tabel 7.

Tabel 7. Produksi gas metan (mL/g) dalam rumen secara *in vitro*

Level Glukosa	Jenis Mikroba	
	Rumen	Rumen:Domba
0 Ks	0,94±0,2341^{e}	0,67±0,0004^{d}
0,25 Ks	1,11±0,0803^{f}	0,40±0,0003^{c}
0,5 Ks	2,17±0,0492^{g}	0,31±0,0091^{bc}
0,75 Ks	1,86±0,0251^{h}	0,16±0,0871^{ab}
1Ks	1,45±0,118^{i}	0,03±0,0100^{a}

$^{a,b,c,d\ dst.}$ Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Hasil penelitian menunjukan bahwa menunjukkan adanya interaksi secara signifikan antara perlakuan jenis mikroba dan level glukosa (P<0,05). Penambahan BAL pada fermentasi secara invitro terbukti dapat menurunkan gas metan dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan BAL. Hal ini sesuai dengan pernyataan Jeyanathan (2016) bahwa ada beberapa jenis bakteri termasuk BAL yang dapat mengurangi metanogenesis sehingga dapat mereduksi produksi gas metan pada ruminansia. BAL dapat mempengaruhi metanogenesis ruminal dalam tiga cara yaitu penggunaan metabolit BAL untuk menggeser fermentasi rumen sehingga terjadi penurunan produksi metan, penggunaan BAL atau metabolitnya untuk secara langsung menghambat metanogen rumen dan, penggunaan BAL atau metabolitnya untuk menghambat bakteri rumen tertentu yang menghasilkan H_2 atau senyawa metil yang mengandung ataupun yang merupakan substrat untuk metanogenesis (Doyle *et al*., 2019).

Selain sebagai jalur pemanfaatan hidrogen BAL juga dapat menghasilkan metabolit yang diketahui dapat menurunkan produksi metan. Senyawa metabolit yang dihasilkan BAL merupakan produk hasil fermentasi antara lain asam organik dan hidrogen peroksida serta peptida yang disintesis oleh ribosom yang dikenal sebagai bakteriosin (Cotter *et al*., 2013). Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL telah diteliti dan diketahui dapat menurunkan produksi metan di dalam rumen sebanyak 49% secara invitro Renuka *et al*. (2013). *Lactobacillus reuteri* secara spesifik dapat menghasilkan senyawa antimikroba berupa reuterin senyawa ini

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

menghambat aktivitas enzim reduktase ribonukleotida bakteri patogen, sehingga menghambat replikasi DNA bakteri Patogen (Prayoga *et al*., 2021). Ojetti *et al*. (2017) juga melaporkan bahwa *Lactobacillus reuteri* dapat menurunkan produksi metan oleh bakteri metanogen (*Methanobrevibacter smithii*), dengan peningkatan pergerakan usus dan juga kompetitor konsumsi hidrogen (H_2).

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Diperoleh strain bakteri unggul yaitu BAL-D33 yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus reuteri* dari hasil isolasi, seleksi dan identifikasi bakteri asam laktat dari sekum domba.
2. BAL D-33 memiliki afiinitas yang baik terhadap substrat glukosa dengan nilai Ks 0,015 gram/ml dan μ_{max} 0.013/jam.
3. BAL D-33 mampu digunakan sebagai mitigasi metan karena dapat menurunkan produksi metan secara *in vitro.*

Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan saran untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap variable fermentasi yang lain terutama terhadap hasil VFA dalam rumen,
2. Perlu adanya kajian lebih lanjut pemanfaatan BAL yang telah teridentifkasi terhadap fermentasi secara *in vivo.*
3. Perlu dikasi mengenai dosis optimal yang diberikan dan kajian interaksi dengan bakteri lain di dalam rumen jika diberikan strain BAL D-33

