

Modulasi Pola Fermentasi Rumen dan Emisi Gas Metana dari Penambahan Ekstrak Lerak pada Silase Gamal

(MODULATION OF RUMEN FERMENTATION AND METHANE EMISSION
BY LERAK EXTRACT ADDITION TO GLIRICIDIA SILAGE)

Pristian Yuliana¹, Erika Budiarti Laconi², Anuraga Jayanegara^{2,*},
Suminar Setiati Achmadi³, Anjas Asmara Samsudin⁴

¹ Program Studi Pascasarjana Ilmu Nutrisi dan Pakan,
Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

² Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan,
Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

³ Departemen Kimia,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor

⁴ Departemen Peternakan,

Fakultas Pertanian, Universiti Putra Malaysia

* Penulis korespondensi e-mail: anuraga.jayanegara@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of lerak fruit extract (*Sapindus rarak*) addition to leguminous gamal silage (*Gliricidia sepium*) on methane emission, rumen fermentation pattern, and rumen microbial population *in vitro*. *In vitro* rumen fermentation was designed according to a randomized complete block design with four replicates and consisted of 3 treatments, i.e. (1) gamal silage without lerak extract addition, (2) gamal silage + lerak extract 2% (w/w), and (3) gamal silage + lerak extract 4% (w/w). The measured parameters were chemical composition, saponin content, gas production, ammonia, methane, volatile fatty acid (VFA), and rumen microbial population. Results showed that the addition of 4% lerak extract increased gas production after 24 and 48 h, increased organic matter digestibility of gamal silage, increased propionate and decreased methane emission as compared to control treatment ($P < 0.05$). Addition of lerak extract tended to reduce methanogen population and total protozoa in the rumen *in vitro*. Lerak extract at level 2% significantly increased ammonia concentration ($P < 0.05$). It can be concluded that the addition of lerak extract at level 4% to gamal silage can increase gas production, organic matter digestibility and proportion of propionate, reduce methane emission, and tend to reduce methanogen population and total protozoa in the rumen *in vitro*.

Keywords: lerak; gamal; methane; saponin; rumen

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek ekstrak saponin dari buah lerak (*Sapindus rarak*) yang ditambahkan pada silase leguminosa gamal (*Gliricidia sepium*) terhadap emisi gas metana, pola fermentasi rumen, serta populasi mikroba rumen secara *in vitro*. Fermentasi rumen *in vitro* menggunakan rancangan acak kelompok dengan 3 perlakuan dan empat ulangan, yakni: (1) silase gamal tanpa penambahan ekstrak lerak, (2) silase gamal + ekstrak lerak 2% (b/b), dan (3) silase gamal + ekstrak lerak 4% (b/b). Parameter yang diukur adalah komposisi kimia, kandungan saponin, produksi gas, amonia, metana, asam lemak terbang, dan populasi mikroba

rumen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan 4% ekstrak lerak meningkatkan produksi gas setelah 24 dan 48 jam, meningkatkan KCBO silase gamal, serta meningkatkan propionat dan menekan produksi gas metana dibandingkan dengan kontrol ($P < 0,05$). Penambahan ekstrak lerak cenderung menurunkan populasi metanogen dan total protozoa dalam rumen secara *in vitro*. Penambahan 2% ekstrak lerak pada level 2% di silase daun gamal meningkatkan secara signifikan konsentrasi amonia ($P < 0,05$). Dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak lerak pada level 4% terhadap silase daun gamal dapat meningkatkan produksi gas, pencernaan bahan organik dan proporsi propionat, menurunkan emisi gas metana, menurunkan bakteri *F. succinogenes* serta cenderung menurunkan populasi metanogen dan total protozoa dalam rumen secara *in vitro*.

Kata kunci: lerak, gamal, metana, saponin, rumen.

