

# Uji aktivitas sinbiotik ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) dan bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen pada ayam broiler secara *in vitro*

## The activity test of synbiotic between extract of noni leaf (*Morinda citrifolia*) and lactic acid bacteria against pathogenic bacteria in broiler chicken *in vitro*

AINUNNI'MAH ZEN, TJAHHADI PURWOKO, HARDI JULENDRA

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 8 Desember 2011. Revisi disetujui: 15 Februari 2013.

**Abstract.** Zen A, Purwoko T, Julendra H. 2013. The activity test of synbiotic between extract of noni leaf (*Morinda citrifolia*) and lactic acid bacteria against pathogenic bacteria in broiler chicken *in vitro*. *Biofarmasi* 11: 19-23. The breeders of broiler chicken usually provide the commercial rations to increase the business of chicken livestock because the commercial rations have met the standard needs of the substances of feed that been appointed. The commercial rations that often used as broiler feed are currently using a low-dose antibiotic that will give a harmful effect on human health in the long-term if it continues to be consumed. Therefore, it needs to use bioadditive to replace the antibiotic. One bioadditive is a symbiosis between probiotic and phytophotic that it is expected to inhibit the growth of pathogenic bacteria in poultry. This study was conducted to determine the presence of inhibition of noni leaf extract against BAL and the pathogenic bacteria, and to determine the effect of symbiosis between the noni leaf extract and BAL against the pathogenic bacteria *in vitro*. This study included the selection of noni leaf extract based on the highest yield and the water content measurement. Thereafter, an antibacterial test was performed by using the selected leaf extract, the neutral supernatant from *Pseudococcus acidilactici* as BAL, and the synbiotics of both against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella pullorum* bacteria by using the Kirby-Bauer diffusion method. From the results, it was selected the noni leaf extract by ethanol 40% which had a yield value of 20.8% with the water content of 18.9%. The selected noni leaf extract was then tested on BAL and the pathogenic bacteria. The results of antibacterial test showed the smallest inhibition on *P. acidilactici* occurred in the noni leaf extract with the concentration of 250 mg/mL, while the highest inhibition of noni leaf extract to *E. coli* was 5.42 mm, *S. aureus* 3.76 mm and *S. pullorum* 3.45 mm. The inhibition after the synbiotic against *E. coli* was 4.75 mm, *S. aureus* was 3.83 mm, while *S. pullorum* was 3.58 mm.

**Keywords:** Broiler chicken, Lactic acid bacteria (BAL), *Morinda citrifolia* L., symbiotic

### PENDAHULUAN

Ayam pedaging merupakan bagian penting dalam pemenuhan kebutuhan protein hewani bagi masyarakat Indonesia. Permintaan terhadap daging ayam semakin bertambah seiring dengan meningkatnya penghasilan dan kesadaran masyarakat akan pentingnya protein hewani.

Dalam pengembangan usaha ternak ayam pedaging, pada umumnya peternak memberikan ransum komersial, karena ransum komersial telah memenuhi standar kebutuhan zat-zat makanan yang telah ditetapkan. Di dalam ransum komersial tersebut, terkandung pakan tambahan (*feed additive*) yang bertujuan untuk meningkatkan daya simpan ransum dan memacu pertumbuhan ternak. *Feed additive* adalah bahan yang ditambahkan ke dalam pakan, biasanya dalam jumlah sedikit dan bukan sebagai sumber zat gizi, yang dapat mempengaruhi karakteristik pakan, meningkatkan kinerja, kesehatan, dan/atau kualitas produk ternak/hewan (SNI 2006). Salah satu *feed additive* yang sudah digunakan dalam pakan ternak adalah antibiotik dosis rendah, seperti tetrasiklin, prokain, penisilin, teramisin, dan tilosin.

Penggunaan antibiotik yang terus-menerus ternyata dapat mengakibatkan munculnya residu antibiotik dapat tubuh ternak (Rusiana dan Iswarawanti 2004). Residu antibiotik tersebut akan memberikan dampak yang dapat membahayakan bagi kesehatan manusia dalam jangka panjang apabila terus dikonsumsi.

