

ANALISIS DINAMIKA POPULASI MIKROBA DAN PROFIL METABOLIT RUMEN SAPI PERANAKAN ONGOLE YANG DIBERI PROBIOTIK DAN ASAM AMINO TERPROTEKSI

ADILAH ADAWIAH



PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Analisis Dinamika Populasi Mikroba dan Profil Metabolit Rumen Sapi Peranakan Ongole yang Diberi Probiotik dan Asam Amino Terproteksi” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Juli 2024

Adilah Adawiah
G3501231039

RINGKASAN

ADILAH ADAWIAH. Analisis Dinamika Populasi Mikroba dan Profil Metabolit Rumen Sapi Peranakan Ongole yang Diberi Probiotik dan Asam Amino Terproteksi. Dibimbing oleh ANJA MERYANDINI. RONI RIDWAN. I KOMANG GEDE WIRYAWAN.

Industri Sektor peternakan di Indonesia menghadapi tantangan dalam menyediakan sapi berkualitas untuk memenuhi kebutuhan protein hewani. Salah satu sapi yang sering dibudidayakan di Indonesia adalah sapi Peranakan Ongole (PO). Rumen merupakan organ pencernaan unik dan juga kompleks pada hewan ruminansia yang memiliki berbagai jenis mikroorganisme termasuk didalamnya yang paling dominan adalah bakteri dan arkea. Asosiasi antara mikroorganisme kompleks didalam rumen dapat menghasilkan berbagai metabolit seperti asam lemak volatil yang digunakan sebagai sumber energi bagi inangnya. Memahami dinamika mikroba dan profil metabolit di dalam cairan rumen sangat penting untuk efisiensi pakan dan kesehatan hewan yang secara langsung berdampak terhadap produktivitas sapi. Keterbatasan kualitas nutrisi dalam pakan berpotensi mengubah ketidakseimbangan mikroba dan metabolit yang dihasilkan yang dapat menghambat efisiensi pencernaan pakan maupun kesehatan hewan. Selain kualitas pakan yang rendah permasalahan lain yang juga turut berkontribusi yaitu produksi gas metan oleh kelompok arkea metanogen di dalam rumen sapi. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan dalam upaya mengurangi permasalahan yang terjadi yaitu memperbaiki kualitas pakan dengan penambahan pakan aditif. Pakan aditif yang dapat diberikan yaitu probiotik bakteri asam laktat (*Lactiplantibacillus plantarum*) yang diketahui mampu merangsang mikroflora rumen dan mengurangi populasi arkea. Selain itu penambahan asam amino lisin dan metionin penting untuk menunjang pertumbuhan sapi secara keseluruhan. Pemberian asam amino ini perlu diproteksi menggunakan tanin untuk menghindari degradasi bakteri rumen sehingga dapat diserap secara langsung oleh sapi. Kombinasi pakan aditif dapat juga diberikan dengan penambahan premix berupa enzim dan mineral untuk meningkatkan laju degradasi pakan dan menunjang kesehatan inang. Penelitian bertujuan untuk mengetahui dinamika populasi mikroba dan profil metabolit sapi PO yang diberi kombinasi *feed additive* menggunakan analisis metagenomik dan metabolomik.

