

## KECERNAAN DAN FERMENTABILITAS SUBSTRAT KOMBINASI MINERAL– FUNGI DALAM RUMEN

### *Digestibility and Fermentability of Combinations Mineral - Fungi in Rumen*

Khanza Syahira Dhia, Kurnia A. Kamil, U. Hidayat Tanuwiria

Faculty of Animal Husbandry, Padjajaran University

Jl. Raya Bandung Sumedang KM.21, Hegarmanah, Jatinangor, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat 45363

E-mail: [khanzasy@gmail.com](mailto:khanzasy@gmail.com)

### ABSTRACT

*This study aims to determine the digestibility and fermentability of mineral-fungal combinations. The benefit of this study was to obtain data from the digestibility and fermentability of mineral-fungi combinations. The study was carried out in vitro with a completely randomized factorial 2 × 4 design with 3 replications. The variables observed were dry matter digestibility, organic matter digestibility, total VFA production (total volatile fatty acid), and NH<sub>3</sub>. The data obtained were then analyzed using variance test (ANOVA), if there was an influence on the variables measured, it will be followed by the Tukey's Studentized Range test. The results showed that the combination of minerals gave a significant effect ( $P < 0.05$ ) and there was an interaction between mineral-fungi ( $P < 0.05$ ) in the digestibility of organic matter and VFA. The highest result was combination mineral with *S. cerevisiae* and as individual was combination Cu-Sc and Se-Sc.*

**Keywords:** *Digestibility, Fermentability, Fungi, Mineral, Rumen.*

### PENDAHULUAN

Modifikasi mikroba rumen telah banyak dilakukan untuk meningkatkan pemanfaatan pakan oleh ternak dalam rangka menghasilkan produktivitas tinggi. Beberapa upaya telah dilakukan yaitu dengan menambah pasokan mikroba dari luar rumen (*direct-fed microbial*) (Krehbiel *et al.*, 2003), menambahkan suplemen yang berfungsi untuk meningkatkan aktivitas mikroba berupa monesin, *tallow*, serta probiotik (Castillo-González *et al.*, 2014), dan mineral untuk meningkatkan fungsi tertentu dari mikroba (Genther and Hansen, 2014). Penelitian Sonawane dan Arora (1976) menunjukkan bahwa penambahan Zn meningkatkan aktivitas enzimatis mikroba dan Eryavuz dan Dehority (2009) menambahkan Zn memberikan efek inaktivasi bakteri selulase. Menurut Arthington (2005) Cu menurunkan pencernaan NDF dan CP tapi tidak pencernaan bahan organik dalam rumen. Engle and Spears (2000) menambahkan bahwa Cu tidak mempengaruhi pH rumen, serta konsentrasi VFA rumen. Penelitian Zhang *et al.* (2007) memberikan hasil oposit mengenai penambahan Cu dalam rumen meningkatkan konsentrasi VFA. Pada penelitian Besong *et al.*

(2001) supplemental Cr tidak memberi efek terhadap VFA rumen. Penelitian Mihaliková *et al.* (2005) dan Panev *et al.* (2013) menunjukkan hasil bahwa selenium dapat berkorporasi dengan sel mikroba.

Selain mineral, fungi sering digunakan untuk membantu memperbaiki pencernaan rumen. Fungi yang umum digunakan adalah *S. cerevisiae* dan *A. oryzae*. Populasi mikroba rumen meningkat setelah disuplementasi *S. cerevisiae* (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997), karena dapat meningkatkan pH ketika rumen dalam keadaan asam (Throne *et al.*, 2009). Selain itu, penambahan *A. oryzae* dapat meningkatkan penggunaan laktat oleh bakteri *Selomonas ruminantium* (Beharka *et al.*, 1991), sehingga dapat mencegah rumen dalam keadaan terlalu asam (Moya *et al.*, 2009).

