

---

## PERTUMBUHAN PROTOZOA DALAM CAIRAN RUMEN KERBAU YANG DISUPLEMENTASI TANIN SECARA IN VITRO

I. Sugoro<sup>1</sup> dan I. Yuniyanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN, Jakarta

<sup>2</sup> Jurusan Biologi Universitas Nasional, Jakarta

### ABSTRAK

**PERTUMBUHAN PROTOZOA DALAM CAIRAN RUMEN KERBAU YANG DI SUPLEMENTASI TANIN SECARA IN VITRO** Tanin merupakan senyawa antinutrisi yang dapat digunakan untuk meningkatkan protein by pass ternak ruminansia. Sumber tanin yang digunakan adalah serbuk daun akasia *Acacia mangium*. Kadar tanin diukur dengan metode presipitasi <sup>125</sup>I-BSA dan kadar tanin yang terukur adalah  $9,02 \pm 1,02$  %. Pengujian dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan cairan rumen kerbau. Perlakuan berdasarkan konsentrasi tanin yang terukur, yaitu A (1,25%); B (2,5%) dan C (5%) serta Kontrol (0%) . Hasil percobaan menunjukkan bahwa suplementasi tanin dapat menurunkan jumlah total sel protozoa dalam cairan rumen kerbau secara *in vitro* dan penurunan jumlah total sel protozoa paling tinggi dicapai oleh suplementasi serbuk daun akasia dengan kadar tanin 2,5 %. Komposisi jenis protozoa menurun pada seluruh perlakuan and viabilitas populasi protozoa menunjukkan terdapat sembilan jenis protozoa yang viabilitasnya yaitu *Dasytricha ruminantium*, *Entodinium ecaudatum* f. caudatum, *Ostracodinium mammosum*, *Elytroplastron bubali*, *Entodinium nanellum*, *Charonin ventriculi*, *Entodinium rostratum*, *Ostracodinium bubali* dan *Metadinium medium*.

**Kata kunci** : Tanin, protozoa, cairan rumen kerbau, dan *in vitro*

### ABSTRACT

**THE GROWTH OF PROTOZOA IN BUFFALO RUMEN LIQUID WITH ADDITION OF TANNIN IN VITRO.** Tannin is antinutrient compound which can be used to increased by pass protein in ruminantia. The source of tannin was used from acacia leaf powder (*Acacia mangium*). The concentration of tannin was determined by precipitated of <sup>125</sup>I-BSA method. The experiments were carried out by *in vitro* method in buffalo rumen liquid. The treatments were A(1,25%); B (2,5%), C (5%) and Kontrol (0%). The result showed that tannin supplementation was decreased the number of protozoa and the lowest growth occurred on A (1,25%). The competition of protozoa was decreased and the viability of protozoa population showed that nine isolates has high viability, i.e. *Dasytricha ruminantium*, *Entodinium ecaudatum* f. caudatum, *Ostracodinium mammosum*, *Elytroplastron bubali*, *Entodinium nanellum*, *Charonin ventriculi*, *Entodinium rostratum*, *Ostracodinium bubali* dan *Metadinium medium*.

**Key words** : Tannin, protozoa, buffalo rumen liquid, and *in vitro*.

---

## LATAR BELAKANG

Tanin merupakan senyawa golongan polifenol yang memiliki kemampuan antinutrisi. Dampak antinutrisi tanin pada ternak ruminansia berawal dari proses mastikasi, selanjutnya tanin akan berikatan dengan protein saliva sehingga pakan tidak disukai dan konsumsi pakan menurun. Di dalam rumen tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan protein, karbohidrat (selulosa, hemiselulosa, dan pektin), mineral, vitamin dan enzim-enzim mikroba rumen (1,2,). Selain dampak negatif, tanin memiliki dampak positif yaitu meningkatkan by-pass protein. Kompleks tanin protein tidak mudah didegradasi oleh mikroba akan tetapi dapat diserap oleh dinding saluran pencernaan bawah secara langsung sebagai sumber protein sebanyak 40 – 60 % (3,4,5).

