

Pengaruh Suplementasi *Acacia mangium* Willd pada *Pennisetum purpureum* terhadap Karakteristik Fermentasi dan Produksi Gas Metana *in Vitro*

B. Santoso & B.Tj. Hariadi

Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan Perikanan & Ilmu Kelautan,
Universitas Negeri Papua
Jl. Gunung Salju, Amban, Manokwari – Irian Jaya Barat 98314, email: budi_santoso@unipa.ac.id
(Diterima 08-01-2007; disetujui 06-06-2007)

ABSTRACT

An *in vitro* study was conducted to determine the effect of *Acacia mangium* Willd supplementation to *Pennisetum purpureum* on fermentation characteristics, protozoal numbers, nutrients degradability and *in vitro* methane production. Treatments consisted of four composite substrates with *P. purpureum* and *A. mangium* Willd ratios at 100:0 (0%), 85:15 (15%), 70:30 (30%), and 55:45 (45%). Crude saponin and total tannin contents of *A. mangium* were 1.67% and 4.51%, respectively. Methane and gas productions decreased linearly ($P < 0.01$) in response to acacia levels. Addition of *A. mangium* at 15%, 30% and 45% decreased CH_4 production by 16.2%, 26.8% and 61.1%, respectively as compared to the control. There were linear decreases in total VFA and acetate concentrations ($P < 0.01$), and propionate production ($P < 0.05$) in response to increase in acacia addition. Total protozoal populations increased linearly ($P < 0.05$) with added acacia. *In vitro* dry matter and organic matter degradabilities of substrate decreased linearly ($P < 0.01$) with acacia addition. It is concluded that methane production is not essentially associated with protozoal population. *A. mangium* has a potential use for mitigation of enteric methane production.

Key words : *Acacia mangium*, *methan*, *degradability*, *in vitro*

PENDAHULUAN

Gas metana (CH_4) merupakan hasil fermentasi anaerob karbohidrat struktural maupun non struktural oleh metanogen (bakteri penghasil metana) di dalam rumen ternak ruminansia, dan selanjutnya dikeluarkan ke atmosfer melalui proses eruktasi. Menurut Johnson & Johnson (1995) dan Pelchen & Peters (1998), gas CH_4 yang dikeluarkan dari rumen mengindikasikan energi

yang hilang dari tubuh ternak ruminansia dengan variasi 7% – 12% dari energi yang dikonsumsi. Selain itu, CH_4 yang dihasilkan oleh ternak ruminansia mempunyai kontribusi yang signifikan terhadap pemanasan global. Moss (1993) menyatakan bahwa populasi ruminansia mempunyai kontribusi sebesar 12% – 15% dari pencemaran CH_4 di atmosfer.

Berbagai teknik telah dilakukan untuk menekan produksi gas CH_4 yang dihasilkan ternak

ruminansia, antara lain melalui penggunaan bahan kimia monensin (Van Nevel & Demeyer, 1977); ∞ -asam bromoethanesulfonat (Balch & Wolfe, 1979); nitrat/nitrit (Takahashi & Young, 1991). Namun demikian, penggunaan bahan kimia dengan konsentrasi yang tinggi dan dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan residu dalam produk ternak serta efek toksik terhadap ternak, sehingga bahan aditif tersebut tidak direkomendasikan untuk digunakan dalam mengontrol produksi CH_4 (McAllister *et al.*, 1996).

Dewasa ini penggunaan bahan pakan aditif yang bersifat alami sebagai pengganti bahan pakan aditif yang bersifat kimiawi termasuk antibiotik dan ionofor sebagai manipulator fermentasi dalam rumen semakin populer. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa saponin yang terdapat dalam *Yucca schidigera* efektif dalam menurunkan produksi CH_4 secara *in vivo* (Santoso *et al.*, 2004; Santoso, 2005) dan *in vitro* (Wang *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2000). Saponin bersifat toksik terhadap protozoa dan bakteri dalam rumen, sementara sekitar 9% – 25% dari metanogen bersimbiosis dengan cara menempel pada permukaan protozoa (Stumm *et al.*, 1982). Dengan demikian penurunan populasi protozoa dalam rumen diharapkan akan diikuti dengan penurunan gas CH_4 . Sementara itu, Patra *et al.* (2006) melaporkan bahwa penurunan produksi gas CH_4 secara *in vitro* yang disebabkan tanin dari *Terminalia chebula* berhubungan dengan sifat antimetanogenik.