Pada beberapa penelitian dilakukan kombinasi mineral-fungi secara *in vitro*. Astuti *et al.* (2006) melaporkan mineral Cr yang dikombinasikan dengan *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*), serta *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae*) untuk mensuplementasi mikroba rumen memberikan hasil positif (meningkatkan pencernaan bahan kering, NH<sub>3</sub> dan VFA). Hasil positif juga

dilaporkan oleh Faixová *et al.* (2016) kombinasi Se-Fungi (*yeast*) memberikan efek terhadap meningkatnya aktivitas mikroba pada produksi propionate, dan menurunkan konsentrasi ammonia N.

Berdasarkan paparan di atas sampai saat ini informasi mengenai kombinasi mineral-Fungi belum banyak ditemui, terutama *trace* mineral seperti Cr, Cu, Se dan Zn yang dikombinasikan dengan *S. cerevisiae* dan *A. oryzae* terhadap aktivitas pencernaan dan fermentabilitas substrat dalam rumen, maka perlu adanya kajian mengenai hal tersebut.

## MATERI DAN METODE

Sejumlah mineral digunakan dalam penelitian terdiri atas Cr, Cu, Se, dan Zn yang sudah terinkorporasi dengan *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae* / Ao) dan *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae* / Sc) kandungan nutrisi dapat dilihat pada Tabel 1, cairan rumen sapi perah betina dalam masa laktasi sebagai media inkubasi, larutan buffer (McDougall, 1948), gas CO<sub>2</sub>, larutan HgCl<sub>2</sub> 0,2 ml untuk membunuh mikroba, larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15%, larutan NaOH 0,5N, *phenolphthalein* sebagai indikator pH, larutan HCl 0,5N, serta, dan larutan pepsin 0,2%.

### Rancangan Percobaan dan Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Nutrisi Ternak Ruminansia dan Kimia Makanan Ternak, Fakultas Peternakan

Universitas Padjajaran. Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap pola faktorial (2×4) dengan tiga ulangan. Faktor pertama adalah fungi (Ao dan Sc) dan faktor kedua adalah jenis mineral (Cr, Cu, Se, dan Zn).

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan membuat kombinasi mineral-fungi dengan metode Astuti *et al.* (2006) yaitu fungi dibiakkan di media tumbuh PDA (*potato dexter agar*), substrat menggunakan tepung kedelai dan tepung jagung. Substrat dicampur dengan larutan standar (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,5%; KCl 0,05%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05%; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001%; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,0001%), lalu disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah dingin substrat diletakkan dalam nampan dan didiamkan sampai menunjukkan suhu 39°C lalu diinokulasi dengan inokulum (biakan *A. oryzae* dan *S. cerevisiae*). Inkubasi dilakukan selama empat hari dalam suhu ruangan. Substrat kombinasi mineral-fungi tersebut kemudian dikeringkan dalam suhu 60°C selama 3 × 24 jam, kemudian digiling sampai berbentuk tepung.

Tepung substrat tersebut kemudian digunakan dalam analisis *in vitro* untuk mengukur pencernaan bahan kering, pencernaan bahan organik, VFA total dan NH<sub>3</sub>, sebelumnya dipersiapkan cairan rumen terlebih dahulu. Cairan rumen yang digunakan adalah cairan rumen sapi. Cairan rumen dimasukkan ke dalam termos kemudian disaring dengan kain saring muslin. Selanjutnya disiapkan alat dan bahan untuk dilakukan pengambilan data *in vitro*.

