
TEKNIK PRODUKSI GAS IN-VITRO UNTUK EVALUASI PAKAN TERNAK : Volume Produksi Gas Dan Kecernaan Bahan Pakan

Asih Kurniawati

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi – BATAN, Jakarta

ABSTRAK

TEKNIK PRODUKSI GAS IN-VITRO UNTUK EVALUASI PAKAN TERNAK: Volume Produksi Gas Dan Kecernaan Bahan Pakan. In-vitro teknik produksi gas dapat digunakan untuk prediksi kualitas pakan. Pengaruh penambahan molase sebagai sumber karbohidrat mudah terdegradasi pada pakan sumber protein silase red clover dipelajari dengan menggunakan teknik ini. Dari data yang diperoleh menunjukkan terdapat korelasi positif antara total produksi gas dengan nilai kecernaan pakan ($r = 0,96$). Korelasi positif antara total produksi gas dengan produksi biomasa mikroba ($r = 0,96$). Penambahan molase sangat nyata meningkatkan nilai kecernaan bahan kering ($P < 0,01$) meningkatkan bahan kering terdegradasi ($P < 0,01$) dan produksi biomasa mikroba ($P < 0,01$), serta meningkatkan efisiensi nitrogen pakan dalam pembentukan biomasa mikroba ($P < 0,01$) seiring dengan peningkatan jumlah suplementasi. Penambahan 0,3 g molase menunjukkan hasil yang tertinggi sementara penambahan 0,15 dan 0,225 molase memberikan hasil yang lebih baik dibanding penambahan 0,0625 molase dan *red clover* tanpa suplementasi. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa in-vitro teknik produksi gas dapat digunakan untuk evaluasi dan pemilihan bahan pakan untuk ternak.

Kata kunci : Produksi gas, Evaluasi, Pakan, Kecernaan dan Biomasa mikroba.

ABSTRACT

IN-VITRO GAS PRODUCTION TECHNIQUE AS FOR FEED EVALUATION: Volume of gas production and feed degradability. In-vitro gas production technique can be used to predict feed quality. The effect of molasses supplementation as a source of degradable carbohydrate to protein source red clover silage has been done using this technique. Data showed there were positive correlation between total volume gas produced and feed degradability ($r = 0,96$), between total volume gas produced and microbial biomass ($r = 0,96$). Dry matter degradability, dry matter degraded, microbial biomass production and efficiency of nitrogen utilization, highly significant ($P < 0,01$) increased due to increasing of degradable carbohydrate. The addition of 0,3 g molasses gave the best result whereas the addition of 0,15g and 0,225g have better effect than 0,0625g molasses addition and red clover only. This result suggested that In-vitro production technique can be used as tool for feed evaluation.

Keywords : Gas production, Evaluation, Feed, Degradability, Microbial biomass.

PENDAHULUAN

Produktivitas ternak yang meliputi produksi susu dan pertambahan bobot badan dibatasi oleh *degradability* (nilai kecernaan) pakan dan konsumsi pakan (1). Kedua parameter tersebut sangat penting dalam nutrisi ternak. Pakan dengan nilai kecernaan rendah memiliki degradasi

pakan rendah pula sehingga tidak mampu mengimbangi aktifitas fermentasi pakan oleh mikroba rumen yang berakibat terhadap rendahnya pertumbuhan mikroba di dalam rumen dan rendahnya konsumsi pakan (2). Namun penentuan nilai kecernaan dan konsumsi pakan secara in-vivo pada ternak secara langsung membutuhkan banyak waktu, tenaga kerja, biaya, di samping membutuhkan volume sampel dalam jumlah yang lebih besar, sehingga teknik in-vivo kurang cocok digunakan dalam evaluasi pakan dalam jumlah yang besar, dalam arti banyak jenisnya (3). Sehingga dibutuhkan suatu teknik yang efisien untuk menentukan kedua parameter tersebut.