PENDAHULUAN

Metana merupakan salah satu sumber gas rumah kaca di atmosfer, kedua terbesar setelah karbon dioksida. Meskipun merupakan yang kedua dalam hal kuantitas, kapasitas CH_4 untuk mempertahankan panas atau yang disebut dengan potensi pemanasan global ternyata 28 kali lebih besar daripada CO_2 (Tian *et al.* 2016). Ternak ruminansia merupakan salah satu sumber emisi gas rumah kaca yang berasal dari fermentasi enterik pakan di dalam rumen. Kontribusi emisi gas rumah kaca dari ternak ruminansia cukup besar, yakni 25% dari total emisi metana antropogenik (Hristov *et al.*, 2017). Selain pengaruhnya pada pemanasan global, emisi metana dari ternak ruminansia juga mengakibatkan hilangnya energi pakan yang seharusnya dapat digunakan untuk mendukung produktivitas. Emisi metana enterik dari ruminansia mewakili sekitar 5-9% dari kehilangan energi bruto pakan (Jeyanathan *et al.*, 2014).

Beberapa pendekatan untuk mengurangi emisi metana dari ruminansia adalah dengan menggunakan senyawa alami seperti tanin, saponin, dan minyak atsiri. Senyawa alami menjadi alternatif solusi untuk menurunkan emisi gas metana terutama setelah larangan penggunaan antibiotik sebagai aditif pakan di banyak negara. Efek mitigasi emisi metana dari senyawa metabolit sekunder tanaman (berupa ekstrak) telah dilaporkan (Kumar *et al.*, 2014). Tumbuhan asal tropis umumnya tinggi senyawa alami ini, termasuk saponin. *Sapindus rarak* atau yang lebih dikenal dengan lerak telah dilaporkan mengandung cukup banyak saponin. Saponin terdiri atas nukleus yang larut lemak dengan struktur steroid atau triterpenoid (Cheok *et al.*, 2014) yang memiliki sifat amfifilik yaitu sifat senyawa yang dapat larut dalam pelarut

baik polar maupun non-polar. Struktur ini menyebabkan saponin memiliki aktivitas membranolitik, sifat anti-bakteri, anti-tumor, anti-inflamasi pada hewan (Wojciechowski *et al.*, 2016), serta mengurangi emisi metana dalam percobaan *in vivo* dan *in vitro* (Rira *et al.*, 2015). Meskipun demikian, efek saponin dari buah lerak terhadap emisi gas metana dan struktur populasi mikroba rumen di Indonesia masih belum banyak diteliti.

Di sisi lain, ketersediaan pakan dengan mutu yang baik adalah salah satu faktor terpenting dalam pemeliharaan ternak, khususnya ruminansia. Hal tersebut merupakan permasalahan tersendiri dengan semakin terbatasnya lahan untuk produksi hijauan pakan dan mahalnya bahan pakan bernilai nutrisi tinggi sebagai bahan baku konsentrat sehingga diperlukan pakan alternatif. Gamal (*Gliricidia sepium*) adalah legum yang memiliki kandungan protein tinggi mencapai 23% dan memiliki potensi sebagai suplemen protein bagi ruminansia dengan ketersediaan yang berlimpah juga biasa digunakan untuk pakan ternak. Selain kandungan protein yang tinggi, gamal mudah didapat, mudah ditanam, dan masih bisa berproduksi saat musim kering. Nilai nutrisi yang tinggi dengan ketersediannya yang melimpah ketika panen, memerlukan suatu teknologi penyimpanan untuk menjaga kandungan nutrisi gamal sehingga dapat digunakan pada masa paceklik pakan dalam jangka panjang, salah satunya melalui teknik ensilase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek ekstrak saponin dari buah lerak (*S. rarak*) yang ditambahkan pada silase leguminosa gamal (*G. sepium*) terhadap emisi gas metana, pola fermentasi rumen, serta populasi mikroba rumen secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Preparasi Sampel dan Analisis Komposisi Kimia