Tabel 1. Kandungan Nutrien Bahan Penelitian

Mineral	BK	Abu	PK	LK	SK	BETN	Konsentrasi mineral
	----- % -----						-----mg/l-----
Cr-Ao	94,84	3,51	22,12	9,78	1,26	63,33	114
Cr-Sc	96,55	2,97	19,93	9,23	1,86	66,11	208
Cu-Ao	93,03	3,62	21,53	9,97	4,60	60,28	1365
Cu-Sc	95,06	3,19	17,93	10,25	5,30	63,33	1674
Se-Ao	95,77	9,13	22,99	9,35	2,00	56,53	252
Se-Sc	93,92	8,81	16,62	9,33	3,04	62,20	249
Zn-Ao	96,55	3,33	23,63	9,41	3,43	60,20	543
Zn-Sc	94,95	4,10	21,29	9,56	1,56	63,49	297

### Peubah yang Diamati

#### a. Kadar NH<sub>3</sub> Cairan Rumen

Kadar NH<sub>3</sub> cairan rumen diukur dengan menggunakan teknik mikrodifusi Conway (1940). Supernatan sebanyak 1 ml diletakkan di kiri sekat cawan Conway, dan meletakkan 1 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jenuh pada sekat kanan. Bagian tengah cawan diisi dengan 1 ml asam borat berindikator merah metal dan brom kresol hijau. Cawan

Conway ditutup rapat dengan penutup berwaslin, kemudian cawan tersebut digoyangkan sehingga supernatant bercampur dengan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar. Amonia yang terikat oleh asam borat dititrasi menggunakan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005N sampai berubah kemerahan.

NH<sub>3</sub> = (ml titrasi × normalitas H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> × 1000) mM

**b. Kadar asam lemak terbang total (VFA total)**

Pengukuran kadar VFA total diukur dengan menggunakan destilasi uap AOAC (1990). Supernatan sebanyak 5ml dimasukkan ke dalam tabung destilasi yang dipanaskan dengan uap air, menambahkan 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15% kemudian tabung ditutup rapat. Uap panas akan mendesak VFA melewati tabung pendingin terkondensasi, kemudian ditampung dengan tabung Erlenmeyer berisi NaOH 0,5N sebanyak 5 ml hingga mencapai volume sekitar 300 ml, setelah itu menambahkan indikator phenolphthalein sebanyak 2 tetes dan menitrasi dengan HCl 0,5N, sampai terjadi perubahan warna merah menjadi bening. Titrasi juga dilakukan terhadap blanko 5 ml NaOH.

Rumus VFA total = (vol titrasi blanko – volume titran sampel) × Normalitas HCl × 1000/5

**c. Kecernaan Bahan Kering dan Bahan Organik**

Metode pengukuran kecernaan bahan kering dan bahan organik yang digunakan adalah metode Tilley dan Terry (1969). Proses pengukuran kecernaan bahan kering sama seperti pengukuran kadar NH<sub>3</sub> dan VFA sampai dengan pengocokan tabung dengan gas CO<sub>2</sub>, lalu diinkubasi selama 24 jam dalam *waterbath* pada suhu 39°C. Setelah 24 jam, ditetesi larutan HgCl<sub>2</sub> jenuh sebanyak 0,2 ml yang berfungsi untuk membunuh mikroba. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Cairan supernatan dibuang dan endapan ditambahkan 50 ml larutan pepsin 0,2% dalam

suasana asam yang kemudian diinkubasi kembali dalam suasana aerob selama 24 jam, selanjutnya endapan disaring kertas Whatman 41 dan dianalisis bahan kering dan bahan organik. Cairan rumen tanpa perlakuan digunakan sebagai blanko.

**Analisis Statistik**

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan uji sidik ragam (ANOVA) dan factorial, jika terdapat pengaruh terhadap peubah yang diukur, maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan dan *Tukey's Studentized Range* (Sarmanu, 2017).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Nilai fermentabilitas menunjukkan tingkat degradasi oleh mikroba rumen. Semakin tinggi nilai fermentabilitasnya maka semakin besar tingkat degradasi mikroba rumen. Hasil penelitian kecernaan dan fermentabilitas substrat kombinasi mineral-fungi disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3. Secara umum nilai kombinasi mineral dengan *S. cerevisiae* lebih tinggi dibandingkan dengan mineral – *A. oryzae*. Hal tersebut terjadi karena karakteristik *S. cerevisiae* dengan *A. oryzae* berbeda. Pada nilai KCBO serta NH<sub>3</sub> interaksi mineral-fungi tidak berbeda nyata (*P*>0,05). Berdasarkan hal tersebut, diduga bahwa interaksi antara fungi dan mineral tidak terjadi, atau ada namun tidak memberikan pengaruh yang besar, jika dilihat berdasarkan hasil analisis Tabel 2 seluruh perlakuan berpengaruh nyata terhadap peubah yang diamati.