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

RINGKASAN

Ruminansia merupakan ternak yang dapat memanfaatkan pakan serat menjadi produk bernilai ekonomis melalui proses fermentasi enteric yang ada didalam rumen. Namun, fermentasi enterik yang ada pada ruminansia bekontribusi terhadap pemanasan global dan merupakan sumber emisi kedua terbesar yaitu sekitar 40% dari total emisi gas rumah kaca dari sektor pertanian. Selain itu pembentukan gas metan juga merupakan bentuk hilangnya energi pakan pada ternak. Disisi lain produksi gas metan memiliki peran homeostatis untuk mempertahankan kondisi rumen dangan mengubah NADH menjadi NAD^+ dalam proses glikolisis untuk menghasilkan ATP. Sehingga perlu dilakukan mitigasi produksi metan dalam rumen dengan memanfaatkan hydrogen oleh bakteri asam laktat yang dapat berkompetisi dengan metanogen yang diperoleh dari sekum domba. Sekum merupakan saluran pencernaan yang terdapat berbagai macam mikroba seperti yang ada pada rumen, serta kondisi lingungan anaerob yang sama seperti rumen. Telah diteliti juga bahwa produksi metan pada sekum 10 kali lebih rendah jika dibandingkan dengan produksi metan pada rumen.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapakan strain BAL baru dari sekum domba melalui proses isolasi, seleksi dan identifikasi BAL dari sekum domba, dan dapat mengetahui pengaruh strain tersebut untuk mitigasi produksi metan dalam rumen. Beberapa genus BAL antara lain *Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, Pediococcus, Tetragenococcus, Leuconostoc, Bifidobacterium dan Lactococcus.* Kelompok BAL seringkali juga dipertimbangkan sebagai mikrobia menguntungkan, dapat memanfaatkan hydrogen, dan menghasilkan beberapa senyawa antimikroba sehingga dapat berkompetisi dengan bakteri lain dalam saluran pencernaan.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Nutrisi, Departemen Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini meliputi 2 tahapan, yaitu Tahap I yaitu Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL). dan Tahap II yaitu Aplikasi BAL untuk mitigasi metan secara *in vitro*. Tahap pertama dilakakukan dengan mengisolasi BAL dari sekum domba menggunakan media MRS yang ditambah dengan cysteine HCL dan resarzurin serta dimasukan ke dalam botol serum untuk membuat suasana menjadi anaerob. Selanjutnya bakteri yang berhasil diisolasi

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

kemudian dilakukan seleksi untuk mendapatkan BAL unggul yang meliputi uji pH rendah, uji daya hambat terhadap bakteri pathogen, dan uji seleksi pertumbuhan BAL. Selanjutnya dilakukan identifikasi terhadap isolat terpilih yang meliputi pengecatan Gram, uji katalase, dan identifikasi secara molekuler terhadap BAL terpilih. Tahap ketiga dilakukan pengujian fermentasi secara *in vitro* dengan menggunakan metode theodorou, namun dilakukan perhitungan nilai μ_{max} dan Ks pada isolate terpilih untuk menentukan jumlah substrat optimal untuk perlakuan. Data yang diperoleh dari penelitian tahap 1 akan dianalisis secara deskriptif sedangkan data penelitian tahap 2 yaitu parameter fermentasi meliputi pH dan produksi gas metan, dianalisis menggunakan pola faktorial, kemudian bila ada perbedaan nyata karena perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan's New Multiple Range Tes.

Hasil penelitian tahap pertama yaitu isolasi dan seleksi BAL sekum domba diperoleh 1 isolat BAL unggul yaitu isolat BAL D-33. Isolat tersebut kemudian dilakukan Identifikasi dan diperoleh hasil bahwa isolat BAL D-33 teridentifikasi sebagai BAL strain *L. reuteri*. Selanjutnya dilakukan penelitian tahap 2 terhadap strain BAL D-33 yaitu dengan pengujian secara *in vitro*, namun terlebih dahulu dilakukan perhitungan nilai μ_{max} dan Ks BAL D-33 untuk mengetahui afinitas terhadap substrat glukosa dan diperoleh hasil yaitu nilai Ks 0,015 gram/ml dan μ_{max} 0.013/jam. Selanjutnya dilakukan fermentasi secara *in vitro* dengan perlakuan penambahan strain BAL D-33 dan mikroba rumen (50:50) dan tanpa penambahan isolat serta perbedaan konsentrasi glukosa yaitu 0Ks, 0,25Ks, 0,5Ks, 0,75Ks, dan 1Ks. Hasil yang diperoleh dari fermentasi rumen secara *in vitro* yaitu bahwa interaksi antara pemberian level glukosa yang berbeda dengan penambahan BAL tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap pH rumen. Sedangkan pemberian perlakuan level glukosa dan BAL-D33 berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap produksi metan di dalam rumen. BAL D-33 dapat menjadi kompetitor bakteri metanogenik dalam pemanfaatan hidrogen di dalam rumen.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan yaitu diperoleh strain baru BAL yaitu BAL D-33 yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus reuteri* dari hasil isolasi, seleksi dan identifikasi bakteri asam laktat dari sekum domba yang memiliki afinitas yang cukup baik yaitu memiliki nilai μ_{max} dan Ks yaitu 0,015 gram/ml dan 0.013/jam yang dapat secara menurunkan nilai metan pada ferementasi secara *in vitro.*

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

SUMMARY

Ruminants are livestock that can utilize fiber feed into economically valuable products through the enteric fermentation process in the rumen. However, enteric fermentation in ruminants contributes to global warming and is the second largest source of emissions, namely around 40% of total greenhouse gas emissions from the agricultural sector. Apart from that, the formation of methane gas is also a form of loss of feed energy in livestock. On the other hand, methane gas production has a homeostatic role in maintaining rumen conditions by converting NADH into NAD+in the process of glycolysis to produce ATP. So it is necessary to mitigate methane production in the rumen by utilizing hydrogen by lactic acid bacteria which can compete with methanogens obtained from the cecum of sheep. The cecum is a digestive tract that contains various kinds of microbes such as those in the rumen, as well as the same anaerobic environmental conditions as the rumen. It has also been researched that methane production in the cecum is 10 times lower compared to methane production in the rumen.

