

## UJI *IN VITRO* KCBK DAN KCBO, KONSENTRASI FVA TANAMAN HERBAL TERHADAP EMISI GAS METAN DAN POPULASI PROTOZOA

### *In Vitro Testing of Kcbk and KCBO Herbal Plants on Methane Gas Emissions and Protozoa Population*

Nursanti Laia dan Ulfa Nikmatia

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Graha Nusantara Padangsidimpuan

Email : [nursanti46@gmail.com](mailto:nursanti46@gmail.com)

#### Abstrak

Sektor peternakan khususnya ternak ruminansia, memegang peranan besar terhadap laju emisi gas metan yang berkontribusi terhadap pemanasan global sekaligus merupakan bentuk representasi dari sejumlah kehilangan energi bagi ternak. Salah satu pendekatan meminimalisasi emisi gas metan pada ternak ruminansia adalah melalui strategi pemberian pakan. Kelor, kunyit dan kedawung merupakan tanaman herbal yang mampu menurunkan populasi bakteri metagenetik. Tanaman-tanaman herbal mengandung saponin yang mampu menurunkan protozoa dan meningkatkan bakteri rumen, sehingga memperbaiki metabolisme rumen. Penelitian ini menggunakan teknik fermentasi *in vitro*. Media inkubasi yang digunakan adalah cairan rumen + larutan buffer bikarbonat yang ditempatkan dalam botol dan diinkubasi dalam *water bath* bersuhu 39-41°C selama 72 jam. Penelitian dirancang dengan menggunakan rancangan acak kelompok (RAL) dengan 8 perlakuan dan 3 ulangan. Hasilnya menunjukkan bahwa pemberian tanaman herbal nyata meningkatkan KCBK berkisar 56.72% sampai 65.77%, KCBO berkisar 52.10% sampai 59.54% dan NH<sub>3</sub> berkisar 13.20 mM sampai 17.91 mM, emisi gas metan dibandingkan kontrol ( $P < 0.05$ ). Simpulan dalam penelitian ini adalah penggunaan tepung daun kelor, kunyit dan tepung kedawung, persentase KCBK dan persentase KCBO lebih mudah terdegradasi dan menurunkan emisi gas metan dan populasi protozoa pada fermentasi rumen.

Kata kunci: metan, protozoa, tanaman herbal, KCBK, KCBO, *in vitro*

#### Abstract

*The livestock sector, especially ruminant livestock, plays a large role in the rate of methane gas emissions which contribute to global warming and is also a form of representation of a number of energy losses for livestock. One approach to minimizing methane gas emissions in ruminant livestock is through feeding strategies. Moringa, turmeric and kedawung are herbal plants that can reduce the population of metagenetic bacteria. Herbal plants contain saponins which can reduce protozoa and increase rumen bacteria, thereby improving rumen metabolism. This research uses in vitro fermentation techniques. The incubation medium used is rumen fluid + bicarbonate buffer solution which is placed in a bottle and incubated in a water bath at 39-41°C for 72 hours. The research was designed using a randomized block design (CRD) with 8 treatments and 3 replications. The results showed that giving herbal plants significantly increased KCBK ranging from 56.72% to 65.77%, KCBO ranging from 52.10% to 59.54% and NH<sub>3</sub> ranging from 13.20 mM to 17.91 mM, methane gas emissions compared to controls ( $P < 0.05$ ). The conclusion of this research is that using Moringa leaf flour, turmeric and kedawung flour, the percentage of KCBK and the percentage of KCBO are more easily degraded and reduce methane gas emissions and protozoa populations in rumen fermentation.*