Untuk mengatasi hal tersebut, penggunaan bioaditif sebagai bahan tambahan pada pakan ternak merupakan alternatif untuk mengurangi akumulasi residu antibiotik dalam daging karena tidak menimbulkan efek yang berbahaya bagi kesehatan manusia sebagai konsumen. Bioaditif dapat berupa fitobiotik, probiotik, prebiotik, ataupun sinbiotik.

Salah satu bahan alam fitobiotik yang berpotensi mempunyai aktivitas sebagai antibakteri adalah daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), karena pada daun mengkudu terkandung minyak atsiri, alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol, dan antrakuinon (Mursito 2002). Antrakuinon merupakan salah satu senyawa yang bersifat sebagai antibakteri pada *Salmonella* dan *Shigella* (Rukmana 2002).

Probiotik merupakan contoh lain dari agens yang menunjukkan aktivitas antibakteri. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan probiotik yang memiliki peranan penting bagi manusia, baik melalui keterlibatannya dalam fermentasi makanan maupun sebagai bagian dari mikroflora normal pada saluran pencernaan. BAL yang secara normal tumbuh dalam saluran pencernaan dapat memberikan efek positif bagi kesehatan tubuh melalui kemampuannya dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen penyebab diare serta menstimulasi sistem imun. Probiotik dapat memacu keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan, sehingga mikroflora normal dapat sedini mungkin dimiliki oleh ayam. Ayam dengan kondisi mikroflora yang seimbang akan memiliki resistensi atau daya tahan tubuh yang lebih kuat, khususnya terhadap serangan bakteri patogen usus (Carvalho dan Hansen 2005).

Penelitian mengenai fitobiotik dan probiotik sudah banyak dilakukan, tetapi penelitian tentang sinbiosis antara fitobiotik dan probiotik sendiri belum banyak dilakukan. Dalam penelitian ini dilakukan sinbiosis ekstrak etanol daun mengkudu sebagai fitobiotik dengan supernatan netral (SN) dari BAL sebagai probiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam saluran pencernaan ayam broiler secara *in vitro*. Sinbiotik tersebut diharapkan dapat memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan hanya menggunakan salah satu dari keduanya dalam upaya menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada saluran pencernaan ayam, seperti *Escherichia coli*, *Salmonella* (Abun 2008), dan *Staphylococcus aureus* (Tabbu 2000). Dengan demikian, peternak dapat beralih menggunakan bioaditif sebagai pakan ayam.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus sampai Desember 2011, di Laboratorium Mikrobiologi, Unit Pelaksana Teknis, Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (UPT. BPPTK, LIPI) Yogyakarta dan Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA UNS, Surakarta.

### Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi, inkubator, *laminar airflow cabinet*, Bunsen burner, *vortex*, *driglasky*, *petri dish*, *microtube*, pinset, dan kamera digital. Sementara itu, bahan yang digunakan meliputi ekstrak etanol daun mengkudu, isolat *Pediococcus acidilactici* R01, *Escherichia coli* FNCC 194, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, dan *Salmonella pullorum*, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), *De Man Rogosa Sharpe* (MRS) *broth*, etanol, akuades steril, kertas cakram (*blank*, streptomisin 10 mcg, penisilin 10 mcg), *syringe* 10 ml, dan *milipore* 0,20 µm.

### Cara kerja

Isolat *P. acidilactici*, *S. pullorum*, *E. coli*, dan *S. aureus* diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi UPT.

BPPTK, LIPI, Yogyakarta. Aktivitas ekstrak daun mengkudu terhadap *P. acidilactici*, *S. pullorum*, *E. coli*, dan *S. aureus* diujikan dengan menggunakan metode dilusi cair, dengan parameter tingkat kekeruhan yang terbentuk pada media, sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak yang optimal sebagai antibakteri pada bakteri patogen, tetapi tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL). Setelah itu, dilakukan uji aktivitas ekstrak daun mengkudu pada BAL dan bakteri patogen, serta sinbiotik ekstrak daun mengkudu dengan BAL terhadap bakteri patogen menggunakan metode difusi agar *Kirby-Bauer*. Berdasarkan hasil uji pendahuluan digunakan ekstrak daun mengkudu dengan konsentrasi 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, dan 250 mg/mL.