Akasia (*Acacia mangium* Willd) merupakan salah satu tumbuhan yang banyak digunakan sebagai pohon pelindung. Daun akasia mengandung senyawa sekunder seperti saponin dan tanin sehingga berpotensi digunakan sebagai pakan aditif dalam mengontrol produksi CH_4 pada ternak ruminansia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi daun *Acacia mangium* Willd yang mengandung senyawa sekunder saponin dan tanin pada *Pennisetum purpureum* terhadap produksi CH_4 , karakteristik

fermentasi, populasi protozoa dan degradasi nutrisi secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Preparasi *Pennisetum purpureum* dan *Acacia mangium* Willd

Sampel rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) dipotong dari Kebun Koleksi Hijauan, Fakultas Peternakan Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Negeri Papua pada umur 60 hari setelah penanaman, kemudian dicacah dengan ukuran 3 – 5 cm. Sampel daun akasia (*Acacia mangium* Willd) dikoleksi dari beberapa pohon akasia yang tumbuh di Manokwari. Sampel daun akasia dipisahkan dari batangnya, kemudian bersama-sama dengan sampel rumput dikeringkan dalam oven 55 – 60°C selama 72 jam. Sampel digiling menggunakan *Wiley mill* yang dilengkapi dengan saringan 1 mm, selanjutnya dianalisis komposisi kimia dan digunakan pada percobaan *in vitro*.

Ternak Donor

Dua ekor sapi Peranakan Ongole yang difistula bagian rumennya dengan rata-rata bobot badan $282 \pm 9,9$ kg digunakan sebagai donor cairan rumen. Ternak diberi pakan pada jam 08.00 dan 16.00 setiap hari dengan pakan basal yang terdiri atas rumput gajah (*P. purpureum*) dan konsentrat (70 : 30) sesuai dengan kebutuhan hidup pokok.

Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Percobaan ini disusun dalam rancangan acak lengkap yang terdiri atas 4 perlakuan dan 3 ulangan, sebagai berikut :

- P. purpureum* (100%) + *Acacia mangium* (0%)
- P. purpureum* (85%) + *Acacia mangium* (15%)
- P. purpureum* (70%) + *Acacia mangium* (30%)
- P. purpureum* (55%) + *Acacia mangium* (45%)

Percobaan Gas *in Vitro*

Sebanyak 300 ± 10 mg substrat ditimbang dan dimasukkan ke dalam *syringe* berukuran 100 ml (Model Fortuna, Häberle Labortechnik, Germany). Larutan buffer dipreparasi berdasarkan metode yang dikemukakan oleh Menke & Steingass (1988). Tiga puluh mililiter campuran larutan buffer dan cairan rumen (2 : 1) ditambahkan ke dalam tabung sambil dialiri gas CO_2 untuk mempertahankan kondisi anaerob. *Syringe* diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 39°C selama 48 jam. Produksi gas diukur pada waktu 2, 4, 6, 12, 24, dan 48 jam inkubasi, sedangkan sampel gas CH_4 diambil pada waktu 12 dan 48 jam inkubasi. Selanjutnya konsentrasi gas CH_4 dianalisis menggunakan kromatografi gas (Hitachi 263-50). Setelah inkubasi 48 jam, 10 ml sub sampel diambil dari masing-masing tabung dan diukur pHnya menggunakan pH meter digital (Hanna Hi 8520). Sub sampel cairan rumen (0,2 ml) ditambahkan 1 ml larutan asam metafosfat 25%, kemudian disentrifugasi pada $9000 \times g$ selama 10 menit dan dimasukkan ke dalam *freezer* -20°C sampai dengan analisis *volatile fatty acids* (VFA) menggunakan kromatografi gas. Sebanyak 0,5 ml sub sampel dipreparasi dan dianalisis konsentrasi N-NH_3 menggunakan metode Chaney & Marbach (1962). Satu milliliter sub sampel cairan rumen lainnya ditambahkan 0,8 ml larutan formaldehid-asalina yang terdiri atas 37% (v/v) formaldehid dan 0,9% (w/v) NaCl dengan perbandingan 1 : 9. Selanjutnya populasi protozoa dihitung menggunakan hemositometer.

