

Kemampuan Isolat Bakteri Pencerna Serat Asal Rumen Kerbau pada Berbagai Sumber Hijauan Pakan

I. PRIHANTORO¹, T. TOHARMAT¹, D. EVVYERNIE¹, SURYANI² dan L. ABDULLAH¹

¹Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga. Bogor, 16680
e-mail: iprihantoro@yahoo.com

²Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga. Bogor, 16680.

(Diterima 13 Juni 2012; disetujui 7 Agustus 2012)

ABSTRACT

PRIHANTORO I., T. TOHARMAT, D. EVVYERNIE, SURYANI dan L. ABDULLAH 2012. the ability of fiber rumen bacterial isolates from local buffalo on various sources of forage substrates. *JITV* 17(3): 189-200.

Local buffalo rumen fluid is a source of fiber-digesting bacteria. That bacteria were adapted well with low quality forage of agricultural byproduct. The aim of these study were: (1) to isolate the fiber digesting bacteria from buffalo rumen, (2) to investigate the characteristics and adaptability of bacteria isolated from buffalo rumen fluid, (3) and to determine the diversity of the bacteria. This research used three rumen fluid buffalo slaughtered at slaughterhouse (RPH) Faculty of Animal Husbandry, Bogor Agricultural University and fiber-digesting bacteria were isolated using McDougall buffer supplemented with fiber feed. The experimental design for characteristic and adaptability of bacteria was Completely Randomized Factorial Design with two factors: the type of bacteria and types of feed source of fiber. Diversity of the bacteria were analyzed using NTSys 2.10 program. The results showed that nine bacteria have a high adaptability to fiber feed based on CMC_{case}. The highest CMC_{case} activity bacteria on *Pennisetum purpureum* are A9 (11.36 ± 1.70 unit/ml/h), A3 (11.22 ± 0.60 unit/ml/h) and A42 (10.62 ± 1.96 unit/ml/h). CMC_{case} activity of fiber digesting bacteria from buffalo rumen did not have correlation with the number of bacteria. Based on genetic similarity, nine isolates grouped into five types which have similarity $\geq 46\%$.

Key Words: Buffalo Rumen Fluid, Fiber-Digesting Bacteria, Low Quality Forage

ABSTRAK

PRIHANTORO I., T. TOHARMAT, D. EVVYERNIE, SURYANI dan L. ABDULLAH 2012. Kemampuan Isolat Bakteri Pencerna Serat Asal Rumen Kerbau pada Berbagai Sumber Hijauan Pakan. *JITV* 17(3): 189-200.

Cairan rumen kerbau lokal berpotensi sebagai sumber bakteri pencerna serat yang telah beradaptasi dengan baik terhadap produk sisa pertanian yang umumnya berkualitas rendah. Penelitian ini bertujuan untuk: (1) Mengisolasi bakteri pencerna serat asal rumen kerbau, (2) Mempelajari karakteristik isolat bakteri asal rumen kerbau terhadap substrat berupa hijauan pakan konvensional dan limbah pertanian/perkebunan sebagai alternatif hijauan, serta (3) Mengidentifikasi kekerabatan genetik isolat tersebut dengan menggunakan *Repetitive* PCR. Tiga sampel cairan rumen kerbau diambil di rumah potong hewan (RPH) Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bakteri pencerna serat diisolasi menggunakan media *McDougall* yang ditambah hijauan pakan sumber serat. Percobaan karakteristik dan adaptabilitas bakteri menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan dua faktor yaitu jenis bakteri dan jenis pakan sumber serat. Kekerabatan genetik dari isolat potensial dianalisis menggunakan program NTSys 2,10. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diperoleh sembilan isolat bakteri pencerna serat dengan aktivitas CMC_{case} tinggi. Aktivitas CMC_{case} terbaik dari isolat bakteri pencerna serat pada substrat rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) adalah isolat A9 ($11,36 \pm 1,70$ unit/ml/jam), A3 ($11,22 \pm 0,60$ unit/ml/jam) dan A42 ($10,62 \pm 1,96$ unit/ml/jam). Aktivitas enzim CMC_{case} dari isolat bakteri pencerna serat asal rumen kerbau tidak berkorelasi dengan jumlah bakteri yang tumbuh. Nilai kekerabatan genetik dari sembilan isolat bakteri pencerna serat yang diperoleh dikelompokkan dalam lima jenis isolat bakteri yang dengan tingkat similaritas $\geq 46\%$.

Kata Kunci: Cairan Rumen Kerbau, Bakteri Pencerna Serat, Pakan Berkualitas Rendah

PENDAHULUAN

Komponen serat asal hijauan pakan sangat bermanfaat bagi ternak ruminansia. Hal ini terkait kemampuan ternak dalam mencerna komponen serat asal hijauan pakan sebagai sumber energi utamanya.

Permasalahan yang timbul adalah komponen serat sangat kompleks dengan ikatan yang kuat dan sulit dicerna sehingga pencernaan komponen serat pakan lambat dan tidak sempurna (YANG *et al.*, 2002). Kelompok bakteri pencerna serat berinteraksi secara sinergis antar mikroorganisme di dalam rumen

(MORGAVI *et al.*, 2000), termasuk dengan bakteri lain yang non selulolitik (OSBORNE dan DEHORITY, 1989), khususnya dalam kondisi anaerob (AKIN dan BENNER, 1988).

Kerbau umumnya cukup dipelihara dengan pakan berkualitas rendah karena bakteri rumen kerbau telah beradaptasi dengan baik terhadap pakan hijauan dan sisa pertanian yang umumnya berkualitas rendah dengan kandungan lignoselulosa tinggi (PANDYA *et al.*, 2010; NRC, 1981). Pada kondisi yang sama, kerbau mampu mencerna jerami lebih baik dibandingkan dengan sapi (COCKRILL, 1974) dengan nilai pencernaan 2-3% lebih tinggi dibandingkan dengan sapi (WANAPAT, 1989). Hal tersebut terkait dengan tingginya jumlah total bakteri dan persentase bakteri selulolitik dari rumen kerbau dibanding sapi (PRADHAN, 1994) dan tingginya aktivitas bakteri di dalam rumen kerbau yang ditunjukkan dengan laju produksi *volatile fatty acids* (VFA) yang lebih cepat dan lebih tinggi dibandingkan dengan sapi (NRC, 1981).

SURYAHADI *et al.* (1996) melaporkan beberapa bakteri selulolitik yang dapat diisolasi dan diidentifikasi dari cairan rumen kerbau diantaranya adalah *Ruminococcus flavefacien*, *R. albus* dan *Bacteroides rumenicola* yang memiliki aktivitas selulolitik sebesar 43,2%/hari. Bakteri selulolitik yang hidup dengan baik pada rumen kerbau dewasa diantaranya adalah *R. albus*, *B. succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *C. lochheadii*, *C. longisporum* (SINHA dan RANCANATHAN, 1983), kelompok *Fibrobacter succinogenes* (CHENG *et al.*, 1989) dan *B. fibrisolvens* yang perannya lebih dominan dalam proses degradasi hemiselulosa (AKIN, 1989). Jumlah komunitas bakteri tersebut dalam rumen bervariasi sesuai jenis pakan yang dikonsumsi (VAN GYLSWYK, 1970).