Penelitian ini menggunakan empat ekor sapi jantan fistula PO. Setiap sapi menerima empat perlakuan aditif pakan yang berbeda per 1 periode percobaan dengan istirahat diet basal menggunakan desain *crossover*. Perlakuan yang digunakan adalah semua mendapatkan pakan basal G1 (60% konsentrat dan 40% hijauan) dengan penambahan masing-masing *feed additive* yang terdiri dari G2: probiotik (*L. plantarum*), G3: premix, G4: G2+G3 + asam amino lisin dan metionin, G5: G2+G3 + asam amino terproteksi oleh tanin. Sebelum perlakuan, dilakukan persiapan pembuatan probiotik kering *L. plantarum*. Cairan rumen hasil perlakuan dikoleksi dan diekstraksi DNA kemudian dilanjutkan analisis dinamika mikroba menggunakan *Nanopore* NGS dan *quantitative* PCR (qPCR). Cairan rumen juga dilakukan analisis lebih lanjut untuk melihat profil metabolit menggunakan *headspace* GC-MS. Penelitian ini juga menganalisis hubungan antara kelimpahan mikroba target dengan qPCR dan metabolit yang dihasilkan.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Hasil perhitungan populasi probiotik yang digunakan didapatkan $2,35 \times 10^8$ CFU/ml dengan pH rata-rata cairan rumen berkisar antara 6,98-7,02. Hasil analisis *Nanopore* NGS berupa keanekaragaman alfa dan beta pada perlakuan G1, G2, G3, dan G5 menunjukkan kekayaan dan keanekaragaman spesies hampir sama dengan dominasi filum *Bacteroidota*, *Bacillota* dan genus *Prevotella*. Perlakuan G5 memiliki keragaman mikrobial melimpah dan berkontribusi terhadap penurunan populasi *Methanobacteriales* dan *Methanosarcinales* yang diketahui sebagai penghasil metan. Pakan G4 memiliki komposisi yang sangat berbeda, dengan tersuksesnya filum *Bacteroidota* dan meningkatnya *Bacillota*, *Butyrivibrio*. Pakan G4 ini menunjukkan tingginya bakteri pemanfaat asam amino sehingga distribusi kelimpahan berbeda pada empat perlakuan lainnya. Profil metabolit yang terdeteksi pada sampel cairan rumen yaitu sebanyak 28 senyawa (VIP>1). Senyawa prenol lipid merupakan senyawa paling dominan muncul pada saat diberikan perlakuan *feed additive* dan melimpah pada pakan G5. Anggota senyawa ini diketahui memiliki sifat antioksidan yang baik, antibakterial, dan dapat berkontribusi dalam penurunan populasi arkea metanogenik di dalam rumen. Dalam penelitian ini, *Methanosarcinales* tampaknya memiliki korelasi negatif yang dominan dengan prenol lipid. Metagenomik NGS, analisis qPCR, dan headspace menggunakan GCMS dapat mendeteksi perubahan struktur komunitas bakteri dan metabolitnya sebagai respons terhadap variabel yang berbeda.

Kata kunci: 16S *r*RNA, metagenomik, metabolomik, pakan, tanin

SUMMARY

ADILAH ADAWIAH. The Rumen Microbial Population Dynamics and Metabolite Profiles Analysis of Ongole Crossbred (PO) Cattle Fed Probiotics and Protected Amino Acids. ANJA MERYANDINI. RONI RIDWAN. I KOMANG GEDE WIRYAWAN.

The livestock industry in Indonesia encounters significant challenges in providing high-quality cattle to meet the burgeoning demand for animal protein. One of the prominent breeds reared in Indonesia is the Ongole (PO) crossbreed cattle. The rumen, a unique and intricate digestive organ in ruminants, harbors a diverse array of microorganisms, predominantly bacteria and archaea. The synergistic interactions among these microorganisms in the rumen yield various metabolites, such as volatile fatty acids, which serve as crucial energy sources for the host. A comprehensive understanding of the microbial dynamics and metabolite profiles in rumen fluid is imperative to optimizing feed efficiency and ensuring animal health, both of which directly influence cattle productivity. Inadequate nutritional quality of feed can disrupt microbial equilibrium and alter metabolite production, thereby impairing feed digestion efficiency and compromising animal health. Additionally, methane gas produced by methanogenic archaea in the rumen poses another significant challenge. Enhancing feed quality through the incorporation of feed additives offers a viable solution to these issues. The inclusion of probiotic lactic acid bacteria (*Lactiplantibacillus plantarum*) can stimulate rumen microflora and mitigate archaea populations. Furthermore, the supplementation of essential amino acids, lysine and methionine, is vital for promoting overall bovine growth. These amino acids must be protected with tannins to prevent degradation by rumen bacteria, ensuring their direct absorption by the cattle. A combination of feed additives can also include a premix of enzymes and minerals to enhance the rate of feed degradation and support host health. This research aims to determine the dynamics of the microbial population and the metabolite profile of PO cattle given a combination of feed additives, using metagenomic and metabolomic analysis.