Sejak tahun 1950 telah banyak dikembangkan teknik in-vitro dengan simulasi sistem yang ada di dalam rumen, baik dari sistem yang sederhana dalam *batch culture* maupun dengan sistem yang lebih kompleks dalam sistem *continuous culture*. Teknik in-vitro produksi gas merupakan teknik yang sederhana dan banyak digunakan dalam penelitian fermentasi rumen meskipun teknik in-vivo dibutuhkan pula pada akhirnya. Umumnya digunakan dalam tahap awal penelitian secara in-vitro untuk prediksi nilai kecernaan pakan dalam rumen dan prediksi nilai nutrisi pakan. Terdapat keterkaitan antara proses fermentasi di dalam rumen dengan produksi gas (4). Quin (4) mempelajari glukosa dan *lucerna hay* serta beberapa jerami lainnya dengan menghubungkan manometer ke dalam canula domba merino untuk mengukur gas yang dihasilkan selama proses fermentasi. Namun pengukuran secara langsung pada ternak sangat sulit dilakukan dan tidak mudah untuk diulang. Menke *et al* (5) menyebutkan bahwa terdapat korelasi yang nyata antara produksi gas secara in-vitro dengan produksi gas secara in-vivo.

Produksi gas in-vitro merupakan simulasi rumen dalam sistem *batch culture*. Sampel pakan yang akan diteliti di inkubasi dalam fermentor (syringe glass atau botol serum) pada suhu 39⁰C dalam medium anaerob yang diinokulasi dengan mikroba rumen. Adanya aktifitas fermentasi oleh mikroba rumen akan menghasilkan gas. Gas yang terbentuk berasal dari hasil fermentasi (CO₂ dan CH₄) dan secara tidak langsung dari CO₂ yang dilepaskan dari buffer bikarbonat setiap dihasilkan *volatyl fatty acid* (VFA) (6). Volume gas yang terbentuk dapat digunakan sebagai indikasi proses fermentasi yang terjadi. Korelasi yang sangat signifikan antara kecernaan bahan organik dan produksi VFA dengan produksi gas dilaporkan oleh Beuvink *et al* (7). VFA merupakan salah satu hasil fermentasi rumen yang sangat penting disamping mikroba rumen (6). Dua model in-vitro produksi gas yang berkembang saat ini adalah dengan menggunakan syringe glass berskala dan dengan menggunakan botol serum. Prinsip kerja in-vitro produksi gas dengan menggunakan syringe glass adalah gas yang terbentuk selama inkubasi akan mendorong piston ke atas, sehingga volume gas dapat dibaca pada skala yang terdapat pada dinding syringe Perbedaan

antara metode ini dengan metode pemakaian botol serum adalah gas yang terbentuk pada metode botol serum akan mengisi ruang kosong pada bagian atas botol (*head space*). Volume gas diukur dengan menggunakan syringe 10 ml.

Kelebihan dari teknik *in-vitro* di bandingkan teknik *in-vivo* adalah, 1) lebih efektif, efisien dan mudah (8) ;2) biaya dan waktu yang dibutuhkan lebih sedikit, 3) memungkinkan mengontrol kondisi fermentasi sesuai dengan kebutuhan, 4) Volume sample yang dibutuhkan sedikit sangat cocok digunakan untuk evaluasi pakan yang banyak ragamnya (9,10), 4) tidak membutuhkan banyak tenaga kerja, 5) dan mudah untuk diulang (10).