Tabel 2. Hasil analisis KCBK, KCBO, VFA dan NH<sub>3</sub>

Perlakuan	VFA	NH <sub>3</sub>	KCBO	KCBK
	-----mM-----		-----%-----	
Cr-Ao	139,50±2,29 <sup>c</sup>	4,45±0,48 <sup>bc</sup>	77,65±0,63 <sup>d</sup>	72,32±0,29 <sup>ab</sup>
Cr-Sc	164,83±1,76 <sup>b</sup>	5,20±0,25 <sup>b</sup>	79,55±0,55 <sup>bc</sup>	74,66±0,37 <sup>a</sup>
Cu-Ao	140,67±2,75 <sup>c</sup>	4,80±0,13 <sup>b</sup>	79,03±0,96 <sup>c</sup>	72,53±0,86 <sup>bc</sup>
Cu-Sc	161,83±7,28 <sup>b</sup>	7,33±0,90 <sup>a</sup>	81,06±0,43 <sup>a</sup>	74,82±1,13 <sup>a</sup>
Se-Ao	108,67±8,69 <sup>d</sup>	4,55±0,35 <sup>bc</sup>	80,27±0,24 <sup>bc</sup>	71,84±0,58 <sup>c</sup>
Se-Sc	182,17±6,43 <sup>a</sup>	5,39±0,52 <sup>b</sup>	81,46±0,44 <sup>a</sup>	75,64±0,18 <sup>a</sup>
Zn-Ao	135,83±8,55 <sup>c</sup>	2,88±1,34 <sup>c</sup>	76,66±0,24 <sup>d</sup>	69,53±0,25 <sup>d</sup>
Zn-Sc	171,83±4,31 <sup>ab</sup>	5,20±0,80 <sup>b</sup>	80,51±0,28 <sup>ab</sup>	73,88±1,44 <sup>ab</sup>

Produksi NH<sub>3</sub> yang dihasilkan merupakan kisaran konsentrasi NH<sub>3</sub> normal berkisar antara 4 – 12 mM (Sutardi, 1980). Pada hasil kombinasi Zn-Ao, konsentrasi NH<sub>3</sub> kurang dari kisaran normal. Hal tersebut dapat dikarenakan penambahan Zn akan menurunkan aktivitas bakteri protease (Eyavuz dan Dehority, 2009). Konsentrasi NH<sub>3</sub> merupakan hasil degradasi

protein di dalam rumen oleh bakteri proteoliti yang sangat penting untuk pertumbuhan mikroba rumen, karena NH<sub>3</sub> adalah sumber utama untuk sintesis protein mikroba serta untuk memenuhi kebutuhan protein mikroba. Produksi NH<sub>3</sub> yang tinggi mencerminkan banyaknya protein ransum yang mudah didegradasi oleh mikroba rumen (Tanuwiria *et al.*, 2005). Kombinasi terbaik untuk

menghasilkan  $\text{NH}_3$  adalah kombinasi mineral-Sc meski interaksinya tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Tingginya konsentrasi  $\text{NH}_3$  secara tidak langsung menunjukkan bahwa semakin besar hasil buangan protein maka protein yang didegradasi oleh mikroorganisme rumen semakin banyak. Menurut Astuti *et al.* (2006) aktivitas proteolitik *A. oryzae* mempengaruhi konsentrasi ammonia. Meski begitu, tidak berlaku pada penelitian ini. *S. cerevisiae* dapat memberikan interaksi mikroorganisme proteolitik yang lebih baik dibandingkan dengan *A. oryzae* terlihat dari kombinasi mineral-Ao, meski nilai interaksi tersebut tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ).