Sifat tanin yang antinutrisi secara langsung akan mempengaruhi populasi mikroba di dalam rumen, diantaranya protozoa. Populasi protozoa rumen dalam jumlah besar dapat menurunkan kadar protein mikrobial yang tersedia untuk dicerna dalam usus halus. Protozoa juga berperan dalam predasi terhadap bakteri rumen sehingga menurunkan efisiensi penggunaan nitrogen dalam rumen (6) mengemukakan efek negatif utama keberadaan protozoa bagi metabolisme protein pada ruminansia yaitu sebagai predator bakteri. Protozoa kelompok entodiniomorph (suku Ophryoscolecidae) memakan bakteri sebagaimana mereka memakan granula pati, sehingga total aliran protein bagi usus halus berkurang akibat keberadaan protozoa.

Salah satu sumber tanin yang dapat digunakan adalah daun akasia (*Acacia mangium*). Tanaman ini sangat berpotensi untuk digunakan sebagai suplemen pakan ternak karena keberadaan melimpah dan hanya berpotensi sebagai tanaman peneduh (7,8).

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi tanin yang berasal serbuk daun akasia pada berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan sel protozoa dalam cairan rumen kerbau (*Bubalus bubalis*) secara *in vitro*.

## BAHAN DAN TATA KERJA

**Pengukuran total tanin dengan metode presipitasi <sup>125</sup>I-BSA.** Serbuk daun akasia dengan berat 80 mg ditambah 10 ml metanol 50 % kemudian dilakukan pemecahan sel dengan menggunakan waterbath ultrasonik 20 menit (2 x 10 menit

dengan 5 menit jeda) pada suhu kamar. Selanjutnya disentrifugasi 3000 g dan suhu 4°C selama 10 menit dan diambil supernatannya sehingga diperoleh ekstrak tanin dan disimpan pada suhu 4°C. Untuk standar digunakan asam tanin yang dilarutkan dalam 50% metanol. Sebanyak 5 µl supernatan sampel, standar dan metanol 50 % (blank) diteteskan ke kertas saring/disk (diameter 1 cm) dan dikeringkan pada suhu kamar. Sebanyak 10 ml <sup>125</sup>I-BSA (30.000 cpm) hasil dialisis dituangkan ke dalam cawan petri (100 x 15 mm). Selanjutnya 10 disk dimasukkan ke dalamnya dan tidak boleh saling bertumpukan. Agitasi selama 30 menit pada suhu kamar dan pindahkan larutan protein ke tempat limbah lalu diganti dengan larutan buffer untuk pencucian diagitasi selama 30 menit pada suhu kamar (lakukan 3 kali pencucian). Tempatkan disk ke dalam vial kemudian cacah dengan gamma counter dan kalkulasi berdasarkan persamaan kurva standar untuk mengetahui kadar tanin (4).

**Uji *in vitro*.** Cairan rumen diambil dari kerbau yang telah difistula sekitar 1 L lalu dimasukkan ke dalam termos. Untuk menjaga anaerobiositas, dilakukan *gasing* (pengaliran gas) dengan CO<sub>2</sub> sementara cairan rumen disaring menggunakan kain kassa empat lapis, lalu dimasukkan ke dalam gelas beker 500 mL (9). Sebanyak 30 ml cairan rumen dimasukkan ke dalam *syringe* yang masing-masing telah diberikan serbuk daun akasia (*A.mangium*) dengan konsentrasi tanin yang berbeda dan serbuk rumput lapangan (Tabel 1). Blanko berupa cairan rumen sebanyak 30 mL yang dimasukkan dalam *syringe* tanpa perlakuan pemberian serbuk daun akasia maupun serbuk rumput lapangan. Seluruh *syringe* kemudian diinkubasi pada suhu 39°C selama 6 dan 24 jam. Untuk pengamatan pada jam ke-0, cairan rumen dicuplik kemudian dilakukan pengukuran pH, NH<sub>3</sub> serta pengukuran sel protozoa.

Tabel 1. Komposisi perlakuan uji *in vitro*.

Perlakuan	Konsentrasi Tanin (%) dari serbuk akasia
A	1,25
B	2,5
C	5
Kontrol	0

**Perhitungan jumlah, komposisi jenis, viabilitas dan ukuran sel protozoa.** Sampel cairan rumen dari tiap-tiap perlakuan pada *syringe* dicuplik sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 9 ml larutan MFS lalu didiamkan sampai 30 menit, kemudian ditutup (10). Dilakukan pengamatan terhadap jumlah total sel, komposisi jenis dan viabilitas, serta ukuran panjang dan lebar sel protozoa dibawah mikroskop dengan bantuan monitor. Sel protozoa difoto untuk keperluan identifikasi jenis.