Kemajuan biologi molekuler telah menghasilkan metode-metode yang potensial untuk mempelajari keragaman spesies bakteri melalui pendekatan genetik. *Repetitive PCR* (Rep-PCR) merupakan metode *amplifikasi* dengan menggunakan primer tunggal yang mengandalkan urutan nukleotida berulang pada genom bakteri (SCHNEEGURT dan KULPA., 1998). Setiap mikroorganisme memiliki sekuen yang berulang (*repetitive sequence*) dengan jumlah dan jarak yang bervariasi (DE BRUIJN *et al.*, 1996) dan teknik biologi molekuler dapat memonitor, menemukan dan mengidentifikasi bakteri dengan cepat dan akurat (WIDADA *et al.*, 2002).

Kemampuan bakteri pencerna serat (bakteri selulolitik) mendominasi populasi bakteri dalam rumen dan potensial sebagai pengganti rumen segar dalam kajian *in vitro* (PRIHANTORO *et al.*, 2012). Kemampuan dan potensi isolat bakteri rumen kerbau terhadap hijauan pakan sebagai sumber serat bagi ruminansia perlu dikaji lebih mendalam. Penelitian ini bertujuan

untuk mengisolasi dan mempelajari karakteristik isolate bakteri asal rumen kerbau terhadap substrat hijauan pakan konvensional dan limbah pertanian/perkebunan sebagai alternatif hijauan, serta mengidentifikasi kekerabatan genetik isolat tersebut dengan menggunakan *Repetitive PCR*.

MATERI DAN METODE

Preparasi cairan rumen kerbau

Cairan rumen diambil dari tiga ekor kerbau lokal tipe rawa berasal dari kawasan Jonggol, Bogor, Jawa Barat yang disembelih di rumah potong hewan (RPH) Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Cairan rumen dimasukkan ke dalam tabung steril untuk dicampur dengan gliserol pada konsentrasi akhir 3% dan disimpan dalam *freezer* pada suhu -21°C untuk digunakan sebagai sumber isolat bakteri pencerna serat.

Isolasi bakteri pencerna serat

Penentuan kemampuan bakteri pencerna serat asal rumen kerbau terhadap substrat pakan sumber serat dilakukan melalui dua tahapan. Tahap pertama adalah penentuan daya tumbuh bakteri dari tiga cairan rumen kerbau asal Jonggol, Jawa Barat pada enam jenis pakan sumber serat menggunakan 5 ml media yang terdiri dari *Brain Heart infusion* (BHI) 3,7%, sistein-HCl 0,05%, pati 0,05%, glukosa 0,05%, cellobiosa 0,05%, hemin 0,05%, resazurin 0,05%, dan 0,05 g substrat pakan sumber serat dalam bentuk tunggal (jerami jagung, jerami padi, rumput gajah, rumput lapang, serat sawit dan alang-alang). Media dialiri gas CO₂ hingga jenuh dan disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah media dingin disuntikkan 0,1 ml cairan rumen dari stok gliserol dan diinkubasi pada suhu 39°C selama 60 jam. Jumlah bakteri dihitung dengan seri pengenceran hingga 10⁻⁸ menggunakan larutan McDougall steril pada media agar yang terdiri dari *Brain Heart infusion* (BHI) 3,7%, sistein-HCl 0,05%, pati 0,05%, glukosa 0,05%, cellobiosa 0,05%, hemin 0,05%, resazurin 0,05%, dan bakto agar 10%. Tahap kedua dilakukan isolasi bakteri berdasarkan jenis serat hijauan pakan yang dipergunakan. Secara acak diambil 21 cuplikan koloni tunggal bakteri yang tumbuh dari kultur (rumput gajah, rumput lapang dan jerami jagung) menggunakan oase pada media A yang terdiri 5 ml McDougall, 0,05% resazurin dan 0,05 g campuran rumput gajah, rumput lapang dan jerami jagung. Metode yang sama dilakukan pada kultur (jerami padi, alang-alang dan serat sawit) pada media B yang terdiri dari 5 ml McDougall, 0,05% resazurin dan 0,05 g campuran jerami padi, alang-alang dan serat sawit.

Kultur tunggal bakteri diinkubasi pada suhu 39°C selama 60 jam dan diukur kerapatannya menggunakan spektrofotometer LW UV-200-RS pada OD 600λ. Nilai absorbansi dari setiap bakteri ditabulasi berdasarkan korelasi regresi standar dari beberapa sampel bakteri tersebut berdasarkan pendekatan metode turbidimetri menurut DALGAARD *et al.* (1994).

Penetapan aktivitas Carboxy Methyl Cellulose (CMCase)

Isolat bakteri dengan kemampuan tumbuh terbaik dari setiap media A dan B diukur kemampuannya dalam mendegradasi pakan hijauan sumber serat. Isolat yang diisolasi dari media A (sumber serat rumput gajah, rumput lapang dan jerami jagung) diberi kode A dan isolat dari media B (sumber serat jerami padi, alang-alang dan serat sawit) diberi kode B. Setiap isolat yang berkode A diuji kemampuan CMCase-nya pada substrat rumput gajah, rumput lapang dan jerami jagung dalam bentuk tunggal dengan komposisi 5 ml McDougall, 0,05% resazurin dan 0,05 g substrat sumber serat berdasarkan pendekatan GHOSE (1987). Kajian serupa dilakukan pada isolat berkode B pada substrat jerami padi, alang-alang dan serat sawit.

Karakterisasi isolat bakteri pencerna serat

Bakteri pencerna serat asal rumen kerbau diharapkan memiliki potensi sebagai sumber inokulan pada ternak ruminansia periode *pre-ruminant* yang cenderung diperkenalkan pakan sumber serat dalam berupa rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) pada periode prasapih. Isolat bakteri pencerna serat A dan B dengan aktivitas CMCase tertinggi ditetapkan sebagai isolat potensial. Karakteristik isolat potensial bakteri pencerna serat asal rumen kerbau diuji kemampuannya pada media yang terdiri dari 5 ml McDougall, 0,05% resazurin dan 0,05 g rumput gajah untuk diukur kemampuan tumbuh dan aktivitas CMCase-nya.

Analisis kekerabatan isolat potensial bakteri pencerna serat

Isolat potensial bakteri pencerna serat asal rumen kerbau dengan aktivitas CMCase tinggi dianalisis tingkat kekerabatan genetiknya menggunakan *Repetitive Polymerase Chain Reaction* (repPCR) dengan primer BOXA1R (5-TCGCTCAAACAACGAC ACC-3) dengan tahapan siklus PCR : denaturasi awal 94°C selama 5 min; siklus inti sebanyak 35 kali pada suhu 93°C selama 1 menit, 37°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit; selanjutnya 72°C selama 8 menit. Selanjutnya hasil amplifikasi divisualisasi menggunakan agarose 2% dan diukur

kekerabatannya menggunakan program NTSys 2.10 menurut ROHLF (2000).