Metode produksi gas *in-vitro* dapat digunakan untuk mengukur dan memprediksi nilai kecernakan bahan pakan, pengaruh bahan pakan terhadap fermentasi di dalam rumen, dan pengaruh bahan pakan terhadap pertumbuhan mikroba rumen. Dalam penelitian ini teknik produksi gas digunakan untuk mengetahui pengaruh penambahan sumber karbon mudah terdegradasi pada pakan sumber protein terhadap total produksi gas, kecernaan bahan pakan, bahan pakan tercerna, korelasi antara produksi gas dengan kecernaan bahan pakan, pertumbuhan mikroba rumen, dan efisiensi nitrogen pakan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Molases. Molases ditambahkan pada pakan sumber protein *red clover* untuk meningkatkan keseimbangan antara karbohidrat dan protein sehingga mampu memaksimalkan *capture* nitrogen pakan oleh mikroba rumen bagi pertumbuhannya. Pakan yang diuji terdiri dari 5 perlakuan pakan yaitu : 1) 0,75 g *red clover*, 2) perlakuan 1 + 0,0625 g molase, 3) perlakuan 1 + 0,15 g molase, 4) perlakuan 1 + 0,225 g molase dan 5) perlakuan 1 + 0,3 g molase.

Inokulum mikroba rumen. Digesta dan cairan rumen diambil dari ternak ruminansia sapi berfistula. Dibawa ke laboratorium segera setelah pengambilan dimasukkan ke dalam termos untuk mempertahankan temperatur. Digesta dan cairan rumen diblender agar homogen dan melepaskan mikroba yang menempel pada partikel pakan. Empat lapis kain muslin digunakan untuk menyaring campuran. Cairan yang dihasilkan ditampung dalam beaker yang dialiri gas CO₂, digunakan sebagai inokulan segera setelah penyaringan (11).

Metode

Teknik produksi gas menurut Theodorou, *et.al.* (11) digunakan untuk mempelajari keseimbangan pakan yang terbaik.

Preparasi medium buffer

Medium buffer terdiri dari 660 ml Cairan rumen, 1095 ml H₂O, 730 ml buffer (4 g NH₄HCO₃ + 35gNaHCO₃ dijadikan 1000 ml dengan H₂O), 365 ml macromineral (5,7 g Na₂HPO₄ + 6,2 g KH₂PO₄ + 0,6 g MgSO₄.7 H₂O, dijadikan 1000 ml dengan H₂O) , 0,23 ml micromineral (13,2 g CaCl₂.2H₂O + 10,0 g MnCl₂.4 H₂O + 1,0 g Co Cl₂.6 H₂O + 8,0 g Fe Cl₃. 6 H₂O dijadikan 100 ml dengan H₂O) , 1,0 ml rezasurine 0,1 % (w/v), 60 ml larutan pereduksi (3,7 ml NaOH 1N + 580 mg Na₂S.9 H₂O tepatkan dengan H₂O menjadi 60 ml). Namun dalam penelitian ini larutan pereduksi diganti dengan titanium acetat 15% (12).

Fermentasi dilakukan dengan menggunakan botol serum 160 ml. Setiap botol berisi bahan pakan yang diuji ditambah 90 ml medium bufer, 10 ml inokulum mikroba rumen. Ammonium-¹⁵N sulfat (kelimpahan ¹⁵N 10% ; isotec, UK) dengan konsentrasi 0,94% ditambahkan pada awal inkubasi sebanyak 1 ml/ botol. Fermentasi dengan volume yang lebih besar dilakukan dengan perlakuan yang sama pada botol 1 liter. Perbandingan antara bahan pakan, medium bufer, dan Ammonium-¹⁵N sulfat sesuai dengan botol 160 ml sehingga diperoleh ratio antara volume larutan dan *head space* sama antara botol besar dan botol kecil. Fermentasi pada botol besar digunakan untuk mengisolasi mikroba dalam pengukuran kelimpahan ¹⁵N mikroba rumen, selama inkubasi.

Fermentasi dihentikan pada waktu yang diinginkan pada penelitian ini setelah 24 jam. Volume gas yang dihasilkan di catat. Keseluruhan isi botol kecil disentrifuge pada 20.000 g selama 30 menit pada 4⁰C untuk memisahkan sel mikroba dari medianya (13). Pelet dicuci dengan cara diresuspensi dengan 0,9 % NaCL untuk menghilangkan sisa NH₃-N, kemudian disentrifus kembali pada kecepatan 20.000 g selama 30 menit pada 4⁰C. Pencucian dengan NaCl dilakukan 2 kali, selanjutnya dicuci dengan aquades. Pelet di keringkan untuk mengukur kecernaan dan kelimpahan ¹⁵N mikroba rumen. Pengeringan dilakukan dengan *freeze dryer* selama satu malam. Sisa air dihilangkan dengan memanaskan tabung pada oven 105⁰ C selama 3 jam. Kecernaan dihitung dengan cara berat tabung plus pelet dikurangi tabung kosong dan dikoreksi dengan berat pellet blangko (14).

