

Uji Efektivitas Isolat Bakteri Hasil Isolasi Mikroba Rumen dengan Media Asetogen sebagai Inhibitor Metanogenesis

AMLIUS THALIB, Y. WIDIAWATI dan H. HAMID

Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002

(Diterima dewan redaksi 29 Nopember 2004)

ABSTRACT

THALIB, A., Y. WIDIAWATI and H. HAMID. 2004. Study of effectiveness of bacteria isolated from rumen microbes with acetogen medium as methanogenesis inhibitor. *JITV* 9(4): 233-238.

Ruminal methanogenesis has disadvantageous effects on ruminant animals and environment of atmosphere. Inhibition of methane produced through reduction of carbondioxide has been conducted by bacteriological approach. The approach involved the isolation of bacteria from rumens of sheep (IBD) and buffalo (IBK) using medium for CO-utilizing acetogens. The isolate of bacterium was multiplied with the usual culture medium and then used as inoculum to degrade a substrate of King grass under constant temperature (39°C) for 48 hours. Fresh rumen fluid of sheep (CRDS) was used as comparing inoculum. Measurements were carbondioxide and methane gasses, pH, volatile fatty acid (VFA) and NH₃-N contents, bacterial count, and dry matter digestibility (*in vitro* DMD). The data measured were analyzed by using completely randomized design. The results showed that morphological cell of IBD was oval pleomorphic with Gram negative type, and cell of IBK was rod with Gram negative type. Percentage of CH₄ produced by inoculum of IBD was lower than CRDS but was not significantly different (29.47 vs. 33.07%), while the percentage of methane produced by inoculum of IBK was very significantly lower than CRDS (24.29 vs. 33.07%) (P<0.01). Acetate/propionate ratio as a result of substrate fermentation by inoculum of IBD (3.55) and IBK (3.79) were very significantly higher than that of CRDS (2.43) (P<0.01). It is concluded from this experiment that isolates used were effective to inhibit the methanogenesis and the species contained in the isolates were indicated to be homoacetogenic bacteria.

Key words: Bacterial isolate, acetogen medium, methanogenesis, inhibitor

ABSTRAK

THALIB, A., Y. WIDIAWATI dan H. HAMID. 2004. Uji efektivitas isolat bakteri hasil isolasi mikroba rumen dengan media asetogen sebagai inhibitor metanogenesis. *JITV* 9(4): 233-238.

Metanogenesis yang terjadi dalam sistem rumen memberikan pengaruh yang merugikan terhadap hewan ruminansia dan lingkungan atmosfer. Pencegahan pembentukan gas metan melalui jalur reduksi gas karbondioksida oleh gas hidrogen telah dilakukan secara mikrobiologis. Pendekatan yang dilakukan diawali dengan tahap isolasi bakteri dari rumen domba (IBD) dan kerbau (IBK) dengan menggunakan media asetogen pengguna karbonmonoksida. Selanjutnya perbanyakkan isolat digunakan medium biakan bakteri anaerob standar dalam penyiapan sediaan inoculum untuk fermentasi substrat (rumpun Raja) yang diinkubasi pada suhu 39°C selama 48 jam. Cairan rumen domba segar (CRDS) digunakan sebagai pembandingan. Parameter utama yang diukur adalah produksi gas CO₂, CH₄, dan komposisi asam-asam lemak volatil (VFA). Parameter lainnya yang diukur adalah pH, N-NH₃, populasi bakteri, dan *in vitro* DMD. Data hasil percobaan dianalisis dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Hasil pengamatan morfologis menunjukkan bahwa sel IBD berbentuk oval pleomorfik dengan tipe Gram negatif dan sel IBK memperlihatkan bentuk batang dengan tipe Gram negatif. Dibandingkan CRDS, persentase volume gas CH₄ dalam volume total gas yang dihasilkan oleh IBD lebih rendah, namun tidak berbeda nyata (29,47 vs. 33,07%), dan IBK lebih rendah secara sangat nyata (P<0,01) (24,29 vs. 33,07%). Rasio asetat/propionat hasil fermentasi oleh IBD dan IBK menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01) dibandingkan CRDS yakni berturut-turut (3,55 dan 3,79) versus 2,43. Disimpulkan dari percobaan ini bahwa isolat yang diperoleh mampu menekan metanogenesis secara efektif, dan spesies bakteri isolat IBD dan IBK diindikasikan bersifat homoasetogenik.