This research aims to obtain a new LAB strain from the cecum of sheep through the process of isolation, selection and identification of LAB from the cecum of sheep, and to determine the effect of this strain to mitigate methane production in the rumen. Several LAB genera include: *Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, Pediococcus, Tetragenococcus, Leuconostoc, Bifidobacterium and Lactococcus.* The LAB group is often also considered as beneficial microbes, can utilize hydrogen, and produce several antimicrobial compounds so that they can compete with other bacteria in the digestive tract.

Research was carried out at the Nutritional Biochemistry Laboratory, Department of Animal Nutrition and Forage, Faculty of Animal Husbandry, Gadjah Mada University. This research includes 2 stages, namely Stage I, namely Isolation, Selection and Identification of Lactic Acid Bacteria (LAB). and Phase II, namely BAL application for methane mitigationin vitro. The first stage was carried out by isolating BAL from the cecum of sheep using MRS media supplemented with cysteine HCL and resarzurin and placing it in a serum bottle to make the atmosphere anaerobic. Furthermore, the bacteria that have been isolated are then selected to obtain superior LAB which includes a low pH test, an inhibitory test against pathogenic bacteria, and a LAB growth selection test. Next, identification

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

of the selected isolates was carried out which included Gram staining, catalase testing, and molecular identification of the selected LAB. The third stage is carried out by fermentation testingin vitro using the Theodorou method, but calculating the μ valuemaxand Ks on selected isolates to determine the optimal amount of substrate for treatment. Data obtained from research stages 1 will be analyzed descriptively while the data stage 2, there are fermentation parameters including pH and methane gas production, were analyzed using a factorial pattern, then if there were significant differences due to treatment, it was continued with Duncan's New Multiple Range Test.

The results of the first stage of research, namely isolation and selection of BAL from the sheep's caecum, resulted in 1 superior LAB isolate, namely BAL isolate D-33. The isolate was then identified and the results obtained were that the BAL D-33 isolate was identified as the BAL strain L. *reuteri.* Next, stage 2 research was carried out on the BAL D-33 strain, namely by testing in vitro, but first calculate the μ value max and Ks BAL D-33 to determine the affinity for glucose substrates and the results obtained were Ks values of 0.015 gram/ml and μmax 0.013/hour. Next, fermentation is carried out in vitro with treatment with the addition of LAB strain D-33 and rumen microbes (50:50) and without the addition of isolates as well as different glucose concentrations, namely 0Ks, 0.25Ks, 0.5Ks, 0.75Ks, and 1Ks. Results obtained from rumen fermentation in vitro namely that the interaction between giving different levels of glucose and adding BAL was not significantly different ($P>0.05$) on rumen pH. Meanwhile, treatment with glucose levels and BAL-D33 had a significant effect ($P<0.05$) on methane production in the rumen. LAB D-33 can be a competitor of methanogenic bacteria in utilizing hydrogen in the rumen.

From this research, it can be concluded that a new strain of LAB was obtained, namely BAL D-33, which was identified as Lactobacillus reuteri from the results of isolation, selection and identification of lactic acid bacteria from the cecum of sheep which had a fairly good affinity, namely having a μ max and Ks value of 0.015 grams/ ml and 0.013/hour which can significantly reduce the value of methane in in vitro fermentation.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR PUSTAKA

Akhadiarto, S dan M. N. Rofiq. 2017. Estimasi Emisi Gas Metana Dari Fermentasi Enterik Ternak Ruminansia Menggunakan Metode Tier-1 Di Indonesia. Jurnal Teknologi Lingkungan. 18 (1): 1-8.

Anggita, D., D. A. Abdi dan V. Desiani. 2018. Efektifitas ekstrak daun dan getah tanaman jarak cina (Jatropha Multifida L.) sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri Staphylococcus aureus secara In vitro. Window of Health. 1(1): 29-33.

Astuti, W. D., Wiryawan, K. G., Wina, E., Widyastuti, Y., Suharti, S., dan Ridwan, R. 2018. Effects of selected Lactobacillus plantarum as probiotic on in vitro ruminal fermentation and microbial population. Pak. J. Nutr. 17, 131–139. doi: 10.3923/pjn.2018.131.139.