Rancangan percobaan

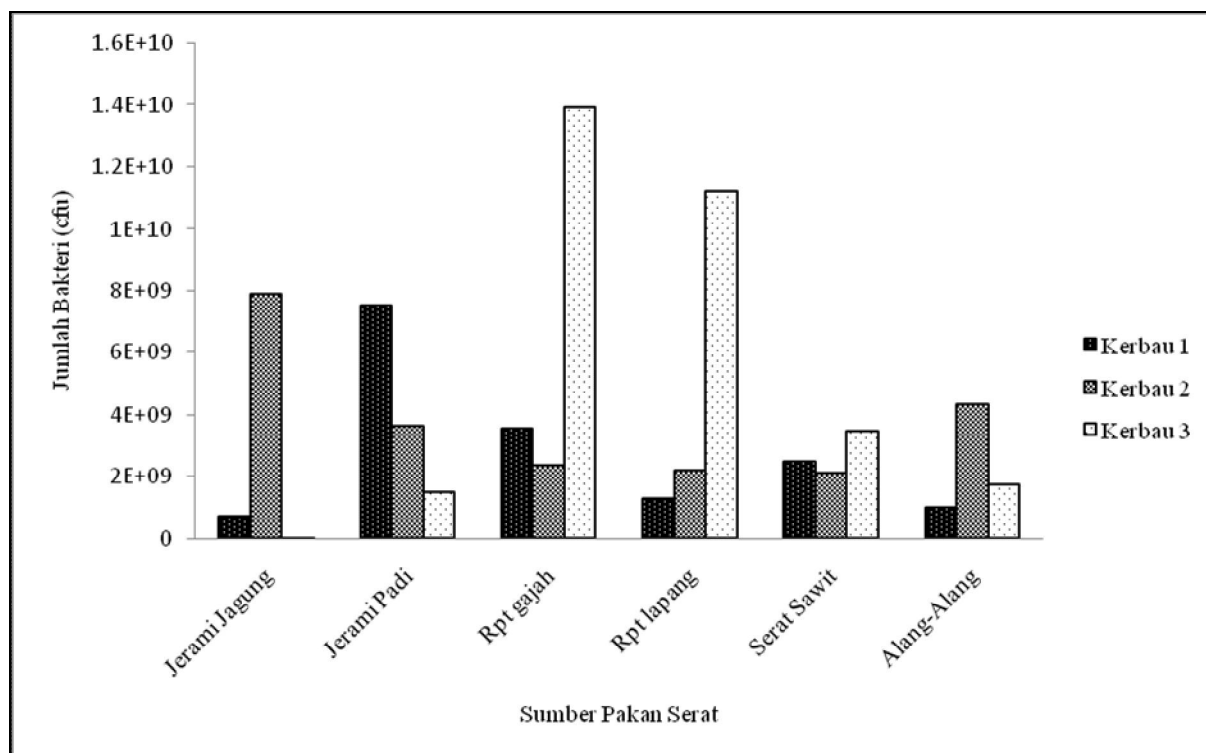
Penetapan aktivitas CMCase dan jumlah isolat bakteri pencerna serat pada berbagai hijauan sumber serat pakan terdiri dari 12 isolat A (A9, A62, A3, A67, A42, A7, A12, A4, A5, A36, A39 dan A63) pada 3 macam hijauan sumber serat (rumput Gajah, rumput lapang dan jerami jagung) dijadikan sebagai faktor dalam perlakuan dan dilaksanakan dalam empat ulangan. Hal serupa untuk 12 isolat B (B24, B61, B41, B6, B63, B66, B39, B52, B16, B10, B38 dan B54) pada 3 macam hijauan sumber serat (sawit, jerami padi dan alang alang) sebagai faktor dengan empat ulangan percobaan. Percobaan dirancang dalam rancangan acak lengkap berfaktor 12 x 3 (MATTJIK dan SUMERTAJAYA, 2002). Karakteristik 9 isolat bakteri pencerna serat potensial (A9, A3, A42, A62, A67, B24, B41, B61 dan B6) terhadap rumput gajah dilaksanakan pada tiga ulangan dan regresi antara jumlah bakteri potensial terhadap aktivitas CMCase pada substrat rumput Gajah dirancang menggunakan pola rancangan acak lengkap menurut MATTJIK dan SUMERTAJAYA (2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri pencerna serat asal cairan rumen kerbau pada berbagai jenis hijauan pakan sumber serat

Kemampuan tumbuh dari bakteri asal rumen kerbau pada substrat pakan merupakan gambaran kemampuan mezofir rumen dalam memanfaatkan nutrisi pakan sumber serat. Kemampuan tumbuh bakteri dari tiga cairan rumen kerbau pada berbagai substrat sumber serat tersaji pada Gambar 1.

Konsorsium bakteri dari cairan rumen kerbau mampu tumbuh dengan baik dalam memanfaatkan sumber pakan berstruktur karbohidrat kompleks. Hasil sidik ragam tidak terdapat perbedaan jumlah populasi bakteri terhadap substrat hijauan pakan yang diberikan, jumlah bakteri dari tiga cairan rumen kerbau mampu tumbuh dengan baik pada substrat hijauan pakan sumber serat (Gambar 1). Menurut WANAPAT (2001) kerbau tropis dapat tumbuh baik dengan pakan berkualitas rendah, seperti limbah pertanian dan industri yang kaya lignoselulosa sebagai sumber energi utamanya. Hasil kajian ini menunjukkan bahwa cairan rumen dari ketiga kerbau mengandung bakteri selulolitik dan dalam kondisi yang baik dan ideal sebagai sumber bakteri pencerna serat yang unggul dalam memanfaatkan sumber pakan serat. Tingginya kemampuan isolat bakteri asal rumen dalam



Gambar 1. Jumlah bakteri rumen kerbau dalam media substrat hijauan pakan sumber serat

mendegradasi bahan pakan sumber serat dimungkinkan karena ternak-ternak ruminansia dikawasan tropis cenderung mengkonsumsi pakan dalam bentuk limbah pertanian yang memiliki kandungan lignoselulosa tinggi (PANDYA *et al.*, 2010). Serat merupakan penyusun utama dinding sel tumbuhan yang terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Limbah pertanian, seperti jerami padi, jerami jagung dan serat sawit, serta alang-alang dan rumput lapang memiliki kandungan serat kasar yang tinggi dan protein yang rendah (ARITONANG, 1986). Serat merupakan fraksi karbohidrat yang tidak larut dalam keadaan basa ataupun asam (SOFYAN dan SRIHARINI, 1986) dengan struktur kompleks dan ikatan yang kuat serta sulit dicerna, sehingga pencernaan komponen serat tersebut lambat dan tidak sempurna (YANG *et al.*, 2002). Kelompok enzim ekstraseluler asal bakteri pencerna serat dapat memanfaatkannya dengan cara memecah ikatan metoksil dari struktur lignoselulosa dan meningkatkan kelompok hidroksil dan karboksil fenolat (WAHYUDI *et al.*, 2010).

Kemampuan tumbuh dari isolat bakteri asal cairan rumen kerbau dalam memanfaatkan pakan sumber serat merupakan indikasi utama dari isolat tersebut sebagai isolat bakteri pencerna serat. Hasil penapisan dari tiga cairan rumen kerbau menggunakan media A (substrat rumput lapang, rumput gajah dan jerami jagung) diperoleh 54 isolat dengan kisaran absorbansi 0,901-