**Analisis data.** Data dianalisis dengan menggunakan uji multivariat dengan bantuan program SPSS 11.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

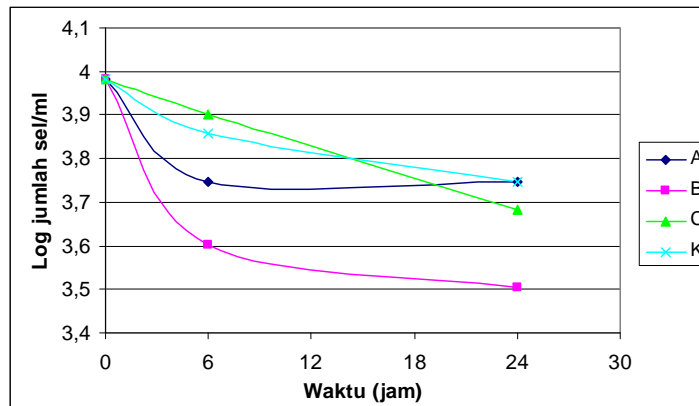
### *Kadar tanin dalam daun akasia*

Hasil pengukuran dengan metode total tanin dengan metode presipitasi  $^{125}\text{I}$ -BSA menunjukkan konsentrasi tanin dalam daun akasia adalah  $9,02 \pm 1,02$  %. Data ini selanjutnya menjadi acuan untuk perlakuan selanjutnya. Metode pengukuran tanin dengan teknik nuklir ini memiliki keunggulan dalam hal sensitifitasnya dibandingkan dengan metode konvensional (4).

### *Jumlah Total Sel Protozoa*

Jumlah total sel protozoa (sel/mL) sebagai parameter pertumbuhan sel selama inkubasi 6 hingga 24 jam menunjukkan terjadinya penurunan untuk setiap perlakuan dan kontrol (Gambar 1). Total rata-rata jumlah sel pada jam ke-0 yaitu  $9,6 \times 10^3$  sel/mL, kemudian setelah 6 jam untuk masing-masing perlakuan A, B, C dan kontrol turun secara berturut-turut menjadi  $5,6 \times 10^3$ ;  $4 \times 10^3$ ;  $8 \times 10^3$  dan  $7,2 \times 10^3$  sel/mL. Setelah inkubasi 24 jam, jumlah sel tetap untuk perlakuan A, namun untuk perlakuan B, C dan kontrol turun menjadi  $3,2 \times 10^3$ ;  $4,8 \times 10^3$  dan  $5,6 \times 10^3$  sel/mL. Penurunan jumlah sel langsung terjadi pada jam ke-6. Untuk perlakuan A dan B lebih rendah dari kontrol, sedangkan untuk perlakuan C jumlah sel lebih tinggi dari kontrol. Hal tersebut berarti setelah inkubasi 6 jam, langsung terlihat pengaruh perlakuan A dan B yang nyata dalam menurunkan jumlah total sel protozoa. Setelah inkubasi 24 jam, jumlah sel untuk perlakuan B dan C berada di bawah kontrol dengan penurunan jumlah sel paling tinggi pada perlakuan B. Dapat disimpulkan perlakuan B memberikan pengaruh paling

nyata dibandingkan kontrol dalam menurunkan jumlah total sel protozoa setelah inkubasi 6 dan 24 jam.



Gambar 1. Jumlah sel protozoa/ml antar waktu inkubasi  
Keterangan: A (1,25%); B(2,5%); C(5%); K (0%)

Total rata-rata jumlah sel pada jam ke-0 yaitu  $9,6 \times 10^3$  sel/mL, kemudian setelah 6 jam untuk masing-masing perlakuan A, B, C dan kontrol turun secara berturut-turut menjadi  $5,6 \times 10^3$ ;  $4 \times 10^3$ ;  $8 \times 10^3$  dan  $7,2 \times 10^3$  sel/mL. Setelah inkubasi 24 jam, jumlah sel tetap untuk perlakuan A, namun untuk perlakuan B, C dan kontrol turun menjadi  $3,2 \times 10^3$ ;  $4,8 \times 10^3$  dan  $5,6 \times 10^3$  sel/mL. Penurunan jumlah sel langsung terjadi pada jam ke-6. Untuk perlakuan A dan B lebih rendah dari kontrol, sedangkan untuk perlakuan C jumlah sel lebih tinggi dari kontrol. Hal tersebut berarti setelah inkubasi 6 jam, langsung terlihat pengaruh perlakuan A dan B yang nyata dalam menurunkan jumlah total sel protozoa. Setelah inkubasi 24 jam, jumlah sel untuk perlakuan B dan C berada di bawah kontrol dengan penurunan jumlah sel paling tinggi pada perlakuan B. Dapat disimpulkan perlakuan B memberikan pengaruh paling nyata dibandingkan kontrol dalam menurunkan jumlah total sel protozoa setelah inkubasi 6 dan 24 jam.