Bachruddin, Z. 2014. Teknologi Fermentasi pada Industri Peternakan. Gadjah Mada

University Press. Yogyakarta.Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Eckard RJ, et al. 2020. Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. Animal, 14, s2-s16.

Bell MJ, Wall E, Simm G, Russel G. Effects of genetic line and Bintsis, T. 2018. Lactic acid Bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics. AIMS Microbiol, 4: 665–684.

Bureenok, S., Suksombat, W., & Kawamoto, Y. (2011). Effects of the fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria (FJLB) and molasses on digestibility and rumen fermentation characteristics of ruzigrass (Brachiaria ruziziensis) silages. Livestock Science, 138(1-3), 266-271.

Chen, L., Shen, Y., Wang, C., Ding, L., Zhao, F., Wang, M., et al. (2019). Megasphaera elsdenii lactate degradation pattern shifts in rumen acidosis models. Front. Microbiol. 10:162. doi: 10.3389/fmicb.2019.00162

Chotiah, S. dan Rini D. 2018. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik untuk Mengatasi Salmonelosis pada Ayam Pedaging. Bul. Plasma Nutfah, 24(1), 89–96.

Claverie, J. M. dan C. Notredame. 2007. Bioinformatics for Dummies 2nd edition. Wiley Publishing, Inc. Indianapolis.

Cotter, D., Ross, P., and Hill, C. 2013. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? Nat. Rev. Microbiol. 11, 95–102. doi: 10.1038/nrmicro2937.

Doyle, N., Mbandlwa, P., Kelly, W. J., Attwood, G., Li, Y., Ross, R. P., and Leahy, S. (2019). Use of lactic acid bacteria to reduce methane production in ruminants, a critical review. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2207.

Eckard, R. J., Grainger, C., and De Klein, C. A. M. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. Livestock Sci. 130, 47–56.

Ellis, J. L., Bannink, A., Hindrichsen, I. K., Kinley, R. D., Pellikaan, W. F., Milora, N., & Dijkstra, J. (2016). The effect of lactic acid bacteria included as a

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production. Animal feed science and technology, 211, 61-74.

Forsythe, S. J. 2000. The Microbiology of Safe Food. Blackwell Science,Ltd. Berlin.

Francisco, A. E., Santos-Silva, J. M., V. Portugal, A. P., Alves, S. P., & B. Bessa, R. J. (2019). Relationship between rumen ciliate protozoa and biohydrogenation fatty acid profile in rumen and meat of lambs. PLOS ONE, 14(9) : 1 – 21.

Gamayanti, K. N., Pratiwiningrum, A., & Yusiati, L. M. (2012). Pengaruh penggunaan limbah cairan rumen dan lumpur gambut sebagai starter dalam proses fermentasi metanogenik. Buletin Peternakan, 36(1), 32-39.

Gottschalk, G. (1986). Bacterial Metabolism. New York, NY: Springer.

Greening, C., Geier, R., Wang, C., Woods, L. C., Morales, S. E., McDonald, M. J., Mackie, R. I. 2019. Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. The ISME Journal.

Guo, C., S. Zhang., Y. Yuan dan T. Yue. 2015. Comparison of lactobacilli isolated from Chinese suan-tsai and koumiss for their probiotic and functional properties. J. Funct Foods. 12(1): 294-302.

Hackmann, T. J., Ngugi, D. K., Firkins, J. L., and Tao, J. (2017). Genomes of rumen bacteria encode atypical pathways for fermenting hexoses to short-chain fatty acids. Environ. Microbiol. 19, 4670–4683. doi: 10.1111/1462-2920.13929

Hou, C., X. Zeng, F. Yang, H. Liu and S. Qiao. Study and use of the probiotic Lactobacillus reuteri in pigs: a review. Journal of Animal Science and Biotechnology. 6:14.

Hungate R.E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York, NY.

Huws, S.A., Creevey, C.J., Oyama, L.B., Mizrahi, I, Denman, S.E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S.M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S.J., Yáñez-Ruiz, D.R., Belanche, A., Guan, L., Gruninger, R.J., McAllister, T.A., Newbold, C.J., Roehe, R., Dewhurst, R.J., Snelling, T.J., Watson, M., Suen, G., Hart, E.H., Kingston-Smith, A.H., Scollan, N.D., do Prado, R.M., Pilau, E.J., Mantovani, H.C., Attwood, G.T., Edwards, J.E., McEwan, N.R., Morrisson, S., Mayorga, O.L., Elliott, C. and Morgavi, D.P. 2018. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. Frontiers in Microbiology, 9, 2161.

Janssen P.H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. Animal Feed Science and Technology 160: 1-22.

