# NAURA RAHMI WICAKSONO 16820052

by yosadiprakoso 1

**Submission date:** 04-Nov-2020 10:01PM (UTC-0500)

**Submission ID:** 1368048022

File name: NAURA\_RAHMI\_WICAKSONO\_16820052.docx (1.99M)

Word count: 7571

Character count: 47621

#### KAJIAN HISTOMORFOLOGI LEUM DAN HEPAR AYAM PEDAGING RAS DENGAN PEMBERIAN FITASE ASAL L. plantarum A1-E DAN C. tropicalis TKd-3

#### Naura Rahmi Wicaksono



Penelitian ini bertujuan untak mengetahui histomorfologi ileum dan hepar ayam pedaging dengan pemberian fitase asal L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-351 enelitian ini menggunakan 140 ekor day old chicken ayam pedaging ras Cobb yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan dan 15 ulangan. Masing-masing kelompok diberi perlakuan pakan basal tanpa fitase (FA/kontrol negatif), pakan basal dengan fitase asal L. plantarum A1-E (FB), pakan basal dengan fitase asal C. tropicalis TKd-3 (FC), dan pakan basal dengan fitase komersial microtech® (FD/kelompok pembanding). Pemberian fitase dilakukan dengan cara dicampurkan dengan pakan basal, dimulai pada hari ke tujuh sampai ke-28, kemudian dilakukan nekropsi untuk pengambilan sampel organ ileum dan hepar. Sampel organ selanjutnya melalui proses pembuatan preparat histopatologi untuk kemudian dilakukan pengamatan terhadap luas area vili ileum serta perubahan histopatologi degenerasi melemak dan nekrosis pada hepar. Data kuantitatif luas area vili ileum yang diperoleh dianalisis menggunakan uji ANOVA, sedangkan data semi-kuantitatif degenerasi melemak dan nekrosis pada hepar dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis. Hasil analisis statistik dengaran ji ANOVA terhadap luas area vili ileum menunjukkan nilai signifikansi berbeda nyata (P<0,05). Hasil analisis statistik dengan uji Kruskal-Wallis terhadap perubahan histopato i hepar menunjukkan nilai signifikansi degenerasi melemak dan nekrosis tida berbeda nyata (P>0,05). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian fitase asal L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 dapat menambah luas area vili ileum serta tidak menyebabkan degenerasi melemak dan nekrosis pada hepar ayam pedaging.

**Kata Kunci**; Ayam pedaging, C. tropicalis, Fitase, L. plantarum

# STUDY OF ILEUM HISTOMORPHOLOGY AND LIVER FEEDING BY L. plantarum A1-E AND C. tropicalis TKd-3 MICROBIAL PHYTASE IN BROILER CHICKEN

#### Naura Rahmi Wicaksono



This research aimed to determine the effects of dietary microbial phytase from  $\overline{L}$ . plantarum A1-E and C. tropicalis TKd-3 in feed on histomorphology of ileum and liver in broiler chicken. This study used 140 day old chicken Cobb broilers divided into four equal groups with 15 replications in each group given basal feed (FA/negative control), basal feed with phytase from L. plantarum A1-E (FB), basal feed with phytase from C. tropicalis TKd-3 (FC), and basal feed with commercial phytase microtech® (FD/comparison group). The treatment was given by mixing the dietary microbial phytase with basal feed started on day seven until day 28 then carried out to the necropsy for ileum and liver organ sampling. Those samples were made to be histopathological slides to examine the ileum villus surface area and histopathological alteration fatty degeneration and necrosis in liver. The quantitative data of ileum villus surface area obtained analyzed with ANOVA test, while semi-quantitative data of fatty degeration and necrosis in liver analyzed with Kruskall-Wallis test. The result of statistical analysis with ANOVA test 58 howed that there were significant differences in ileum villus surface a (P<0,05). The results of statistical analysis with Kruskal-Wallis test showed that there were no significant differences (P>0,05) in both fatty degeneration and necrosis in broiler chicker liver. The result of this research indicates that dietary microbial phytase from  $\overline{L}$ . plantarum A1-E and C. tropicalis TKd-3 in feed improves ileum villus surface area, and also does not induce histopathological alteration fatty degeneration and necrosis in broiler chicken liver.

**Keywords**: Broiler chicken, *C. tropicalis*, *L. plantarum*, Phytase



#### 1.1 Latar Belakang

Potensi negara Indonesia yang memiliki keanekaragaman biodiversitas, yaitu tumbuhan, hewan, dan mikroba yang sangat luas mendukung penggunaan mikroba sebagai sumber bahan baku bioaditif pakan ternak (Fatmawati, 2015). Pengembangan bioaditif pakan berbasis mikroba penghasil senyawa fungsional tertentu banyak dikembangkan karena memiliki manfaat tersendiri, antara lain mendukung keamanan pangan hewani dari adanya cemaran dan residu yang berbahaya bagi konsumen, resistensi bakteri tertentu serta isu lingkungan. Bioaditif pakan ternak yang diberikan juga dapat meningkatkan performa sistem pencernaan dan metabolisme ternak (Akhadiarto, 2010).

Kecepatan pertumbuhan unggas dapat ditingkatkan, salah satunya melalui peningkatan kualitas dan efisiensi pakan sehingga produktivitas dan kualitas ternak dapat tercapai. Menurut El-Hack, et al. (2018), dalam rangka peningkatan efisiensi pakan melalui optimalisasi penyerapan mineral dan nutrisi yang tersedia dari pakan, salah satu usaha yang dilakukan adalah dengan penambahan fitase yang berasal dari mikroba, misalnya adalah Bakteri Asam Laktat (BAL).

Kemampuan sistem pencernaan unggas dalam mendegradasi fitat menjadi fosfor inorganik memiliki efektivitas sangat rendah sehingga penambahan enzim fitase sebagai bioaditif diharapkan dapat meningkatkan penyerapan fosfor dan

kalsium yang merupakan mineral utama yang dibutuhkan oleh unggas untuk tumbuh dan berkembang (Anastasio, et al., 2010; Morgan, 2014).

Aktivitas fitase ekstraseluler dari beberapa BAL yang diisolasi dari berbagai sumber telah dilaporkan (Anastasio, et al., 2010). Isolat BAL L. plantarum A1-E yang berasal dari usus halus ayam kampung telah diketahui mampu menghasilkan fitase secara in vitro. Aktivitas fitase juga ditemukan pada isolat khamir C. tropicalis TKd-3 yang diperoleh dari makanan tradisional yang telah terfermentasi (Istiqomah et al., 2015). Pengujian in vivo terhadap aktivitas fitase kedua mikroba tersebut dilakukan dengan metode purifikasi parsial enzim yang selanjutnya digunakan sebagai bioaditif pakan ternak (Bhargav, et al., 2008).

Menurut Bao, *et al.* (2010), ileum merupakan organ yang berperan dalam penyerapan mineral, sedangkan menurut Zaefarian, *et al.* (2019), hepar merupakan organ yang memiliki peranan penting dalam sistem pencernaan dan metabolisme kimiawi lemak, karbohidrat, protein, vitamin serta mineral dalam tubuh. Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih dalam mengenai pengaruh pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 terhadap gambaran histomorfologi ileum dan hepar pada ayam pedaging.

#### 1.2 Rumusan Masalah

- 1. Apakah pemberian fitase asal L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 sebagai bioaditif memiliki pengaruh terhadap luas area vili ileum ayam pedaging?
- 2. Apakah pemberian fitase asal L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 sebagai bioaditif memiliki pengaruh terhadap gambaran histopatologi degenerasi melemak pada hepar ayam pedaging?
- 3. Apakah pemberian fitase asal L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 sebagai bioaditif memiliki pengaruh terhadap gambaran histopatologi nekrosis pada hepar ayam pedaging?

#### 1.3 Tujuan Penelitian

- 1. Menganalisis pengaruh pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C*. *tropicalis* TKd-3 terhadap luas area vili ileum pada ayam pedaging.
- Menganalisis pengaruh pemberian fitase asal L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 terhadap adanya gambaran histopatologis degenerasi melemak pada hepar ayam pedaging.
- Menganalisis pengaruh pemberian fitase asal L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 terhadap adanya gambaran histopatologis nekrosis pada hepar ayam pedaging.

#### 1.4 Hipotesis

- H-0: Pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 tidak menambah luas area vili ileum serta tidak menyebabkan terjadinya degenerasi melemak dan nekrosis pada hepar ayam pedaging.
- H-1: Pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 menambah luas area vili ileum serta menyebabkan terjadinya degenerasi melemak dan nekrosis pada hepar ayam pedaging.

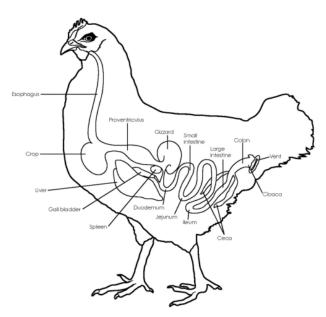
## 1.5 Manfaat Hasil Penelitian

- Hasil penelitian dapat memberikan informasi tentang pemberian fitase asal
   L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 sebagai bioaditif pakan ayam pedaging.
- Hasil penelitian dapat dijadikan referensi dalam pemilihan bioaditif pakan ayam pedaging.
- Hasil penelitian dapat digunakan sebagai rekomendasi penelitian-penelitian yang akan datang (keberlanjutan penelitian).