0,250 dan menggunakan media B (substansi jerami padi, alang-alang dan rumput gajah) diperoleh isolat dengan jumlah yang lebih sedikit, yaitu 44 isolat dengan kisaran absorbansi 0,896-0,317 dari 63 cuplikan yang dilakukan. Hal ini menunjukkan bahwa setiap isolat memiliki kemampuan tumbuh dan tingkat adaptasi yang berbeda terhadap substrat serat yang dipergunakan dan isolat bakteri dari cairan rumen kerbau lebih mudah hidup pada substrat pakan dengan karbohidrat kompleks yang lebih sederhana. PRADHAN (1994) menyebutkan bahwa jumlah total bakteri rumen kerbau lebih tinggi dibandingkan dengan sapi ($18,45 \times 10^8$ CFU/ml vs $11,62 \times 10^8$ CFU/ml) dengan jenis bakteri selulolitik 2-3 kali lipat lebih besar dibandingkan dengan sapi ($6,86 \times 10^8$ CFU/ml vs $2,58 \times 10^8$ CFU/ml). Selain itu diduga jumlah dan jenis bakteri didalam media B lebih sedikit dibandingkan dengan media A. Hal ini diperkuat hasil rataan jumlah total bakteri pada Gambar 1, jumlah bakteri dari jerami padi ($4,23 \times 10^9 \pm 3,07 \times 10^9$ CFU/ml); alang-alang ($2,37 \times 10^9 \pm 1,75 \times 10^9$ CFU/ml); serat sawit ($2,70 \times 10^9 \pm 0,72 \times 10^9$ CFU/ml) lebih rendah dibandingkan dengan jumlah bakteri yang tumbuh di substrat rumput lapang ($4,90 \times 10^9 \pm 5,47 \times 10^9$ CFU/ml) dan rumput gajah ($6,62 \times 10^9 \pm 6,38 \times 10^9$ CFU/ml) meskipun hasil sidik ragam tidak berbeda nyata yang disebabkan oleh tingginya variasi bakteri antar rumen akibat pola manajemen pakan yang berbeda. Jumlah total bakteri yang tumbuh lebih tinggi

dari THALIB *et al.* (2000) terhadap bakteri selulolitik asal rumen sapi, kerbau, domba, kambing dan rusa yang diadaptasi pada substrat holoselulosa, selulosa dan hemiselulosa pada kisaran 10^7 koloni/ml. Sebanyak 24 isolat atau masing-masing 12 isolat terbaik dari kultur A dan B ditetapkan sebagai isolat terpilih. Nilai *optical density* dari isolat terpilih berdasarkan substrat hijauan pakan sumber serat disajikan dalam Tabel 1.

Aktivitas CMCase beberapa isolat bakteri pencerna serat asal rumen kerbau pada berbagai hijauan pakan sumber serat

Bakteri asal rumen kerbau diyakini mampu mendegradasi dan memanfaatkan pakan berkualitas rendah lebih efisien dibandingkan dengan asal rumen sapi. Salah satu kemungkinannya adalah di dalam rumen kerbau terdapat bakteri pencerna serat yang lebih dominan dibandingkan dengan sapi, sehingga daya cerna pakan pada kerbau lebih baik dibandingkan dengan sapi. PRADHAN (1994) menyatakan bahwa persentase bakteri selulolitik dari rumen kerbau lebih tinggi dibandingkan dengan sapi (37,2% vs 22,2%). Kerbau merupakan ternak ruminansia yang mampu mencerna serat kasar secara efisien, karena waktu retensi pakan di rumen lebih lama (BHATTACHARYA dan MULLICK, 1965) dengan laju aktivitas selulolitik dari ternak kerbau (43,2%/hari) lebih tinggi

dibandingkan dengan sapi (6,3%/hari) (SURYAHADI *et al.*, 1996).

Suplementasi bakteri pencerna serat asal rumen kerbau pada ruminansia muda diharapkan mampu mempercepat adaptasi pedet terhadap pakan berserat tinggi serta meningkatkan nilai guna pakan serat untuk dapat dimanfaatkan lebih optimal. Beberapa karakteristik mendasar dari bakteri pencerna serat adalah kemampuannya yang cukup baik dalam memanfaatkan sumber pakan serat yang dapat diindikasikan dari jumlah populasi bakteri dan aktivitas CMCase-nya. Karakteristik CMCase dari 24 isolat bakteri pencerna serat terpilih dari isolat A dan B tersaji pada Tabel 2 dan jumlah populasi bakteri pada Tabel 3.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri pencerna serat asal rumen kerbau mampu tumbuh dengan baik pada substrat media sumber serat dengan nilai aktivitas CMCase yang bervariasi. Hal ini menunjukkan bahwa setiap individu bakteri memiliki potensi yang berbeda-beda dalam mencerna serat. Hasil sidik ragam aktivitas CMCase berdasarkan jenis substrat menunjukkan bahwa rumput gajah ($11,54 \pm 4,08$ unit/ml/jam) dan rumput lapang ($10,31 \pm 2,79$ unit/ml/jam) nyata ($p < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan jerami jagung ($9,86 \pm 4,65$ unit/ml/jam). Hal ini diduga dari struktur selulose rumput gajah dan rumput lapang yang lebih sederhana dan lebih mudah didegradasi dibandingkan dengan jerami jagung.

Tabel 1. Nilai *optical density* (od) dari isolat terpilih berdasarkan substrat hijauan pakan sumber serat

Isolat	Substrat campuran (RL+RG+JJ)		Isolat	Substrat campuran (JP+AA+SS)	
	OD 600 λ *	Jumlah bakteri (10^8)**		OD 600 λ	Jumlah bakteri (10^8)**
A67	0,901	1,24	B38	0,896	1,23
A62	0,882	1,20	B39	0,885	1,21
A4	0,876	1,19	B6	0,879	1,19
A9	0,854	1,16	B66	0,86	1,17
A5	0,848	1,15	B61	0,854	1,16
A42	0,848	1,15	B52	0,847	1,15
A36	0,837	1,13	B41	0,838	1,13
A12	0,829	1,12	B16	0,827	1,11
A7	0,823	1,11	B24	0,814	1,09
A63	0,813	1,09	B10	0,743	0,97
A3	0,785	1,04	B54	0,735	0,96
A39	0,783	1,04	B63	0,715	0,92

* = OD 600 λ = pembacaan dengan spektrofotometer pada pengenceran 5 kali

** = Jumlah Bakteri = ditentukan dengan metode turbidimetri menurut DALGAARD *et al.* (1994)

RL = Rumput lapang, RG = Rumput gajah, JJ = Jerami jagung, JP = Jerami padi, AA= Alang-alang dan SS= Serat sawit

Tabel 2. Aktivitas CMCase isolat bakteri terpilih A dan B pada berbagai hijauan pakan sumber serat