Mikroba rumen diisolasi dengan sentrifugasi 500 ml media pada botol besar dengan kecepatan 500 g selama 30 menit pada 4⁰C untuk memisahkan partikel pakan dan protozoa.

Partikel pakan dan protozoa terendapkan pada sentrifugasi 100 – 2000 g (14). Selanjutnya supernatan disentrifus pada 20.000 g selama 30 menit pada 4⁰C untuk memisahkan mikroba dari medianya. Pencucian pelet mikroba dilakukan dengan cara resuspensi seperti telah disebutkan sebelumnya.

Pelet kering dari botol besar maupun botol kecil selanjutnya dibuat tepung dengan ukuran 250µm atau kurang dengan jalan digiling dengan menggunakan *ball mill grinding* (15). ¹⁵N *enrichment* mikroba rumen diukur dengan menggunakan isotop-ratio spectrometer massa.

Parameter yang diamati adalah, total produksi gas selama 24 jam, bahan kering pakan tercerna, nilai kecernaan bahan pakan, produksi N mikroba, efisiensi N pakan.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola searah. Bila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple-Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa penambahan molase sebagai sumber karbohidrat mudah terdegradasi pada pakan sumber protein (*red clover*) secara sangat nyata ($P<0,01$) meningkatkan total bahan kering tercerna dan kecernaan bahan kering. Peningkatan bahan pakan tercerna dan nilai kecernaan berjalan seiring dengan peningkatan jumlah pemberian molase. Peningkatan jumlah pemberian karbohidrat mudah terdegradasi secara sangat nyata ($P<0,01$) juga meningkatkan produksi biomasa mikroba (Tabel 1). Penambahan karbohidrat mudah terdegradasi akan meningkatkan pertumbuhan mikroba rumen dan laju degradasi substrat oleh mikroba rumen. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan karbohidrat mudah terdegradasi dan protein secara bersamaan mampu meningkatkan degradasi bahan organik pakan dan meningkatkan pertumbuhan mikroba rumen yang berimplikasi terhadap peningkatan produktifitas ternak (2). Bahan pakan yang tercerna selama proses fermentasi rumen akan diubah menjadi produk utama yaitu VFA yang merupakan sumber energi bagi ternak dan biomasa mikrobia yang merupakan sumber protein utama bagi ternak (6). Dua pertiga sampai tiga perempat asam amino yang diserap oleh ternak ruminansia berasal dari protein mikroba rumen (16).

Jumlah bahan pakan tercerna berdasarkan bahan kering dan nilai kecernaan tertinggi terdapat pada perlakuan 5 yaitu pada penambahan molase sebesar 0,3 g. Bahan kering tercerna sebesar 1,25 g, sedangkan nilai kecernaan adalah 91, 72%, diikuti perlakuan 4, 3, 2, dan terendah

pada perlakuan 1 dimana sumber protein tidak disuplementasi dengan sumber karbohidrat. Jumlah bahan tercerna pada perlakuan 1 adalah 0,59 g dengan nilai kecernaan 78,43% (Tabel 1).

Tabel 1. Profil fermentasi rumen : total produksi gas selama 24 jam inkubasi, pH, total produksi *volatil fatty acid* (VFA), Total produksi mikroba, konsentrasi amonia (NH₃) media, dan akumulasi H₂S pada penambahan karbohidrat mudah terdegradasi (molases) terhadap pakan sumber protein (*red clover*).