## II. TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Saluran Pencernaan Ayam

Saluran pencernaan hewan apa pun, termasuk ayam memiliki peran yang sangat penting dalam mengubah makanan yang dikonsumsi menjadi nutrisi yang dibutuhkan untuk menjaga kesimbangan metabolisme, pertumbuhan, perkembangan, serta produksi, baik daging mau pun telur. Makanan harus dipecah menjadi molekul yang lebih kecil agar dapat diserap oleh tubuh, yaitu melalui proses mekanik dan kimia yang berlangsung dalam saluran pencernaan (Jacob and Pescatore, 2013).



Gambar 2.1 Saluran Pencernaan Ayam Pedaging (Clavijo and Florez, 2017)

#### 2.1.1 Oropharynx

Bagian mulut pada ayam disebut *oropharynx* (mulut dan faring), merupakan kombinasi rongga memanjang dari paruh ke esofagus. Ayam tidak memiliki gigi pada rongga mulut. Glandula saliva berkembang dengan baik, namun hanya sedikit mengandung amilase. Saliva berfungsi melembabkan makanan sehingga lebih mudah untuk ditelan (Reece, 2015).

#### 2.1.2 Esofagus dan Crop atau Tembolok

Organ saluran pencernaan tepat setelah *oropharynx* adalah esofagus yang terdiri dari regio *cervicalis* dan *thoracalis*. Esofagus pada ayam berbentuk lebar dan lentur, dilengkapi dengan kelenjar mukus, berfungsi memudahkan penyaluran makanan yang tidak melalui proses mastikasi sebelumnya. *Crop* atau tembolok merupakan bagian dari esofagus tepatnya di perbatasan antara regio *cervicalis* dan *thoracalis* yang mengalami pelebaran seperti kantung, berfungsi sebagai tempat penyimpanan makanan sebelum masuk ke lambung (Reece, 2015).

#### 2.1.3 Lambung

Ayam dan golongan avian lainnya memiliki dua buah lambung, yaitu proventriculus dan ventrikulus/gizzard. Proventriculus berhubungan langsung dengan esofagus dan merupakan lambung sejati yang berfungsi sebagai pencernaan secara kimiawi dengan bantuan enzim dan asam klorida. Berbeda dengan proventriculus, ventrikulus/gizzard tersusun atas otot-otot polos tebal dan tipis, berfungsi sebagai pencernaan mekanis yang dibantu oleh adanya grit. Grit

adalah bebatuan kecil (kerikil) yang membantu mencerna makanan di dalam ventrikulus (Reece, 2015).

#### 2.1.4 Usus Halus

Usus halus terbagi menjadi tiga bagian, yaitu duodenum (bagian atas), jejunum, dan ileum (bagian bawah). Duodenum terletak di *caudal* ventrikulus dan mempunyai bentuk khas, yaitu lengkungan. Duodenum menerima enzim dan empedu dari pankreas dan hepar untuk mencerna protein, lemak serta vitamin larut lemak (vitamin A,D, E, dan K) yang selanjutnya melalui proses absorbsi di usus halus bagian bawah. Meskipun cukup sulit untuk dibedakan antara jejunum dan ileum, terdapat divertikulum meckel di ujung akhir jejunum sehingga dapat diketahui batas antara jejunum dan ileum. Divertikulum meckel merupakan residu dari kantung kuning telur yang terdapat pada embrio ayam (Jacob *and* Pestacore, 2013).

Menurut Svihus (2014), bagian usus halus yang memiliki peran paling besar dalam penyerapan nutrisi (lemak, protein dan karbohidrat) adalah jejunum. Hampir sama dengan jejunum, ileum juga memiliki peran dalam penyerapan lemak, protein dan karbohidrat, namun ileum memiliki peran utama tersendiri, yaitu penyerapan air dam mineral. Ileum merupakan segmen terakhir pada usus halus yang berhubungan langsung dengan usus besar (*caecum*) dengan perbatasan yang disebut *ileo-ceco-colic-junction*.

#### 2.1.5 Caecum, Colon atau Usus Besar dan Cloaca

Caecum berjumlah satu pasang, merupakan saluran buntu (seperti kantung) yang terletak di perbatasan antara usus halus dan usus besar. Caecum berfungsi dalam penyerapan air serta fermentasi terhadap sisa makanan yang akan menjadi feses (Jacob and Pestacore, 2013). Colon atau usus besar pada ayam berukuran relatif pendek, berperan dalam penyerapan air pada feses terakhir kali, sebelum dieliminasi keluar tubuh melalui cloaca. Cloaca merupakan muara dari tiga saluran, yaitu usus besar (coprodeum) yang terletak paling cranial, diikuti oleh saluran urin (urodeum), dan saluran reproduksi (proctodeum) (Reece, 2015).

#### 2.1.6 Organ Asesoris Saluran Pencernaan (Kelenjar Pankreas dan Hepar)

Kelenjar pankreas terletak pada bagian tengah lengkungan duodenum. Kelenjar pankreas memiliki tiga saluran atau duktus pankreatik yang berfungsi menyalurkan enzim menuju duodenum. Hepar pada ayam terdiri dari dua lobus, yaitu lobus kanan dan lobus kiri. Hepar memiliki dua duktus atau saluran yang berfungsi menyalurkan empedu menuju duodenum. Duktus yang pertama berhubungan dengan kantung empedu, sedangkan duktus yang kedua berhubungan dengan bagian distal duodenum, berdekatan dengan duktus pankreatik (Reece, 2015).

#### 2.2 Kebutuhan Mineral Ayam Pedaging

Penelitian yang dilakukan terhadap kebutuhan mineral dan vitamin ayam pedaging umumnya disesuaikan dengan kondisi di lapangan berdasarkan nilai ekonomis dan kejadian kasus defisiensi mineral pada ayam. Sebagian besar

penelitian yang dilakukan adalah mengenai kebutuhan mineral makro seperti kalsium dan fosfor, sebaliknya hanya sedikit penelitian mengenai mineral mikro. Hal tersebut dikarenakan jumlah mineral mikro seperti potasium, magnesium dan zat besi pada pakan komersial yang diberikan cenderung telah memenuhi kebutuhan mineral mikro ayam pedaging pada umumnya (Sell, *et al.*, 1994).

Kalsium adalah mineral yang paling dibutuhkan ayam pedaging dalam jumlah banyak karena memiliki peran penting dalam berbagai proses metabolisme tubuh. Peran kalsium paling utama adalah dalam pembentukan dan pertumbuhan tulang. Hidrolisis protein, polisakarida, dan fosfolipid juga membutuhkan kalsium yang membantu melepaskan ikatan antara protein-protein dan protein-fosfolipid. Kalsium juga berperan dalam proses pembekuan darah dan komunikasi antar sel (Morgan, 2014).

Mineral makro yang dibutuhkan dalam jumlah banyak oleh ayam pedaging setelah kalsium adalah fosfor. Fosfor pada ayam pedaging disebut dengan istilah nonfitat-P. Mirip dengan kalsium, fosfor terlibat dalam berbagai proses metabolisme. Fosfor merupakan kunci utama dalam proses pertumbuhan, perkembangan serta mineralisasi tulang. Hal tersebut menunjukkan bahwa fosfor sangat dibutuhkan terutama ketika ayam dalam masa tumbuh kembang. Fosfor juga berperan penting dalam proses metabolisme lemak, karbohidrat, serta regulasi keseimbangan asam basa dalam tubuh ayam pedaging (Sell, et al., 1994; Van Krimpen, et al., 2016).

#### 2.3 Fitat dan Asam Fitat

Asam fitat (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis dihydrogen phosphate; IP6) atau fitat (bentuk garam) merupakan bentuk simpanan dari fosfor pada jaringan tumbuhan seperti gandum/sereal dan tanaman leguminosa (Reddy *and* Sathe, 2002). Fitat merupakan 1-1.5% dari bobot serta 60-80% dari total fosfor pada bijibijian (Lei, *et al.*, 2013). Jumlah fitat yang terkandung dalam gandum bervariasi, yaitu antara 0.5 - 2% (Coulibaly, *et al.*, 2011). Fitat teridentifikasi sebagai senyawa antinutrisi yang dapat berikatan dengan protein dan kation mineral seperti Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> dan Zn<sup>2+</sup> sehingga dapat menyebabkan penyerapan nutrisi pada saluran pencernaan hewan terhambat (Amritha *and* Venkateswaran, 2017; Raghavendra *and* Halami, 2009).

Gambar 2.2 Struktur Asam Fitat (Dersjant-Li, et al., 2014)

Istilah fitat dan asam fitat umumnya dianggap sama karena fitat merupakan campuran dari garam kation asam fitat. Sebagian besar fosfor yang terkandung dalam biji-bijian gandum dan minyak sayur berikatan dengan struktur asam fitat (Viveros, *et al.*, 2002 dalam Morgan, 2014). Fitat yang berikatan dengan fosfor

disebut dengan fitat-P, sebaliknya fosfor yang tidak berikatan dengan asam fitat disebut dengan *non*fitat-P. *Myo*-inositol paling sering ditemukan sebagai komponen fitat, namun juga dapat ditemukan pada pakan hewan monogastrik dalam bentuk molekul bebas dan atau inositol yang mengandung fosfolipid (Cowieson, *et al.*, 2011).