Kata kunci: Isolat bakteri, medium asetogen, metanogenesis, inhibitor

PENDAHULUAN

Melalui proses metanogenesis dalam rumen, CH₄ (gas metana) merupakan salah satu bentuk hilangnya energi kimia pakan tercerna pada ternak ruminansia (BOCCAZZI dan PATTERSON, 1995), dan memberikan

kontribusi yang signifikan terhadap efek ruang kaca (STEWART, 1999).

Pada prinsipnya, metanogenesis dapat diinhibisi oleh berbagai macam zat kimia melalui beberapa mekanisme. Mekanisme inhibisi produksi gas metana dalam rumen oleh zat kimia antara lain berdasarkan sifat toksik zat tersebut terhadap bakteri metanogen

seperti senyawa-senyawa metana terhalogenasi, sulfid, nitrat, trikloroetilpivalat, adipat, dan asam-asam lemak berantai panjang tidak jenuh (ULCFA). Disamping itu senyawa yang terakhir ini juga memberikan bentuk interaksi berdasarkan reaksi hidrogenasi sehingga mengurangi terjadinya reduksi CO₂ oleh hidrogen. Beberapa ionofor seperti monensin, lasalocid, dan salinomisin, selain dapat meningkatkan kandungan asam propionat dan menurunkan tingkat biohidrogenasi terhadap ULCFA sebagai akibat penekanan populasi bakteri penghasil hidrogen, juga menyebabkan penurunan produksi gas metana (DEMEYER dan VAN NEVEL, 1988). Mekanisme inhibisi metanogenesis dapat juga dilakukan menggunakan senyawa-senyawa kimia yang afinitasnya terhadap hidrogen lebih tinggi daripada CO₂, seperti ion Fe³⁺ dan SO₄²⁻ (BAKER, 1995; OBASHI *et al.*, 1995; THALIB, 2004), dan antraknon (KUNG *et al.*, 2003). Adanya hubungan yang sebanding antara populasi protozoa dan produksi gas metana (JOUANY, 1991), maka secara simultan zat-zat defaunator protozoa (*protozoa-defaunating agents*) dapat berperan sebagai inhibitor metanogenesis sebagaimana yang telah dilaporkan oleh THALIB (2004) dalam penelitian sebelumnya.

Perlu pertimbangan yang cukup kompleks dalam penggunaan zat-zat kimia sebagai inhibitor metanogenesis terutama berkaitan dengan adanya efek samping yaitu diantaranya dapat menyebabkan penurunan degradasi serat kasar dan kuantitas protein mikrobial, adaptabilitas mikroba dan terjadi akumulasi gas hidrogen. Guna menghindari akumulasi gas hidrogen, telah dilakukan pendekatan lain untuk tujuan menekan metanogenesis di rumen, yaitu dengan intervensi bakteri homoasetogen pengguna hidrogen (LE VAN *et al.*, 1998; LOPEZ *et al.*, 1999), dimana bakteri ini memanfaatkan substrat CO₂ dan H₂ untuk pertumbuhan dan menghasilkan asam asetat sebagai produk metabolit. Bioreaksi pembentukan asam asetat melalui reduksi CO₂ oleh H₂ dikemukakan oleh LJUNGDAHL (1986). Namun, laporan mengenai inhibisi metanogenesis dengan intervensi bakteri homoasetogen serta aplikasinya masih terbatas. Bakteri asetonogen pengguna H₂-CO₂ ada terdapat dalam rumen, dan yang sudah teridentifikasi adalah: *Acetitomaculum ruminis*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium pfennigi* (MACKIE dan BRYANT, 1994). Beberapa spesies bakteri pengguna H₂ lainnya tapi tidak bersifat asetonogenik, yang juga termasuk populasi mikroba di dalam ekosistem rumen, adalah *Wollinella succinogenes*, *Selenomonas ruminantium* dan *Anaerovibrio lipolytica* (STEWART dan BRYANT, 1988). Dari informasi potensi asetonogenik pengguna H₂-CO₂, maka pengembangan teknik penyiapan serta pemanfaatannya dapat dijadikan sebagai cara alternatif untuk menghambat metanogenesis rumen. Dalam penelitian ini dilakukan pengujian efektivitas isolat bakteri asetonogenik pengguna

CO₂ dan H₂ yang bersumber dari mikroba rumen lokal, yang spesiesnya sangat beragam dan bergantung pada mikroflora lingkungan dimana hewan-hewan ruminansia hidup.