Pengaruh perlakuan A, B dan C terhadap penurunan jumlah sel protozoa pada jam ke-6 maupun jam ke-24 dapat disebabkan oleh aktivitas tanin yang mampu menghambat pertumbuhan sel protozoa dengan cara menginaktivasi berbagai enzim-enzim mikrobial, adhesin, maupun transpor protein. Jika tanin membentuk kompleks dengan dinding sel, sel tersebut akan terganggu secara fisiologis dan mengakibatkan kematian sel (8,11).

Penurunan jumlah sel protozoa juga dapat disebabkan faktor antagonisme yang terjadi pada beberapa jenis protozoa. Hal tersebut dapat menjelaskan mengapa pada kontrol juga mengalami penurunan jumlah sel setelah inkubasi 6 dan 24 jam. Pola hubungan predasi (pemangsa dan mangsa) menentukan faktor antagonisme tersebut. Contoh predasi terjadi pada *Polyplastron multivesiculatum* terhadap *Epidinium ecaudatum*, juga terjadi pada *Entodinium longinucleatum* terhadap beberapa ciliata yang berukuran kecil (10).

Hasil yang diperoleh sesuai secara teoritis. Suplementasi tanin sebagai perlakuan sebagaimana pernah diteliti oleh Ben Salem dkk (12) menggunakan daun *Acacia cyanophylla* Lidl. kering sebagai suplemen pakan jerami pada ternak domba dengan taraf 0, 75, 150, dan 300 g. Daun akasia memiliki kandungan tanin terkondensasi (CT) yang tinggi (ekuivalen dengan 45 g katekin per kg berat kering). Hasil penelitian tersebut menunjukkan penambahan akasia menyebabkan penurunan jumlah protozoa secara linear dalam cairan rumen.

Dari hasil pengamatan terhadap jumlah sel, disimpulkan bahwa suplementasi serbuk daun akasia dengan kadar tanin 2,5% (perlakuan B) memberikan pengaruh penurunan jumlah total sel protozoa paling nyata.

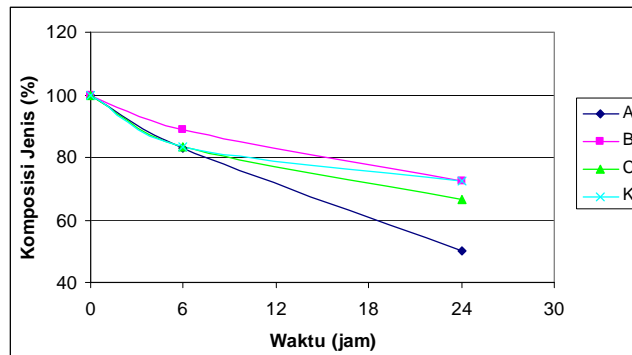
## 2. Komposisi Jenis dan Viabilitas Populasi Protozoa

Komposisi jenis menunjukkan total tingkat kehadiran masing-masing jenis protozoa pada berbagai perlakuan antar waktu inkubasi, sedangkan viabilitas menunjukkan jumlah kehadiran suatu jenis pada masing-masing perlakuan per waktu pengamatan (Gambar 2).