Degradasi fitat terjadi dalam saluran gastrointestinal, sebelum akhirnya melalui proses absorbsi di usus. Fitat harus dihidrolisis menjadi inositol dan fosfat inorganik di dalam saluran pencernaan unggas agar dapat dimetabolisir oleh tubuh (Van Krimpen, et al., 2016). Hewan monogastrik, termasuk unggas dan manusia tidak memiliki kemampuan metabolisme yang cukup baik untuk mencerna fitat karena keterbatasan aktivitas enzim pendegradasi fitat yang ada dalam saluran pencernaan (El-Hack, et al., 2018; Gupta, et al., 2013).

#### 2.4 Fitase

Fitase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) adalah enzim yang bekerja menghidrolisis fitat yang ada dalam saluran pencernaan menjadi fosfat inorganik dan inositol. Fitase secara bertahap melepaskan ikatan antara fosfor dengan fitat atau asam fitat (Wyss, et al., 1999; Yu, et al., 2012). Berdasarkan Van Krimpen, et al. (2016), aktivitas fitase dapat ditemukan hampir di sepanjang saluran pencernaan, di antaranya tembolok, lambung, usus halus dan caecum. Aktivitas fitase dalam saluran gastrointestinal dapat diperoleh dari mukosa usus serta flora normal yang ada di dalam saluran tersebut.

Kemampuan hewan monogastrik dalam mencerna fitat sangat lemah, seperti yang dikemukakan oleh Cowieson, *et al.* (2006), fitat-P yang dicerna oleh unggas hanya mencapai kurang dari 10%. Hal tersebut disebabkan oleh fitase endogen yang kurang efektif bekerja dalam melepas ikatan fosfat dari lingkaran inositol fitat, yang disertai adanya interaksi dengan protein dan mineral lain yang terdapat dalam saluran pencernaan hewan monogastrik.

Berdasarkan El-Hack, *et al.* (2018), penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penambahan fitase sebagai aditif pakan pada hewan monogastrik dapat meningkatkan daya cerna terhadap fitat. Fitase yang dinilai cukup efektif adalah mikrobial fitase. Fitase memiliki kemampuan melepaskan ikatan antara fosfor dan fitat, juga dapat meningkatkan bioavailabilitas fosfor dalam pakan ternak, namun kemampuan tersebut tetap tergantung konsumsi mineral yang terkandung dalam pakan, terutama kalsium dan fosfor.

Secara umum fitase dapat ditemukan di alam dan diperoleh dari berbagai sumber, yaitu tumbuhan, hewan serta mikroorganisme seperti bakteri asam laktat dan *yeast*. Berbagai penelitian telah dilakukan terhadap sumber-sumber tersebut. Jika dibandingkan, produksi fitase asal mikroba lebih banyak dikembangkan dari pada fitase asal tumbuhan. Produksi fitase asal tumbuhan dinilai kurang ekonomis karena harus melalui prosedur yang cukup rumit sehingga membutuhkan banyak waktu dan biaya (Sanberg *and* Andlid, 2002; Gupta, *et al.*, 2013).

Aktivitas mikrobial fitase yang diketahui paling menonjol adalah pada jamur atau fungi. Dari berbagai jamur Mycelia yang telah banyak diteliti,

golongan Aspergillus merupakan jamur yang telah diketahui memiliki aktivitas fitase dan diproduksi secara komersial. Aktivitas fitase secara konsisten juga ditemukan pada bakteri asam laktat, terutama dari genus Bacillus (Amritha and Venkateswaran, 2017; Wyss, et al., 1999). Menurut Dersjant-Li, et al. (2014), beberapa sumber fitase asal jamur dan bakteri yang telah tersedia di pasaran antara lain Aspergillus niger, Peniophora lycii, Escherichia coli, Critrobacter braakii dan Buttiauxella spp.

#### 2.5 Lactobacillus plantarum Sebagai Sumber Fitase

Lactobacillus merupakan bakteri Gram positif, microaerophilic dan tidak berspora. Lactobacillus yang memiliki sifat katalase negatif disebut dengan Bakteri Asam Laktat (BAL) (Lavilla-Lerma, et al., 2013; Moraes, et al., 2013). Bakteri tersebut dapat ditemukan sebagai flora normal saluran pencernaan ayam, di antaranya pada tembolok atau crop, lambung dan usus halus (McVey, et al., 2013). Penelitian yang pernah dilakukan terhadap Bakteri Asam Laktat (BAL) menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki potensi sebagai probiotik, yaitu apabila diberikan sebagai aditif dalam jumlah tertentu dapat memberikan manfaat kesehatan bagi host (Koztamanidis, et al., 2010; Martin, et al., 2008).

Berdasarkan penelitian terhadap beberapa strain *Lactobacillus* oleh Carrizo, *et al.* (2016) diperoleh hasil bahwa terdapat aktivitas fitase pada *Lactobacillus*, salah satunya yaitu *L. plantarum* yang memproduksi 579 U fitase/mL. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya oleh Anastasio, *et al.*,

(2010), yaitu terdapat aktivitas fitase pada *L. plantarum* H5 yang memproduksi 710 U fitase/mL.

#### 2.6 Candida tropicalis Sebagai Sumber Fitase

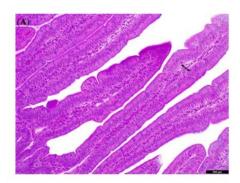
Candida merupakan jamur yang memiliki sifat oportunis, yaitu secara normal ada pada bagian tubuh seperti kulit atau mukosa, namun dapat menjadi patogen ketika imun *host* dalam keadaan lemah (Haynes, 2001). Meskipun memiliki sifat patogen, berdasarkan penelitian Ogunremi, *et al.* (2015), *Candida* dengan spesies *C. tropicalis* BOM21 diketahui memiliki kemampuan untuk memproduksi fitase yang dapat dimanfaatkan sebagai mikrobial probiotik.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Tsang (2011), menunjukkan bahwa beberapa spesies *Candida* yang diteliti, di antaranya *C. albicans, C. dubliniensis, C. glabrata, C. guilliermondii, C. kefyr, C. krusei, C. parapsilosis* dan *C. tropicalis* dapat memproduksi fitase dengan jumlah yang berbeda pada masing-masing spesies.

#### 2.7 Histologi Intestinum

Evaluasi terbaik untuk organ intestinum secara mikroskopik dilakukan menggunakan potongan atau irisan longitudinal karena dapat menghasilkan area pandang yang lebih luas untuk diamati dibandingkan dengan potongan transversal. Perbedaan duodenum, jejunum dan ileum secara histologis cukup sulit utuk dibedakan. Semakin jauh dari lambung semakin pendek dan lebar vili, serta kedalaman kripta semakin berkurang. Pernyataan tersebut menunjukkan bahwa duodenum memiliki vili paling panjang (Abdul-Aziz, et al., 2016).

Pola perubahan histopatologi pada saluran intestinum sangat perlu diperhatikan untuk menentukan apakah lesi utama terletak pada area epitelium vili atau pada epitelium kripta. Bentuk vili pada golongan unggas lebih cenderung elipsoidal daripada silindris. Edema, hemoragi, infiltrasi sel radang (heterofil dan atau eosinofil) serta hiperplasia sel limfoid merupakan lesi yang dapat menyebabkan penebalan lamina propria sehingga mengakibatkan meningkatnya lebar vili serta menebalnya lapisan mukosa (Abdul-Aziz, *et al.*, 2016).



Gambar 2.3 Histologi Ileum Ayam Pedaging (Belote, et al., 2018).

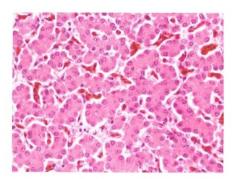
Secara normal lamina propria vili ayam tidak memiliki *central lacteal*, yaitu pembuluh kapiler limfatik yang berfungsi dalam absorbsi lemak. Semakin ke *caudal*, tinggi vili serta kedalaman kripta akan semakin berkurang, seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.3 (Reece, 2015; Randall *and* Reece, 1996).

#### 2.8 Toksisitas Fosfor Terhadap Hepar

Jika agen bersifat toksik yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan dan mampu bertahan melewati reaksi kimia dalam lambung dan mencapai usus halus maka agen toksik akan melalui proses absorbsi kemudian

disalurkan menuju hepar melalui vena porta hepatika. Meskipun proses metabolisme terbesar dalam hepar adalah reaksi detoksifikasi, namun juga terdapat banyak reaksi oksidatif yang dapat memicu terjadinya lesi pada hepar (Hodgson, 2004).

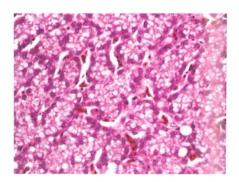
Fosfor merupakan salah satu mineral yang juga dapat bersifat toksik bagi hepar. Setelah melalui proses absorbsi pada saluran gastrointestinal, di dalam darah fosfor mengalami proses oksidasi menjadi fosfat. Lesi pada hepar yang timbul akibat paparan fosfor adalah degenerasi melemak (Beasley *and* Poppenga, 1999). Menurut Hodgson, (2004), selain degenerasi melemak, fosfor juga menyebabkan nekrosis pada hepar.