Jeyanathan, J., Martin, C., and Morgavi, D. P. 2016. Screening of bacterial direct-fed microbials for their antimethanogenic potential in vitro and

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

assessment of their effect on ruminal fermentation and microbial profiles in sheep. J. Anim. Sci. 94, 739–750.

Johnson K. A. and Johnson D.E.1995. Methane emissions from cattle. J Anim Sci. 73(8): 2483– 2492. Martinez G, Ab.

Kristjansdottir, T., E. F. Bosma, F. B. Santos, E. Özdemir, M. J. Herrgård, L. França, B. Ferreira, A. T. Nielsen, and S. Gudmundsson. 2019. A metabolic reconstruction of Lactobacillus reuteri JCM 1112 and analysis of its potential as a cell factory. . Microb Cell Fact. 18:186

Laily, I. N., R. Utami dan E. Widowati. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat penghasil riboflavin dari produk fermentasi sawi asin. Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan. 2(4): 179-184.

Kamra D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. Current Science 89: 124-135.

Khalid, K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International journal of Biosciences*, *1*(3), 1-13.

Martin, C., Morgavi, D. P., & Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. Animal, 4(3), 351-365.

Markiewicz, L. H., E. Wasilewska dan M. Bielecka. 2008. Identification of Lactobacillus strains present in fermented dairy products and their differentiation using molecular methods. Pol. J. Food Nutr. Scie. 58(2): 251-256.

McBirney, S.E., Trinh, K., Wong-Beringer, A., Armani, A.M. (2016). Wavelength-normalized spestroscopic analysis of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa growth rates. Biomedical Optics Express,7 (10), 4034-4042

Mc.Donald, P., Edwards, R.A., and Greenhalgh, J.F.D., 2011. Animal Nutrition, Fourth Edition, Longman London and New York.

Michelland RJ, Monteils V, Zened A, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Hamelin J, Fortun-Lamothe L. 2009. Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. J. Appl. Microbiol. 107:1642–1650.

Millen, D. D., M. D. B. Arrigoni dan R. D. L. Pacheco. 2016. Rumenology. Springer. Brazil.

Morgavi D.P., Martin C., Jouany J.P. dan Ranilla M.J. 2012. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. British Journal of Nutrition 107: 388-397

Mosoni P., Martin C., Forano E. dan Morgavi D.P. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. Journal of Animal Science 89: 783-791.

Murray, A. J., Lygate, C. A., Cole, M. A., Carr, C. A., Radda, G. K., Neubauer, S., & Clarke, K. (2006). Insulin resistance, abnormal energy metabolism and increased ischemic damage in the chronically infarcted rat heart. *Cardiovascular research*, *71*(1), 149-157.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Michelland RJ, Monteils V, Zened A, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Hamelin J, Fortun-Lamothe L. 2009. Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. J. Appl. Microbiol. 107:1642–1650.

Mosoni P., Martin C., Forano E. and Morgavi D.P. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. Journal of Animal Science 89: 783-791.

Offner A., D. Sauvant. 2006. Thermodynamic modeling of ruminal fermentations. Animal Research, EDP Sciences. 55 (5): 343-365.

Ojetti V., Petruzziello C., Migneco A., Gnarra M., Gasbarrini A., Franceschi F. Effect of *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) on methane production in patients affected by functional constipation. 2017. A retrospective study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 21:1702–1708.

Ørskov, E. R. 1998. Feed evaluation with emphasis on fibrous roughages and fluctuating supply of nutrients: a review. Small Rumin. Res. 28(1): 1-8.

Osborne, C. A., M. Galic., P. Sangwan dan P. H. Jansen. 2005. PCR generated artefact from 16s rRNA gene-spesific primers. FEMS Microbiol Lett. 248(2): 183-187.

Pan, X., F. Chen, T. Wu, H. Tang, and Z. Zhao. 2009. The acid, bile tolerance, and antimicribial property of Lactobacillus acidophilus NIT. J. Food Control. 20: 598-602.

Paradhipta, D.H.V., Z. Bachruddin, and L. M. Yusiati. 2014. Feed formulation based on by-products : kinetic study of food industry by-product on lactic acid fermentation. Proceeding of the 16th AAAP Animal Science Congress, 10-14 November 2014, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia. 11 : 304- 307.

Pereira G. V., Neto, E., Soccol, V. T., Medeiros, A. B. P., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. 2015. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, *75*, 348-356.Plavec,Tina Vida and Aleš Berlec. 2020. Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. Microorganisms. 8 (297),1-21

Popova, M.; Morgavi, D. P.; Martin, C. 2013. Methanogens and Methanogenesis in the Rumens and Ceca of Lambs Fed Two Different High-Grain-Content Diets. Applied and Environmental Microbiology, 79(6), 1777–1786. doi:10.1128/AEM.03115-12.