MATERI DAN METODE

Tahap awal dalam percobaan ini adalah isolasi bakteri anaerobik yang berkarakter asetonogenik/ pengguna H₂ dengan menggunakan media asetonogen pengguna karbonmonoksida menurut prosedur GEERLINGS *et al.* (1987). Media pada prinsipnya terdiri dari larutan basal (mengandung makro mineral, *buffer* dan resazurin), larutan vitamin, agen pereduksi, dan larutan mikro mineral. Pada akhir proses, media yang dipersiapkan secara anaerobik diinjeksikan gas karbonmonoksida dengan tekanan 200 kPa. Sebagai sumber bakteri digunakan cairan rumen domba dan kerbau.

Isolat yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya dikembangkan dengan media kultur menurut prosedur OGIMOTO dan IMAI (1981) yang dimodifikasi (THALIB *et al.*, 2000) untuk disiapkan menjadi sediaan inokulum. Sediaan ini diasumsikan sebagai sediaan bakteri homoasetogenik.

Selanjutnya sediaan ini diuji efektivitas dan aktivitasnya sebagai inokulum menurut prosedur THEODOROU dan BROOKS (1990) yang dimodifikasi (THALIB *et al.*, 2000) secara *in vitro*. Prosedur mencakup inkubasi substrat selama 48 jam dengan sediaan inokulum (10 ml) dalam media fermentasi pada pH 6,9 dan suhu 39°C. Komposisi media terdiri dari 86 bagian volume larutan basal dan 4 bagian volume larutan pereduksi. Inokulum isolat homoasetogenik yang berasal dari rumen domba (IDB) dan yang berasal dari rumen kerbau (IBK) dibandingkan dengan inokulum cairan rumen domba segar (CRDS).

Parameter yang diamati

Komposisi produksi gas CO₂ dan CH₄ ditetapkan menurut prosedur TJANDRAATMADJA (1981). Prosedur mencakup penampungan gas hasil fermentasi dengan siring pengukur volume dan dengan sistem konektor T, gas tersebut diinjeksikan ke dalam 2 tabung yang dihubungkan secara seri dan keduanya berisi larutan NaOH 6 N, dan selanjutnya gas yang lepas ditampung dengan siring pengukur volume kedua untuk menampung gas CH₄.

Kecernaan bahan kering *in vitro* (*in vitro* DMD) substrat dilakukan menurut prosedur THEODOROU dan BROOKS (1990) yang dimodifikasi (THALIB *et al.*, 2000).

Produk hasil fermentasi berupa asam lemak volatil (VFA) dengan sistem khromatografi gas (GC Chrompack CP 9002) dan N-NH₃ dengan cawan

Conway (keduanya prosedur baku Balitnak). Populasi bakteri (metode *roll tube*) menurut prosedur OGIMOTO dan IMAI (1981).

Analisis data

Data pengamatan hasil fermentasi substrat oleh tiga perlakuan inokulum yang masing-masing perlakuan terdiri dari 5 buah botol inkubator sebagai ulangan, dianalisis berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL). Nilai rata-rata antar perlakuan diuji berdasarkan uji beda nyata terkecil (STEEL dan TORRIE, 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan penelitian ini bergantung pada hasil isolasi bakteri yang dilakukan. Untuk isolasi bakteri diperlukan media dengan komposisi nutrisi yang lengkap dan spesifik. Identifikasi morfologis dan uji tipe Gram isolat yang diperoleh dari sumber rumen domba dan kerbau diperlihatkan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi morfologi dan uji Gram isolat bakteri (dengan media asetonogen pengguna CO)

Sumber isolat	Morfologi	Tipe gram
Rumen domba	Oval pleomorfik	negatif
Rumen kerbau	Batang (<i>rod</i>)	negatif