VFA (*volatile fatty acid*) merupakan hasil fermentasi bahan organik berupa karbohidrat.

VFA merupakan sumber energi utama ternak ruminansia serta sumber kerangka karbon pembentukan protein mikroba. Produksi VFA total bagi kelangsungan hidup ternak berkisar 70-150 mM (McDonald *et al.*, 2011). Produksi VFA total pada tabel 2. menunjukkan kisaran normal, namun ada beberapa yang nilainya lebih tinggi dari pendapat McDonald *et al.* (2011). Penjumlahan hasil VFA total kombinasi Zn-fungi, serta Cr-fungi memberikan nilai VFA total lebih baik dibandingkan dengan kombinasi fungi dengan mineral Cu dan Se. Menurut Astuti *et al.* (2006) suplementasi Cr organik memberikan pengaruh terhadap kinerja mikroba rumen, karena adanya suplai energi yang menjadikan mikroba semakin aktif.

Tabel 3. Hasil analisis pengaruh interaksi mineral-fungi.

Parameter	Fungi	Mineral			
		Cr	Cu	Se	Zn
VFA	Ao	139,5 $\pm$ 2,29 <sup>b</sup>	140,7 $\pm$ 7,28 <sup>b</sup>	108,7 $\pm$ 8,69 <sup>b</sup>	135,8 $\pm$ 8,55 <sup>b</sup>
	Sc	164,8 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	161,8 $\pm$ 2,74 <sup>a</sup>	182,2 $\pm$ 6,43 <sup>a</sup>	171,8 $\pm$ 4,31 <sup>a</sup>
$\text{NH}_3$	Ao	4,45 $\pm$ 0,48	4,80 $\pm$ 0,13	4,55 $\pm$ 0,35	2,88 $\pm$ 1,34
	Sc	5,20 $\pm$ 0,25	7,33 $\pm$ 0,90	5,39 $\pm$ 0,51	5,20 $\pm$ 0,80
KCBK	Ao	77,65 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>	79,03 $\pm$ 0,96 <sup>b</sup>	80,27 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	76,66 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
	Sc	79,55 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	81,06 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	81,46 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	80,51 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>
KCBO	Ao	72,32 $\pm$ 0,29	72,53 $\pm$ 0,86	71,84 $\pm$ 0,58	69,53 $\pm$ 0,25
	Sc	74,66 $\pm$ 0,37	74,82 $\pm$ 1,13	75,64 $\pm$ 0,18	73,88 $\pm$ 1,44

Berdasarkan analisis statistik nilai VFA total Se-Sc dan Zn-Sc lebih tinggi secara nyata ( $P<0,05$ ) diantara nilai VFA mineral kombinasi lainnya. Kombinasi Cu-Sc maupun Cu-Ao memberikan pengaruh nyata ( $P<0,05$ ) terhadap VFA total namun jumlah yang didapatkan tidak sebanyak mineral yang lain. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh sifat mineral. Cu tidak berinteraksi dengan baik dengan mikroorganisme rumen yang berkaitan dengan serat. Hal tersebut juga terjadi pada kombinasi Se-Ao. Kombinasi Se-Ao yang menghasilkan jumlah VFA total rendah ( $P<0,05$ ). Jumlah VFA selain dipengaruhi oleh kombinasi mineral-Fungi, dapat dipengaruhi oleh substrat yang digunakan. Penggunaan jagung sebagai substrat dapat meningkatkan produksi VFA total. Namun jika melihat hasil analisis interaksi (Tabel 3) menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara mineral dengan fungi dilihat dari hasil yang signifikan ( $P<0,05$ ), hal tersebut menunjukkan adanya interaksi positif antara mineral dengan fungi. Interaksi mineral dengan *S. cerevisiae* menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan interaksi mineral dengan *A. oryzae*. Hal tersebut terjadi diduga karena interaksi mineral dengan *S. cerevisiae* meningkatkan

potensi mikroba rumen, sedangkan *A. oryzae* tidak memberikan pengaruh yang besar melalui interaksi tersebut.