**Key words:** methane, protozoa, herbal plants, KCBK, KCBO, *in vitro*

## PENDAHULUAN

Pemanasan global (*global warming*) merupakan permasalahan lingkungan utama yang dihadapi oleh manusia khususnya pada abad terakhir ini. Akar permasalahan pemanasan global telah diketahui berkaitan dengan sangat tingginya laju

akumulasi sejumlah gas rumah kaca pada lapisan atmosfer seperti karbon dioksida (CO<sub>2</sub>), metan (CH<sub>4</sub>), nitrogen oksida (N<sub>2</sub>O) dan kloro fluoro karbon (CFC) sebagai akibat dari semakin tingginya intensitas berbagai aktivitas manusia (Thorpe 2009). Gas metan (CH<sub>4</sub>) merupakan hasil fermentasi anaerob karbohidrat struktural maupun non struktural oleh

metanogen (bakteri penghasil metan) di dalam rumen ternak ruminansia, dan selanjutnya dikeluarkan ke atmosfer melalui proses eruktasi. Menurut Johnson (1995) dan Pelchen dan Peters (1998), gas CH<sub>4</sub> yang dikeluarkan dari rumen mengindikasikan energi yang hilang dari tubuh ternak ruminansia dengan variasi 7% sampai 12% dari energi yang terkonsumsi.

Populasi protozoa di dalam rumen diketahui berbanding lurus dengan produksi gas metan, artinya produksi gas metan berkurang bila populasi protozoa rumen menurun. Dengan demikian, emisi gas metan dapat dikurangi dengan memberikan zat defaunator protozoa pada populasi bakteri pencernaan serat seperti saponin (Thalib 2008). Sementara tanin dapat menurunkan emisi gas metan melalui kinerjanya dalam mereduksi populasi metanogen dalam rumen (Bhatta *et al.* 2009) dan juga melalui penghambatan pencernaan komponen serat pakan sehingga mengurangi produksi H<sub>2</sub> (Tavendale *et al.* 2005).

Salah satu pendekatan meminimalisasi emisi gas metan pada ternak ruminansia adalah melalui strategi pemberian pakan. Menurut Clark (2009), metode untuk menurunkan produksi gas metan telah banyak dilakukan, antara lain dengan pendekatan

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2015 sampai dengan Maret 2016. Analisis proksimat, Van Soest dan *in vitro* dilaksanakan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor dan Analisa proporsi molar VFA di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gajah Mada (UGM).

tanaman tropis diidentifikasi senyawa bioaktifnya (tanin dan saponin), kemudian dilihat hubungan antara senyawa metabolit sekunder semua tanaman tropis ini dengan semua parameter uji *in vitro* yang dilakukan pada tahap 1. Harbone (1987) menyatakan untuk mendapatkan informasi kandungan senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid, tannin, saponin dan lain-lain dapat diidentifikasi dengan analisis fitokimia.

Peubah yang diamati dalam penelitian tahap II adalah:

1. Degradabilitas bahan kering (KCBK) dan bahan organik (KCBO)
2. Konsentrasi N-NH<sub>3</sub> (Amonia)
3. pH cairan rumen
4. Konsentrasi VFA parsial (asam asetat, asam propionate, asam butirrat)
5. Kecepatan produksi gas dan total produksi gas

manajemen pemberian pakan seperti penggunaan hijauan yang berkualitas, meningkatkan jumlah konsentrat dalam ransum, pemberian lemak dan minyak dalam ransum serta penambahan metabolit tanaman-tanaman sekunder (zat aktif).

Zat aktif yang terdapat dalam tanaman herbal (kunyit, kelor, kedawung) anatar lain tanin, saponin dan flavanoid. Jika kedua senyawa tersebut digunakan secara simultan dalam pakan, baik pada pakan dengan proporsi hijauan tinggi maupun pakan dengan proporsi konsentrat tinggi, diharapkan akan menghasilkan efek yang lebih signifikan dalam menurunkan emisi gas metan. Penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai pemberi informasi, rekomendasi dan alternatif tanaman herbal terbaik di dalam ransum komplit dalam rangka mengurangi emisi gas metan, meningkatkan karakteristik fermentasi rumen serta menurunkan populasi protozoa pada ternak ruminansia secara *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi pengaruh suplementasi tanaman herbal terhadap fermentasi rumen, karakteristik rumen dan emisi gas metan secara *in vitro*.