Isolat	Rumput gajah	Rumput lapang	Jerami jagung	Rataan	Isolat	Sawit	Jerami padi	Alang-alang	Rataan
		Aktivitas CMCase (unit/ml/jam)				Aktivitas CMCase (unit/ml/jam)			
A9	16,17 ± 4,05	11,83 ± 3,84	15,59 ± 11,69	14,53 ^a ± 7,06	B24	9,55 ± 1,99	15,79 ± 15,00	7,79 ± 3,71	11,05 ^a ± 8,89
A62	16,81 ± 8,60	11,43 ± 2,79	13,01 ± 3,87	13,75 ^a ± 5,65	B61	9,28 ± 2,26	11,21 ± 4,04	7,96 ± 2,48	9,48 ^{ab} ± 3,08
A3	13,52 ± 2,35	10,62 ± 3,55	12,31 ± 4,05	12,15 ^{ab} ± 3,31	B41	9,48 ± 3,36	9,67 ± 3,40	7,77 ± 2,85	8,98 ^{ab} ± 3,04
A67	11,92 ± 4,02	12,67 ± 1,73	11,87 ± 3,66	12,15 ^{ab} ± 3,00	B6	9,16 ± 2,34	10,00 ± 3,51	7,53 ± 1,65	8,89 ^{ab} ± 2,60
A42	12,00 ± 4,44	11,84 ± 3,17	10,61 ± 3,41	11,48 ^{abc} ± 3,42	B63	9,01 ± 1,75	7,67 ± 0,97	7,84 ± 2,80	8,17 ^{ab} ± 1,90
A7	10,75 ± 1,44	10,63 ± 3,36	9,62 ± 0,39	10,33 ^{bc} ± 1,99	B66	8,65 ± 1,87	8,15 ± 1,49	7,65 ± 1,36	8,15 ^{ab} ± 1,50
A12	9,99 ± 2,23	10,09 ± 2,52	8,70 ± 2,00	9,59 ^{bcd} ± 2,15	B39	9,01 ± 2,66	6,90 ± 1,02	7,82 ± 1,83	7,91 ^b ± 1,99
A4	10,06 ± 1,89	10,05 ± 2,63	7,56 ± 1,23	9,22 ^{bcd} ± 2,19	B52	8,90 ± 2,25	7,87 ± 0,92	6,80 ± 0,88	7,86 ^b ± 1,62
A5	9,46 ± 1,10	9,38 ± 2,63	8,52 ± 1,77	9,12 ^{bcd} ± 1,81	B16	7,12 ± 1,18	7,72 ± 3,36	6,44 ± 0,69	7,09 ^b ± 1,97
A36	10,05 ± 1,33	9,71 ± 1,50	7,37 ± 2,05	9,05 ^{bcd} ± 1,95	B10	7,93 ± 0,73	6,64 ± 0,88	6,44 ± 0,65	7,00 ^b ± 0,97
A39	9,35 ± 2,89	8,27 ± 1,22	8,30 ± 2,14	8,64 ^{cd} ± 2,05	B38	6,74 ± 1,79	7,51 ± 1,95	6,67 ± 1,97	6,97 ^b ± 1,77
A63	8,36 ± 1,06	7,16 ± 1,75	4,83 ± 0,74	6,78 ^d ± 1,91	B54	6,70 ± 0,62	8,11 ± 1,41	6,09 ± 0,79	6,97 ^b ± 1,27
Rataan	11,54^a ± 4,08	10,31^{ab} ± 2,79	9,86^b ± 4,65		Rataan	8,46^{ab} ± 2,06	8,94^a ± 4,94	7,23^b ± 1,91	

Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda (p < 0,05)

Tabel 3. Kemampuan tumbuh isolat bakteri terpilih A dan B pada berbagai hijauan pakan sumber serat

Isolat	Rumput Gajah	Rumput lapang	Jerami jagung	Rataan	Isolat	Sawit	Jerami Padi	Alang-alang	Rataan
	Jumlah bakteri 10 ⁸ CFU/ml*					Jumlah Bakteri 10 ⁸ CFU/ml*			
A9	1,15 ± 0,85	1,41 ± 0,68	2,12 ± 0,71	1,27 ^{bc} ± 0,69	B24	1,40 ± 0,46	1,66 ± 0,41	2,01 ± 0,84	1,69 ± 0,60
A62	0,92 ± 1,20	1,05 ± 0,12	2,12 ± 0,90	1,05 ^c ± 1,00	B61	1,14 ± 0,58	1,49 ± 0,97	1,98 ± 1,30	1,54 ± 0,97
A3	1,12 ± 0,75	1,25 ± 0,77	2,69 ± 1,13	1,23 ^{bc} ± 0,82	B41	1,22 ± 0,34	1,17 ± 1,00	1,81 ± 0,62	1,39 ± 0,71
A67	2,05 ± 0,57	1,43 ± 1,16	0,90 ± 0,72	1,77 ^{ab} ± 0,82	B6	1,17 ± 0,58	1,09 ± 0,50	1,87 ± 0,85	1,37 ± 0,70
A42	2,11 ± 0,30	1,89 ± 1,27	2,79 ± 0,49	2,06 ^a ± 0,74	B63	1,20 ± 0,39	1,26 ± 0,82	1,72 ± 1,08	1,39 ± 0,78
A7	1,49 ± 0,44	1,55 ± 0,62	1,17 ± 0,46	1,58 ^{abc} ± 0,47	B66	1,24 ± 0,39	1,33 ± 0,87	1,53 ± 0,13	1,36 ± 0,86
A12	1,65 ± 0,99	1,38 ± 0,81	0,14 ± 1,02	1,35 ^{abc} ± 0,89	B39	1,20 ± 0,58	1,43 ± 0,75	1,56 ± 1,07	1,39 ± 0,76
A4	1,63 ± 0,82	1,17 ± 0,55	0,64 ± 0,55	1,42 ^{abc} ± 0,62	B52	1,24 ± 0,73	1,32 ± 0,66	1,52 ± 0,92	1,36 ± 0,71
A5	0,97 ± 0,18	1,12 ± 0,42	0,47 ± 0,63	1,04 ^c ± 0,41	B16	1,17 ± 0,74	1,50 ± 0,94	1,82 ± 0,75	1,49 ± 0,78
A36	1,81 ± 0,49	1,49 ± 0,62	0,16 ± 1,01	1,60 ^{abc} ± 0,69	B10	1,05 ± 0,48	1,41 ± 0,99	1,10 ± 1,06	1,18 ± 0,82
A39	1,70 ± 0,35	1,32 ± 0,86	0,43 ± 0,74	1,51 ^{abc} ± 0,64	B38	1,09 ± 0,63	0,97 ± 0,35	1,53 ± 0,70	1,19 ± 0,58
A63	1,47 ± 0,31	1,65 ± 0,67	0,82 ± 0,52	1,55 ^{abc} ± 0,48	B54	0,94 ± 0,54	1,01 ± 0,58	1,49 ± 0,88	1,15 ± 0,67
Rataan	1,51 ± 0,71	1,39 ± 0,77	1,45 ± 0,75		Rataan	1,17^b ± 0,49	1,30^b ± 0,70	1,66^a ± 0,89	

Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda ($p < 0,05$)

* Metode turbidimetri bakteri menurut DALGAARD *et al.* (1994)

Hasil sidik ragam aktivitas CMCCase antar isolat A pada substrat rumput Gajah, rumput lapang dan jerami jagung menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) pada isolat A9 ($14,53 \pm 7,06$ unit/ml/jam) dan A62 $13,75 \pm 5,65$ (unit/ml/jam) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Hasil uji lanjut antara jenis isolat bakteri terhadap substrat serat tidak menunjukkan perbedaan nyata.

Nilai CMCCase dari isolat B berdasarkan pada substrat sawit, jerami padi dan alang-alang menunjukkan bahwa CMCCase pada jerami padi ($8,94 \pm 4,94$ unit/ml/jam) dan sawit ($8,46 \pm 2,06$ unit/ml/jam) nyata ($p < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan alang-alang ($7,23 \pm 1,91$ unit/ml/jam). Ini menunjukkan bahwa isolat bakteri B lebih teradaptasi dengan kandungan kompleks karbohidrat jerami padi dan sawit dibandingkan dengan alang-alang. CMCCase tertinggi dari isolat B pada substrat sawit, jerami padi dan alang-alang adalah isolat B24 ($11,05 \pm 8,89$ unit/ml/jam) nyata ($p < 0,05$) paling tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Kajian lain menunjukkan bahwa aktivitas CMCCase dari *Micromonospora* sp. yang dikultur menggunakan media jerami padi pada kondisi aerob sebesar 36,5 unit/ml (MONIRUZZAMAN *et al.*, 1990); *Clostridium* 1,36 unit/ml (JIN dan TODA, 1988) dan CMCCase dari *Phlebia brevispora* pada substrat jerami gandum secara *invitro* sebesar 0,552 unit/ml/menit sebanding dengan 33,12 unit/ml/jam (ARORA dan SHARMA, 2011). Aktivitas selulase dari CMCCase dari kultur *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 pada kultur yang ditambah sekam padi yang telah dimurnikan sebesar 153 unit/ml (LEE *et al.*, 2008).