Parameter	Perlakuan					
	1	2	3	4	5	6
Bahan kering tercerna (g)	1,77 ^a	2,11 ^b	2,77 ^c	3,2 ^d	3,76 ^e	**
Kecernaan bahan kering (%)	78,43 ^a	79,95 ^a	87,31 ^b	88,04 ^b	91,72 ^b	**
Total produksi N Mikroba (mg)	26,14 ^a	30,18 ^b	35,05 ^c	36,27 ^c	42,98 ^d	**
Efisiensi nitrogen pakan (%)	54,98 ^a	59,52 ^{ab}	63,57 ^{bc}	62,54 ^{bc}	68,51 ^c	**
Total produksi gas (ml)	128,17 ^a	147,67 ^b	184,67 ^c	210,83 ^d	238 ^e	**

^{a,b,c,d,e} nilai yang diikuti huruf berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata sangat nyata (**)
nyata (*)
tidak nyata (NS)
Semua nilai pada Tabel adalah rata-rata dari 5 ulangan

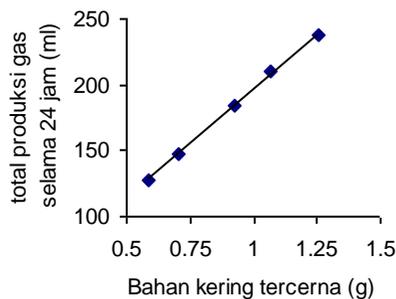
Produksi biomasa protein mikroba tertinggi terdapat pada perlakuan 5, yaitu sebesar 42,98mg, diikuti perlakuan 3 dan 4 sebesar 35,05mg dan 36,27mg. Perlakuan 1 menghasilkan biomasa protein mikroba terendah yaitu sebesar 26,14mg.

Peningkatan karbohidrat mudah terdegradasi secara sangat nyata ($P < 0,01$) mampu meningkatkan efisiensi pemanfaatan nitrogen pakan menjadi nitrogen mikroba portein. Efisiensi tertinggi dicapai pada perlakuan 5 sebesar 68,51%, diikuti perlakuan 3 dan 4 masing-masing sebesar 63,57% dan 62,54%. Efisiensi nitrogen pakan perlakuan 2 lebih rendah dari perlakuan 3 dan 4 yaitu sebesar 59,52% dan terendah pada perlakuan 1 sebesar 54,98%.

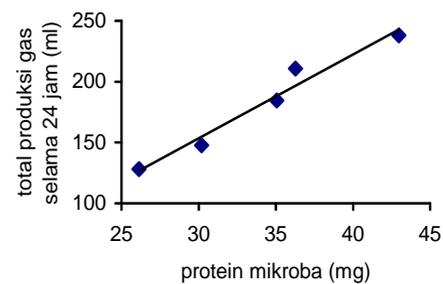
Wallace, *et.al.* (17) mengatakan bahwa ternak ruminansia merupakan ternak yang sangat tidak efisien dalam retensi pakan sumber protein. Protein pakan setelah masuk ke dalam rumen akan segera didegradasi secara cepat menjadi peptida yang merupakan senyawa antara. Peptida selanjutnya didegradasi menjadi bentuk yang lebih sederhana, yaitu amonia yang segera hilang melalui difusi dinding rumen. Hilangnya amonia menurunkan efisiensi pemanfaatan protein. Peningkatan laju inkorporasi asam amino dan amonia oleh mikroba rumen akan meningkatkan efisiensi pemanfaatan protein pakan. Efisiensi pemanfaatan protein pakan dipengaruhi oleh laju degradasi protein yang sangat cepat yang tidak seimbang dengan ketersediaan sumber energi yang

cepat dapat digunakan untuk pertumbuhan mikroba rumen. Penambahan sumber protein tidak dapat menstimulasi pertumbuhan mikroba rumen tanpa diimbangi penambahan sumber karbohidrat mudah terdegradasi. Penambahan selobiosa dibarengi dengan penambahan protein mampu meningkatkan laju pertumbuhan mikroba rumen dan efisiensi pemanfaatan protein (18).