Isolat bakteri (dengan media asetonogen pengguna CO) yang berasal dari kedua sumber rumen, memperlihatkan bentuk batang dengan tipe gram negatif. Isolasi bakteri asetonogenik dengan media asetonogen pengguna CO memberikan keuntungan penting karena kebanyakan bakteri yang terisolasi dengan media ini bersifat homoasetogenik. Disamping itu dapat tumbuh dengan cepat tanpa memerlukan waktu untuk terlebih dahulu beradaptasi (GEERLINGS *et al.*, 1987). Dalam ulasan DIEKERT (2000), disebutkan beberapa spesies bakteri homoasetogenik yang sudah teridentifikasi dapat tumbuh dengan substrat CO yaitu diantaranya *Peptostreptococcus productus*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium thermoaceticum*, *C. thermoautotrophicum*, *Sporomusa termitida*, *Acetobacterium woodii*, dan *Acetitomaculum ruminis*. Sebagian dari spesies yang disebutkan ini (yaitu *B. methylotrophicum*, *C. thermoaceticum*, *C. thermoautotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, dan *Acetitomaculum ruminis*) secara morfologis berbentuk batang dengan tipe dinding sel Gram negatif (OGIMOTO dan IMAI, 1981; LOMANS *et al.*, 2001). Spesies bakteri dari hasil isolasi yang didapat dalam penelitian ini mungkin sama dengan diantara yang berbentuk batang

dengan tipe Gram negatif seperti yang telah diidentifikasi oleh OGIMOTO dan IMAI (1981) dan LOMANS (2001), namun mungkin juga berbeda karena lingkungan tropis nusantara Indonesia dikenal kaya akan berbagai spesies mikroflora.

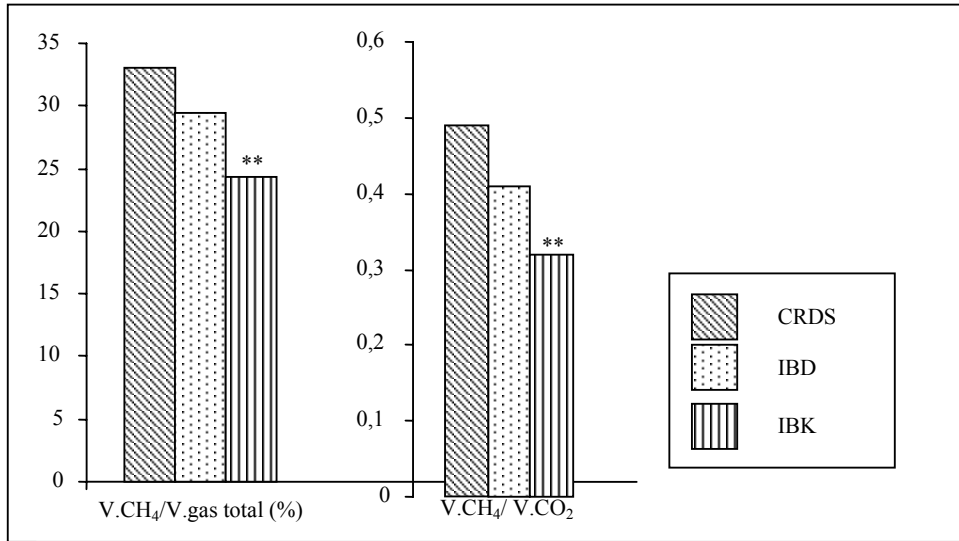
Isolat yang sudah murni secara morfologis dan uji Gram selanjutnya diperbanyak dalam suatu bentuk sediaan dengan menggunakan media perbanyak M8 (THALIB *et al.*, 2000), dan digunakan sebagai inokulum untuk fermentasi substrat rumput Raja. Nilai pengukuran hasil fermentasi dalam masa inkubasi 48 jam pada suhu 39°C, berupa gas CO₂ dan CH₄ serta asam-asam lemak volatil (VFA) diperlihatkan dalam Gambar 1, Tabel 2, dan Gambar 2.