**Gambar 2.4** Histologi Hepar Ayam Pedaging Usia 35 Hari (Abdul-Aziz, *et al.*, 2016)

#### 2.8.1 Degenerasi Melemak

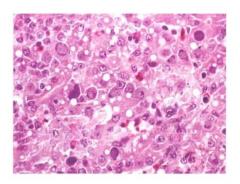
Degenerasi melemak adalah akumulasi dari globulus-globulus trigliserida dan metabolit lemak lain yang berlebihan di dalam sitoplasma hepatosit. Secara umum degenerasi melemak juga dapat disebut dengan istilah *fatty liver*, lipidosis hepatik atau steatosis hepatik. Keadaan tersebut dapat terjadi karena lemak pada jaringan larut oleh parafin ketika proses pembuatan preparat, yaitu *embedding* berlangsung sehingga vakuola lipid tampak sebagai ruang kosong pada sitoplasma hepatosit (Szende *and* Suba, 1999).



**Gambar 2.5** Histopatologi Degenerasi Melemak pada Hepar Ayam Pedaging Usia 3 Hari (Abdul-Aziz, *et al.*, 2016)

#### 2.8.2 Nekrosis

Nekrosis pada sel adalah proses degenerasi yang berujung pada terjadinya kematian sel. Nekrosis umumnya merupakan lesi akut, dapat terjadi secara focal (terlokalisir di tempat tertentu dan hanya sedikit hepatosit yang terlibat) atau masif (terjadi hampir pada keseluruhan lobus). Kematian sel terjadi bersamaan dengan rupturnya membran plasma yang sebelumnya didahului oleh berbagai perubahan morfologi sel, antara lain edema sitoplasma, dilatasi retikulum endoplasma, disagregasi polysom, akumulasi trigliserida, kebengkakan mitokondria serta hancurnya organel dan nukleus (Hodgson, 2004).



**Gambar 2.6** Histopatologi Nekrosis Focal pada Hepar Ayam Pedaging Usia 21 Hari yang Mengalami Hepatitis disertai Badan Inklusi (Abdul-Aziz, *et al.*, 2016).

#### 2.9 Standar Nasional Indonesia (SNI) Formulasi Pakan Ayam Pedaging

Berdasarkan SNI (2015), pakan adalah bahan makanan tunggal atau campuran, baik yang diolah mau pun yang tidak diolah, yang diberikan kepada hewan untuk kelangsungan hidup, berproduksi, dan berkembang biak, sedangkan bahan pakan adalah bahan hasil pertanian, perikanan, peternakan, atau bahan lainnya yang layak dipergunakan sebagai pakan, baik yang telah diolah, mau pun belum diolah. Formulasi pakan ayam pedaging s*tarter* dan *finisher* sesuai dengan SNI (2015) dapat dilihat pada tabel 1.1

Tabel 1.1 Formulasi Pakan Ayam Pedaging Starter dan Finisher

No.	Nama Bahan	Prosentase (%)	
		Pakan Starter	Pakan Finisher
1	Jagung kuning	55.07	55.22
2	Dedak	3.00	4.00
3	Bungkil Kedelai (SBM)	34.88	32.27
4	Tepung Ikan	1.11	2.00
5	Crude Palm Oil (CPO)	2.21	3.43
6	L-Lysine	0.64	0.44
7	L-Methionine	0.35	0.29
8	Limestone	1.10	1.01
9	DCP (18%)	1.53	1.25
10	Premix poultry	0.10	0.10
Total		100.00	100.00

#### 9 III. MATERI DAN METODE

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dalam penelitian ini dilaksanakan di laboratorium hewan coba Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Pembuatan preparat histopatologi organ dilakukan di laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Analisis preparat histopatologi organ dilakukan di laboratorium Patologi Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan pada periode 2 September 2019 hingga 30 Juni 2020.

#### 3.2 Materi Penelitian

#### 3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: kandang sistem tertutup (closed house) yang dilengkapi alat penunjang seperti sistem pendingin, kipas, termohigrometer, lampu wolfram 60-W, dan pemanas gas (brooder), kandang pengujian (panggung) berukuran 100 x 100 x 80 cm sebanyak 20 unit, tempat pakan kapasitas 5 kg sebanyak 20 buah, tempat air minum volume 4 liter sebanyak 20 buah, alat bedah (gunting bedah, skalpel, pinset, gloves, masker), tabung sampel/kontainer organ 60 buah, serta alat untuk pembuatan preparat histopatologi (embedding cassette, automatic tissue processor machine, mikrotom, waterbath, slide/object glass, cover glass, rak slide staining, slide staining jars with lids, mikroskop Olympus BX 51.

#### 12 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Day Old Chicken* (DOC) ayam pedaging komersial *strain Cobb* sejumlah 140 ekor, fitase asal bakteri asam laktat *L. plantarum* A1-E 500 FTU/kg, fitase asal *yeast C. tropicalis* TKd-3 500 FTU/kg, fitase komersial (Microtech®) 500 FTU/kg, pakan ayam pedaging periode *starter* (umur 1-14 hari) dan periode *finisher* (umur 15-35 hari), serta vaksin ND-IB, IBD dan ND Lasota.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bahan kimia untuk pembuatan preparat histopatologi, meliputi: *buffer neutral formalin* 10%, formalin 4%, alkohol (80%, 95%, absolut), larutan xylene, paraffin, dan *hematoxylin-eosin* (HE) sebagai bahan kimia untuk pewarnaan.

#### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan 140 ekor DOC ayam pedaging. Ayam pedaging dibagi menjadi 4 kelompok dan masing-masing kelompok mendapatkan perlakuan yang berbeda. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 15 ekor per kelompok perlakuan, sesuai dengan metode Gomez dan Gomez (2007), yaitu tiap satuan percobaan menggunakan ≥ 6 individu sampel. Perhitungan jumlah unit pengulangan (n) sebagai berikut (Gomez dan Gomez, 2007):

$$(t-1)(n-1) \ge 6$$

$$(t-1)(n-1) \ge 6$$

$$(4-1)(n-1) \ge 6$$

$$3(n-1) \ge 6$$

$$3n \geq \, 6 {+} 3$$

$$3n \geq 9$$

$$n \geq \, 3$$

 $Keterangan: \quad t = \sum perlakuan$ 

 $n = \sum unit pengulangan$ 

## 3.3.2 Rancangan Penelitian

Desain penelitian menggunakan bentuk Rancangan Acak Lengkap (RAL)

dengan teknik pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan 4 perlakuan.

Rincian perlakuan yang diberikan, antara lain:

- 1. Kelompok kontrol negatif (FA): pakan basal tanpa fitase
- Kelompok perlakuan 1 (FB): pakan basal + fitase asal L. plantarum A1-E
   (500 FTU/kg)
- Kelompok perlakuan 2 (FC): pakan basal + fitase asal C. tropicalis TKd-3 (500 FTU/kg)
- 4. Kelompok pembanding (FD): pakan basal + fitase komersial (microtech®) (500 FTU/kg)

### 3.3.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah fitase asal *L. plantarum* A1-E, fitase asal *C. tropicalis* TKd-3 dan fitase komersial. Variabel terikat adalah gambaran histopatologis adanya degenerasi melemak dan nekrosis pada hepar, serta luas area vili pada ileum.

#### 3.3.4 Pengambilan Sampel

Sampel untuk analisa histopatologi diperoleh dengan cara nekropsi 15 ekor ayam yang diambil secara acak dari setiap kelompok perlakuan pada umur pemeliharaan 28 hari. Sebelum dinekropsi, ayam melalui proses *euthanasia* terlebih dahulu dengan cara dekapitasi. Spesimen organ hepar dan ileum diambil dengan cara digunting 3-4 cm kemudian difiksasi menggunakan *buffer neutral formalin* 10% dalam kontainer organ serta diberi label kode sampel. Selanjutnya sampel akan melalui proses pembuatan preparat histopatologi.

#### 3.3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.3.5.1 Pembuatan Fitase Asal L. plantarum A1-E

Proses pembuatan fitase asal *L. plantarum* A1-E dilakukan dengan metode fermentasi padat (*solid state fermentation*). Berdasarkan Mandviwala *and* Khire (2000) yang dimodifikasi sebanyak 30 g *Soy Bean Meal* (SBM) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambah akuades 30 mL digunakan sebagai media fermentasi. Selanjutnya media SBM disterilisasi dengan *autoclave* pada 121°C selama 40 menit. Setelah sterilisasi, media didinginkan. Selanjutnya

10% suspensi isolat cair *L. plantarum* A1-E diinokulasikan kedalam media SBM, kemudian dihomogenkan dengan pengaduk kaca dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, SBM yang telah diinokulasi ditambahkan dengan larutan 2% CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O sebanyak 150 ml (1:5), kemudian di*shaker* menggunakan *rotary shaker* pada kecepatan putaran 200 rpm selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah di*shaker*, SBM yang telah dinokulasi disaring menggunakan 2 lapis kain muslin. Filtrat hasil penyaringan selanjutnya dipisahkan menggunakan sentrifuse menggunakan *centrofriger* pada 4000 rpm, selama 30 menit, suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi dikoleksi sebagai enzim kasar fitase.

Enzim kasar hasil sentrifugasi dipresipitasi menggunakan ammonium sulfat 20 % secara bertahap hingga larut pada suhu 4°C dan kondisi *slow stirring*. Kemudian, didiamkan selama semalam pada suhu 4°C dengan kondisi *slow stirring*. Hasil presipitasi kemudian disentrifuse pada kecepatan 5000 rpm selama 60 menit. Endapan yang terbentuk selanjutnya diproses menjadi serbuk kering beku menggunakan *freezedry* dengan *setting pressure ice condenser* 0.068 dan *ice condenser temperature* (-49.5) °C selama 18-20 jam.