6. Produksi gas CH<sub>4</sub> *in vitro*

7. Populasi total protozoa yang dihitung dengan metode Ogimoto dan Imai (1981)

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK) dengan 8 perlakuan dan 3 kelompok berdasarkan waktu pengambilan cairan rumen untuk uji *in vitro*. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Excell untuk data analisis proksimat dan Van Soest. Analisis ragam ANOVA untuk analisis *in vitro*, jika menunjukkan perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan menggunakan SPSS 16.0. Model analisis ragam pada penelitian ini adalah :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  : pengamatan pada perlakuan ke-i dan kelompok ke-j

$\mu$  : rata-rata umum

$\tau_i$  : pengaruh perlakuan ke-i

$\beta_j$  : pengaruh kelompok ke-j

$\varepsilon_{ij}$  : error (galat) pada perlakuan ke-i kelompok ke-j

Adapun perlakuan terdiri atas :

1. R1 = Kontrol/ tanpa suplementasi
2. R2 = R1+ tepung kelor (30%)
3. R3 = R1 + tepung kunyit (30)
4. R4 = R1+ tepung kedawung (30%)
5. R5 = R1 + tepung kelor (15%) + tepung kunyit (15%)
6. R6 = R1 + tepung kelor (15%) + tepung kedawung (15%)
7. R7 = R1 + tepung kunyit (15%) + tepung kedawung (15%)
8. R8 = R + tepung kelor (10%) + tepung kunyit (10%) + tepung kedawung (10%)

### Inkubasi *In Vitro*

Cairan rumen disaring menggunakan kain penyaring dan dimasukkan ke dalam termos untuk kemudian dibawa ke laboratorium. Inkubasi substrat secara *in vitro* menggunakan metode yang telah dijelaskan oleh Theodorou dan Brooks (1994). Substrat sebanyak 0.75 g dimasukkan ke botol *vial injection* berukuran 100 ml. Ke dalam botol tersebut ditambahkan 75 ml cairan buffer dan rumen yang telah dijenuhkan untuk digunakan sebagai media inkubasi.

Substrat beserta cairan buffer dan rumen yang sudah bercampur di dalam botol, dialiri gas CO<sub>2</sub>, kemudian ditutupi dengan penutup karet dan penutup aluminium menggunakan alat penekan. Selanjutnya dilakukan inkubasi ke dalam waterbath pada suhu 39°C.

### Pengukuran KCBK dan KCBO (Tilley dan Terry 1963).

Kecernaan bahan kering (KCBK) dan bahan organik (KCBO) mengacu pada metode Tilley dan Terry (1963). Tabung fermentor yang telah diisi dengan 0.5 g sampel, ditambahkan 40 mL larutan McDougall. Tabung dimasukkan ke dalam shaker bath dengan suhu 39 °C, kemudian diisi cairan rumen 10 mL, tabung dikocok dengan dialiri CO<sub>2</sub> selama 30 detik, dicek pH (6.5–6.9), kemudian ditutup dengan karet berventilasi, dan difermentasi selama 48 jam. Setelah 48 jam, dibuka tutup karet tabung fermentor, diteteskan 2-3 tetes HgCl<sub>2</sub> untuk membunuh mikroba. Tabung fermentor dimasukkan ke dalam sentrifugasi kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4 ribu rpm selama 10 menit. Substrat akan terpisah menjadi endapan di bagian bawah dan supernatan yang bening berada di bagian atas. Supernatan dibuang dan endapan hasil sentrifugasi pada

kecepatan 4 ribu rpm selama 15 menit ditambahkan 50 mL larutan pepsin-HCl 0.2%. Campuran ini lalu diinkubasi kembali selama 48 jam tanpa tutup karet. Sisa pencernaan disaring dengan kertas saring Whatman no. 41 (yang sudah diketahui bobotnya) dengan bantuan pompa vakum. Endapan yang ada di kertas saring dimasukkan ke dalam cawan porselen, setelah itu dimasukkan ke dalam oven 105°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, cawan porselen dan kertas saring dan residu dikeluarkan, dimasukkan ke dalam eksikator dan ditimbang untuk mengetahui kadar bahan keringnya. Selanjutnya bahan dalam cawan dipijarkan atau diabukan dalam tanur listrik selama 6 jam pada suhu 450–600°C, kemudian ditimbang untuk mengetahui kadar bahan organiknya. Sebagai blanko dipakai residu asal fermentasi tanpa bahan pakan.