Daun gamal (*G. sepium*) segar didapatkan dari Laboratorium Lapang Fakultas Pertanian Universiti Putra Malaysia, Serdang, Malaysia. Daun gamal dibuat menjadi silase dengan cara dimasukkan pada silo skala laboratorium yang bervolume 1 L, dipadatkan untuk meminimumkan kandungan oksigen awal, kemudian difermentasi selama 30 hari. Perlakuan yang digunakan adalah penambahan ekstrak saponin dari buah lerak pada level yang berbeda yakni 0,2 dan 4% dari bahan kering gamal. Masing-masing perlakuan dilakukan dalam empat ulangan. Ekstraksi saponin dari buah lerak dilakukan dengan menggunakan perlakuan gelombang ultrasonik (dengan alat berupa *sonicator*) pada suhu ruang selama 2×20 menit. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi saponin yaitu 50% air dan 50% metanol (Makkar 2007). Setelah ekstrak saponin terkumpul maka dilakukan rotavapor untuk mengevaporasikan pelarut organik. Sampel saponin kemudian disimpan di dalam freezer hingga beku, dan dikeringbekukan dengan *freeze dryer* untuk mendapatkan ekstrak kering saponin.

Setelah proses fermentasi berakhir, sampel pakan dianalisis untuk kandungan protein kasar (PK), lemak kasar (LK), serat kasar (SK) dan abu sesuai dengan prosedur AOAC (1990). Kandungan serat deterjen netral (NDF), serat deterjen asam (ADF) dan lignin (ADL) dianalisis menurut Van Soest *et al.* (1991). Analisis total saponin dilakukan sesuai dengan metode Hiai dan Nakajima (1976) dan dikalibrasi terhadap standar diosgenin (Sigma-Aldrich D1634, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Jerman). Untuk analisis kandungan saponin, sampel ditambah dengan 0,2 mL vanilin, 0,25 mL etanol, dan 2,5 mL 72% H₂SO₄, dan kemudian divorteks. Sampel dipanaskan dalam penangas air pada suhu 60°C selama 10 menit. Setelah dingin, nilai absorbansi dibaca pada spektrofotometer UV-Vis (U-1800, 5930482, High Technology Corporation, Tokyo, Jepang) pada panjang gelombang 544 nm.

Prosedur Fermentasi Rumen *In Vitro*

Sampel silase daun gamal dikeringkan, digiling (ukuran saringan 1 mm) dan diinkubasi secara *in vitro* berdasarkan metode Hohenheim Gas Test (Menke dan Steingass, 1988). Sebanyak 200 mg substrat dimasukkan ke dalam *syringe*

inkubasi (FORTUNA® Optima glass syringe, Jerman). Cairan rumen diambil dari sapi fistula *Brahman-cross*, dan dibawa ke laboratorium untuk disaring dengan kain kasa yang tebal sebanyak dua lapis dan dicampur dengan cairan bufer (cairan rumen:bufer = 1:2 v/v). Sampel diinkubasi dalam empat ulangan menggunakan rancangan acak kelompok, dengan perbedaan antar inkubasi (cairan rumen) sebagai kelompoknya. Sampel diinkubasi pada suhu 39°C selama 48 jam. Produksi gas dibaca pada jam ke-24 dan 48 jam pascainkubasi awal. Peubah lain yang diamati pada eksperimen *in vitro* ini adalah pencernaan bahan organik (KCBO), profil asam lemak terbang (*volatile fatty acid*, VFA), konsentrasi amonia, emisi gas metana dan populasi mikrob rumen. Pengambilan sampel untuk analisis profil VFA dilakukan pada saat jam ke 0 dan 24. Sebanyak 1,5 mL sampel cairan rumen ditambahkan 200 μ L asam metaphosphorik dan didiamkan selama 30 menit. Sampel kemudian disentrifugasi pada 3.000 rpm pada suhu 24°C selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 500 μ L untuk kemudian dianalisis dengan menggunakan kromatografi gas (Hewlett Packard 6890 GC system) sesuai dengan prosedur Cottyn & Boucque (1968). Emisi metana yang dihasilkan diestimasi dengan persamaan stoikiometri Moss *et al.* (2000) sebagai berikut: CH₄ = 0,5 × Asetat – 0,25 × Propionat + 0,5 × Butirat.