Secara umum persentase produk gas CH₄ dan rasio antara volume CH₄ dengan volume CO₂ dalam perlakuan fermentasi menggunakan inokulum isolat cenderung lebih rendah dibandingkan inokulum cairan rumen segar, dan yang terendah diperlihatkan secara sangat nyata (P<0,01) oleh perlakuan isolat dari rumen kerbau (IBK) bila dibandingkan dengan cairan rumen domba segar (CRDS) (24,29 vs. 33,07%). Komposisi gas metana dalam volume total gas pada perlakuan isolat IBK juga lebih rendah daripada CRDS, namun tidak berbeda nyata (P>0,05) (Gambar 1). Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri yang diisolasi dari rumen kerbau memiliki daya hambat metanogenesis yang paling efektif.

Ketiga inokulum memperlihatkan produksi VFA total yang cukup tinggi, namun secara nyata (P<0,05) kandungan VFA total pada perlakuan inokulum IBK lebih rendah daripada CRDS (Tabel 2). VFA merupakan hasil fermentasi substrat (bahan pakan) yang dapat diserap langsung melalui dinding rumen-retikulum untuk dimanfaatkan oleh ternak sebagai sumber energi (PRESTON dan LENG, 1987).

Persentase asam lemak C₂ dalam kandungan VFA total dan rasio C₂ : C₃ pada perlakuan inokulum isolat lebih tinggi dibandingkan inokulum cairan rumen segar sebagaimana yang diperlihatkan pada Gambar 2.

Hal ini menunjukkan bahwa inokulum dari isolat diasumsikan menghasilkan enzim yang dapat mengkatalisis terbentuknya asam asetat mengikuti jalur reaksi yang dikemukakan oleh LJUNGDAHL (1986) (2CO₂ + 4H₂ ==> CH₃COOH + 2H₂O). Melalui jalur reaksi ini, menyebabkan terjadi penurunan produksi CH₄ akibat CO₂ tidak mengalami reaksi oksidasi reduksi dengan H₂ tapi oleh bakteri homoasetogenik, CO₂ dan H₂ bereaksi membentuk senyawa asam asetat, sehingga kandungan asam asetat lebih tinggi sebagaimana yang diperlihatkan pada perlakuan IBK dan IBK (Gambar 2). Dengan demikian spesies bakteri yang terdapat dalam kedua isolat ini mengindikasikan bersifat asetonogenik.



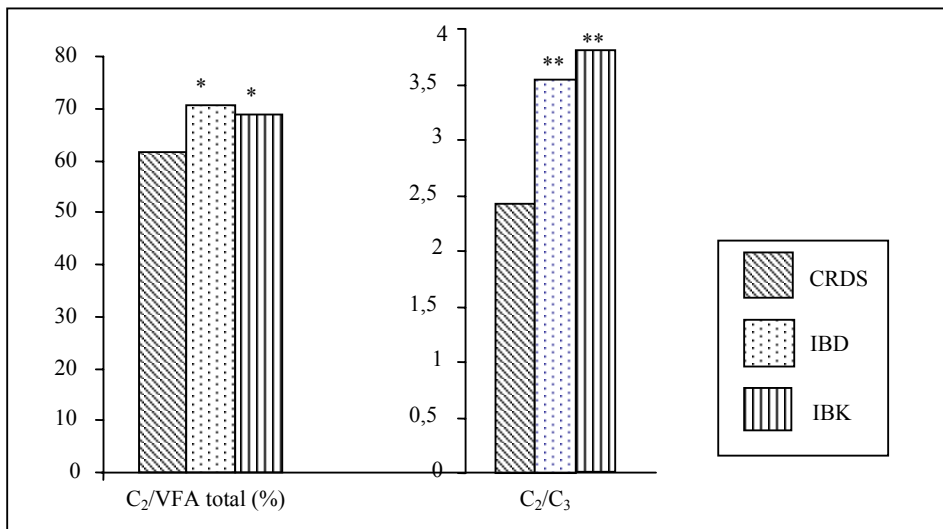
** Berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan CRDS. CRDS: Cairan rumen domba segar; IBD: Isolat bakteri asetogenik dari rumen domba; IBK: Isolat bakteri asetogenik dari rumen kerbau

Gambar 1. Persentase volume CH₄ dalam volume gas total dan rasio volume CH₄/volume CO₂, hasil fermentasi substrat (rumput Raja) oleh inokulum sediaan bakteri asetogen selama 48 jam

Tabel 2. Produksi VFA hasil fermentasi substrat rumput Raja (selama 48 jam) oleh inokulum isolat bakteri asetogen pengguna CO