$$\begin{aligned} \% \text{ KCBK} &= \left( \frac{\text{BK sample(g)} - (\text{B Kresidu(g)} - \text{BK blanko(g)})}{\text{B K sampel (g)}} \right) \times 100\% \\ \% \text{ KCBO} &= \left( \frac{\text{BO sample(g)} - (\text{BO residu(g)} - \text{BO blanko(g)})}{\text{BO sampel (g)}} \right) \times 100\% \end{aligned}$$

### Pengukuran Konsentrasi VFA

Sampel hasil fermentasi dengan inkubasi 4 jam dimasukkan dalam tabung eppendorf dan diturunkan pHnya sampai pH 3 dengan menambahkan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sebanyak 1 tetes pada masing-masing sampel di tabung eppendorf. Penambahan asam pekat bertujuan untuk menstabilkan sampel yang akan diukur gasnya. Pengukuran produksi VFA total dan parsial (asam asetat, propionat, butirat menggunakan alat Gas Chromatography dengan spesifikasi GC 8A, Shimadzu Crop, Kyoto, Japan dengan kolom berisi 10% SP-1200, 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> on 80/100 Cromosorb WAW. Secara berturut-turut sebanyak 1 µl larutan standar diinjeksikan pada GC setelah itu diinjeksikan sampel hasil inkubasi dengan volume yang sama. Hasil analisa nilai VFA standar dan sampel dibaca dalam kromatogram. Konsentrasi VFA sampel dihitung menggunakan rumus:

$$\text{mM sampel VFA} = \frac{\text{Area Contoh} \times 10 \text{ mM}}{\text{Area Standar}}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Koefisien Cerna Bahan Kering (KCBK) dan Bahan Organik (KCBO)

Perlakuan pemberian tanaman herbal dalam ransum signifikan mempengaruhi KCBK. Pemberian tanaman herbal nyata meningkatkan KCBK dibandingkan kontrol ( $P < 0.05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa kandungan nutrisi dari tanaman herbal yang digunakan mengandung sumber protein terdegradasi yang tinggi (protein yang dibutuhkan oleh mikroba rumen) sehingga nutrisi tersebut diduga menstimulasi pertumbuhan dan aktifitas mikroba rumen lebih baik untuk mencerna pakan jika dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan tanaman herbal. Busquet *et al.* (2005) melaporkan bahwa suplementasi tanaman herbal berupa bawang dalam ransum mampu meningkatkan nilai KCBK dan KCBO dibandingkan pakan kontrol.

Pemberian tanaman kelor 30% (R2) dan campuran tanaman herbal dengan level 15% tanaman kelor dan biji kedawung 15% (R5) ( $P > 0.05$ ) dalam ransumpaling tinggi meningkatkan KCBK (Tabel 2). KCBK menurun pada perlakuan campuran tanaman herbal dengan level tepung kelor 10%, 10% tepung kunyit dan 10% tepung kedawung (R8) (Tabel 4). KCBK perlakuan campuran tanaman herbal dengan level 10% tepung kelor sebanding dengan perlakuan tepung kunyit 15% (R4) maupun campuran keduanya (R7) (Tabel 4). Namun demikian KCBKnya nyata lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian tepung kelor sampai 30% paling baik meningkatkan KCBK. Kelor merupakan tanaman yang cukup efektif dalam menghambat pertumbuhan atau aktivitas mikroorganisme patogen karena memiliki senyawa *saponin*, *flavonoid*, *tannin*, *alkaloid* dan *fenol* (Oluduro 2012). Dengan menghambatnya pertumbuhan mikroorganisme patogen maka mikroba non patogen meningkat pertumbuhannya. Sehingga akan meningkatkan proses pencernaan nutrisi. Selain itu, Kurniawati (2007) menjelaskan bahwa kelor mengandung protein mudah terdegradasi yang mampu meningkatkan pertumbuhan mikroba rumen.