#### 3.3.5.2 Pembuatan Fitase Asal C. tropicalis TKd-3

Proses pembuatan fitase asal *C. tropicalis* TKd-3 dilakukan dengan dengan metode fermentasi padat (*solid state fermentation*) berdasarkan Mandviwala *and* Khire (2000) yang dimodifikasi. *Soy Bean Meal* (SBM) 57 sebanyak 30 g dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambah akuades 30 mL

digunakan sebagai media fermentasi. Selanjutnya media SBM disterilisasi dengan autoclave pada 121°C selama 40 menit. Setelah sterilisasi, media didinginkan. Selanjutnya 10% suspensi isolat cair *C. tropicalis* TKd-3 diinokulasikan kedalam media SBM, kemudian dihomogenkan dengan pengaduk kaca, dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Setelah inkubasi, SBM yang telah diinokulasi ditambahkan dengan larutan 2% CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O sebanyak 150 ml (1:5), kemudian dishaker menggunakan rotary shaker pada 200 rpm selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah dishaker, SBM yang telah dinokulasi disaring menggunakan 2 lapis kain muslin. Filtrat hasil penyaringan selanjutnya dipisahkan menggunakan sentrifuse menggunakan centrofriger pada 4000 rpm, selama 30 menit, suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi dikoleksi sebagai enzim kasar fitase.

Enzim kasar hasil sentrifugasi dipresipitasi menggunakan ammonium sulfat 40 % secara bertahap hingga larut pada suhu 4°C dan kondisi *slow stirring*. Kemudian, didiamkan selama semalam pada suhu 4°C dengan kondisi *slow stirring*. Hasil presipitasi kemudian disentrifuse pada kecepatan 5000 rpm, selama 60 menit. Endapan yang terbentuk selanjutnya diproses menjadi serbuk kering beku menggunakan *freezedry* dengan setting *pressure ice condenser* 0.068 dan *ice condenser temperature* (-49.5)°C selama 18-20 jam.

#### 3.3.5.3 Pengujian in vivo

Penelitian dilakukan di Laboratorium hewan coba Balai Penelitian

Teknologi Bahan Alam - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Gunung Kidul,

Daerah Istimewa Yogyakarta. Pengujian *in vivo* dilakukan dengan memberikan

perlakuan penambahan fitase yang dicampurkan dengan pakan. Perlakuan diberikan mulai usia ayam 7 - 28 hari. Adapun kelompok perlakuan pada peneltian ini adalah sebagai berikut: Kelompok kontrol negatif (FA) ayam diberi pakan tanpa tambahan fitase; Kelompok perlakuan 1 (FB) ayam diberi pakan dengan tambahan fitase asal *L. plantarum* A1-E (500 FTU/kg); Kelompok perlakuan 2 (FC) ayam diberi pakan dengan tambahan fitase asal *C. tropicalis* TKd-3 (500 FTU/kg); Kelompok pembanding (FD) ayam diberi pakan dengan tambahan fitase komersial (microtech<sup>®</sup>) (500 FTU/kg).

Pakan ayam terdiri dari pakan periode *starter* (umur 1-14 hari) dan *finisher* (umur 15-35 hari) menggunakan pakan formulasi sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI): SNI 01-3930-2006 (Pakan anak ayam ras pedaging) dan SNI 01-3930-2006 (Pakan ayam ras pedaging masa akhir). Pemberian pakan dan air minum diberikan secara ad libitum.

Kesehatan ayam juga dijaga dengan pemberian vaksin. Program vaksinasi yang diterapkan dalam percobaan ini terdiri dari vaksin ND-IB ketika ayam berumur 1 hari, vaksin IBD pada umur 11 hari, dan ND Lasota pada usia 18 hari. Semua jenis vaksin yang digunakan merupakan *live vaccine* dengan cara pemberian tetes di bagian mata ayam. Pada hari ke 28 masa pemeliharaan, 15 ekor ayam dari setiap kelompok perlakuan diambil secara acak. Selanjutnya ayam dinekropsi, dan dikoleksi sampel organ hepar dan ileum untuk dibuat preparat histopatologi. Pengamatan dilakukan terhadap luas area vili ileum serta gambaran degenerasi melemak dan nekrosis pada hepar ayam secara histopatologis.

#### 3.3.6 Pembuatan Preparat Histopatologi

Sampel untuk analisa histopatologi diperoleh dengan cara nekropsi 15 ekor ayam yang diambil secara acak dari setiap kelompok perlakuan pada umur pemeliharaan 28 hari. Sebelum dinekropsi, ayam melalui proses *euthanasia* terlebih dahulu dengan cara dekapitasi. Organ ileum dan hepar diambil dari setiap ekor ayam yang berasal dari setiap unit percobaan, kemudian difiksasi dalam kontainer organ yang berisi larutan *buffer neutral formalin* 10%. Selanjutnya organ melalui tahap preparasi, dimulai dengan proses *trimming*, yaitu melakukan pemotongan tipis jaringan setebal kurang lebih 4 mm dengan orientasi sesuai dengan organ yang akan dipotong. Jaringan tersebut dimasukkan dalam *embedding cassette* untuk melalui proses selanjutnya, yaitu *dehidrasi*.

Dehidrasi dilakukan menggunakan *tissue processor* untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti ethanol atau iso propil alkohol. Cairan dehidran ini kemudian dibersihkan dari dalam jaringan menggunakan reagen pembersih (*clearing agent*), misalnya xylene. Reagen pembersih kemudian diganti dengan paraffin yang akan penetrasi le dalam jaringan. Proses ini disebut impregnasi.

Jaringan yang berada di dalam *embedding cassette* selanjutnya dipindahkan ke dalam *base mold*, diisi dengan paraffin cair lalu dilekatkan pada balok kayu ukuran 3x3 cm. Jaringan yang sudah dilekatkan pada balok kayu disebut *blok*. Setelah itu blok melalui proses *cutting*, yaitu pemotongan menggunakan alat bantu mikrotom. Lembaran potongan jaringan yang diperoleh kemudian

diapungkan dengan meletakkan salah satu ujung potongan di atas permukaan air dalam waterbath lalu diambil menggunakan slide/object glass. Setelah lembaran jaringan melekat pada slide, selanjutnya melalui proses staining atau pewarnaan.

Teknik pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan Harris Hematoksilin-Eosin, dengan berturut-turut menggunakan larutan xylol, alkohol absolut, akuades, pewarna hematoksilin dan eosin, dan alkohol 96%. Setelah jaringan pada slide diwarnai, terakhir dilakukan *mounting* dengan cara meneteskan bahan *mounting* (DPX/Entelan/Canada Balsam) sesuai kebutuhan dan ditutup dengan *cover glass*. Gambaran histopatologi dievaluasi dengan melihat perubahan seluler yang diindikasikan dari perubahan patologi anatomi organ ayam tersebut secara mikroskopis menggunakan mikroskop Olympus BX 51 (Slaoui *and* Fiette, 2011).

#### 3.3.7 Analisis Hisopatologi

Analisis histomorfologi vili ileum menggunakan mikroskop Olympus BX 51 perbesaran 10x dengan aplikasi OptiLab Image Raster v2.1. Berdasarkan Sittiya and Yamauchi (2014), sebanyak dua vili dalam lamina propria dipilih secara acak. Kemudian tinggi vili diukur dari ujung (apex) sampai dasar perbatasan antara vili dan kripta, sedangkan untuk lebar vili diukur dengan ratarata lebar vili bagian apex dan lebar bagian basal vili. Tinggi vili ileum pada satu kelompok perlakuan diwakili oleh rata-rata tinggi vili dari 15 ekor ayam per kelompok perlakuan.

Menurut De los Santos, *et al.* (2005) perlu diukur luas area vili karena vili merupakan struktur berbentuk silindris. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut:

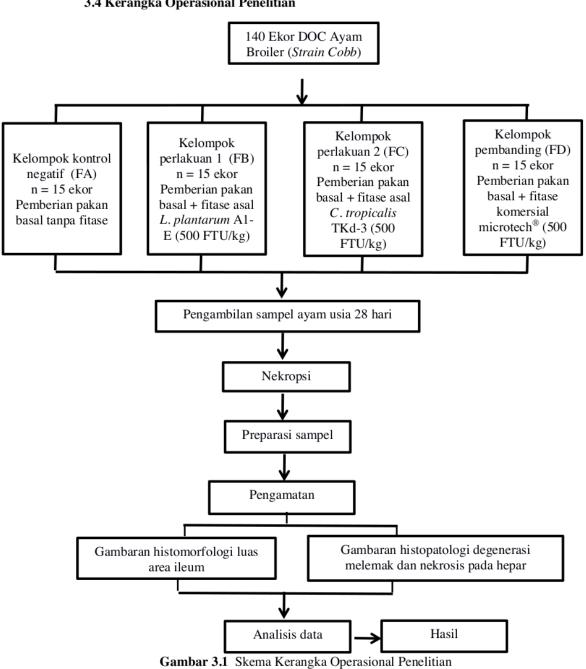
Luas permukaan vili = 
$$2\pi$$
 x (rata-rata lebar vili/2) x tinggi vili

Analisis histopatologi hepar menggunakan mikroskop Olympus BX 51 perbesaran 400x dengan metode semi kuantitatif, yaitu skoring terhadap adanya nekrosis dan degenerasi melemak. Berdasarkan Belote, *et al.* (2019) dan Keese, *et al.* (2016), kriteria skoring nekrosis dan degenerasi melemak sebagai berikut (Tabel 3.1):

Tabel 3.1 Sistem Skoring Nekrosis dan Degenerasi Melemak Histopatologi Hepar

Parameter	Skor	Keterangan ( LP : Lapang Pandang)	
Nekrosis	0	Tidak ditemukan lesi nekrosis	
	1	<25% LP	
	2	25,1%-50% LP	
	3	>50% LP	
Degenerasi melemak	0	Tidak ditemukan vakuola	
	1	< 5% dari LP	
	2	5% - 25% dari LP	
	3	25% - 50% dari LP	
	4	> 50% dari LP	

#### 3.4 Kerangka Operasional Penelitian



#### 3.5 Analisis Data

Data kuantitatif luas area ileum ayam pedaging diolah menggunakan uji ANOVA dengan signifikansi  $P \leq 0.05$  untuk mengetahui perbedaan pengaruh fitase dari L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 terhadap luas area vili ileum antar kelompok perlakuan. Pengolahan data tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer CoStat ver.6.4 (Sittiya and Yamauchi, 2014). Data semi kuantitatif hasil skoring perubahan histopatologi nekrosis dan degenerasi melemak pada hepar diolah menggunakan uji Kruskal-Wallis dengan signifikansi  $P \leq 0.05$  untuk membandingkan antar perlakuan dari masing-masing sampel. Pengolahan data tersebut menggunakan program komputer Statistical Package for Social Science (SPSS) 20 (Akrom, dkk., 2014).