Produksi gas selama 24 jam meningkat sangat nyata ($P < 0,01$) dengan peningkatan jumlah karbohidrat mudah terdegradasi. Peningkatan karbohidrat mudah terdegradasi meningkatkan jumlah bahan kering tercerna. Bahan pakan tercerna akan diubah oleh mikroba rumen menjadi VFA dan protein mikroba dengan meningkatkannya pertumbuhan. Hasil samping fermentasi bahan tercerna adalah CO_2 dan CH_4 yang berupa gas. Pada teknik produksi gas CO_2 akan dilepaskan dari bufer bikarbonat setiap dihasilkan VFA (6). Sehingga peningkatan bahan pakan terdegradasi akan meningkatkan gas yang dilepaskan. Dengan kata lain produksi gas dapat digunakan untuk mengestimasi bahan pakan tercerna.



Gambar 1. Korelasi antara bahan pakan tercerna (g) dengan total produksi gas selama 24 jam pada perlakuan penambahan sumber karbohidrat mudah terdegradasi (molase) terhadap pakan sumber protein (*red clover*)
 $y = 167x + 30,485$ ($r = 0,999$) $n : 5$



Gambar 2. Korelasi antara produksi biomassa mikroba (mg) dengan total produksi gas selama 24 jam pada perlakuan penambahan sumber karbohidrat mudah terdegradasi (molase) terhadap pakan sumber protein (*red clover*)
 $y = 6,8968x - 53,48$ ($r = 0,9641$) $n : 5$

Gambar 1. menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif yang nyata antara total produksi gas dengan bahan kering tercerna dengan $r = 0,999$, dan persamaan regresi $Y = 167x + 30,485$. y adalah total produksi gas selama 24 jam dan x adalah bahan kering tercerna. Demikian dengan nilai pencernaan bahan kering berkorelasi positif dengan total produksi gas (gambar tidak disajikan) dengan persamaan regresi $y = 7,7706x - 479,33$ dan $r = 0,9621$. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Blummel *et.al.* (14).

Produksi biomassa protein mikroba berkorelasi positif dengan produksi gas selama 24 jam (Gambar 2). Persamaan regresi adalah $y = 6,8968x - 53,48$ dan $R^2 = 0,9641$. Hal ini sesuai dengan

Carro dan Miller (19) yang menyatakan bahwa volume produksi gas selama inkubasi berkorelasi positif dengan pertumbuhan mikroba dan jumlah pakan yang terfermentasi. Namun berkebalikan dengan hasil penelitian Blummel *et. al.* (14).

KESIMPULAN

Terdapat korelasi positif antara volume produksi gas dan nilai kecernaan bahan pakan serta pertumbuhan mikroba.

Penambahan karbohidrat mudah terdegradasi dapat meningkatkan nilai kecernaan bahan pakan, produksi biomasa mikroba, dan efisiensi penggunaan nitrogen pakan oleh mikroba rumen untuk pembentukan biomasa mikroba, seiring dengan peningkatan jumlah penambahan karbohidrat. Penambahan 0,3 g molase menunjukkan hasil yang tertinggi sementara penambahan 0,15 dan 0,225 molase memberikan hasil yang lebih baik dibanding penambahan 0,0625 molase dan *red clover* tanpa suplementasi. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa in-vitro teknik produksi gas dapat digunakan untuk evaluasi dan pemilihan bahan pakan untuk ternak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dr. Roger J Merry. Join Team Leader di IGER, UK, yang telah memberikan bimbingan dan memberi kesempatan kepada penulis untuk melakukan kegiatan penelitian serta memberikan kesempatan kepada penulis untuk menulis materi ini. Terima kasih diucapkan pula kepada IAEA yang telah memberikan fellowship sehingga penulis dapat melakukan kegiatan penelitian. Juga kepada Bapak Suharyono, M.Rur. Sci. yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mendapatkan fellowship.