KCBK perlakuan pemberian tanaman herbal sampai 30% dalam ransum pada penelitian ini berkisar 56.72-65.77%. Nilai KCBK sesuai dengan penelitian Muchlas (2014) menggunakan tepung gaplek (20%) + tepung silase kulit ketela pohon (30%) + tepung daun kelor (50%) berkisar

56.96+1.24%. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan tanaman herbal mampu meningkatkan kecernaan bahan dengan serat kasar rendah.

Peningkatan KCBK berbanding lurus dengan KCBO. Perlakuan pemberian tanaman herbal dalam ransum nyata meningkatkan KCBO dibandingkan kontrol ( $P < 0.05$ ). Namun demikian nilai KCBO antar perlakuan tanaman herbal tidak berbeda nyata (Tabel 4). Hal ini diduga ransum yang diberikan tanaman herbal memiliki kualitas yang sama. Selain itu menunjukkan bahwa tanaman herbal tidak mengganggu aktivitas mikroba dalam proses fermentasi. Sehingga tidak mengganggu kecernaan bahan organik.

KCBO perlakuan pemberian tanaman herbal dalam ransum pada penelitian ini berkisar 52.10-59.54%. Sesuai dengan penelitian Muchlas (2014) yaitu 55.34+3.09%. Hal ini membuktikan bahwa tanaman herbal tidak mengganggu mikroba rumen dalam mencerna bahan organik ransum. Selain itu juga tanaman herbal tidak merubah komposisi nutrisi ransum yang dapat menyebabkan menurunnya kecernaan nutrisi ransum.

Tabel 1. Rataan persentase KCBK dan KCBO, pada berbagai perlakuan ransum

Perlakuan	Variabel	
	KCBK (%)	KCBO (%)
R1	42.84a±3.53	34.77a±4.04
R2	63.82c ± 3.25	57.74b±8.34
R3	59.34bc±6.61	58.48b±8.61
R4	62.17bc±9.79	53.84b±13.04
R5	65.77c±5.94	52.10b±5.30
R6	65.16c±4.46	59.54b±2.70
R7	60.56b±3.48	56.68b±5.80
R8	56.72b±3.66	53.15b±7.77

Superscrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaaan nyata ( $P < 0.05$ ).

Keterangan :

R1 (100% bungkil inti sawit), R2 (70% bungkil inti sawit + 30 % tepung daun kelor), R3 (70% bungkil inti sawit + 30 % tepung kunyit), R4 (70% bungkil inti sawit + 30 % tepung biji kedawung), R5 (70% bungkil inti sawit + 15% tepung kelor + tepung kunyit), R6 (70% bungkil inti sawit + 15% tepung kelor + 15% tepung kedawung), R7 (70% bungkil inti sawit + 15% tepung kunyit + 15% tepung kedawung), R8 (70% bungkil inti sawit+ 10% tepung kelor + 10% tepung kunyit + 10% tepung kedawung

### Konsentrasi VFA Parsial dan Konsentrasi VFA Total

Konsentrasi VFA yang diamati dalam penelitian ini meliputi asam asetat, asam propionat dan asam butirat. Asam VFA ini merupakan salah satu produk akhir dari fermentasi karbohidrat dan protein dan merupakan sumber energi bagi ternak ruminansia. Hasil Konsentrasi asam asetat, asam propionat, asam butirat dan VFA total dari masing-masing perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 5.

Konsentrasi VFA total cairan kontrol dalam penelitian ini adalah 35.80 mM. Hasil analisis menunjukkan bahwa konsentrasi VFA total cairan rumen perlakuan tidak berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dibandingkan dengan kontrol. Madigal *et al.* (2003) menyatakan bahwa kisaran komposisi VFA dalam rumen adalah asetat 60 mM, propionat 20 mM dan butirat 10 mM. Nilai rata-rata VFA total dalam penelitian ini adalah 34.99–44.71 mM. McDonald (2002) mengatakan bahwa konsentrasi VFA total yaitu 70-150 mM. Nilai rata-rata VFA total dalam penelitian ini masih berada dibawah nilai normal konsentrasi VFA total. Hal ini diduga karena lamanya waktu inkubasi yang melebihi waktu optimum kenaikan VFA. Lamanya waktu inkubasi akan mengakibatkan semakin sedikit tersedianya bahan pakan yang akan difermentasi oleh mikroba, sehingga berdampak terhadap laju produksi VFA yang semakin berkurang sebagai indikasi menurunnya ketersediaan energi bagi ternak ruminansia (Jayanegara *et al.* 2006).