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Penelitian

Data yang diperoleh dalam penelitian ini merupakan hasil pengamatan terhadap luas area vili ileum, serta perubahan histopatologi degenerasi melemak dan nekrosis pada hepar ayam pedaging ras *Cobb* usia 28 hari yang telah diberi perlakuan menggunakan fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3, masing-masing 500 FTU/kg pakan. Pengamatan histomorfologi ileum menggunakan mikroskop Olympus BX 51 perbesaran 10x, kemudian analisis lanjutan dilakukan menggunakan aplikasi Optilab Image Raster ver2.1. Data yang diperoleh kemudian diolah secara statistik dengan uji ANOVA menggunakan aplikasi CoStat ver.6.4. Pengamatan perubahan histopatologi hepar menggunakan mikroskop Olympus BX 51 perbesaran 400x dengan metode skoring. Data yang diperoleh merupakan data semi kuantitatif yang diolah secara statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis dengan aplikasi *Statistical Package for Social Science* (SPSS) 2.0.

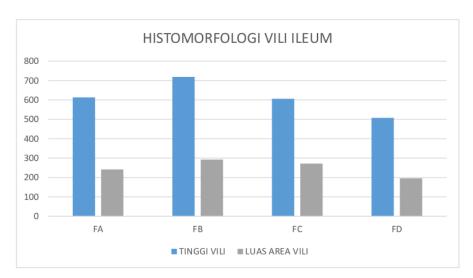
#### 4.1.1 Luas Area Vili Ileum

**Tabel 4.1** Rata-rata tinggi, lebar, dan luas area vili ileum ayam pedaging usia 28 hari.

Perlakuan	n	Tinggi vili ± SD (µm)	Lebar vili ± SD (μm)	Luas area vili ± SD (μm²)
FA	15	$612.61^{\text{b}} \pm 108.90$	$120.15^{a} \pm 36.07$	$241.34^{ab} \pm 33.76$
FB	15	718.60 <sup>a</sup> ± 163.39	123.50° ± 20.77	$292.30^{a} \pm 53.30$
FC	15	$605.79^{b} \pm 41.42$	129.99° ± 51.19	271.42 <sup>a</sup> ± 100.79
FD	15	$507.22^{b} \pm 64.53$	119.20° ± 30.47	195.31 <sup>b</sup> ± 51.49
Sig.		0.00	0.89	0.00

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (P≤0,05).

Hasil analisis statistik menggunakan uji ANOVA diperoleh signifikansi luas area vili ileum adalah P<0,05 sehingga dapat dikatakan bahwa dalam penelitian ini terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa H1 diterima, yaitu pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai bioaditif pakan ayam pedaging menambah luas area vili ileum. Grafik histomorfologi tinggi dan luas area vili ileum dapat dilihat pada gambar 4.1, yang menunjukkan bahwa rata-rata tinggi dan luas area vili ileum tertinggi terdapat pada perlakuan FB, yaitu pemberian pakan basal ditambahkan dengan fitase asal *L. plantarum* A1-E.



**Gambar 4.1.** Grafik rata-rata tinggi dan luas area vili ileum ayam pedaging usia 28 hari.

#### 4.1.2 Skor Histopatologi Degenerasi Melemak pada Hepar

**Tabel 4.2** Rata-rata skor degenerasi melemak pada hepar ayam pedaging usia 28 hari.

Perlakuan	n	Mean ±Standar Deviasi
FA	15	$1.00^{a} \pm 0.93$
FB	15	$0.60^{a} \pm 0.74$
FC	15	$1.13^a \pm 0.92$
FD	15	$1.40^{\rm b} \pm 0.74$

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (P≤0,05).

Hasil analisis statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis diperoleh signifikansi degenerasi melemak adalah P>0,05 (Sig. 0,08) sehingga dapat dikatakan bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat perbedaan nyata antar perlakuan terhadap degenerasi melemak pada hepar. Hasil tersebut menunjukkan

bahwa H0 diterima, yaitu pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai bioaditif pakan ayam pedaging tidak menyebabkan terjadinya degenerasi melemak pada hepar ayam pedaging. Ditinjau dari grafik degenerasi melemak pada gambar 4.2, rata-rata kejadian degenerasi melemak terendah terdapat pada perlakuan FB, yaitu pemberian pakan basal ditambahkan dengan fitase asal *L. plantarum* A1-E.



Gambar 4.2 Grafik degenerasi melemak pada hepar ayam pedaging usia 28 hari.

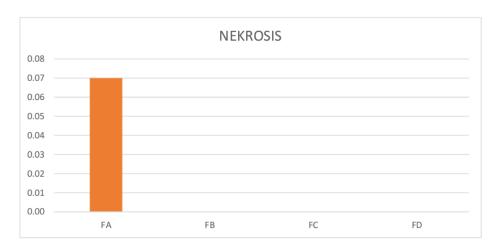
#### 4.1.3 Skor Histopatologi Nekrosis pada Hepar

**Tabel 4.3** Rata-rata skor nekrosis pada hepar ayam pedaging usia 28 hari.

Perlakuan	n	Mean ± Standar Deviasi
FA	15	$0.07^{a} \pm 0.25$
FB	15	$0.00^{a} \pm 0.00$
FC	15	$0.00^{a} \pm 0.00$
FD	15	$0.00^{a} \pm 0.00$

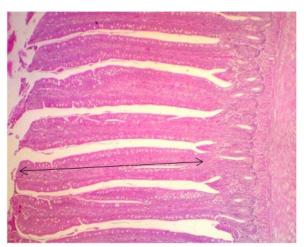
Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (P≤0,05).

Hasil analisis statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis diperoleh signifikansi nekrosis adalah P>0,05 (Sig. 0,40) sehingga dapat dikatakan bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat perbedaan nyata antar perlakuan terhadap nekrosis pada hepar. Hasil tersebut menunjukkan bahwa H0 diterima, yaitu pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai bioaditif pakan ayam pedaging tidak menyebabkan nekrosis pada hepar ayam pedaging.

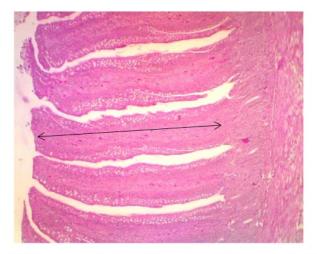


Gambar 4.3 Grafik kejadian nekrosis pada hepar ayam pedaging usia 28 hari.

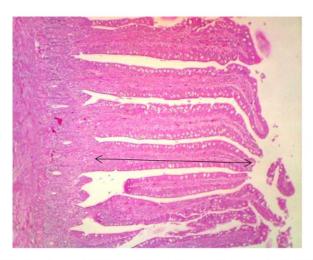
#### 4.1.4 Gambaran Histomorfologi Ileum



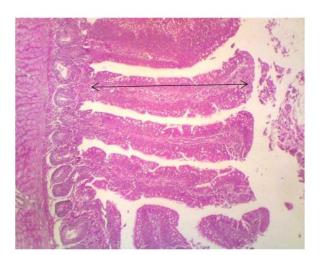
**Gambar 4.4** Gambaran Histomorfologi Ileum Kelompok Perlakuan FA/kontrol negatif yang menunjukkan tinggi vili ileum (panah hitam) (Hematoksilin-Eosin: 10x).



**Gambar 4.5** Gambaran Histomorfologi Ileum Kelompok Perlakuan FB yang menunjukkan terjadinya hiperplasia pada vili ileum, ditandai oleh adanya penambahan tinggi vili pada lamina propria (panah hitam) dibandingkan dengan kelompok kontrol (FA) (Hematoksilin-Eosin: 10x).

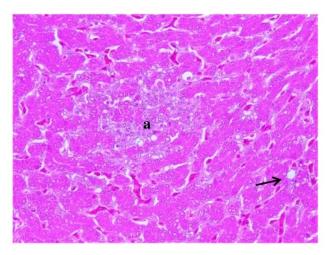


**Gambar 4.6** Gambaran Histomorfologi Ileum Kelompok Perlakan FC yang menunjukkan terjadinya hiper sia pada vili ileum, ditandai oleh tinggi vili pada lamina propria (panah hitam) yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (FA) (Hematoksilin-Eosin: 10x).