Bagian BAL yang digunakan sebagai antibakteri adalah supernatan netral (SN) dari *P. acidilactici* setelah diinokulasi selama 24 jam. Sebanyak 10 ml inokulum bakteri di-*sentrifuge* pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang telah terpisah dari *pellet* dipindahkan ke Erlenmeyer, kemudian diukur pH-nya. Supernatan tersebut dinetralkan hingga didapatkan pH 6,7 dengan menggunakan larutan NaOH 0,5 N. Supernatan netral disaring menggunakan *milipore*, sehingga didapatkan supernatan netral steril.

Media NA dibuat dengan melarutkan 23 g media NA dalam 1 L akuades di atas *hotplate* dengan panas sedang dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Inokulum bakteri berumur 18-24 jam sebanyak 100 µl ditumbuhkan di atas permukaan media agar NA yang sudah memadat menggunakan *driglasky*. Ekstrak etanol daun mengkudu yang telah diencerkan pada akuades steril dan bakteriosin netral *P. acidilactici* dihomogenkan dalam *microtube* dengan perbandingan volume masing-masing 1:1 (masing-masing sebanyak 0,5 ml) kemudian kertas cakram direndam dalam *microtube* tersebut selama ±3 menit. Kertas cakram diletakkan di atas permukaan media agar yang telah ditumbuhi bakteri patogen, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pengukuran diameter zona bening yang terbentuk.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji antibakteri dari ekstrak daun mengkudu serta antibiotik penisilin G dan streptomisin terhadap *E. coli*, *S. aureus*, dan *S. pullorum* dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil yang diperoleh menunjukkan penghambatan oleh ekstrak daun mengkudu lebih rendah dibandingkan dengan penghambatan oleh penisilin G dan streptomisin. Hasil tersebut dikarenakan dalam ekstrak daun mengkudu terdapat banyak senyawa aktif dengan mekanisme penghambatan yang berbeda-beda. Hal tersebut menyebabkan kerja senyawa-senyawa yang diinginkan tidak dapat bekerja secara optimal, akibat adanya pengaruh dari senyawa aktif lain yang terkandung dalam ekstrak daun mengkudu.

Mekanisme kerja penisilin yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan cara menghambat pembentukan mukopeptida. Oleh karena sintesis dinding sel terganggu maka bakteri tidak akan mampu mengatasi perbedaan

tekanan osmosis di luar dan di dalam sel yang mengakibatkan bakteri mati.

Peningkatan daya hambat ekstrak daun mengkudu seharusnya semakin besar seiring dengan semakin besarnya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Namun dalam penelitian menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak tidak selalu menghasilkan daya hambat yang lebih besar meskipun perbedaan tersebut tidak terlalu jauh. Menurut Dewi (2010), tidak stabilnya penghambatan ekstrak etanol daun mengkudu diduga disebabkan karena ekstrak yang digunakan merupakan ekstrak kasar yang kelarutan senyawa antibakterinya belum maksimal, sehingga aktivitasnya belum maksimal.

Berdasarkan hasil analisis statistik pada taraf kepercayaan 95%, tidak ada beda nyata untuk perlakuan konsentrasi ekstrak daun mengkudu, baik pada *E. coli*, *S. aureus*, ataupun *S. pullorum*. Perbedaan struktur dinding sel menentukan penetrasi, ikatan, dan aktivitas senyawa antibakteri (Jawetz et al. 2005). Menurut Ruiz et al. (2006), *outer membrane* (OM) pada bakteri gram negatif bersifat *selective barrier* yang mencegah masuknya molekul ke dalam sel, sehingga senyawa antibakteri lebih sulit menembus bakteri gram negatif daripada bakteri gram positif.