Pratama, I. B. G. P. 2013. Nutrisi dan Pakan Ternak Ruminansia. Udayana University Press. Bali.

Priadi, G., F. Setiyoningrum., F. Afiati., R. Irzaldi dan P. Lisdiyanti. 2020. J. Teknologi dan Industri Pangan. 31(1): 21-28.

Prayoga, I., P. A., Y. Ramon, I. B. M. Suaskara. 2021. Bakteri Asam Laktat Bermanfaat Dalam Kefir Dan Perannya Dalam Meningkatkan Kesehatan Saluran Pencernaan. SIMBIOSIS IX (2): 115-130.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Purbowati, A., Tambunan, R. D. & Basri. E., 2014. Kajian teknologi konservasi dau ubi kayu sebagai pakann untuk meningkatkan efisiensi usaha sapi potong. Bandar Lampung, BPTP Lampung.

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. Food Engineering Reviews, 4(2), 124-140.

Renuka, Puniya, M., Sharma, A., Malik, R., Upadhyay, R. C., and Puniya, A. K. (2013). Influence of pediocin and enterocin on in-vitro methane, gas production and digestibility. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci., 2, 132–142.

Russell J.B. dan Wallace R.J. 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In The rumen microbial ecosystem (Hobson PN & Stewart CS, eds), pp. 246–282. Blackie Academic & Professional, London, UK.

Ruwisch. R. C., H.J. Seitz, and R. Conrad. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. Arch Microbiol. 149:350-357

Restuati, M., E. S. Gultom. 2021. Uji Potensi Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Spons Asal Pulau Ngge (Sibolga) Sebagai Sumber Antibakteri. Jurnal Saintika. 12(2): 98 – 104.

Risna Y. K., S. Harimurti, Wihandoyo, dan Widodo. 2022. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh. JPI Vol. 24 (1): 1-7

Risna, Y. K. 2021. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh dan Potensinya sebagai Probiotik. Disertasi. Fakultas Peternakan UGM. Yogyakarta.

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogeny Trees. Mol. Biol. Evol. 4(4): 406-425. University of Chicago.

Simanjuntak, R., dan B. Naibaho. 2023. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Dengke Naniura. Jurnal Riset Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian (RETIPA). 4(1).

Sumual, A. M., Fatimawali dan T. E. Tallei. 2019. Uji antibakteri dari bakteri asam laktat hasil fermentasi selada romain (Lactuca sativa var. Iongifolia Lam.). Pharmacon. 8(2): 306-314.

Takahashi, J. 2013. Lactic acid bacteria and mitigation of GHG emission from ruminant livestock. Lactic Acid Bacteria R&D for Food, Health and Livestock Purposes. M. Kongo (ed), InTech, Croatia, 455-466.

Ungerfeld, E. M. 2020. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. *Frontiers in Microbiology*, 589.

Varnava, K. G., Ronimus, R. S., and Sarojini, V. (2017). A review on comparative mechanistic studies of antimicrobial peptides against archaea. Biotechnol. Bioeng. 114(11): 2457–2473.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Volk, W. A. and M. F. Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Edisi Kelima. Jilid 1. Penerbit Erlangga. Jakarta.

Wang Y. dan McAllister T.A. 2002. Rumen microbes, enzymes and feed digestion. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 15: 1659-1676.

Widodo., T. D. Wahyuningsih., A. Nurrochmad., E. Wahyuni., T. T. Taufiq., N. S. Anindita., S. Lestari., P. A. Harsita., A. S. Sukarno dan R. Handaka. 2017. Bakteri Asam Laktat Strain Lokal: Isolasi Sampai Aplikasi Sebagai Probiotik Dan Starter Fermentasi Susu. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Yanuartono, S. I., Nururrozi, A., Purnamaningsih, H., & Raharjo, S. 2018. Peran pakan pada kejadian kembung rumen Article Review: The role of feed on bloat. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan, 28(2), 141-157.

Zhou, Y.Y., Mao, H.L., Jiang, F., Wang, J.K., Liu, J.X., and Mcsweeney, C.S., 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 166-167, 93– 100.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

LAMPIRAN

Lampiran 1. Proses pengkayaan atau *enrichment* sumber isolate



Gambar 7. Hasil *enrichment* sumber isolat

Cara kerja:

Sampel digesta sekum domba diambil dari RPH Kentungan kemudian dibawa di Laboratorium Biokimia Nutrisi Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada dan dipreparasi serta dilakukan pengkayaan (*enrichment*) dengan cara ditumbuhkan pada media MRS yang telah ditambah dengan cysteine HCL dan resazurin. Media kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer. Media yang telah homogen selanjutnya dimasukan ke dalam botol anaerob selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan autoklaf. Setelah preparasi media selesai, kemudian media yang diperoleh ditambahkan sampel atau sumber isolat bakteri yaitu kolostrum sebanyak 10% dari volume media. Proses ini dilakukan dengan mengaliri gas CO_2 ke dalam botol supaya suasana tetap dalam keadaan anaerob. Botol yang telah berisi media dan sumber bakteri kemudian ditutup Kembali dengan tutup klem serta diinkubasi pada oven suhu 37°C selama 24-48 jam.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Lampiran 2. Protokol ekstraksi DNA dengan Quick-DNA Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research,D6005).