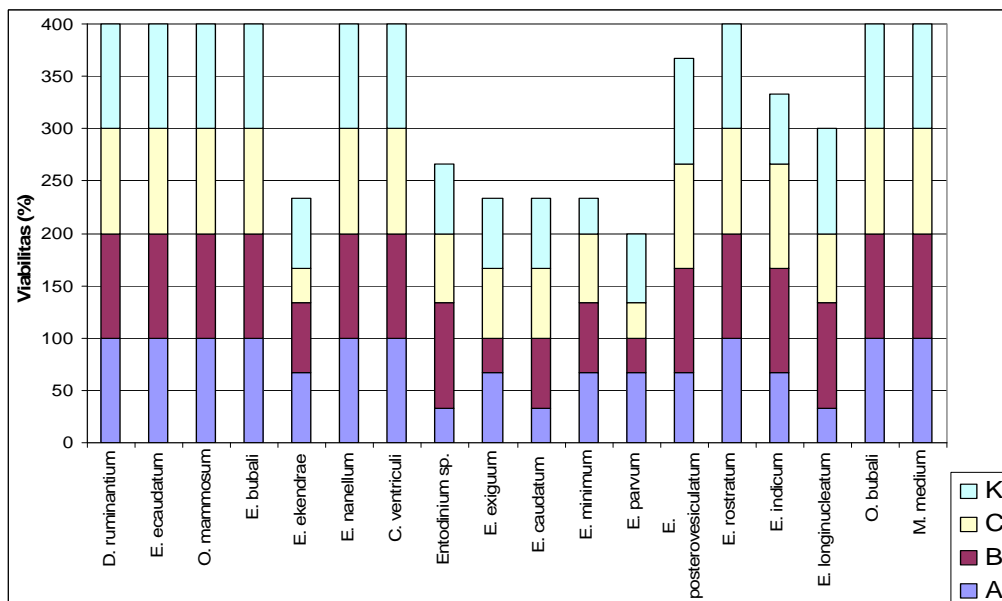
Komposisi jenis protozoa (%) secara umum menurun pada seluruh perlakuan baik jam ke-6 maupun jam ke-24 (gambar 7). Penurunan komposisi jenis pada jam ke-6 antara perlakuan A, C dan kontrol yaitu sebesar 17% dibandingkan jam ke-0 atau menjadi 83%. Sedangkan pada jam ke-24 terjadi penurunan paling tinggi untuk perlakuan A hingga 50%, untuk perlakuan B dan kontrol menjadi 72%, dan untuk perlakuan C menjadi 67%. Dapat dikatakan perlakuan A memberikan pengaruh paling nyata dalam menurunkan komposisi jenis protozoa.

Penurunan komposisi jenis disebabkan perubahan kondisi lingkungan dalam cairan rumen akibat pengaruh perlakuan. Menurut Franzolin dan Dehority (13) jumlah dan proporsi protozoa rumen dipengaruhi oleh tipe dan frekuensi pakan. Pemberian serbuk daun akasia kaya tanin dapat menurunkan nilai pH rumen sebagaimana

tercantum pada gambar 14, sehingga beberapa jenis protozoa yang tidak toleran tidak mampu melangsungkan kehidupannya. Jumlah total sel protozoa (gambar 6) juga mengalami penurunan secara logaritmik sebanding dengan waktu inkubasi pada seluruh perlakuan termasuk kontrol.



Gambar 2. Komposisi jenis protozoa.  
 Keterangan : A (1,25%); B(2,5%); C(5%); K (0%)



Gambar 3. Viabilitas populasi protozoa  
 Keterangan: A (1,25%); B(2,5%); C(5%); K (0%)

Viabilitas populasi protozoa (Gambar 3) menunjukkan terdapat sembilan jenis protozoa yang viabilitasnya pada masing-masing perlakuan mencapai 100%. Protozoa tersebut adalah : *D. ruminantium*, *E. ecaudatum* f. *caudatum*, *O. mammosum*, *E. bubali*, *E. nanellum*, *C. ventriculi*, *E. rostratum*, *O. bubali* dan *M. medium*. Viabilitas menunjukkan kemampuan jenis protozoa untuk dapat hidup pada kondisi perlakuan dan waktu inkubasi tertentu. Semakin tinggi tingkat kehadiran suatu jenis pada berbagai perlakuan dan waktu inkubasi maka semakin tinggi pula viabilitasnya.

Beberapa jenis lain juga diketahui memiliki viabilitas 100% pada kondisi perlakuan tertentu, yaitu: *Entodinium* sp. pada perlakuan B; *E. posterovesiculatum* pada perlakuan B, C dan kontrol; jenis *E. indicum* pada perlakuan B dan C; serta jenis *E. longinucleatum* pada perlakuan B dan kontrol. Sebaliknya, beberapa jenis yang viabilitasnya paling rendah (33%) yaitu: *E. ekendrae* pada perlakuan C; *Entodinium* sp. pada perlakuan A; *E. exiguum* pada perlakuan B; *E. caudatum* f. *lobosopinosum* pada perlakuan A; *E. parvum* pada perlakuan B dan C; serta *E. longinucleatum* pada perlakuan A. Protozoa yang viabilitasnya paling rendah merupakan jenis yang sangat sedikit ditemukan kehadirannya pada sampel yang diperiksa dari seluruh perlakuan.