Hasil sidik ragam jumlah total bakteri A terhadap jenis serat perlakuan (rumput gajah, rumput lapang dan jerami padi) tidak menunjukkan perbedaan nyata, tetapi rataan individu menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$). Isolat A 42 nyata paling tinggi ($2,06 \pm 0,74 \times 10^8$ CFU/ml) dibandingkan dengan isolat lainnya. Hasil sebaliknya diperoleh dari isolat B, rataan jumlah bakteri pada substrat alang-alang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi ($1,66 \pm 0,89 \times 10^8$ CFU/ml) dibandingkan dengan sawit ($1,17 \pm 0,49 \times 10^8$ CFU/ml) dan jerami padi ($1,30 \pm 0,70 \times 10^8$ CFU/ml) sebagaimana tersaji pada Tabel 3. Jumlah bakteri yang tumbuh dalam percobaan ini lebih rendah kisaran normal rumen $> 10^9$ koloni/ml (MINATO *et al.*, 1990).

Secara umum jumlah populasi isolat bakteri pencerna serat terhadap beberapa substrat hijauan pakan sumber serat menunjukkan pola sidik ragam yang berbeda dengan aktivitas CMCCase isolate, seperti jumlah populasi bakteri dari isolat A42 paling tinggi sedangkan antar isolat B tidak menunjukkan beda nyata. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim CMCCase

dari isolat bakteri pencerna serat asal rumen kerbau tidak berkorelasi positif dengan jumlah populasi bakteri yang tumbuh pada kultur tersebut. Selanjutnya isolat terbaik A dengan aktivitas CMCCase diatas 11 unit/ml/jam ditetapkan sebagai isolat potensial (A9, A62, A3, A67, A42) dan isolat B dengan aktivitas CMCCase diatas 8,5 unit/ml/jam sebagai isolat potensial (B24, B61, B41, B6).

Karakteristik isolat bakteri pencerna serat potensial asal rumen kerbau pada substrat rumput gajah (*Pennisetum purpureum*)

Lambatnya pedet mengkonsumsi pakan selain susu dan tingginya kasus diare pada pedet akibat salah makan dapat disebabkan oleh ketidaksiapan mikroba rumen dan belum berkembangnya rumen untuk mencerna serat. Karakteristik isolat bakteri pencerna serat potensial dari isolat A dan B terhadap substrat rumput gajah tersaji pada Tabel 4. Secara umum semua isolat mampu tumbuh dengan baik pada substrat rumput gajah. Hasil sidik ragam isolat pada substrat rumput gajah menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap jumlah populasi bakteri. Isolat A3 merupakan isolat dengan kemampuan tumbuh terbaik dibanding isolat lainnya dengan jumlah populasi $1,89 \pm 0,58 \times 10^8$ CFU/ml dan terendah A42 dengan jumlah populasi $0,10 \pm 0,17 \times 10^8$ CFU/ml.

Hasil sidik ragam aktivitas CMCCase dari sembilan isolat potensial A dan B terhadap substrat rumput gajah menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$), dimana isolat A9, A3 dan A42 memiliki aktivitas nilai yang tinggi yaitu berturut-turut $11,36 \pm 1,70$; $11,22 \pm 0,60$ dan $10,62 \pm 1,96$ unit/ml/jam dan isolat A67 memiliki aktivitas terendah yaitu $7,72 \pm 0,35$ unit/ml/jam.

Aktivitas CMCCase dari *Clostridium* yang diisolasi dari feses onta pada media selulosa sebesar 1,36 unit/ml (JIN dan TODA, 1988) dan 0,65 unit/ml pada *Streptomyces* spp. yang di kultur selama delapan hari (MERYANDINI, 2007). Kajian pada mutan *Bacillus sp* menggunakan sinar gamma pada media yang mengandung gandum 3% memiliki aktivitas CMCCase sebesar 17,5 unit/ml and 15,7 unit/ml. (YOON *et al.*, 1991).

Hubungan jumlah bakteri terhadap CMCCase dari sembilan isolat bakteri pencerna serat potensial pada substrat rumput gajah tersaji pada Gambar 2. Hasil sidik ragam jumlah isolat bakteri terhadap aktivitas CMCCase tidak menunjukkan perbedaan nyata. Peningkatan jumlah populasi tidak mengindikasikan peningkatan aktivitas enzimatis. Hal ini menunjukkan bahwa daya degradasi selulosa dari setiap isolat sangat bervariasi yang dimungkinkan akibat berbedanya jenis isolat dan produksi enzim yang dihasilkan dari setiap individu.

Tabel 4. Karakteristik isolat bakteri pencerna serat potensial asal rumen kerbau pada substrat rumput Gajah (*P. purpureum*)

Isolat	Kemampuan tumbuh (Total bakteri 10^8 CFU/ml)*	Aktivitas CMCCase (unit/ml/jam)**
A9	0,42 ± 0,21 ^{de}	11,36 ± 1,70 ^a
A3	1,89 ± 0,58 ^a	11,22 ± 0,60 ^a
A42	0,10 ± 0,17 ^e	10,62 ± 1,96 ^a
B24	1,17 ± 0,09 ^{bc}	10,43 ± 1,31 ^{ab}
B41	1,58 ± 0,28 ^{ab}	10,33 ± 2,04 ^{ab}
A62	1,13 ± 0,21 ^{bc}	9,65 ± 0,49 ^{ab}
B 61	0,88 ± 0,55 ^{cd}	9,35 ± 1,89 ^{ab}
B6	1,56 ± 0,33 ^{ab}	9,16 ± 1,75 ^{ab}
A67	1,33 ± 0,09 ^{abc}	7,72 ± 0,35 ^b

Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda ($p < 0,05$)

* = Metode turbidimetri kekeruhan dari kultur tunggal bakteri menurut DALGAARD *et al.* (1994)

** = Aktivitas enzim CMCCase menurut GHOSE (1987)

Analisis kekerabatan isolat bakteri pencerna serat potensial asal rumen kerbau dengan repetitive PCR

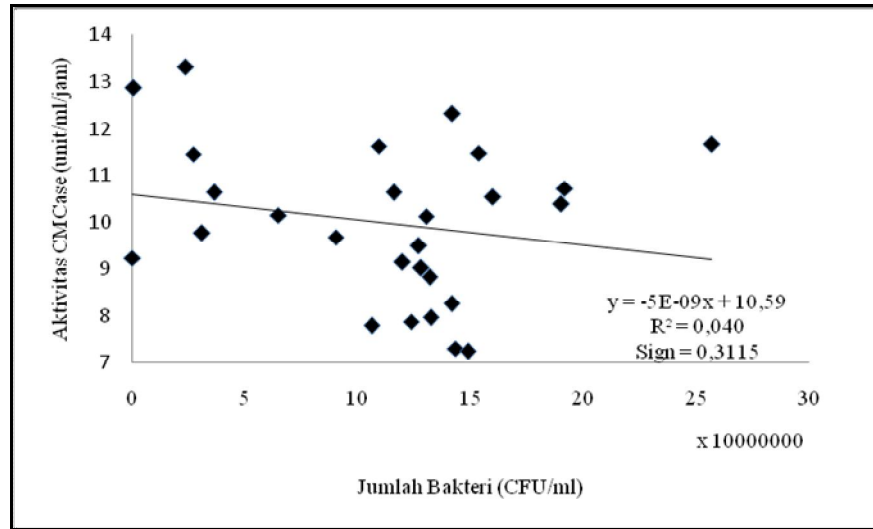
Hingga saat ini, analisis kekerabatan isolat bakteri asal rumen menggunakan metode repPCR masih sangat terbatas. Padahal metode repPCR memiliki tingkat akurasi yang tinggi dan waktu yang cepat terhadap berbagai jenis isolat bakteri (DEPLANO *et al.*, 2000) dengan cara mengamplifikasi sekuen berulang dari beberapa kodon (PRIHANTORO, 2006). Penelitian lain membuktikan bahwa metode repPCR efektif dalam mengukur tingkat kekerabatan *Staphylococcus aureus* pada sapi perah mastitis (REINOSO *et al.*, 2007)