This study utilized four Fistula PO bulls, each subjected to four different feed additive treatments per experimental period, employing a crossover design with a basal diet break. All treatments included a basal feed of G1 (60% concentrate and 40% forage) with the addition of specific feed additives: G2: probiotic (*L. plantarum*), G3: premix, G4: a combination of G2 and G3 with amino acids lysine and methionine, and G5: a combination of G2 and G3 with tannin-protected amino acids. Before treatment, dried probiotic *L. plantarum* was prepared. Rumen fluid was collected post-treatment and then DNA extracted for microbial dynamics analysis using Nanopore NGS and quantitative PCR (qPCR). The rumen fluid was also analyzed to determine the metabolite profile using headspace GC-MS. Additionally, this research examined the relationship between target microbes (qPCR) and the metabolites.

The results indicated that the probiotic population used was 2.35×10^8 CFU/ml, with the average pH of rumen fluid ranging from 6.98 to 7.02. Nanopore NGS analysis of alpha and beta diversity in treatments G1, G2, G3, and G5 revealed similar species richness and diversity, with a predominance of the phyla *Bacteroidota*, *Bacillota*, and the genus *Prevotella*. Treatment G5 exhibited significant microbial diversity and contributed to a reduction in *Methanobacteriales*.



and *Methanosarcinales* populations, known methane producers. The G4 feed displayed a distinct microbial composition, characterized by an increase in the phylum *Bacteriodota* and *Bacillota*, and a notable rise in the genus *Butyrivibrio*. This treatment showed a high prevalence of amino acid-utilizing bacteria, resulting in a distribution profile distinct from the other four treatments. The metabolite profile detected in the rumen fluid consisted of 28 compounds (VIP > 1). The prenol lipid compound was the most dominant in response to the feed additive treatments and was particularly abundant in the G5 feed. This compound is known for its potent antioxidant and antibacterial properties and its ability to reduce methanogenic archaea populations in the rumen. In this study, *Methanosarcinales* exhibited a strong negative correlation with prenol lipids. NGS metagenomics, qPCR, and headspace analysis using GC-MS effectively detected changes in the structure of bacterial communities and their metabolites in response to different feed additive treatments.

Keywords: 16S rRNA, feed, metagenomics, metabolomics, tannin



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2024
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

ANALISIS DINAMIKA POPULASI MIKROBA DAN PROFIL METABOLIT RUMEN SAPI PERANAKAN ONGOLE YANG DIBERI PROBIOTIK DAN ASAM AMINO TERPROTEKSI

ADILAH ADAWIAH

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Mikrobiologi

**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tesis:
Dr. rer.nat. Rahadian Prataman. S.Si., M.Si.



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

IPB University

Judul Tesis : Analisis Dinamika Populasi Mikroba dan Profil Metabolit Rumen Sapi Peranakan Ongole yang Diberi Probiotik dan Asam Amino Terproteksi

Nama : Adilah Adawiah
NIM : G3501231039

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Anja Meryandini, M.S.



Pembimbing 2:
Dr. Roni Ridwan., S.Pt. M. Si

Pembimbing 3:
Prof Dr. Ir. I Komang Gede Wiryawan



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Anja Meryandini. M. S.
NIP 196203271987032001



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam.
Dr. Berry Juliandi, S.Si., M. Si
NIP 197807232007011001



Tanggal Ujian:
18 Juli 2024

Tanggal Lulus:
(6 Agustus 2024)

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanaahu wa Ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan April 2023 sampai bulan Mei 2024 ini ialah analisis metagenomik dan metabolomik dari rumen sapi Peranakan Ongole dengan judul “Analisis Dinamika Populasi Mikroba dan Profil Metabolit Rumen Sapi Peranakan Ongole yang Diberi Probiotik dan Asam Amino Terproteksi”.