Analisis Populasi Mikrob Rumen

Analisis populasi mikroba rumen dilakukan dengan menggunakan Real Time PCR. Sampel cairan rumen diekstraksi dengan toolkit (Qiagen Inc., Valencia, USA). Target populasi mikroba rumen, sekuens primer dan suhu annealing amplifikasi ditampilkan pada Tabel 1. Real-Time PCR menggunakan BioRad CFX96 Real-Time PCR sistem (BioRad, USA) dengan grade optical plate. Volume total 25 μ L QuantiFast® SYBR® Green PCR kit (Qiagen Inc., Valencia, USA), dengan 12,5 μ L 2 μ L SYBRGreen Master Mix, 1 μ L dari 10 μ M forward primary, 2 μ L DNA sampel, dan 8,5 μ L nuclease-free water untuk setiap reaksi. Jumlah template kontrol diatur pada real time PCR sistem. Kondisi siklus real-time diatur dengan suhu annealing 94°C selama 5 menit untuk denaturasi awal, kemudian 40 siklus pada suhu 94°C selama 20 detik. Total annealing untuk total bakteri, metanogen, total protozoa, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, dan *R. flavefaciens* dilakukan pada suhu annealing 60°C dan

ekstensi pada 72°C selama 20 detik berdasarkan pada metode Navidshad *et al.* (2012).

Analisis Data

Data penelitian dianalisis berdasarkan rancangan acak kelompok dengan 4 ulangan menggunakan analisis sidik ragam (Steel dan Torrie 1993). Ketika suatu parameter menunjukkan perbedaan yang signifikan pada $P < 0,05$, uji lanjut Duncan dilakukan untuk membandingkan antar perlakuan. Analisis data dilakukan dengan *software* statistik SPSS versi 22.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Kimia

Komposisi kimia dari silase daun gamal yang ditambahkan ekstrak lerak dengan level yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata untuk sejumlah peubah yakni PK, LK, abu, NDF dan saponin ($P < 0,05$; Tabel 2). Kandungan nutrisi dari pakan penelitian cukup beragam karena level saponin yang ditambahkan berbeda. Hal ini terlihat bahwa PK silase pada gamal mengalami sedikit penurunan dengan semakin tinggi level saponin yang diberikan jika dibandingkan kontrol. Hal ini diduga karena adanya kandungan antinutrisi pada bahan pakan sehingga degradasi protein berkurang. Protein dipecah menjadi amonia, asam amino, amida, dan air. Produksi cairan atau effluent akan membawa zat-zat gizi yang terlarut di dalamnya mengandung gula, senyawa nitrogen terlarut, mineral, dan asam organik (Reksohadiprodjo 1988). Nitrogen yang terkandung dalam silase sebagian besar akan menguap dan terlarut, sehingga kandungan protein kasar setelah ensilase lebih rendah dibanding sebelum ensilase. Hal lain diduga penurunan PK pada pengawetan silase dapat disebabkan degradasi PK oleh enzim protease dari hijauan maupun clostridia proteolitik selama ensilase. Menurut Givens dan Rulquin (2004) menyatakan bahwa pada ensilase hijauan baik secara langsung maupun setelah pelayuan, proteolisis berlangsung secara kontinyu dalam waktu 24 jam. Selama periode tersebut kandungan protein dapat mengalami penurunan dari 0,8 sampai 0,6. Lebih lanjut dijelaskan bahwa permulaan aktivitas proteolitik selama ensilase terjadi karena aktivitas enzim protease dari hijauan. Menurunnya kandungan protein dan lemak dari silase daun gamal setelah ditambahkan ekstrak lerak diduga karena

ekstrak lerak mengandung protein dan lemak dalam jumlah yang sedikit. Kadar protein pada lerak yaitu sebesar 3,55% dan kadar lemak pada ekstrak lerak sebesar 0,5% sehingga menjadi salah satu faktor yang menyebabkan variasi protein silase. Adapun meningkatnya kandungan NDF silase daun gamal setelah ditambahkan ekstrak lerak diduga karena ekstrak lerak tinggi akan serat khususnya komponen hemiselulosa (Ababea *et al.*, 2004), di samping itu saponin yang terdapat pada ekstrak lerak dapat mengikat sejumlah nutrisi sehingga menjadi tidak larut pada larutan deterjen netral (Ababea *et al.*, 2004). Meningkatnya kandungan saponin pada silase daun gamal setelah ditambahkan ekstrak lerak sesuai dengan ekspektasi dikarenakan ekstrak lerak tinggi akan saponin. Hal ini sesuai dengan Wina *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa ekstrak buah lerak mengandung 48-87% saponin. Ini juga mengindikasikan bahwa saponin relatif resisten terhadap degradasi selama proses ensilase.