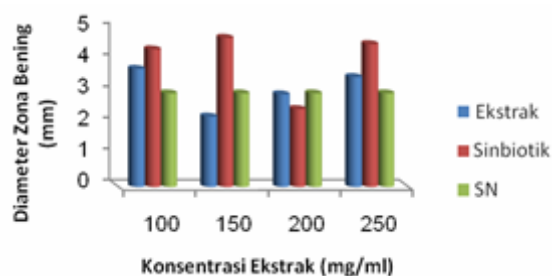
Bakteri gram negatif lebih banyak mengandung lipid, serta memiliki dua lapis membran yaitu membran luar dan membran dalam yang mengapit lapisan tipis peptidoglikan. Dua lapis membran berfungsi sebagai pertahanan selektif terhadap senyawa-senyawa yang keluar-masuk sel dan menimbulkan efek toksik. Membran luar terdiri dari fosfolipid (lapisan dalam), lipopolisakarida (lapisan luar), serta tersusun atas lipid A yang bersifat nonpolar (Dewi 2010).

Efek penghambatan ekstrak daun mengkudu diduga berkaitan dengan senyawa fenol dan flavonoid yang terkandung di dalamnya. Senyawa fenol yang terdapat dalam ekstrak mengkudu diantaranya adalah antrakuinon, akubin, dan alizarin. Ketiga senyawa tersebut dilaporkan mengandung zat antibiotik (Bangun dan Sarwono 2002). Fenol dapat berperan sebagai senyawa antibakteri karena dapat menurunkan tegangan permukaan membran sel bakteri kemudian mendenaturasi protein dan mengganggu fungsinya (Fitri 2005), yang diduga menyebabkan terjadinya penghambatan pertumbuhan pada *E. coli* dan *S. pullorum* yang merupakan kelompok bakteri gram negatif. Dalam penelitian ini, efek penghambatan diduga dilakukan oleh senyawa antrakuinon terhadap *E. coli* yang lebih besar dibandingkan dengan efek penghambatan terhadap *S. pullorum*. Penelitian yang dilakukan oleh Rahayu (2006) menunjukkan hasil yang sama, yaitu *E. coli* sensitif terhadap senyawa antrakuinon yang terkandung dalam *Aloe barbadensis* Miller dan *Aloe chinensis* Baker, sedangkan *Salmonella thyphimurium* tidak sensitif terhadap senyawa antrakuinon tersebut. Perbedaan penghambatan yang terjadi terhadap kedua jenis bakteri gram negatif tersebut masih belum diketahui.

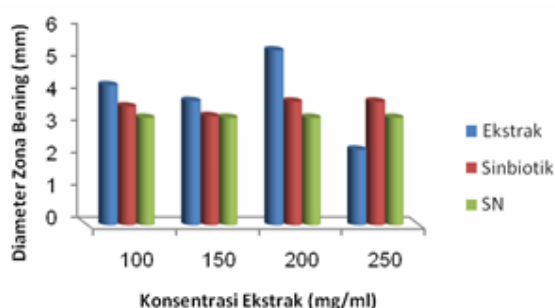
Kandungan flavonoid dalam daun mengkudu merupakan senyawa yang bersifat polar, sehingga lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang bersifat polar daripada lapisan lipid yang bersifat nonpolar. Dengan

demikian, senyawa tersebut dapat menyebabkan aktivitas penghambatan pada bakteri gram positif *P. acidilactici* lebih besar dibandingkan pada aktivitas penghambatan pada bakteri gram negatif. Penghambatan ekstrak daun mengkudu pada *S. aureus* yang merupakan bakteri gram positif menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih kecil dibandingkan penghambatan pada *E. coli* yang merupakan bakteri gram negatif. Aktivitas penghambatan terhadap kedua jenis bakteri tersebut masih belum diketahui penyebabnya dengan pasti karena setiap jenis bakteri memiliki respons penerimaan yang berbeda-beda terhadap antibakteri.

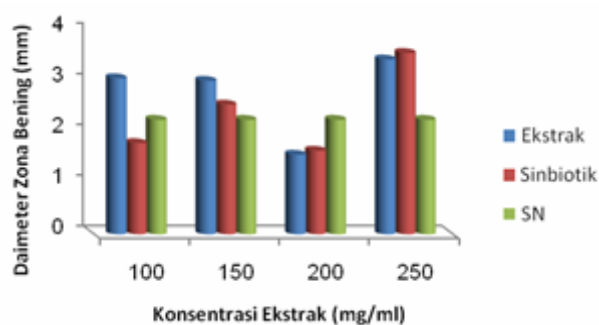
Dari data tersebut dapat dibuat grafik pengaruh ekstrak daun mengkudu, supernatan netral, dan sinbiotik keduanya terhadap pertumbuhan setiap jenis bakteri, seperti yang disajikan pada Gambar 1-3.