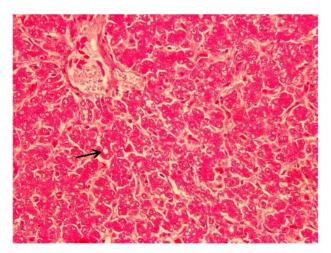


**Gambar 4.7** Gambaran Histomorfologi Ileum Kelompok Perlakan FD yang menunjukkan terjadinya hipop ia pada vili ileum, ditandai oleh tinggi vili pada lamina propria (panah hitam) yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (FA) (Hematoksilin-Eosin: 10x).

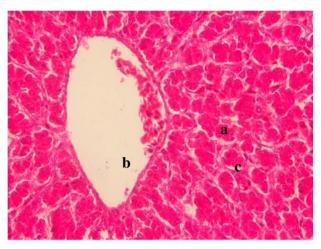
#### 4.1.5 Gambaran Histopatologi Hepar



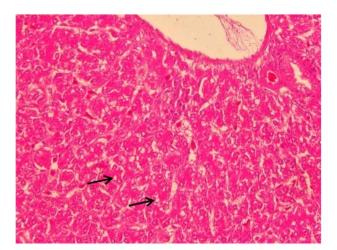
**Gambar 4.8** Gambaran Histopatologi Hepar Ayam Pedaging Perlakuan FA (pakan basal tanpa penambahan fitase) yang menunjukkan lesi nekrosis, ditandai oleh terjadinya *karyorrhexis* dan lisis pada membran hepatosit (a) serta lesi degenerasi melemak, yang ditandai oleh adanya vakuola-vakuola lemak dalam sitoplasma hepatosit (panah hitam). (Hematoksilin-Eosin: 400x).



**Gambar 4.9** Gambaran Histopatologi Hepar Ayam Pedaging Perlakuan FB (pakan basal dengan fitase asal *L. plantarum* A1-E) yang menunjukkan lesi degenerasi melemak, ditandai oleh adanya vakuola-vakuola lemak dalam sitoplasma hepatosit (panah hitam). (Hematoksilin-Eosin: 400x).



**Gambar 4.10** Gambaran Histopatologi Hepar Ayam Pedaging Perlakuan FC (pakan basal dengan fitase asal *C. tropicalis* TKd-3) yang menunjukkan sel normal hepatosit (a), sinusoid (b), vena centralis (c). (Hematoksilin-Eosin: 400x).



**Gambar 4.11** Gambaran Histopatologi Hepar Ayam Pedaging Perlakuan FD (pakan basal dengan fitase komersial microtech<sup>®</sup>) yang menunjukkan lesi degenerasi melemak, ditandai oleh adanya vakuola-vakuola lemak dalam sitoplasma hepatosit (panah hitam). (Hematoksilin-Eosin: 400x).

#### 4.2 Pembahasan

#### 4.2.1 Luas Area Vili Ileum

Hasil yang diperoleh setelah analisis statistik terhadap luas area vili ileum adalah terdapat perbedaan nyata (P<0,05) antara kelompok perlakuan FA/kontrol negatif, FB, FC, dengan kelompok perlakuan FD sehingga dapat dikatakan bahwa H1 diterima, yaitu pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai bioaditif pakan ayam pedaging dapat menambah luas area vili ileum. Ditinjau dari grafik 4.1, rata-rata tinggi dan luas vili ileum tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan FB, yaitu pemberian pakan basal yang ditambah dengan fitase asal *L. plantarum* A1-E. Pertambahan tinggi vili dalam kelompok perlakuan menunjukkan adanya peningkatan luas permukaan area yang mampu menyerap lebih banyak nutrisi (Caspary, 1992). Peningkatan fungsi pencernaan dan penyerapan pada intestinum terjadi seiring bertambahnya tinggi vili karena bertambah juga luas permukaan area penyerapan nutrisi sehingga semakin banyak nutrisi yang dapat diserap tubuh (Awad, *et al.*, 2011).

Saluran pencernaan memiliki peran yang sangat penting dalam proses pertumbuhan ayam sebagai hewan ternak karena proses penyerapan nutrisi yang baik akan menghasilkan produk dengan kualitas tinggi. Salah satu organ pencernaan yang dinilai penting adalah usus halus. Organ tersebut dapat dijadikan sebagai acuan mekanisme pertumbuhan karena berperan penting dalam penyerapan nutrisi (Setiawan, *et al.*, 2018). Kemampuan penyerapan nutrisi dipengaruhi oleh morfologi struktur jaringan usus halus, salah satunya yaitu tinggi

vili. Semakin tinggi vili pada intestinum, semakin bertambah luas area penyerapan nutrisi (Adil, *et al.*, 2010; Brudnicki, *et al.*, 2017).

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa fitase asal *Aspergillus oryzae* berpengaruh terhadap vili pada usus halus, yaitu menambah tinggi vili jejunum ayam pedaging (Pekel, *et al.*, 2017). Penelitian lain oleh Wu, *et al.* (2004), menunjukkan bahwa fitase asal *Aspergillus niger* dapat menambah tinggi vili duodenum, namun tidak berpengaruh terhadap vili jejunum dan ileum ayam pedaging. Menurut Jozefiak, *et al.* (2012), selain faktor kandungan nutrisi pada makanan yang dikonsumsi oleh ayam, faktor genetik juga dapat berpengaruh terhadap perbedaan tinggi vili pada ayam.

Pertambahan tinggi dan luas area vili ileum dapat dijadikan indikator bahwa peran utama ileum dalam penyerapan mineral berfungsi dengan baik karena semakin bertambah tinggi vili, semakin bertambah luas area permukaan penyerapan mineral (Mohammadagheri, et al., 2016; Svihus, 2014). Fitase yang diberikan sebagai aditif pakan mampu meningkatkan degradasi ikatan antara fitat dan fosfor serta nutrisi-nutrisi lain seperti kalsium, asam amino, dan asam lemak sehingga dapat meningkatkan performa serta kesehatan skeletal ayam pedaging sebagai hewan ternak (Roofchaei, et al., 2019). Ditinjau dari hasil penelitian yang menunjukkan bahwa fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai bahan aditif pakan dapat menambah luas area vili ileum, diharapkan penyerapan mineral dan nutrisi lain dapat berlangsung secara optimal.

#### 4.2.2 Skor Histopatologi Degenerasi Melemak pada Hepar

Hasil yang diperoleh setelah analisis statistik terhadap kejadian degenerasi melemak pada hepar adalah tidak terdapat perbedaan nyata (P>0,05) antara kelompok perlakuan FA/kontrol negatif dengan kelompok perlakuan FB, FC, dan FD sehingga dapat dikatakan bahwa H0 diterima, yaitu pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai bioaditif pakan ayam pedaging tidak menyebabkan degenerasi melemak pada hepar ayam pedaging. Ditinjau dari grafik pada gambar 4.2, rata-rata kejadian degenerasi melemak terendah terdapat pada perlakuan FB, yaitu pemberian pakan basal yang ditambah dengan fitase asal *L. plantarum* A1-E.

Degenerasi melemak merupakan kondisi abnormal adanya akumulasi lemak di dalam hepatosit. Pada dasarnya akumulasi lemak tersebut berhubungan dengan adanya gangguan pada proses sintesis dan atau sekresi lipoprotein. Lemak berlebihan yang terakumulasi dalam hepar dapat berasal dari adanya gangguan pada proses pelepasan trigliserida dari hepar ke plasma. Trigliserida disekresi dari hepar dalam bentuk lipoprotein (*Very low density lipoprotein*/VLDL) sehingga terjadinya degenerasi melemak umumnya diikuti dengan menurunnya kadar liporotein dan lemak dalam plasma (Hodgson, 2004).

Menurut (Szende *and* Suba, 1999) gambaran histopatologi fase awal degenerasi melemak adalah tampak adanya vakuola di sekitar nukleus dalam sitoplasma hepatosit. Vakuola yang tampak pada sitoplasma hepatosit tersebut merupakan akibat dari proses pembuatan preparat, yaitu *embedding* yang

menyebabkan lemak pada jaringan larut oleh parafin sehingga menyisakan ruang kosong seperti yang tampak pada gambar 4.9 atau gambar 4.11.

Penelitian ini menunjukkan hasil bahwa fitase tidak menyebabkan degenerasi melemak pada hepar ayam pedaging. Pada proses skoring, sebagian besar tidak ditemukan kejadian degenerasi melemak yang berat pada hepar (tidak ditemukan lesi degenerasi melemak lebih dari 50% lapang pandang). Hasil tersebut didukung oleh hasil penelitian terdahulu oleh Liu, et al. (2009), yaitu fitase dapat meningkatkan kinerja proses metabolisme lemak pada hepar sehingga hasil lemak tubuh ayam pedaging meningkat. Hal tersebut juga berkaitan dengan pendapat yang dikemukakan oleh Hodgson (2004), apabila tidak terjadi gangguan pada proses sintesis dan atau sekresi lipoprotein, maka tidak akan terjadi akumulasi lemak pada hepar ayam pedaging. Adanya degenerasi melemak juga tidak selalu berarti terjadi disfungsi pada hepar. Untuk mengetahui adanya kerusakan secara pasti dapat dilihat dari tingkat keparahan akumulasi lemak bersamaan dengan perubahan yang terjadi pada biokimia darah.