Fermentasi, Emisi Metana dan Populasi Mikrob Rumen

Penambahan 4% ekstrak lerak meningkatkan produksi gas setelah 24 dan 48 jam dibandingkan dengan kontrol ($P < 0,05$), namun penambahan pada level 2% tidak berbeda nyata dengan kontrol (Tabel 3). Penambahan 4% ekstrak lerak juga meningkatkan KCBO silase daun gamal dibandingkan dengan perlakuan kontrol ($P < 0,05$). Peningkatan pencernaan organik saat diberikan gamal 4% terjadi karena Hal ini diduga saponin inhibisi aktifitas enzim yang mendegradasi komponen serat (Hristov *et al.*, 2003). Hal ini menegaskan bahwa kadar saponin dalam silase memiliki efek positif pada fermentasi pakan. Selain itu pemberian sumber daun silase berpengaruh positif terhadap pencernaan bahan organik. Hal ini dikarenakan daun yang digunakan untuk silase sumber protein yaitu gamal). Total produksi gas pada semua perlakuan meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Produksi gas akan terus meningkat selama substrat yang difermentasi oleh mikrob masih tersedia. Gas yang dihasilkan oleh mikroba rumen selama inkubasi adalah produk metabolisme mikroba dalam mendegradasi pakan dan juga sebagai akibat dari efek *buffering* saliva buatan (larutan bufer) ketika VFA diproduksi (Getachew *et al.*, 1998). Meningkatnya produksi gas setelah penambahan ekstrak lerak diduga karena

Tabel 1. Sekuens primer yang digunakan untuk target total bakteri, total protozoa, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* dan metanogen

Target mikroba	Sekuens 5'- 3'	Suhu <i>Annealing</i> (°C)	Referensi
Total bakteri	F-CGGCAACGAGCGCAACCC R-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	55	Koike dan Kobayashi (2001)
Metanogen	F-CCGAGATGGAACCTGAGAC R-CGGTCTTTGCCAGCTCTTATTC	55 (2009)	Zhou <i>et al.</i>
Total Protozoa	F-CTTGCCCTCYAATCGTWCT R-GCTTTTCGWTGGTAGTGTATT	55	Sylvester <i>et al.</i> (2004)
<i>F. succinogenes</i>	F-GTTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R-CGCCTGCCCTGAACTATC	55	Lane (1991)
<i>R. albus</i>	F-CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTTCG R-CCTCCTTGCGTTAGAACA	55	Koike dan Kobayashi (2001)
<i>R. flavefaciens</i>	F-TCTGAAAACGGATGGTA R-CCTCCTTGCGTTAGAACA	60	Koike dan Kobayashi (2001)

Tabel 2. Komposisi nutrisi silase daun gamal yang ditambahkan ekstrak saponin dari buah lerak

Komposisi nutrien	Level ekstrak lerak (%)			SEM	P-Value
	0	2	4		
SK	16,6	17,1	21,3	1,462	0,390
ABU	10,2 ^b	7,64 ^a	7,96 ^a	0,347	<0,001
LK	5,92 ^b	3,71 ^a	5,18 ^b	0,347	0,003
PK	27,6 ^b	23,1 ^a	23,6 ^a	0,795	0,016
NDF	46,9 ^a	52,2 ^b	59,0 ^b	1,981	0,024
ADF	28,3	25,5	26,3	2,174	0,886
pH	4,52	4,63	4,66	0,116	0,906
Saponin	0,29 ^a	1,0 ^b	3,75 ^c	0,454	<0,001

Keterangan: Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$). SK: serat kasar, LK: lemak kasar, NDF: *neutral detergent fiber*, ADF: *acid detergent fiber*, ADL: *acid detergent lignin*, SEM: *standard error mean*.