Pada penelitian ini, metode repPCR berhasil mengamplifikasi isolat bakteri pencerna serat asal rumen kerbau dan mengukur tingkat kekerabatannya berdasarkan panjang pita DNA dan jumlah pita DNA yang teramplifikasi. Hasil amplifikasi sembilan isolat bakteri pencerba serat asal rumen kerbau dengan kemampuan CMCCase tinggi menggunakan repPCR pada kisaran 200-750 bp yang tersaji pada Gambar 3.

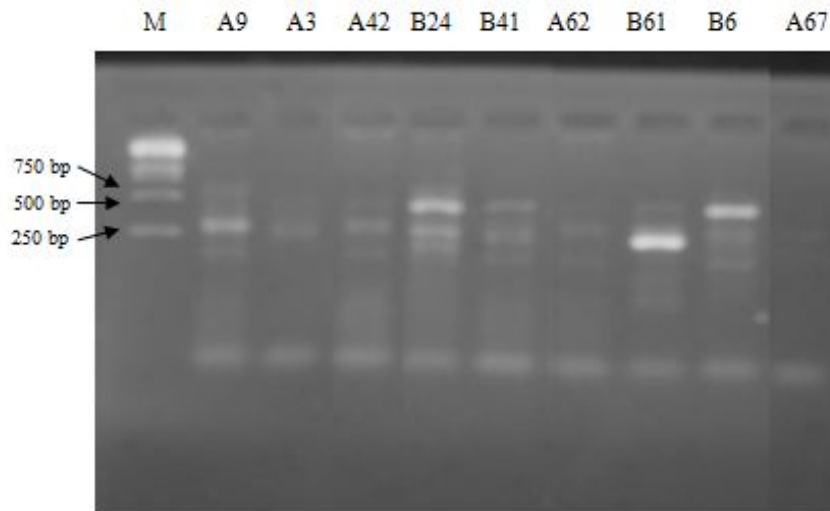
Tingkat kekerabatan genetik hasil amplifikasi repPCR menggunakan primer BOX AIR diukur menggunakan program NTSys 2.10 dengan hasil similaritas tersaji dalam Gambar 4. Secara umum sembilan isolat bakteri potensial dapat dikelompokkan

menjadi lima kelompok yang diberi kode I-V. Pada kelompok I terdiri dari empat isolat bakteri dengan tingkat kemiripan genetik 100%, yaitu A9, A42, B41, A62. Kelompok II terdiri dari dua isolat bakteri dengan tingkat kemiripan genetik 100%, yaitu A3, A67. Pada kelompok III, IV dan V terdiri dari satu isolat yakni B24, B61 dan B6. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa hanya sembilan isolat potensial CMCCase yang dapat diperoleh dan terkelompok dalam lima jenis bakteri yang berbeda dan sebagian besar masuk dalam kelompok I. Hasil penelitian REINOSO *et al.* (2007) terhadap *S. aureus* penyebab mastitis pada sapi perah menggunakan 52 sampel bakteri dari empat ekor sapi mastitis teridentifikasi dalam lima kelompok yang berbeda.

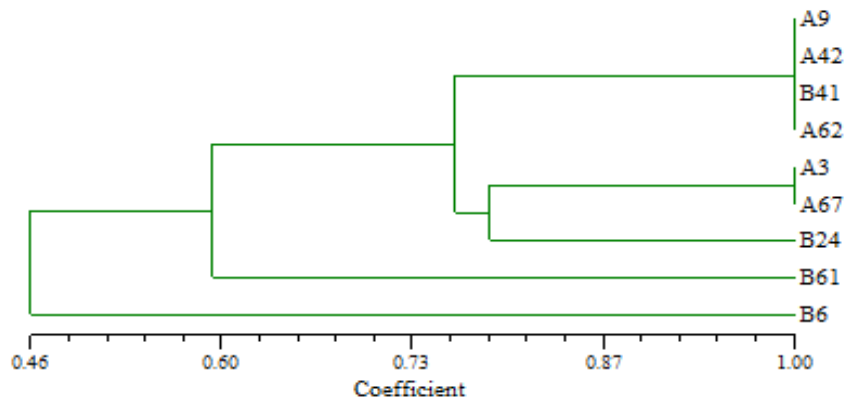
Tingkat kemiripan genetik antara kelompok II dan III sebesar 80% dan tingkat kemiripan genetik dari kedua kelompok tersebut (II dan III) terhadap kelompok I sebesar 73%. Tingkat kekerabatan genetik dari kelompok IV terhadap tiga kelompok di atasnya (kelompok I, II dan III) sebesar 60%. Berdasarkan hasil dendrogram kelompok V terhadap kelompok lainnya hanya sebesar 46%. Ini menunjukkan bahwa tingkat kekerabatan genetik dari sembilan isolat potensial CMCCase tinggi asal rumen kerbau yang diperoleh dalam percobaan ini > 46%.



Gambar 2. Hubungan jumlah bakteri pencerna serat potensial terhadap aktivitas CMCase pada rumput Gajah



Gambar 3. Profil repPCR dari sembilan isolat bakteri pencerna serat potensial asal rumen kerbau. M adalah Marker DNA dan A9, A3, A42, B24, B41, A62, B61, B6, A67 adalah isolat bakteri pencerna serat



Gambar 4. Dendrogram hubungan genetik dari sembilan isolat bakteri pencerna serat potensial asal rumen kerbau menggunakan repPCR