Kecernaan bahan kering dan bahan organik merupakan salah satu tolak ukur kualitas pakan yang diberikan. Semakin tinggi nilainya maka semakin tinggi zat makanan yang dapat digunakan. Kombinasi mineral Se-Sc menghasilkan pencernaan bahan kering dan bahan organik tertinggi dibandingkan dengan kombinasi mineral lain ( $P<0,01$ ), terdapat interaksi positif dengan mikroba rumen pada pencernaan bahan keringnya. Pada rumen, protozoa dan *selomonad* berkontribusi sebesar 20-60% masa mikroba dan keduanya memetabolis Se (Van Soest, 1994), dapat diartikan bahwa Se dibutuhkan oleh mikroba rumen. Penelitian Arzola *et al.* (2008) melaporkan bahwa pemberian selenium organik memberi pengaruh nyata terhadap degradabilitas rumen, hal tersebut menunjukkan bahwa jenis atau sumber selenium memberikan pengaruh. Selain hal itu, hasil pencernaan bahan kering Se-Ao juga menunjukkan hasil yang tinggi namun dengan nilai yang lebih rendah. Kombinasi Cu-Ao dan Cu-Sc menduduki posisi kedua setelah Se-Ao dan Se-Sc. Nilai

kecernaan dapat dipengaruhi juga oleh VFA dan  $\text{NH}_3$ , karena jika nilai kedua hal tersebut tinggi maka akan meningkatkan aktivitas mikroba untuk mencerna pakan.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Kombinasi mineral - *S. cerevisiae* memberikan hasil yang lebih tinggi pada nilai VFA,  $\text{NH}_3$ , dan kecernaan baik bahan kering maupun organik jika dibandingkan dengan kombinasi mineral-A. *oryzae*. Secara individual kombinasi Cu-Sc dan Se-Sc memberikan hasil yang lebih tinggi secara nyata dibandingkan dengan kombinasi lain.

### Saran

Data penelitian mengenai kombinasi substrat mineral dengan fungi masih sulit didapatkan, terutama keterkaitannya dengan produksi ternak secara lebih mendalam. Perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui pengaruh hasil pemberian substrat tersebut terhadap ternak secara langsung.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington.
- Arthington, J. D. 2005. Effects of copper oxide bolus administration or high-level copper supplementation on forage utilization and copper status in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83(12), 2894–2900. <https://doi.org/10.2527/2005.83122894x>.
- Arzola C., J. Segovia, O. Ruiz, J. Salinas-Chavira, C. Rodriguez-Muela, and J. Jiménez. 2008. Influence of organic or inorganic selenium in diets on in situ dry matter degradability and ruminal kinetics in sheep. *Asociación Latinoamericana de Prod Anim.* 16(1): 7-12.
- Astuti, W.D., T. Sutardi, D. Evvyernie and T. Toharmat. 2006. Penggunaan kromium organik dari beberapa jenis fungi terhadap aktivitas fermentasi rumen secara in vitro. *Media Peternakan.* 29(3): 121-132. <https://bit.ly/2HEdMr0>
- Beharka, A.A, T.G. Nagaraja and J.L. Morrill. 1991. Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *J. Dairy Sci.* 74:4326-4336. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78628-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78628-1)
- Besong, S., J.A. Jackson, D.S. Trammell and V. Akay. 2001. Influence of supplemental chromium on concentrations of liver triglyceride, blood metabolites and rumen VFA profile in steers fed a moderately high fat diet. *J. Dairy Sci.* 84: 1679–1685. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74603-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74603-6).
- Castillo-González, A.R., M.E Burrola-Barrazab, J. Domínguez-Viverosb, and A. Chávez-Martínez. 2014. Rumen microorganisms and fermentation. *Arch de Med Vet.* 46(2): 349-361. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000300003>.
- Conway, E.J. 1940. Micro-Diffusion Analysis and Volumetric Error. D. Van Nostrand Co., Inc. New York City, USA.
- Durand-Chaucheyras F., Fonty, G. and Bertin, G. (1997). L'utilisation de levures vivantes, additifs microbiens chez le ruminant: effets sur la microflore et les fermentations ruminales, effets zootechniques. *Buletin des G.T.V n°5B*, 576: 35–52.
- Engle, T. E., and J.W. Spears. 2000. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *J. Anim Sci.* 78(9): 2446–2451. <https://doi.org/10.2527/2000.7892446x>.
- Eryavuz, A., and B.A. Dehority. 2009. Effects of supplemental zinc concentration on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers in vitro. *Anim Feed Sci Tech.* 151(3-4):175–183. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.01.008>.
- Faixová, Z., E. Piešová, Z. Maková, K. Čobanová, and Š. Faix, Š. 2016. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on ruminal enzyme activities and blood chemistry in sheep. *Acta Vet Brno*, 85: 185-194. <https://doi.org/10.2754/avb201685020185>
- Genther, O.N. and S.L. Hansen. 2014. The effect of trace mineral source and concentration on ruminal digestion and mineral solubility. *J. Dairy Sci.* 98: 566–573. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8624>.
- Krehbiel C.R, S.R. Rust, G. Zhang, and S.E. Gilliland. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81: 120-132. [https://doi.org/10.2527/2003.8114\\_suppl\\_2E120x](https://doi.org/10.2527/2003.8114_suppl_2E120x)
- McDonald P., R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh, and C.A. Morgan. 2011. Animal Nutrition.