Penggunaan yang lebih optimal bisa ditambahkan cairan beta- mercaptoethanol.

1. Disiapkan 50 – 100 mg (berat basah) sel jamur atau bakteri sampel yang akan diekstaksi yang telah disuspensikan kembali sebanyak 200 µl aquades atau buffer isotonik (co: PBS) dan di masukkan ke dalam ZR BashingBeadTM Lysis tabung (0.1 mm & 0.5 mm). Tambahkan 750 µl BashingBeadTM Buffer ke tabung.
2. Tabung tersebut kemudian dimasukan pada alat bead beater yang dilengkapi dengan 2 ml tabung dan proses dengan kecepatan maksimum selama kurang lebih 5 menit.
3. Langkah selanjutnya adalah melakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 g selama 1 menit.
4. Supernatan yang diperoleh diambil sebanyak 400 µl dan dipindahkan pada tabung Zymo-SpinTM III-F Filter (tabung koleksi), dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8.000 g selama 1 menit.
5. FIltrat atau pelet yang diperoleh pada langkah no 4 kemudian ditambahkan 1200 µl lisis buffer (Genomic Lysis Buffer) dan dihomogenkan.
6. 800 µl campuran langkah no 5 kemudian disentrifugasi Kembali dengan kecepatan 10.000 g selama 1 menit.
7. Supernatan yang diperoleh kemudian dibuang dan langkah no 6 diulangi kembali.
8. Tambahkan sebanyak 200 µl DNA Pre-Wash Buffer ke dalam tabung Zymo-SpinTM IICR Column kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 1 menit dan dibuang supernatanya.
9. Sebanyak 500 µl g-DNA Wash Buffer ditambahkan dalam Zymo- SpinTM IICR Column kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 1 menit dan dibuang supernatanya.
10. Sampel dari Zymo-SpinTM IICR Column atau GD Column kemudian dipindahkan pada eppendorf steril berukuran 1,5 ml untuk menampung DNA. Pada tabung tersebut kemudian ditambahkan sebanyak 100 µ DNA Elution buffer pada tabung sampel. Kemudian didiamkan sejenak dan disentrifugasi

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

kembali dengan kecepatan 10.000 g selama 30 detik untuk melarutkan dan mendapatkan DNA.

11. DNA murni kemudian siap untuk digunakan selanjutnya.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN
DALAM RUMEN**
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Lampiran 3. Protokol pemurnian produk PCR dengan Zymo DNA Clean

1. Siapkan sampel dan DNA binding buffer dengan proporsi perbandingan adalah 2:1 (untuk plasmid), 5:1 (untuk PCR product, DNA fragmen) dan 7:1 (untuk ssDNA) dan masukan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml serta homogenkan larutan menggunakan vorteks.
2. Pindahkan larutan campuran pada GD Column (Zymo-SpinTM Column).
3. Sentrifugasi selama 30 menit (Kecepatan setiap proses sentrifugasi adalah diantara 10.000-16.000 g) dan buang supernatanya.
4. Tambahkan sebanyak 200 µl DNA Wash Buffer pada column dan sentrifugasi kembali selama 30 detik. Proses pencucian ini diulangi sekali lagi.
5. Tambahkan kurang lebih 25 µl DNA Elution buffer atau aquades steril pada sampel DNA dan inkubasi selama 1 menit pada temperature ruang. Sampel yang diperoleh kemudian dipindahkan dari GD column ke eppendorf steril 1,5 ml dan sentrifugasi kembali selama 30 detik untuk melarutkan dan mendapatkan DNA. DNA yang telah dipurifikasi siap untuk digunakan.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Lampiran 4. Hasil sekuensing sampel isolat bakteri BAL D-33