DAFTAR PUSTAKA

1. MINSON, D.J., 1990. Forage in ruminant nutrition. Academic press. San Diego.
2. OLDHAM, J.D., BUTTERY, P.J., AND FERRY, J.C., Interaction Between Carbohydrates and Nitrogen Digestion in Sheep. *J. Agric. Sci.* 66 : 975-981.
3. COELHO, M., HEMBRY, F.G., BARTON, F.E., AND SAXTON, A.M., 1988. A comparison of microbial, enzymatic, chemical, and near-infrared reflectance spectroscopy methods in forage evaluation. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 20 : 219-231.

4. QUIN, J.I., 1943. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa, 7 : fermentation in the forestomachs of sheep. *Onderspoor Journal of veterinary Science and Animal Industry* 2, 91-117.
5. MENKE, K.H., RAAB,L., SALEWSKI, A., STEINGASS, H., FRITZ, D., AND SCHNEIDER, W., 1979 The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J. Agric. Sci.* 93, 217-222.
6. BLÜMMEL, M., AND ØRSKOV, E.R. (1993) Comparison of in-vitro gas production and nylon bag degradability roughages in prediction of feed intake in cattle. *Animal feed science and technology* 40: 109-229.
7. BEUVINK, J.M.W., AND SPOELSTRA, S.F., 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganism in vitro. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 505-509.
8. KAJIKAWA, H., HAI J., TERADA, F., AND SUGA T. 2003. Operation and Characteristics of Newly Improved and Marketable Artificial Rumen (Rusitec). National Institute of Livestock and Grassland Science. Japan.
9. GETACHEW, G., BLÜMMEL, M., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. 1997. In vitro gas measuring techniques for assesment of nutritional quality of feeds : a review. *Animal Feed Science.* 72 : 261 – 281.
10. TAMMINGA, S., AND WILLIAMS. 1998. In vitro techniques as tools to predict nutrient supply in ruminants. *British Society of Animal Sci. Occasional Publ.* 22 : 1-11.
11. THEODOROU, M.K., WILLIAMS, B.A., DANOA, M.S., McALLAN, A.B., AND FANCE,J. 1998. A simple gas production methode using pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology* (48) : 185 -197.
12. MAKKAR, H.P.S., BLÜMMEL, M., AND BECKER, K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylen glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition* (73) : 897 -913.
13. CRAWFORD, R.J., HOOVER, W.H., AND JUNKINS, L.L. 1980. Effects of solids and liquids flows on fermentation continuous culture. 2. Nitrogen partition and efficiencies of microbial synthesis. *Journal of Animal Science* (51) : 986-993.
14. BLÜMMEL, M., STEINGAB, H., AND BECKER, K., 1997. The Relationship between in-vitro gas production, in-vitro microbial biomass yield and ¹⁵N incorporation and its implications for prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition* 77 : 911-921.

15. FAO/IAEA AGRICULTURE AND BIOTECHNOLOGY LABORATORY SOIL SCIENCE UNIT. 2001. Sample preparation guidelines for C, N stable isotope analysis. http://www.iaea.org/programmes/rial/agriculture/soilscience_main.html.
16. AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH COUNCIL. 1992. Requirements of Ruminant Animal : Protein Nutrition. Abstract Review series B (62) : 787-835.
17. WALLACE, R.J., ATASOGLU, C., AND NEWBOLD, C.J. 1999. Rate of peptides in rumen microbial metabolism. Asian Australian Journal of Animal Science. Review (1) : 139-147.
18. CRUZ SOTO, R., MUHAMMED, S.A., NEWBOLD, C.J., STEWARD, C.S., AND WALLACE,R.J. 1994. Influence of peptides, amino acid, and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria in-vitro. Animal Feed Science and Technology (33) : 195-208.
19. CARRO, M.D., AND MILLER, E.L. 1999. Effect of supplementing a fiber basal diet eith different nitrogen forms on ruminal fermentation & microbial growth in an in-vitro semi continuous culture system (RUSITEC). British Journals of Nutrition (82) 149-157.