Tabel 3. Efek penambahan ekstrak saponin dari buah lerak pada silase daun gamal terhadap produksi gas dan pencernaan secara *in vitro*

Parameter	Level ekstrak lerak (%)			SEM	P-Value
	0	2	4		
Gas 24 (mL)	23,0 ^a	24,5 ^a	27,5 ^b	0,616	0,002
Gas 48 (mL)	28,4 ^a	28,8 ^a	31,5 ^b	0,716	0,037
KCBO (%)	54,3 ^a	52,3 ^a	55,0 ^b	0,471	0,028

Keterangan: Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$). KCBK: pencernaan bahan organik, SEM: *standard error mean*.

Tabel 4. Efek penambahan ekstrak saponin dari buah lerak pada silase daun gamal terhadap profil *volatile fatty acid* (VFA), konsentrasi amonia dan emisi metana di rumen secara *in vitro*

Parameter	Level Saponin (%)			SEM	P-Value
	0	2	4		
Total VFA (mM)	54,7	53,8	59,0	3,08	0,678
C ₂ (%)	68,9	69,3	68,8	0,166	0,127
C ₃ (%)	17,9 ^a	17,8 ^a	19,2 ^b	0,233	0,038
IsoC ₄ (%)	1,53	1,40	1,48	0,032	0,297
C ₄ (%)	7,80	7,84	7,26	0,283	0,123
IsoC ₅ (%)	2,75	2,48	2,61	0,071	0,346
C ₅ (%)	1,18	1,12	1,15	0,031	0,471
NH ₃ (mM)	16,3 ^a	18,9 ^b	17,5 ^{ab}	0,594	0,017
CH ₄ (%VFA)	22,7 ^b	22,9 ^b	22,2 ^a	0,161	0,043

Keterangan: Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$). C₂: asetat, C₃: propionat, IsoC₄: isobutirat, C₄: butirat, IsoC₅: isovalerat, C₅: valerat, NH₃: amonia, CH₄: metana, SEM: *standard error mean*.

Tabel 5. Efek penambahan ekstrak saponin dari buah lerak pada silase daun gamal terhadap populasi mikroba rumen (log 10 cfu mL⁻¹)

Parameter	Level Saponin (%)			SEM	P-Value
	0	2	4		
Total bakteri	10,5	10,6	10,5	0,059	0,520
<i>R. flavefaciens</i>	4,94	5,02	4,86	0,123	0,801
<i>R. albus</i>	5,13	6,40	6,02	0,376	0,336
<i>F. succinogenes</i>	6,45 ^{ab}	6,83 ^b	6,11 ^a	0,117	0,034
Total protozoa	6,25	6,24	4,91	0,311	0,160
Metanogen	6,56 ^{ab}	6,65 ^b	6,34 ^a	0,057	0,100

Keterangan: Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$). SEM: *standard error mean*.

sebagian saponin terdegradasi menjadi komponen aglikon dan glikon (gula) untuk kemudian komponen gula tersebut dimetabolisasi oleh mikroba menjadi gas (Patra *et al.*, 2010). Produksi gas berkorelasi positif dengan KCBO karena sama-sama mencerminkan tingkat degradasi pakan di dalam rumen sehingga pola yang didapatkan di penelitian ini relatif serupa.

Penambahan ekstrak lerak khususnya pada level 4% meningkatkan propionat secara signifikan dibandingkan dengan kontrol ($P < 0,05$), namun tidak nyata untuk peubah total VFA dan individual VFA lainnya (Tabel 4). Peningkatan produksi propionat akibat penambahan ekstrak lerak juga dapat menekan produksi gas metana, lebih rendah dibandingkan perlakuan kontrol ($P < 0,05$). Hal ini dikarenakan baik produksi metana maupun propionat

merupakan dua jalur metabolisme yang sama-sama memerlukan H₂ dalam sistem rumen. Metana disintesis dalam rumen oleh metanogen yang memiliki sistem enzim untuk memanfaatkan H₂ dan dikombinasikan dengan CO₂ untuk kemudian membentuk metana (Morgavi *et al.*, 2011). Penambahan saponin telah diketahui dapat meningkatkan konsentrasi propionat dan rasio relatifnya terhadap total VFA dalam rumen khususnya ketika saponin diberikan dalam konsentrasi tinggi (Goel *et al.*, 2008).