Jumlah sekuen : 1404

```
1       CATGCAAGTC GTACGCACTG GGCCCAACTG ATTGATGGTG CTTGCACCTG ATTGACGATG
61      GATCACCAGT GAGTGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTAGGT AACCTGCCCC GGAGCGGGGG
121     ATAACATTTG GAAACAGATG CTAATACCGC ATAACAACAA AAGCCACATG GCTTTTGTTT
181     GAAAGATGGC TTTGGCTATC ACTCTGGGAT GGACCTGCGG TGCATTAGCT AGTTGGTAAG
241     GTAACGGCTT ACCAAGGCGA TGATGCATAG CCGAGTTGAG AGACTGATCG GCCACAATGG
301     AACTGAGACA CGGTCCATAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAATCTTC CACAATGGGC
361     GCAAGCCTGA TGGAGCAACA CCGCGTGAGT GAAGAAGGGT TTCGGCTCGT AAAGCTCTGT
421     TGTTGGAGAA GAACGTGCGT GAGAGTAACT GTTCACGCAG TGACGGTATC CAACCAGAAA
481     GTCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTATCCGGA
541     TTTATTGGGC GTAAAGCGAG CGCAGGCGGT TGCTTAGGTC TGATGTGAAA GCCTTCGGCT
601     TAACCGAAGA AGTGCATCGG AAACCGGGCG ACTTGAGTGC AGAAGAGGAC AGTGGAACTC
661     CATGTGTAGC GGTGGAATGC GTAGATATAT GGAAGAACAC CAGTGGCGAA GGCGGCTGTC
721     TGGTCTGCAA CTGACGCTGA GGCTCGAAAG CATGGGTAGC GAACAGGATT AGATACCCTG
781     GTAGTCCATG CCGTAAACGA TGAGTGCTAG GTGTTGGAGG GTTTCCGCCC TTCAGTGCCG
841     GAGCTAACGC ATTAAGCACT CCGCCTGGGG AGTACGACCG CAAGGTTGAA ACTCAAAGGA
901     ATTGACGGGG GCCCGCACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGAAGCT ACGCGAAGAA
961     CCTTACCAGG TCTTGACATC TTGCGCTAAC CTTAGAGATA AGGCGTTCCC TTCGGGGACG
1021    CAATGACAGG TGGTGCATGG TCGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC
1081    GCAACGAGCG CAACCCTTGT TACTAGTTGC CAGCATTAAG TTGGGCACTC TAGTGAGACT
1141    GCCGGTGACA AACCGGAGGA AGGTGGGGAC GACGTCAGAT CATCATGCCC CTTATGACCT
1201    GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGACGGTAC AACGAGTCGC AAGCTCGCGA GAGTAAGCTA
1261    ATCTCTTAAA GCCGTTCTCA GTTCGGACTG TAGGCTGCAA CTCGCCTACA CGAAGTCGGA
1321    ATCGCTAGTA ATCGCGGATC AGCATGCCGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC
1381    CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TTTG
```

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Lampiran 5. Analisis statistik pengaruh level glukosa dan jenis mikroba terhadap pH (derajat keasaman)

Anova

Dependent Variable: pH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
glukosa	.081	4	.020	.896	.485
mikroba	1.915	1	1.915	85.247	<,001
glukosa * mikroba	.109	4	.027	1.210	.338
Error	.449	20	.022		
Total	1553.149	30			
Corrected Total	2.554	29			

a. R Squared = .824 (Adjusted R Squared = .745)

ph

Duncan[a]

glukosaxmikroba	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
g4m2	3	6.8933	
g5m2	3	6.9133	
g3m2	3	6.9267	
g1m2	3	6.9533	
g2m2	3	6.9967	
g5m1	3		7.2733
g2m1	3		7.3600
g3m1	3		7.5100
g1m1	3		7.5233
g4m1	3		7.5433
Sig.		.457	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Lampiran 6. Analisis statistik pengaruh level glukosa dan jenis mikroba terhadap metan

Anova

Dependent Variable: Metan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LevelGlukosa	1.091	4	.273	31.696	<,001
JenisMikroba	10.623	1	10.623	1234.064	<,001
LevelGlukosa * JenisMikroba	2.744	4	.686	79.687	<,001
Error	.172	20	.009		
Total	39.755	30			
Corrected Total	14.630	29			

a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .983)

UNIVERSITAS GADJAH MADA
ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEKUM DOMBA UNTUK MITIGASI PRODUKSI METAN DALAM RUMEN
FATMA AINI LUBERINA, Prof. Ir. Zaenal Bachrudin, M.Sc., Ph.D., IPU., ASEAN Eng.; Dr. Ir. Chusnul Hanim, M.Si., I
Universitas Gadjah Mada, 2024 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

metan

Duncan[a]

glukosaxmikroba	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
g5m2	3	.0371								
g4m2	3	.1636	.1636							
g3m2	3		.3181	.3181						
g2m2	3			.4051						
g1m2	3				.6766					
g1m1	3					.9455				
g2m1	3						1.1166			
g5m1	3							1.4534		
g4m1	3								1.8642	
g3m1	3									2.1713
Sig.		.110	.055	.265	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.