**Gambar 1.** Diameter zona bening pada uji antibakteri ekstrak daun mengkudu, sinbiotik, dan supernatan netral (SN) pada bakteri *Escherichia coli*.



**Gambar 2.** Diameter zona bening pada uji antibakteri ekstrak daun mengkudu, sinbiotik, dan supernatan netral (SN) pada bakteri *Staphylococcus aureus*.



**Gambar 3.** Diameter zona bening pada uji antibakteri ekstrak daun mengkudu, sinbiotik, dan supernatan netral (SN) pada bakteri *Salmonella pullorum*.

**Tabel 1.** Diameter zona bening pada pemberian beberapa konsentrasi ekstrak daun mengkudu, penisilin, dan streptomisin terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella pullorum*

Perlakuan	Diameter zona bening (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pullorum</i>	<i>P. acidilactici</i>
Ekstrak daun 100 mg/mL	4,34 <sup>a</sup>	3,76 <sup>a</sup>	3,08 <sup>a</sup>	5,87
mengkudu 150 mg/mL	3,85 <sup>a</sup>	2,24 <sup>a</sup>	3,03 <sup>a</sup>	3,98
200 mg/mL	5,42	2,95	1,57	3,40
250 mg/mL	2,34 <sup>a</sup>	3,50 <sup>a</sup>	3,45 <sup>a</sup>	2,99
Penisilin G10 mcg	8,43	6,61	11,60	
Streptomisin 10 mcg	8,48	4,10	5,20	

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji *GLM Univariate* pada taraf kepercayaan 95%.

**Tabel 2.** Diameter zona bening pada pemberian supernatan netral (SN) dan sinbiotik antara SN dan ekstrak daun mengkudu terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella pullorum*

Konsentrasi ekstrak	Diameter zona bening (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pullorum</i>
100 mg/mL + SN	4,38 <sup>a</sup>	3,68 <sup>b</sup>	1,80 <sup>b</sup>
150 mg/mL + SN	4,75 <sup>a</sup>	3,38 <sup>b</sup>	2,56 <sup>b</sup>
200 mg/mL + SN	2,48 <sup>a</sup>	3,83 <sup>b</sup>	1,65 <sup>b</sup>
250 mg/mL + SN	4,55 <sup>a</sup>	2,83 <sup>b</sup>	3,58 <sup>b</sup>
Supernatan Netral (SN)	2,98	3,33	2,26

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada setiap kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji *GLM Univariate* pada taraf kepercayaan 95%.

Hasil uji antibakteri terhadap *E. coli* menunjukkan adanya efek penghambatan oleh sinbiotik antara ekstrak daun mengkudu dan supernatan netral yang lebih besar dibandingkan dengan pemberian ekstrak daun mengkudu atau supernatan netral secara terpisah, dan efek penghambatan oleh ekstrak daun mengkudu lebih besar dibandingkan supernatan netral.

Hasil uji antibakteri juga menunjukkan pemberian ekstrak daun mengkudu pada *S. aureus* menghasilkan diameter zona bening yang lebih besar dibandingkan dengan pemberian ekstrak bersama dengan supernatan netral ataupun supernatan netral secara terpisah (Tabel 2). Hal ini berarti ekstrak daun mengkudu memiliki efek penghambatan relatif lebih besar pada *S. aureus*. Efek penghambatan terbesar terjadi pada pemberian ekstrak 200 mg/mL dan mengalami penurunan cukup drastis pada konsentrasi ekstrak 250 mg/mL. Adapun pemberian ekstrak daun mengkudu dengan penambahan supernatan netral pada setiap konsentrasi menghasilkan efek penghambatan yang relatif sama.