Percobaan Degradasi *in Vitro*

Degradasi BK dan BO dideterminasi berdasarkan prosedur tahap I dari metode Tilley & Terry (1963). Sebanyak 250 mg substrat ditimbang dalam tabung berukuran 100 ml, kemudian ditambahkan 25 ml medium yang terdiri atas larutan saliva dan cairan rumen (4 : 1). Tabung yang telah berisi substrat dan medium dialiri gas

CO_2 , ditutup dengan karet penutup, kemudian diinkubasi dalam penangas air 39°C selama 48 jam. Residu disaring dengan krusibel Gooch, kemudian kandungan BK dan BO dianalisa, dan degradasi BK dan BO selama 48 jam dihitung.

Analisis Sampel

Kandungan BK, BO, dan protein kasar (PK) dari sampel dianalisa berdasarkan metode AOAC (1990), sedangkan kandungan 'neutral detergent fiber' (NDF) dideterminasi menggunakan metode Van Soest *et al.* (1991). Konsentrasi saponin kasar dan total tanin berturut-turut dianalisa menggunakan metode densitometri *in situ* dan Folin-Ciocalteu, sebagaimana dideskripsi oleh Santoso *et al.* (2007).

Analisis Statistik

Data dianalisis dengan analisis varians menurut rancangan acak lengkap menggunakan program SAS versi 6,12 (1996). Uji ortogonal polinomial digunakan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi akasia (linier atau kuadrat).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Kimia Pakan

Komposisi kimia dari *Pennisetum purpureum* dan daun *Acacia mangium* Willd terdapat pada Tabel 1. Kandungan protein kasar (PK) dari *Pennisetum purpureum* yang digunakan sebagai substrat pada percobaan ini lebih tinggi daripada konsentrasi minimum PK (7%) yang dibutuhkan aktivitas mikroba dalam fermentasi, sebagaimana direkomendasikan oleh Crowder & Chheda (1982). Sementara itu kandungan PK *Acacia mangium* sebanding dengan konsentrasi PK dalam *Acacia tortilis* dan *Acacia nilotica* (17,2%) sebagaimana dilaporkan oleh Abdulrazak *et al.* (2000). Konsentrasi saponin dalam *Acacia mangium* sebanding dengan konsentrasi saponin dalam *Enterolobium cyclocarpum* (1,9%) atau

Tabel 1. Komposisi kimia dan kandungan senyawa sekunder *P. purpureum* dan *A. mangium* Willd

	<i>P. purpureum</i>	<i>A. mangium</i>
Bahan kering (%)	22,75	33,44
Bahan organik (%BK)	88,01	95,79
Protein kasar (%BK)	10,03	16,48
Neutral detergent fiber (%BK)	72,51	50,77
Saponin kasar (%BK)	-	1,67
Total tanin (%BK)	-	4,51

Pithecellobium saman (1,7%) yang dilaporkan oleh Hess *et al.* (2003).

Karakteristik Fermentasi

Pengaruh taraf *Acacia mangium* terhadap karakteristik fermentasi, terdapat pada Tabel 2. Nilai pH, konsentrasi total VFA, asam asetat dan asam propionat pada medium inkubasi menurun secara linier ($P < 0,05$) dengan peningkatan taraf *Acacia mangium*. Penurunan pH medium sejalan dengan peningkatan taraf saponin dari *Acacia mangium* konsisten dengan hasil yang dilaporkan Wu *et al.* (1993). Walaupun nilai pH medium menurun, namun masih dalam kisaran pH normal ($6,7 \pm 0,5$) untuk fermentasi dan pertumbuhan mikroba. Konsentrasi N-NH₃ menunjukkan pola kuadratik ($P < 0,01$) sejalan dengan peningkatan

taraf *Acacia mangium*. Peningkatan taraf *Acacia mangium* dari 15% sampai dengan 45% yang diikuti dengan penurunan konsentrasi N-NH₃ diduga berhubungan dengan penurunan aktivitas bakteri proteolitik dan penurunan degradasi protein akibat adanya ikatan antara protein dan senyawa tanin. Konsentrasi N-NH₃ pada keempat perlakuan tersebut masih lebih rendah daripada konsentrasi minimal yang dibutuhkan untuk fermentasi secara maksimal (Mehrez *et al.*, 1977). Sementara itu, penurunan konsentrasi total VFA maupun asam lemak terbang secara parsial diduga berhubungan dengan penurunan degradasi BO sebagaimana terdapat pada Tabel 4.