- 7<sup>th</sup> edition. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Mihalíková, K., L. Grešáková, K. Boldžárová, Š. Faix, E. Leng, and S. Kišidayová. 2005. The effects of organic selenium supplementation on the rumen ciliate population in sheep. *Folia Microbiol.* 50: 353-356. <https://doi.org/10.1007/BF02931418>.
- Moya D., S. Calsamiglia, A. Ferret, M. Blanch, J.I. Fandiño, L. Castillejos, and I. Yoon. 2009. Effects of dietary changes and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on rumen microbial fermentation of Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 87(9): 2874-2881. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1446>.
- Sarmanu. 2017. Dasar Metodologi Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan Statistika. Airlangga University Press, Surabaya. <https://doi.org/10.17221/6524-CJAS>
- Sonawane, S.N. and S.P. Arora. 1976. Influence of zinc supplementation on rumen microbial protein synthesis in in vitro studies. *Indian J. Anim Sci.* 46: 13-18.
- Sutardi, T. 1980. *Landasan Ilmu Nutrisi*. Jilid 1. Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Tanuwiria, U. H., B. Ayuningsih, dan Mansyur. 2005. Fermentabilitas dan kecernaan ransum lengkap sapi perah berbasis jerami padi dan pucuk tebu teramoniasi (in vitro). *J. Ilmu Ternak.* 5(2): 64-69. <http://jurnal.unpad.ac.id/jurnalilmuternak/article/view/2291/2143>.
- Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1963. Two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Bri. Grassland Soc.* 18: 104-110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>.
- Throne, M., A. Bach, M. Ruiz-Moreno, M.D. Stern, and J.G. Linn. 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows. Yeast supplementation on rumen fermentation. *Lives. Sci.* 124(1-3): 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.02.007>
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of The Ruminant. 2<sup>nd</sup> Ed. Cornell University Press. Massachusetts, USA.
- Zhang, W., Wang, R., Zhu, X., Kleemann, D.O., Yue, C., & Jia, Z. 2007. Effects of dietary copper on ruminal fermentation, nutrient digestibility and fiber characteristics in cashmere. *Asian-Australasian J. Anim Sci.* 20(12): 1843-1848. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.1843>