KESIMPULAN

Diperoleh sembilan isolat bakteri pencerna serat asal rumen kerbau dengan kemampuan CMCase tinggi dengan nilai aktivitas terbaik pada substrat rumput gajah adalah Isolat A9 ($11,36 \pm 1,70$ unit/ml/jam), A3 ($11,22 \pm 0,60$ unit/ml/jam) dan A42 ($10,62 \pm 1,96$ unit/ml/jam). Aktivitas enzim CMCase dari isolat bakteri pencerna serat asal rumen kerbau tidak berkorelasi dengan jumlah bakteri yang tumbuh dan tingkat kekerabatan genetik dari sembilan isolat bakteri potensial yang diperoleh terkelompok dalam lima jenis dengan tingkat similaritas $\geq 46\%$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Litbang Pertanian. Publikasi ini merupakan bagian dari hasil penelitian yang dibiayai Program Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian antara Perguruan Tinggi (KKP3T) dan No. 717/LB.620/I.1/3/2008. Ibu Supriyati, Iber Gayatri dan Ristia Astuti atas kerjasamanya selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- AKIN, D. E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *J. Agric.* 81: 17-25.
- AKIN, D. E. and R. BENNER. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1117-1125.
- ARITONANG. 1986. Perkebunan kelapa sawit, sumber pakan ternak di Indonesia. *J. Penel. Pengemb. Pertan.* 5: 93-95.
- ARORA, D., S. and R. K SHARMA. 2011. Effect of different supplements on bioprocessing of wheat straw by *Phlebia brevispora*: Changes in its chemical composition, *in vitro* digestibility and nutritional properties. *Bioresour. Technol.* 102: 8085-8091.
- BHATTACHARYA, N., K and D. N. MULLICK. 1965. Comparative study of mechanical factors in ruminants digestion: Part II. Pattern of rumen movements in ox and buffalo under similar dietary conditions. *Ind. J. Exp. Bio.* 21: 255-259.
- CHENG, K. J., C. W. FORSBERG, H. MINATO and J. W. COSTERTON. 1989. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. Proc. of VII International Symposium on Ruminant Physiology, Sendai, Japan. New York Academic Press. pp. 515-539.
- COCKRILL, W.R. 1974. The husbandry and health of domestic buffalo. Food and Agriculture Organization of United Nation, Rome.
- DALGAARD, P., T. ROSS, L. KAMPERMAN, K. NEUMEYER and T. A. McMEEKIN. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 391-404.
- DE BRUIJN, F.J., J. RADEMAKER and M. SCHNEIDER. 1996. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. In: Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. APS Press, pp. 497-502.
- DEPLANO, A., A. SCHUERMANS, J. VAN ELDERE, W. WITTE, H. MEUGNIER, J. ETIENNE, H. GRUNDMANN, D. JONAS, G. T. NOORDHOEK, J. DIJKSTRA, A. VAN BELKUM, W. VAN LEEUWEN, P. T. TASSIOS, N. J. LEGAKIS, A. V. D. ZEE, A. BERGMANS, D. S. BLANC, F. C. TENOVER, B. C. COOKSON, G. O'NEIL, M. J. STRUELENS. 2000. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3527-3533.
- GHOSE, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268.
- JIN, F. and K. TODA. 1988. Isolation of new anaerobic, thermophilic and cellulolytic bacteria JT strains and their cellulase production. *J. Ferm. Technol.*: 389-395.
- LEE, Y. J., B.K. KIM, B. H. LEE, K. I. JO, N. K. LEE, C. H. CHUNG, Y. C. LEE and J.W. LEE. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloquelaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour. Technol.* 99: 378-386.
- MATTJIK, A. H. dan M. SUMERTAJAYA. 2002. Rancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. IPB Press, Bogor.
- MERYANDINI, A. 2007. Characterization of xylanase from *Streptomyces* spp. Strain C1-3. HAYATI 14: 115-118.
- MINATO, H., E. MIYAGAWA and T. SUTO. 1990. Techniques for analysis of rumen microbial ecosystem. In: The Rumen Ecosystem. S. HOSHINO, R. ONODERA, H. MINATO and H. ITABASHI (Eds). Jap. Sci. Press, Tokyo. pp. 3-12.
- MONIRUZZAMAN, M., M. A. MALEK, N.A. and N. CHOUDHURY. 1990. Growth and cellulolytic activity of five locally isolated aerobic bacteria. *Bangladesh J. Sci. Res.* 8: 37-42.
- MORGAVI, D. P., K. A. BEAUCHEMIN, V. L. NSEREKO, L. M. RODE, A. D. IWAASA, W. Z. YANG, T. A. McALLISTER and Y. WANG. 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 83: 1310-1321.
- NRC. 1981. The Water Buffalo: New Prospects for an Under Utilized Animal. National Academi Press. Washington, D.C.
- OSBORNE, J. M and B. A. DEHORITY. 1989. Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose, and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2247-2250.
- PANDYA, P. R. , K. M. SINGH, S. PARNERKAR, A. K. TRIPATHI, H. H. MEHTA, D. N. RANK, R. K. KOTHARI and C. G. JOSHI. 2010. Bacterial diversity in the rumen of Indian Surti buffalo (*Bubalus bubalis*), assessed by 16S rDNA analysis. *J. Appl. Genet.* 51: 395-402.

- PRADHAN, K. 1994. Rumen ecosystem in relation to cattle and buffalo nutrition. In: WANAPAT, M. and K. SOMMART (Eds.). Proc. First Asian Buffalo Association Congress. Khon Kaen. 17-21 January 1994. pp. 221-242.
- PRIHANTORO, I. 2006. Dinamika Komunitas Bakteri dalam Tanah Tercemar Minyak Bumi yang Diremediasi. Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- PRIHANTORO, I., Y. SARI, L. RIYANTI, T. E. SASMITA, D. EVVYERNIE A., SURYANI, L. ABDULLAH and T. TOHARMAT. 2012. Nutritive value of forages using a mixed bacteria isolated from the rumen liquor of buffalo. Proceeding of the 2nd International Seminar on Animal Industry. Jakarta. pp. 454-458.
- REINOSO, E., S. BETTERA, L. ODIERNO and C. BOGNI. 2007. rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 44: 115-121.
- ROHLF, F. J. 2000. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. User Guide. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. Stony Brook, NY 11794-5245.
- SCHNEEGURT, M., A. and C. F. KULPA. 1998. Review: The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochemis.* 27: 73-79.
- SINHA, R.N and B. RANCANATHAN. 1983. Cellulolytic bacteria in buffalo rumen. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 1-6.
- SOFYAN, L. A dan I. S. SRIHARINI. 1986. Taraf pemberian onggok dan tepung daun ubi kayu untuk domba yang mendapat ransum basal jerami padi. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- SURYAHADI, W. G. PILIANG, L. DJUWITA and Y. WIDIASTUTI. 1996. DNA recombinant technique for producing transgenic rumen microbes in order to improve fiber utilization. *Indones. J. Trop. Agric.* 7: 5-9.
- THALIB, A., Y. WIDIAWATI, H. HAMID dan MULYANI. 2000. Identifikasi morfologis dan uji aktivitas mikroba rumen dari hewan-hewan ruminansia yang telah teradaptasi pada substrat selulosa dan hemiselulosa. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. pp. 341-348.
- VAN GYLSWYK, N.O. 1970. The effect of supplementing a low protein hay on the cellulolytic bacteria in the rumen of sheep and on the digestibility of cellulose and hemicellulose. *J. Agric. Sci. Camb.* 74: 169-180.
- WAHYUDI, A., L. HENDRANINGSIH and A. MALIK. 2010. Potency of fibrolytic bacteria isolated from Indonesian sheep's colon as inoculum for biogas and methane production. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 2994-2999.
- WANAPAT, M. 1989. Comparative aspects of digestive physiology and nutrition in buffaloes and cattle. In Proceeding of Ruminant Physiology and Nutrition in Asia. C. Devendra and E. Imaizumi (Eds.). Jap. Soc. Zotech Sci. Sendai, pp. 27-43.
- WANAPAT, M. 2001, Swamp buffalo rumen ecology and its manipulation. Paper presented at National workshop on swamp buffalo development. Hanoi. <http://www.mekarn.org/procbuf/wanapat.htm>
- WIDADA, J., H. NOJIRI and T. OMORI. 2002. Recent development in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 45-59.
- YANG, W. Z., K. A. BEAUCHEMIN and D. D. VEDRES. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102: 137-150.
- YOON, K.H., I.K. SHIN, K.H. JUNG, and S.H. Park. 1991. Hyper CMCase producing mutants of *Bacillus* sp. 79-23 induced by gamma radiation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 518-521.