Keberhasilan penulis dalam menyelesaikan tesis ini tidak terlepas dari bantuan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh studi S2 di Program Studi Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
2. Program Sinergi Fasttrack yang telah mendanai penulis selama menempuh studi S2 di Mikrobiologi, FMIPA, IPB.
3. Dana riset oleh Pusat Zoologi Terapan melalui RIIM-BRIN-LPDP sehingga penelitian ini bisa terlaksana dengan baik.
4. Prof. Dr. Anja Meryandini M.S. sebagai ketua komisi pembimbing tesis, Dr. Roni Ridwan, S.Pt. M. Si, selaku anggota komisi pertama pembimbing tesis dan Prof. Dr. Ir. I Komang Gede Wiryawan selaku anggota komisi kedua pembimbing tesis yang telah membimbing penulis selama proses penelitian dan penulisan tesis.
5. Dr. rer. nat. Rahadian Pratama, S.Si. M. Si selaku dosen penguji dan Dr. Rika Indri Astuti, S.Si. M. Si selaku pimpinan sidang yang telah memberikan banyak masukan untuk kesempurnaan tesis saya.
6. Para peneliti BRIN (Dr. Rusli Fidriyanto; Dr. Ki Ageng; Dr Ainissya Fitri) dan segenap keluarga peneliti Lab Annex Genomik dan Lingkungan BRIN yang telah membantu saya dalam pengerjaan penelitian, analisis data, serta menjadi rekan berdiskusi dalam proses penelitian penulis.
7. Ayah Muhammad, Ibu Mardiah, dan seluruh keluarga Jambi yang telah memberikan dukungan moral, material, doa, dan kasih sayangnya kepada penulis.
8. Naurah, Dinda, Alhas, Jelita, Agus, Oik, Farida, Alfina, Avel, Nail, Feby, Raudah, Rara, kak Diana, kak Kiki, kak Afi, kak Dova, kak Ira, ka Ika, kak Handika, kak Bani, Kiki, Ilma, Roy, rekan-rekan lab PAU, LAB baru, teman-teman sinergi MIK 2022, teman-teman angkatan mikrobiologi 2022 dan 2023, teman kontrakan, dan teman Lab Annex yang telah menjadi rekan berdiskusi, membersamai penulis dan tempat berkeluh kesah.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi berbagai pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi.

Bogor, Juli 2024

Adilah Adawiah



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
1.5 Kebaruan	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sistem Pencernaan Ruminan dan Sapi Peranakan Ongole	4
2.2 Komunitas Mikrobiom Ruminansia	5
2.3 Metanogen Rumen	6
2.4 Peran Probiotik pada Hewan Ruminan	7
2.5 Pakan Aditif berupa Premix Combo dan Asam Amino (<i>Lysine</i> dan <i>Methionine</i>)	8
2.6 Tanin	9
2.7 Analisis Keragaman Mikrobiom	10
2.8 Metabolomik GC-MS	13
III METODE	14
3.1 Waktu dan Tempat	14
3.2 Kerangka Penelitian	14
3.3 Alat dan Bahan	15
3.4 Prosedur Kerja	15
3.4.1 Pembuatan Starter Probiotik <i>L. plantarum</i>	15
3.4.2 Persiapan Hewan dan Pakan	15
3.4.3 Perlakuan Percobaan dan Koleksi Sampel Cairan Rumen	16
3.4.4 Ekstraksi DNA dari Sampel Cairan Rumen	16
3.4.5 Analisis <i>Quantitative Real Time</i> PCR (q-PCR)	17
3.4.6 Metagenomik <i>Oxford Nanopore Technology</i> Sequencing	18
3.4.6.1 Amplifikasi Gen 16s <i>rRNA</i>	18
3.4.6.2 <i>Library Preparation</i> dan Sequencing	18
3.4.6.3 Analisis Data Metagenom	18
3.4.6.3.1 <i>Data Prossesing</i> dan <i>Quality Control</i>	18
3.4.6.3.2 Visualisasi Data Kelimpahan dan Keragaman	19
3.4.7 Analisis Metabolomik menggunakan <i>Headspace</i> GC-MS	19
3.4.8 Analisis Korelasi Kelimpahan Target Mikroba (q-PCR) dengan Metabolit (VIP>1)	20
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Hasil	22