#### 4.2.3 Skor Histopatologi Nekrosis pada Hepar

Hasil yang diperoleh setelah analisis statistik terhadap terjadinya nekrosis pada hepar adalah tidak terdapat perbedaan nyata (P>0,05) antara kelompok perlakuan FA/kontrol negatif dengan kelompok perlakuan FB, FC, dan FD sehingga dapat dikatakan bahwa H0 diterima, yaitu pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai bioaditif pakan ayam pedaging tidak menyebabkan nekrosis pada hepar ayam pedaging. Hasil skoring yang

diperoleh menunjukkan lesi nekrosis hampir tidak ditemukan pada sebagian besar sampel hepar. Nekrosis hanya ditemukan pada sampel dari kelompok perlakuan FA/kontrol negatif, yaitu perlakuan pakan basal tanpa penambahan fitase.

Nekrosis adalah proses degenerasi yang berujung pada terjadinya kematian sel. Nekrosis umumnya merupakan lesi akut, dapat terjadi secara focal (terlokalisir di tempat tertentu dan hanya sedikit hepatosit yang terlibat) seperti pada gambar 4.8 atau masif (terjadi hampir pada keseluruhan lobus). Kematian sel terjadi bersamaan dengan rupturnya membran plasma yang diawali oleh berbagai perubahan morfologi sel, antara lain edema sitoplasma, dilatasi retikulum endoplasma, disagregasi polysom, kebengkakan mitokondria serta hancurnya organel dan nukleus (Hodgson, 2004). Menurut Chauhan (2010), gambaran histopatologi nekrosis memliki ciri-ciri *piknosis* (terjadi kondensasi materi kromatin, nukleus mengalami reduksi dan tercat sangat gelap), *karryorhexis* (nukleus mengalami fragmentasi), *karyolysis* (nukleus larut menjadi fragmen kecil atau granul bersifat basofilik), serta *chromatolysis* (materi berbahan kromatin mengalami lisis).

Berkaitan dengan kejadian degenerasi melemak, nekrosis juga dapat terjadi akibat adanya akumulasi trigliserida. Metabolit reaktif yang terikat dengan protein dan lemak tak jenuh memicu terjadinya peroksidasi lemak yang diikuti dengan hancurnya membran sel. Proses biokimia lain yang bisa memicu terjadinya nekrosis antara lain gangguan homeostasis Ca<sup>2+</sup> pada sel, gangguan keseimbangan Na<sup>+</sup> dan K<sup>+</sup>, serta terhambatnya sintesis protein. Pada dasarnya lesi nekrosis pada

hepar tidak terlalu berbahaya karena hepar memiliki kemampuan regenerasi sel cukup baik, namun jika nekrosis terjadi secara masif maka tidak menutup kemungkinan dapat terjadi kerusakan fatal, bahkan terjadi kegagalan pada hepar (Hodgson, 2004).

# V. KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

- 1. Pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai aditif pakan berpengaruh dalam menambah luas area vili ileum pada ayam pedaging secara signifikan (P<0,05).
- Pemberian fitase asal L. plantarum A1-E dan C. tropicalis TKd-3 sebagai aditif pakan tidak menyebabkan degenerasi melemak pada hepar ayam pedaging secara signifikan (P>0,05).
- 3. Pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKd-3 sebagai aditif pakan tidak menyebabkan nekrosis pada hepar ayam pedaging secara signifikan (P>0,05).

### 5.2 Saran

Diharapkan akan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian fitase asal *L. plantarum* A1-E dan *C. tropicalis* TKD-3 sebagai bioaditif pakan terhadap mineral yang dapat diserap oleh tubuh ayam pedaging.

## NAURA RAHMI WICAKSONO 16820052

ORIGINALITY REPORT				
_	6% ARITY INDEX	15% INTERNET SOURCES	7% PUBLICATIONS	3% STUDENT PAPERS
PRIMAR	Y SOURCES			
1	repositor Internet Source	y.setiabudi.ac.id		3%
2	repositor Internet Source	y.usd.ac.id		1%
3	you-gone Internet Source			1%
4	WWW.SCri			1%
5	Sakti, L I "Nutrient supplement producing	graeni, A E Surya stiqomah, M F K digestibility of br ented with probic g", IOP Conferer nental Science, 2	arimy, I N G Da oiler chicken fo otics phytase- nce Series: Ear	arma. ed diets
6	digilib.uir	nsgd.ac.id		1%
7	repositor Internet Source	y.unair.ac.id		1%

8	journal.unair.ac.id Internet Source	<1%
9	docplayer.info Internet Source	<1%
10	ejournal2.undip.ac.id Internet Source	<1%
11	eprints.uns.ac.id Internet Source	<1%
12	es.scribd.com Internet Source	<1%
13	repository.uinjkt.ac.id Internet Source	<1%
14	id.123dok.com Internet Source	<1%
15	peternakan.unpad.ac.id Internet Source	<1%
16	Submitted to Politeknik Kesehatan Kemenkes Semarang Student Paper	<1%
17	moam.info Internet Source	<1%
18	tissacuitzz.blogspot.com Internet Source	<1%

19	Internet Source	<1%
20	Maharini, Rismarika, Yusnelti. "Pengaruh konsentrasi PEG 400 sebagai kosurfaktan pada formulasi nanoemulsi minyak kepayang", CHEMPUBLISH JOURNAL, 2020 Publication	<1%
21	eprints.undip.ac.id Internet Source	<1%
22	docobook.com Internet Source	<1%
23	eprints.unm.ac.id Internet Source	<1%
24	www.actamedindones.org Internet Source	<1%
25	repositori.uin-alauddin.ac.id Internet Source	<1%
26	ejournal.unpatti.ac.id Internet Source	<1%
27	repository.usu.ac.id Internet Source	<1%
28	Lenny Anwar, Dedi Futra. "Potensi metabolit sekunder produksi bakteri endofit dari tumbuhan laban (Vitex pubescens Vahl) sebagai	<1%

# antikanker", CHEMPUBLISH JOURNAL, 2019

Publication

29	ricerca.divsi.unimi.it Internet Source	<1%
30	repo.unand.ac.id Internet Source	<1%
31	repositorio.uss.edu.pe Internet Source	<1%
32	zombiedoc.com Internet Source	<1%
33	www.tandfonline.com Internet Source	<1%
34	jurnal.una.ac.id Internet Source	<1%
35	candramuh.blogspot.com Internet Source	<1%
36	sekeripsi.blogspot.com Internet Source	<1%
37	journal.bio.unsoed.ac.id Internet Source	<1%
38	dent.unhas.ac.id Internet Source	<1%
39	journal.uniga.ac.id Internet Source	<1%

40	www.jurnal.unsyiah.ac.id Internet Source	<1%
41	idoc.pub Internet Source	<1%
42	eprints.umg.ac.id Internet Source	<1%
43	fairuliza1985.blogspot.com Internet Source	<1%
44	biologymu.blogspot.com Internet Source	<1%
45	St Aisyah Sijid, Cut Muthiadin, Zulkarnain Zulkarnain, Ar. Syarif Hidayat. "PENGARUH PEMBERIAN TUAK TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HATI MENCIT (Mus musculus) ICR JANTAN", Jurnal Pendidikan Matematika dan IPA, 2020 Publication	<1%
46	kuliah-bhn.blogspot.com Internet Source	<1%
47	journal.ubm.ac.id Internet Source	<1%
48	repository.unpas.ac.id Internet Source	<1%
49	repository.ipb.ac.id:8080 Internet Source	<1%

50	repositorio.ucv.edu.pe Internet Source	<1%
51	repositori.unud.ac.id Internet Source	<1%
52	pdfs.semanticscholar.org Internet Source	<1%
53	Dwi F. Nahas, Oktovianus R. Nahak, Gerson F. Bira. "Uji Kualitas Briket Bioarang Berbahan Dasar Arang Kotoran Kambing, Arang Kotoran Sapi dan Arang Kotoran Ayam", JAS, 2019	<1%
54	id.scribd.com Internet Source	<1%
55	qdoc.tips Internet Source	<1%
56	digilib.unila.ac.id Internet Source	<1%
57	pt.scribd.com Internet Source	<1%
58	"EUROANAESTHESIA 2006: Annual Meeting of the European Society of Anaesthesiology, Madrid, Spain, June 3–6, 2006", European Journal of Anaesthesiology, 06/2006 Publication	<1%

Exclude quotes Off Exclude matches Off

Exclude bibliography On

## NAURA RAHMI WICAKSONO 16820052

PAGE 1	
PAGE 2	
PAGE 3	
PAGE 4	
PAGE 5	
PAGE 6	
PAGE 7	
PAGE 8	
PAGE 9	
PAGE 10	
PAGE 11	
PAGE 12	
PAGE 13	
PAGE 14	
PAGE 15	
PAGE 16	
PAGE 17	
PAGE 18	
PAGE 19	
PAGE 20	
PAGE 21	
PAGE 22	
PAGE 23	
PAGE 24	

PAGE 25
PAGE 26
PAGE 27
PAGE 28
PAGE 29
PAGE 30
PAGE 31
PAGE 32
PAGE 33
PAGE 34
PAGE 35
PAGE 36
PAGE 37
PAGE 38
PAGE 39
PAGE 40
PAGE 41
PAGE 42
PAGE 43
PAGE 44
PAGE 45
PAGE 46
PAGE 47
PAGE 48
PAGE 49