Populasi protozoa dalam medium inkubasi meningkat secara linear ($P = 0,02$) sejalan dengan peningkatan konsentrasi *Acacia mangium*. Peningkatan populasi protozoa dapat disebabkan

Tabel 2. Nilai pH, konsentrasi N-NH₃ dan konsentrasi VFA pada taraf *A. mangium* yang berbeda

	Taraf <i>A. mangium</i> (%)				S.E.	<i>P</i>	
	0	15	30	45		L	K
pH	6,95	6,88	6,83	6,79	0,028	0,01	0,61
N-NH ₃ (mg/100 ml)	24,1	30,7	24,1	16,6	1,777	0,04	<0,01
Total VFA (mM)	15,0	14,9	13,5	11,7	0,391	<0,01	0,09
Asam asetat (mM)	10,6	10,5	9,4	8,2	0,229	<0,01	0,07
Asam propionat (mM)	3,1	3,1	3,0	2,8	0,065	0,03	0,24
Asam butirat (mM)	1,2	1,2	1,1	0,6	0,168	0,06	0,26
Protozoa ($\times 10^3$ /ml)	23,3	31,9	32,8	49,5	5,004	0,02	0,46

Keterangan: L : linier; K : kuadratik; S.E. : *standard error*.

oleh meningkatnya kandungan PK substrat sehingga menstimulasi perkembangan protozoa. Hasil penelitian ini didukung oleh Sliwinski *et al.* (2002) dan Hristov *et al.* (2003) yang melaporkan bahwa saponin tidak berpengaruh terhadap populasi protozoa. Patra *et al.* (2006) menyatakan bahwa ekstrak *Acacia concinna* secara signifikan menurunkan populasi protozoa, dan Makkar *et al.* (1998) serta Hristov *et al.* (1999) yang melaporkan bahwa suplementasi ekstrak tumbuhan yang mengandung saponin menurunkan populasi protozoa pada percobaan *in vitro*. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan spesies akasia dan preparasi akasia yang digunakan. Pada penelitian ini preparasi akasia melalui pengeringan dan dilanjutkan dengan penggilingan, sedangkan pada penelitian Patra *et al.* (2006) digunakan ekstrak akasia yang diperoleh melalui ekstraksi dengan etanol, metanol dan air. Disamping itu tipe dan asal saponin diduga berpengaruh terhadap penurunan protozoa, sebagaimana dilaporkan oleh Pen *et al.* (2006).

Volume Gas dan Produksi Gas Metana

Volume gas dan CH₄ yang dihasilkan kombinasi substrat *Pennisetum purpureum* dan *Acacia mangium* terdapat pada Tabel 3. Berdasarkan data pada Tabel 3, volume gas pada waktu inkubasi 6, 24 dan 48 jam serta produksi gas CH₄ selama inkubasi 48 jam menurun secara

linear ($P < 0,01$) sejalan dengan peningkatan konsentrasi *Acacia mangium*. Konsentrasi CH₄ menurun sebesar 16,2%; 26,8% dan 61,1% berturut-turut pada konsentrasi *Acacia mangium* 15%, 30% dan 45% dibandingkan perlakuan kontrol (0%). Namun demikian, pada penelitian ini penurunan CH₄ tidak sejalan dengan populasi protozoa (Tabel 2). Penurunan CH₄ diduga berhubungan dengan sifat anti-bakteri dari saponin. Menurut Cheeke (1999), disamping bersifat anti-protozoa, saponin juga bersifat anti-bakteri terutama terhadap bakteri Gram-positif. Sementara itu Moss (1993) menyatakan bahwa bakteri penghasil CH₄ (metanogen) seperti *Methanobrevibacter ruminantium* dan *Methanosarcina barkeri* termasuk dalam klasifikasi bakteri Gram-positif. Oleh sebab itu penurunan CH₄ yang sejalan dengan peningkatan konsentrasi *Acacia mangium* diduga berhubungan dengan penurunan populasi metanogen. Disamping konsentrasi saponin, penurunan produksi CH₄ dapat pula disebabkan oleh peningkatan konsentrasi tanin. Menurut Patra *et al.* (2006), tanin yang terkandung dalam ekstrak *Terminalia chebula* mempunyai aktivitas antimetanogenik, sedangkan Eliwiński *et al.* (2002) melaporkan bahwa produksi gas CH₄ (*in vitro*) per unit bahan organik terfermentasi cenderung menurun, sejalan dengan peningkatan level ekstrak tanin. Penurunan produksi gas metana sebagai respon dari penambahan ekstrak tanin diduga berhubungan

Tabel 3. Volume gas dan CH₄ (ml/300 mg) pada taraf *A. mangium* yang berbeda

	Taraf <i>A. mangium</i> (%)				S.E.	<i>P</i>	
	0	15	30	45		L	K
Volume gas							
6 jam	17,7	16,2	13,5	12,7	0,800	<0,01	0,66
24 jam	49,2	43,2	34,7	26,5	0,718	<0,01	0,19
48 jam	64,7	57,0	48,2	37,5	0,685	<0,01	0,09
CH ₄	11,2	9,4	8,7	5,9	0,375	<0,01	0,26

Keterangan: L : linier; K : kuadratik; S.E. : *standard error*.