4.1.1 Populasi Probiotik dan pH Cairan Rumen	22
4.1.2 Amplifikasi Gen 16S rRNA	22
4.1.3 Informasi Umum Dataset Metagenom	23
4.1.4 Keragaman Alfa	24
4.1.5 Keragaman Beta	24
4.1.6 Distribusi Kelimpahan Taksonomi Komunitas Bakteri Rumen Sapi Peranakan Ongole	27
4.1.7 Populasi target Mikroba Rumen Menggunakan Analisis qPCR	29
4.1.8 Profil Untergeted metabolomik Cairan Rumen	29
4.1.8 Hubungan antara Metabolit dan Kelimpahan Relatif Mikroba	33
4.2 Pembahasan	33
4.2.1 Profil Dinamika dan Keragaman Mikroba Rumen Sapi PO	33
4.2.2 Profil Metabolit Cairan Rumen dan Korelasinya terhadap Mikroba	38
V SIMPULAN DAN SARAN	42
5.1 Simpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	56

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

- Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR TABEL

1	Komunitas bakteri di dalam sistem rumen	5
2	Primer dan kondisi PCR yang digunakan untuk deteksi spesies taerget mikrob rumen menggunakan <i>Quantitative Real Time</i>	21
3	Ringkasan Umum Kualitas Raw Data Hasil Sekuensing	23
4	Hasil analisis kuantitatif real time PCR komunitas bakteri dan arkea rumen yang diberikan pakan berbeda	29
5	Profil bioaktivitas senyawa volatil untargeted sampel cairan rumen yang diberikan perlakuan pakan dengan penambahan aditif pakan dengan VIP >1	31

DAFTAR GAMBAR

1	Proses sekuensing nanopore	12
2	Bagan alir penelitian	14
3	<i>Crossover desain</i> perlakuan pemberian pakan dengan penambahan aditif pakan	16
4	Morfologi koloni probiotik <i>L. plantarum</i> yang digunakan sebagai pakan aditif hasil TPC pada media MRSA + CaCO ₃	22
5	Produk PCR gen target 16S <i>rRNA</i> dari sampel cairan rumen yang divisualisasikan pada gel agarose 1%	22
6	Perbandingan metrik keragaman alfa komunitas berdasarkan indeks <i>Observed OTU</i> , <i>Chao1</i> , <i>Shannon</i> , dan <i>Simpson</i>	24
7	Analisis keragaman beta diberi berbagai perlakuan	26
8	Sebaran kelimpahan relatif komunitas bakteri pada sampel cairan rumen berdasarkan taksa (A) Filum; (B) Famili; (C) Genus; (D) Spesies	27
9	Senyawa metabolit cairan rumen yang diberikan berbagai perlakuan pakan berdasarkan analisis <i>Human Metabolome Data Base</i> (HMDB) yang disusun berdasarkan kategori kelas	30
10	Analisis <i>hierarchical cluster</i> dan <i>heatmap</i> senyawa metabolit cairan rumen yang diberikan 5 perlakuan berbeda	31
11	Profil metabolit cairan rumen diberikan lima pakan berbeda	33
12	Visualisasi hubungan mikrobioma dan profil metabolit rumen yang diberikan lima pakan berbeda	34

DAFTAR LAMPIRAN

1	Konsentrasi DNA Sampel Cairan Rumen	56
2	Anova dan Uji Lanjut <i>Duncan</i> Target Mikroba qPCR	56