Di samping itu, saponin dapat berfungsi sebagai agen defaunasi yang membunuh protozoa dan mempengaruhi jalur H₂ sehingga tidak digunakan oleh metanogen (Johnson dan Johnson, 1995). Pembentukan propionat dalam rumen akan berpengaruh positif bagi ternak karena menggunakan hidrogen (H₂) dalam

rumen. Peningkatan pembentukan propionat oleh keberadaan saponin berarti menurunkan ketersediaan H_2 dalam rumen yang akan dimanfaatkan oleh bakteri metanogen dalam mereduksi CO_2 untuk proses metanogenesis (Hess *et al.*, 2003). Metanogenesis merupakan proses pembentukan gas metana di dalam rumen yang terbentuk secara alami dari CO_2 dan H_2 yang dikatalisis oleh mikroba metanogen sebagai bagian dari proses fermentasi pakan dalam rumen. Saponin memiliki kapasitas mengikat senyawa sterol yang terdapat pada membran sel protozoa dan menyebabkan lisis sel (Wina *et al.*, 2005). Hal ini didukung data penelitian bahwa penambahan ekstrak lerak cenderung menurunkan populasi metanogen dan total protozoa dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Tabel 5). Penambahan saponin dari ekstrak lerak pada level 2% di silase daun gamal menurunkan secara signifikan *F. succinogenes* ($P < 0,05$). Hasil penelitian yang didapat sesuai dengan Zhou *et al.* (2011) yang menemukan penurunan *F. succinogenes* secara signifikan yaitu sebesar 79%. Hal ini diindikasikan bahwa 1-10 % bakteri rumen hidup pada permukaan protozoa, yang mana paling banyak adalah bakteri pemecah serat. Saat terjadi defaunasi protozoa maka sebagian *F. succinogenes* ikut terdefaunasi (Imai dan Ogimoto, 1978). Bakteri *F. succinogenes* adalah bakteri pemecah serat yang merupakan bakteri gram negatif yang memiliki dua jenis dinding sel sehingga berpengaruh saat diberikan penambahan ekstrak saponin. Penambahan ekstrak saponin dilaporkan memiliki pengaruh yang berbeda tergantung kepada lingkungan, spesies ternak yang diambil cairan rumen dan jenis saponin yang digunakan. Hasilnya pun tidak konsisten dan berbeda pada beberapa penelitian sebelumnya. Hal produksi metana di rumen sangat bergantung pada tingkat interaksi antara metanogen dan protozoa rumen dan tingkat produksi metana per sel metanogen (Machmuller *et al.* 2003). Produksi gas metana juga dapat dipengaruhi oleh saponin sebagai hasil dari penurunan laju metanogenesis melalui berkurangnya aktivitas gen penghasil metana tanpa mengubah populasi total metanogen (Hess *et al.*, 2003).

Penambahan saponin dari ekstrak lerak pada level 2% di silase daun gamal meningkatkan secara signifikan konsentrasi amonia ($P < 0,05$). Hal ini dikarenakan kandungan PK dalam pakan menjadi alasan terkait dengan konsentrasi amonia dikarenakan