Pemberian ekstrak daun mengkudu pada *S. pullorum* menunjukkan efek penghambatan yang lebih besar dibandingkan dengan penghambatan oleh sinbiotik atau supernatan netral secara terpisah. Pada konsentrasi ekstrak 200 mg/mL, efek penghambatan mengalami penurunan dan kembali meningkat secara drastis pada konsentrasi ekstrak

250 mg/mL. Pada konsentrasi yang sama, sinbiotik menunjukkan efek penghambatan yang sedikit lebih besar.

Berdasarkan hasil analisis statistik pada taraf kepercayaan 95%, tidak ada beda nyata untuk perlakuan konsentrasi ekstrak daun mengkudu dan sinbiotik pada *E. coli*, *S. aureus*, dan *S. pullorum*. Hal ini dibuktikan dengan nilai  $p < 0,05$ . Secara garis besar, efek penghambatan oleh sinbiotik relatif sama dengan penghambatan yang dilakukan oleh ekstrak daun mengkudu, sehingga diduga dalam sinbiotik, efek penghambatan hanya dilakukan oleh ekstrak daun mengkudu saja. Hasil tersebut diduga disebabkan karena kerja supernatan netral dihambat oleh ekstrak, sehingga peran dari supernatan netral pada sinbiotik tidak optimal.

Dengan demikian, pemberian ekstrak daun mengkudu tidak dapat diberikan bersamaan dengan supernatan netral, karena dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen, penghambatan lebih disebabkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun mengkudu saja. Jadi, pemberian ekstrak daun mengkudu lebih baik diberikan secara terpisah pada bakteri patogen. Hal ini diduga dalam sinbiotik, ekstrak daun mengkudu tidak hanya melakukan aktivitas penghambatan pada bakteri, tetapi juga pada supernatan netral.

## KESIMPULAN

Pemberian ekstrak daun mengkudu 200 mg/mL memberikan penghambatan terbesar pada pertumbuhan *Escherichia coli* dengan diameter zona bening sebesar 5,42 mm. Pemberian ekstrak daun mengkudu 100 mg/mL memberikan penghambatan terbesar pada *Staphylococcus aureus* yaitu sebesar 3,76 mm. Pemberian ekstrak daun mengkudu 250 mg/mL memberikan penghambatan terbesar pada *Salmonella pullorum* sebesar 3,45 mm. Penghambatan terbesar sinbiosis ekstrak daun mengkudu dengan supernatan netral *Pediococcus acidilactici* terjadi pada bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi ekstrak 250 mg/mL dengan zona bening sebesar 4,75 mm.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abun. 2008. Hubungan mikroflora dengan metabolisme dalam saluran pencernaan unggas dan monogastrik. Makalah Ilmiah. Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Bangun AP, Sarwono B. 2002. Khasiat dan manfaat mengkudu. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Carvalho N, Hansen S. 2005. Prospect for probiotic in broiler. Feed International 26, 10 November/December.
- Dewi FK. 2010. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap bakteri pembusuk daging segar. Laporan Penelitian. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Fitri DN. 2005. Studi tentang daya hambat ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) dengan konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophyla* secara in vitro. Laporan Penelitian. Jurusan Perikanan, Fakultas Peternakan Perikanan, Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. Mikrobiologi kedokteran. Diterjemahkan oleh: Nugroho E, Maulany. Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.

- Mursito B. 2002. Ramuan tradisional untuk pengobatan jantung. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Rahayu ID. 2006. *Aloe barbadensis* Miller dan *Aloe chinensis* Baker sebagai antibiotik dalam pengobatan etnoveteriner unggas secara in vitro. Jurnal Protein 13(1): 31-34.
- Rukmana. 2002. Mengkudu budidaya dan prospek agribisnis. Kanisius, Yogyakarta.
- Ruiz, Kahne ND, Silhavy TJ. 2006. Advances in understanding bacterial outer membrane biogenesis. Nat Rev Microbiol 4: 57-66.
- Rusiana, Iswarawanti. 2004. 85% daging ayam broiler mengandung antibiotik. Senior Edisi 236, 23-29 Januari.
- SNI [Standar Nasional Indonesia]. 2006. Pakan ayam ras pedaging masa akhir (*Broiler finisher*). SNI 01-3931-2006.
- Tabbu CR. 2000. Penyakit ayam dan penanggulangannya. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.