Dari nilai viabilitas tersebut diketahui beberapa jenis protozoa tahan terhadap berbagai perlakuan yang diberikan, meskipun secara umum komposisi jenis menurun. Kemampuan adaptasi sel protozoa terhadap senyawa tanin sampai taraf tertentu merupakan penjelasan yang dapat diberikan atas fenomena itu. Meskipun beberapa jenis protozoa toleran terhadap senyawa tanin, terdapat pengaruh fisiologis yang dapat dijelaskan melalui perubahan ukuran panjang dan lebar sel.

## KESIMPULAN

Suplementasi serbuk daun akasia kaya tanin dapat menurunkan jumlah total sel protozoa dalam cairan rumen kerbau secara *in vitro* dan penurunan jumlah total sel protozoa paling tinggi dicapai oleh suplementasi serbuk daun akasia dengan kadar tanin 2,5 %. Komposisi jenis protozoa menurun pada seluruh perlakuan baik jam ke-6 maupun jam ke-24 Viabilitas populasi protozoa menunjukkan terdapat sembilan jenis protozoa yang viabilitasnya pada masing-masing perlakuan mencapai 100%, yaitu *D. ruminantium*, *E. ecaudatum* f. *caudatum*, *O. mammosum*, *E. bubali*, *E. nanellum*, *C. ventriculi*, *E. rostratum*, *O. bubali* dan *M. medium*.



---

## DAFTAR PUSTAKA

1. **MAKKAR HPS.** Roles of Tannins and Saponins in Nutrition. Proceedings of the seventh scientific workshop in Tromso. (1998)
2. **MAKKAR HPS.** Application of In Vitro Gas Method in The Evaluation of Feed Resources, and Enhancement of Nutritional Value of Tannin-Rich Tree/Browse Leaves and Agroindustrial Byproducts. Animal Production dan Health Section, Joint FAO/IAEA Division. Vienna. (2002)
3. **BAKSHI MPS, SINGH MP, WADHWA M,** Evaluation of Forest Grasses as Livestock Feed. Livestock Research for Rural Development 17 (11). (2005).
4. **MAKKAR HPS..** Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. (2003)
5. **MAKKAR HPS..** Effects and Fate of Tannins in Ruminant Animals, Adaptation to Tannins, and Strategies to Overcome Detrimental Effect of Feeding Tannin-rich Feeds. Small Ruminant Research 49, Elsevier Science B.V. (2003) 241-256.
6. **ANNISON EF DAN BRYDEN WL.** Perspectives on Ruminant Nutrition and Metabolism. Nutrition Research Reviews, 11, 173-198. Department of Animal Science, University of Sydney. Camden. (1998).
7. **SUGORO I, GOBEL I, LELANINGTYAS N.,.** Pengaruh Variasi Konsentrasi Tanin terhadap Produksi Gas secara In Vitro. Prosiding APISORA-BATAN. Jakarta. (2004)
8. **SUGORO I.** Pengaruh Tanin Bahan-Bahan Penyusun Suplemen Pakan dan Beberapa Pakan Hijauan terhadap Produksi Gas secara In Vitro. Jurnal Persada Vol. II. BATAN. Bogor. (2005)
9. **MENKE KH, RAAB L, SALEWSKI A.** The Estimation of the Digestibility and Metabolizable Energy Content of Ruminant Feedstuffs from the Gas Production When They Are Incubated with Rumen Liquor *in vitro*. J. Agric. Sci. Cambridge (92): 217-222. (1979)
10. **OGIMOTO K DAN IMAI S.** Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. (1981)
11. **COWAN MM.** Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology. (1999). p. 564-582.

- 
12. **BEN SALEM H, NEFZAOUI A, BEN SALEM L.,** Effect of *Acacia cyanophylla* Lidl. Foliage Supply on Intake and Digestion by Sheep Fed Lucerne Hay-based diets. INRA de Tunisie. Laboratoire de Nutrition Animale. Ariana. (1996).
  13. **FRANZOLIN R DAN DEHORITY BA.** Effect of Prolong ed High-Concentrate Feeding on Ruminal Protozoa Concentration. J. Anim. Sci. 74:2803-2809. (1996).