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil evaluasi penggunaan kombinasi tepung daun kelor dan tepung kunyit efektif meningkatkan persentase KCBK dan persentase KCBO yang lebih mudah terdegradasi.

Tabel 5. Rataan konsentrasi VFA total dan konsentrasi parsial ( asam asetat, asam propionat dan asam butirat)

Perlakuan	Variabel			
	Asam Asetat (%)	Asam Propionat (%)	Asam Butirat (%)	VFA Total (mM)
R1	64.27 <sup>ab</sup> ±6.71	21.45±2.24	14.28±1.20	35.80±1.06
R2	64.87 <sup>a</sup> ±8.49	20.98±2.63	14.15±2.00	38.68±1.294
R3	61.51 <sup>a</sup> ±8.61	22.98±2.94	15.51±2.06	34.94±1.341
R4	61.88 <sup>ab</sup> ±1.072	22.65±3.07	15.47±2.69	38.40±1.623
R5	62.29 <sup>ab</sup> ±3.67	21.93±1.47	15.77±1.28	41.99±6.15
R6	62.85 <sup>ab</sup> ±5.39	22.02±1.32	15.13±1.63	41.60±8.21
R7	63.99 <sup>ab</sup> ±1.81	21.98±0.71	14.02±1.10	44.71±1.97
R8	64.25 <sup>ab</sup> ±2.02	21.04±0.77	14.71±0.91	40.00±3.33

Superscrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaaan nyata ( $P < 0.05$ ).

Keterangan : R1 (100% bungkil inti sawit), R2 (70% bungkil inti sawit + 30 % tepung daun kelor), R3 (70% bungkil inti sawit + 30 % tepung kunyit), R4 (70% bungkil inti sawit + 30 % tepung biji kedawung), R5 (70% bungkil inti sawit + 15% tepung kelor + tepung kunyit), R6 (70% bungkil inti sawit + 15% tepung kelor + 15% tepung kedawung), R7 (70% bungkil inti sawit + 15% tepung kunyit + 15% tepung kedawung), R8 (70% bungkil inti sawit + 10% tepung kelor + 10% tepung kunyit + 10% tepung kedawung

### DAFTAR PUSTAKA

- Clark, H. 2009.Reducing CH4 Emissions from Grazing Ruminants in New Zealand. *Asian-Aust. J Anim Sci.* Vol. 24, No. 2 : 295 – 302.
- Jayanegara A, Tjakradidjaja AS, Sutardi T. 2006. Fermentabilitas dan pencernaan *in vitro* ransumlimbah agroindustri yang disuplementasikromium anorganik dan organik. *J Med Pet.* 29(2):54-62

- Johnson, K.A and D.E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci.* 73:2483-2492.
- Muchlas M, Kusmarton, Marjuki. 2014. Pengaruh penambahan daun pohon terhadap kadar VFA dan pencernaan secara *invitro* ransum berbasis ketela pohon. *J Ilmu-Ilmu Peternakan.* 24 (2):8 – 19.
- Oluduro, A.O. Evaluation of antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. leaf in South Western Nigeria. *J Microbiol of Malaysian.* 8(2), 2012, 59-67
- Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa* and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *J Anim Sci.* 123: 403-419.
- Thalib, A. 2008. Buah Lerak Mengurangi Emisi Gas Metan Pada Hewan Ruminansia. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian Vol 30* N0 2.
- Theodorou MK, Br ook AE. 1990. Evaluation of a New Laboratory Procedure for Estimating the Fermentation Kinetic of Tropical Feeds. UK. Annual Report AFRC Institute.
- Thorpe A. 2009. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role of methane in the climate change debate. *Climate Change.*93: 407-431.
- Tilley, J.M.A., R.A. Terry. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Brit Grassl Soc.* 18:104-111.