Inokulum	VFA (mg/mL)						Total (mg/ml)
	C ₂	C ₃	i-C ₄	n-C ₄	i-C ₅	n-C ₅	
CRDS	3,42	1,41	0,08	0,47	0,11	0,06	5,55
IBD	3,34	0,94	0,13	0,19	0,14	ND	4,74
IBK	2,88	0,76	0,13	0,29	0,13	ND	4,19*

* Berbeda nyata ($P < 0,05$) antara isolat dari rumen kerbau (IBK) dan cairan rumen domba segar (CRDS)



* Berbeda nyata ($P < 0,05$) dan (**) berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) antara (IBD; IBK) dan CRDS

Gambar 2. Persentase kandungan asetat/VFA total dan rasio asetat/proprionat hasil fermentasi substrat (rumput Raja) oleh inokulum sediaan bakteri asetogen selama 48 jam

Tabel 3. *In vitro* DMD substrat rumput Raja (oleh inokulum isolat bakteri asetogen pengguna CO selama 48 jam), pH, kandungan NH₃ dan populasi bakteri

Inokulum	DMD (%)	pH	NH ₃ (mg/l)	Populasi bakteri (x 10 ⁹ kol./ml)
CRDS	43,40 ^a	6,78	81,60 ^b	3,15 ^a
IBD	26,69 ^b	6,88	138,13 ^a	2,71 ^a
IBK	28,63 ^b	6,73	155,60 ^a	1,28 ^b

Nilai rata-rata dengan superskrip yang berbeda dalam satu kolom untuk pengamatan yang sama menunjukkan perbedaan sangat nyata (P<0,01)

Daya mencerna inokulum kedua isolat (IBD dan IBK) lebih rendah daripada cairan rumen domba segar (CRDS). Suatu hal yang mudah dapat dimengerti bahwa bakteri rumen dalam mencerna substrat bahan pakan memerlukan sekawanan bakteri dari berbagai kelompok, umumnya bakteri-bakteri selulolitik, hemiselulolitik, dan amilolitik (HUNGATE, 1966), dan disamping itu juga disebabkan perbedaan populasi. Sehingga dengan demikian daya fibrolitik dari isolat bakteri ini lebih rendah. Namun kedua inokulum isolat ini diasumsikan lebih bersifat proteolitik dan mempunyai enzim deaminase yang lebih tinggi, dan yang lebih penting secara nyata aksinya berdampak terhadap penekanan pembentukan gas metana. Walaupun total bakteri inokulum kedua isolat lebih rendah daripada cairan rumen domba segar, namun memperlihatkan bahwa kedua isolat ini dapat dikembangkan dengan media bakteri anaerobik yang umum digunakan.

KESIMPULAN

Disimpulkan dari percobaan ini bahwa isolat yang diperoleh dapat menghambat proses metanogenesis dalam rumen, sehingga introduksi isolat ini sebagai aditif akan dapat berpengaruh positif terhadap efisiensi penggunaan energi kimia pakan pada ternak ruminansia serta berdampak terhadap penurunan efek ruang kaca. IBK sebagai inhibitor metanogenesis lebih efektif daripada IBD. Disamping dapat menekan metanogenesis, kandungan asam asetat dan rasio C2 : C3 yang lebih tinggi pada hasil fermentasi substrat oleh inokulum isolat yang diuji, maka bakteri dari isolat-isolat ini memberikan indikasi kuat bersifat homoasetogenik pengguna CO₂ dan H₂.