Tabel 4. Persen degradasi bahan kering dan bahan organik pada taraf *A. mangium* yang berbeda

	Taraf <i>A. mangium</i> (%)				S.E.	<i>P</i>	
	0	15	30	45		L	K
Degradasi							
Bahan kering (%)	52,2	44,9	40,0	39,5	1,031	<0,01	0,03
Bahan organik (%)	46,8	39,1	35,7	30,4	1,151	<0,01	0,36

Keterangan: L : linier; K : kuadratik; S.E. : *standard error*.

dengan konsentrasi H₂. Pada proses metanogenesis, bakteri metanogen menggunakan senyawa H₂ dan CO₂ atau format, asetat, methiamin, dan metanol menjadi CH₄. Sementara itu McSweeney *et al.* (2001) menyatakan bahwa penurunan produksi gas CH₄ dapat pula disebabkan oleh penurunan degradasi karbohidrat struktural akibat terbentuknya suatu kompleks antara tanin dengan selulosa atau hemiselulosa.

Berdasarkan data produksi CH₄ dan populasi protozoa terlihat bahwa populasi protozoa dalam rumen tidak merupakan faktor dominan pada proses metanogenesis. Hasil penelitian ini didukung dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Patra *et al.* (2006). Menurut Hess *et al.* (2003) bahwa hanya sebagian kecil dari metanogen yang menempel pada permukaan sel protozoa, sehingga peranan protozoa dalam metanogenesis menjadi tidak dominan.

Degradasi Nutrien

Pengaruh taraf *Acacia mangium* terhadap degradasi nutrien pada inkubasi 48 jam terdapat pada Tabel 4. Degradasi BK dan BO menurun secara linear ($P < 0,01$) terhadap peningkatan taraf *Acacia mangium*. Nilai degradasi BK dan BO menurun dengan variasi 14%–24,3% dan 16,9%–34,6% dibandingkan perlakuan kontrol, sejalan dengan peningkatan taraf akasia. Walaupun pada percobaan ini populasi protozoa meningkat sejalan dengan peningkatan taraf *Acacia mangium*, namun diduga populasi beberapa spesies bakteri menurun

sebagai akibat peningkatan konsentrasi saponin sehingga mempengaruhi degradasi nutrien seperti BK dan BO. Menurut Wang *et al.* (2000), saponin menghambat pertumbuhan bakteri *Butyrivibrio fibrisolvans*, *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, dan *Prevotella bryantii* yang memiliki aktivitas selulolitik dan amilolitik. Hasil yang sama dilaporkan pula oleh Patra *et al.* (2006) bahwa penambahan ekstrak *Acacia concinna* menurunkan degradasi BK dan BO secara signifikan. Menurut McSweeney *et al.* (2001) dan Hristov *et al.* (2003), tanin dapat menghambat proses pencernaan bahan pakan, perkembangan populasi protozoa dan aktivitas enzim.

KESIMPULAN

Daun *Acacia mangium* Willd berpotensi digunakan sebagai pakan suplemen untuk menurunkan volume CH₄. Volume CH₄ menurun sebesar 16,2%; 26,8% dan 61,1% berturut-turut pada taraf *Acacia mangium* 15%, 30% dan 45%. Peningkatan taraf *Acacia mangium* diikuti dengan penurunan secara linier variabel karakteristik fermentasi seperti pH, konsentrasi NH₃ dan total VFA serta degradasi nutrien. Populasi protozoa tidak merupakan faktor dominan yang berperan dalam proses metanogenesis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen

Pendidikan Nasional yang telah menyediakan dana penelitian sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor : 037/SP3/PP/DP2M/2006.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulrazak, S.A., T. Fujihara, J.K. Ondiek & E.R. Ørskov.** 2000. Nutritive evaluation of some Acacia tree leaves from Kenya. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 85:89-98
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists).** 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist. 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA, USA.
- Balch, W.E. & R.S. Wolfe.** 1979. Specificity and biological distribution of coenzym M (2-mercaptosulphonic acid). *J. Bacteriol.* 137:260-263.
- Chaney, A.L. & E.P. Marbach.** 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Cheeke, P.R.** 1999. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.*, 1-10.
- Crowder, L.V. & H.R. Chheda.** 1982. Tropical Grassland Husbandry. Longman Group Limited, New York, USA.
- Hess, H.D., M. Kreuzer, T.E. Díaz, C.E. Lascano, J.E. Carulla, C.R. Soliva & A. Machmüller.** 2003. Saponin rich tropical fruit affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109:79-94.
- Hristov A.N., T.A. McAllister, F.H. Van Herk, K.J. Cheng, C.J. Newbold, & P.R. Cheeke.** 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Anim. Sci.* 77:2554-2563.
- Hristov, A.N., M. Ivan, L. Neill & T.A. McAllister.** 2003. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity *in vitro*. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 105:163-184.
- Johnson, K.A. & D.E. Johnson.** 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483-2492.
- Makkar, H.P.S., S. Sen, M. Blümmel & K. Becker.** 1998. Effects of fractions containing saponin from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculiformis* on rumen fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 46:4324-4328.
- McAllister, T.A., E.K. Okine, G.W. Mathison & K.J. Cheng.** 1996. Dietary, environmental and microbiology aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76:231-243.
- McSweeney, C.S., B. Palmer, D.M. McNeill & D.O. Krause.** 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 91:83-93.
- Mehrez, A.Z., E.R. Ørskov & I. McDonald.** 1977. Rates of rumen fermentation relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 38:437-443.
- Menke, K.H. & H. Steingass.** 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28:7-55.
- Moss, A.R.** 1993. Methane Global Warming and Production by Animals. Chalcombe Publications, Canterbury. p.105.
- Patra, A.K., D.N. Kamra & N. Agarwal.** 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 128:276-291.
- Pelchen, A. & K.J. Peters.** 1998. Methane emissions from sheep. *Small Rum. Res.* 27:137-150.
- Pen, B., C. Sar, B. Mwenya, K. Kuwaki, R. Morikawa & J. Takahashi.** 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 129:175-186.
- Santoso, B.** 2005. Rumen fermentation characteristics and methanogenesis in sheep fed silage-based diet supplemented with *Yucca schidigera* or *Yucca schidigera* combined with nisin. *Bulletin of Animal Science* 28:13-18.
- Santoso, B., A. Kilmaskossu & P. Sambodo.** 2007. Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 137:58-68.

- Santoso, B., B., Mwenya, C. Sar, Y. Gamo, T. Kobayashi, R. Morikawa, K. Kimura, H. Mizukoshi & J. Takahashi.** 2004. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* and nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livest. Prod. Sci.* 91:209-217.
- SAS (Statistical Analysis System).** 1996. SAS/STAT Software, Release 6.12. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Celiwiński, B.J., M. Kreuzer, H.R. Wettstein & A. Machmüller.** 2002. Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plant extracts rich in tannins and saponins, and associated emissions of nitrogen and methane. *Arch. Anim. Nutr.* 56:379-392.
- Stumm, C. K., H.J. Gijzen & G.D. Vogels.** 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *Br. J. Nutr.* 47:95-99.
- Takahashi, J. & B.A. Young.** 1991. Prophylactic effect of L-cystein on nitrate-induced alteration in respiratory exchange and metabolic rate in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 35:105-113.
- Takahashi, J., Y. Miyagawa, Y. Kojima & K. Umetsu.** 2000. Effects of *Yucca schidigera* extract, probiotics, monensin and L-cysteine on rumen methanogenesis. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 13:499-501.
- 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.
- Van Nevel, C.J. & D.I. Demeyer.** 1977. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:251-257.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson & B.A. Lewis.** 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Wang, Y., T.A. McAllister, C.J. Newbold, L.M. Rode, P.R. Cheeke & K.J. Cheng.** 1998. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 74:143-153.
- Wang, Y., T.A. McAllister, L.J. Yanke & P.R. Cheeke.** 2000. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *J. Appl. Microbiol.* 88:867-896.
- Wu, Z., M. Sadik, F.T. Sleiman, J.M. Simas, M. Pessaraki & J.T. Hurber.** 1993. Influence of yucca extract on ruminal metabolism in cows. *J. Anim. Sci.* 72:1038-1042.