DAFTAR PUSTAKA

- BAKER, S.K. 1995. Competition for hydrogen in the rumen. Satellite Symposium of IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores. Clermont-Ferrand, France, September 16-17, 1995. p. 41.
- BOCCAZI, P. and J.A. PATTERSON. 1995. Potential for functional replacement of methanogenic bacteria by acetogenic bacteria in the rumen environment. Satellite Symposium of IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores.. Clermont-Ferrand, France. September 16-17, 1995 p. 43.
- DEMEYER, D.I. and C.J. VAN NEVEL. 1988. Manipulation of rumen fermentation. *In: The Rumen Microbial Ecosystem*. P.N. HOBSON (Ed.). Elsevier Appl. Sci., London and New York. pp. 387-444.
- DIEKERT, G. 2000. The Acetogenic Bacteria. <http://rizzo.springer-ny.com> [17 Maret 2000]. pp. 21-47.
- HUNGATE, R.E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York.
- GEERLINGS, G.H.C., H.C. ALDRICH, W. HARDEN and G. DIEKERT. 1987. Isolation and characterization of a carbonmonoxide utilizing strain of the acetogen *Peptostreptococcus productus*. *Arch. Microbiol.* 148: 305-313.
- JOUANY, J.P. 1991. Defaunation of the rumen. *In: Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. J.P. JOUANY. (Ed.). INRA: 239-261.
- KUNG, L., JR., K.A. SMITH, A.M. SMAGALA, K.M. ENDRES, C.A. BESSETT, N.K. RANJIT and J. YAISLE. 2003. Effects of 9, 10 anthraquinone on ruminal fermentation, total-tract digestion, and blood metabolite concentration in sheep. *J. Anim. Sci.* 81: 323-328.
- LE VAN, T.D., J.A. ROBINSON, J. RALPH, R.C. GREENING, W.J. SMOLENSKI, J.A.Z. LEEDLE and D.M. SCHAEFER. 1998. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium population and *Acetivomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3429-3436.
- LJUNGDAHL, L.G. 1986. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 415-450.
- LOMANS, B.P., P. LEIJDEKKERS, J.J. WESSELINK, P. BAKKERS, A. POE, C. DRIFT and H. J. CAMP. 2001. Obligate sulfide-dependent degradation of methoxylated aromatic compounds and formation of methanethiol and dimethyl sulfide by a fresh water sediment isolate, *Parasporobacterium paucivorans*. gen. nov, sp nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (9): 4017-4023.
- LOPEZ, S., F.M. MCINTOSH, R.J. WALLACE and C.J. NEWBOLD. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78: 1-9.

- MACKIE, R.I. and M.P. BRYANT. 1994. Acetogenesis and the rumen: syntropic relationships. *In: Acetogenesis*. H.L. DRAKE (Ed.). Chapman and Hall. New York, pp. 331-364.
- OBASHI, Y., K. USHIDA, K. MIYASAKI and K. KOJIMA. 1995. Effect of initial sulfate level on electron partition between methanogenesis and sulfate reduction in the rumen. Sattelite Symposium of IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores. Clermont-Ferrand., France, September 16-17, 1995. p. 42.
- OGIMOTO, K dan IMAI. 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- PRESTON, TR. dan RA. LENG. 1987. Matching Ruminant Production System with Available Sources in Tropics. Penambul Book, Armidale.
- STEWART, C.S. and M.P. BRYANT. 1988. The rumen bacteria, *In: The Rumen Microbial Ecosystem*. P.N. HOBSON (Ed.). Elsevier Applied Science. London and New York. pp. 21-75.
- STEWART, C.S. 1999. Microbial interactions in the rumen and their potential impact on the survival of *Escherichia coli* 0157. *In: The Rumen Microbial Ecosystem*. C.R. BELL, M. BRYLINKSKY and P. JOHNSON-GREEN. (Eds.). Proc. of The 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Ilalifax, Canada.
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1980. Principles and Prosedures of Statistics. A Biometrical Approach. McGraw Hill Int. Book Co. Singapore.
- THALIB, A., B. HARYANTO, S. KOMPIANG dan I.W. MATHIUS. 2000. Pengaruh mikro mineral dan fenilpropionat terhadap performans bakteri selulolitik *cocci* dan batang dalam mencerna serat hijauan pakan. *JITV* 5: 92-99.
- THALIB, A. 2004. Uji efektivitas saponin buah *Sapindus rarak* sebagai inhibitor metanogenesis secara *in vitro* pada sistem pencernaan rumen. *JITV* 9: 164-171.
- THEODOROU, M.K and A.E. BROOKS. 1990. Evaluation of a New Laboratory Procedure for Estimating the Fermentation Kinetic of Tropical Feeds. Annual Report AFRC Institute, Hurley, Maidenhead, UK.
- TJANDRAATMADJA, M. 1981. Anaerobic Digestion of Fibrous Materials. A Thesis of Master of Agricultural Science. University of Melbourne, Australia.