unsur protein di dalam rumen akan didegradasi oleh mikroba menjadi bentuk amonia. Hijauan yang digunakan disini yaitu gamal yang memiliki kandungan protein tinggi. Hal lain yang mengindikasikan konsentrasi amonia tinggi adalah pengambilan sampel untuk analisis amonia dilakukan pada inkubasi ke 48 jam bukan pada jam 3, selain itu larutan buffer yang digunakan untuk *in vitro* terdapat kandungan ammonium. Hal ini dapat diindikasikan sebagai salah satu faktor penyumbang tingginya nilai konsentrasi amonia, kemudian dengan pengambilan sampel pada saat inkubasi ke 48 jam dapat diindikasikan sudah banyaknya proses degradasi protein namun tidak ada penyerapan protein dari bakteri sehingga amonia yang ada kemudian diambil lagi untuk didegradasi sebagai amonia oleh bakteri (Yuliana *et al.*, 2014). Konsentrasi amonia yang dihasilkan dari semua perlakuan berkisar antara 16.3-18.9 mM dan nilai tersebut masih optimal untuk pertumbuhan mikroba rumen. McDonald *et al.* (2002) menyatakan bahwa konsentrasi amonia yang optimum untuk menunjang sintesis protein mikroba dalam cairan rumen sangat bervariasi, berkisar antara 6-21 mM.

SIMPULAN

Penambahan ekstrak lerak pada level 4% terhadap silase daun gamal dapat meningkatkan produksi gas, pencernaan bahan organik dan proporsi propionat, menurunkan emisi gas metana, serta cenderung menurunkan populasi metanogen, menurunkan bakteri *F. succinogenes* dan total protozoa dalam rumen secara *in vitro*.

SARAN

Perlu dilakukan purifikasi saponin dari ekstrak lerak dan diujikan kembali sebagai bahan aditif pada silase daun gamal agar efek saponin tidak bercampur dengan senyawa bioaktif lain yang terdapat pada ekstrak kasar buah lerak. Selain itu perlu juga dilakukan komparasi antara dua jenis saponin yakni saponin triterpenoid dan steroid untuk melihat perbedaan efek di antara keduanya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Departemen Peternakan, Fakultas Pertanian,

Universiti Putra Malaysia yang memfasilitasi penelitian ini melalui program *Research Attachment*. Penulis pertama berterima kasih kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Indonesia (Kemendikbud) yang telah memberikan Beasiswa Unggulan Masyarakat Berprestasi untuk menempuh pendidikan program doktor di Institut Pertanian Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Abebea G, Merkel RC, Anmut G, Sahlu T, Goetsch AL. 2004. Effects of ammoniation on supplementation with soybean meal or broiler litter on feed intake and digestion in yearling Spanish goat wethers. *Small Rum Res* 51: 37-47.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Association of Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R. 2014. Extraction and quantification of saponins: a review. *Food Res Int* 59: 16-40.
- Cottyn B, Bouque CV. 1968. Rapid method for gas-chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. *J Agric Food Chem* 16: 105-107.
- Givens DI, Rulquin H. 2004. Utilization by ruminants of nitrogen compounds in silagebased diets. *Anim. Feed Sci Technol* 114: 1-18.
- Getachew G, Blummel M, Makkar HPS, Becker K. 1998. In vitro gas measuring technique for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol* 72: 261-281.
- Goel G, Makkar HPS, Becker K. 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *J Appl Microbiol* 105: 770-777.
- Jeyanathan J, Martin C, Morgavi D. 2014. The use directed-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions: a review. *Animal* 8: 250-261.
- Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci* 73: 2483-2492.
- Hiai S, Oura H, Nakajima T. 1976. Color Reaction of some saponinins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med* 29: 116-122.
- Hess HD, Monsalve LM, Lascano CE, Carulla JE, Diaz TE, Kreuzer M. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and Sapindus saponaria fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Aust J Agric Res* 54: 703-713.
- Hristov AN, Ivan M, Neill L and McAllister TA. 2003. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Anim Feed Sci Technol* 105: 163-184.
- Hristov AN, Oh J, Giallongo F, Frederick WT, Harper TM, Weeks LH, Branco FA, Moate JP, Deighton HM, Williams OR, Kinderman M, Duval S. 2017. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *PNAS* 112: 10663-10668.
- Imai S, Ogimoto K. 1978. Scanning electron and fluorescent microscopic studies on the attachment of spherical bacteria to ciliate protozoa in the ovine rumen. *Jpn J Vet Sci* 40: 9-19.
- Kumar S, Choudhury PK, Carro MD, Griffith GW, Dagar S, Puniya M, Calabro S, Ravella SR, Dhewa T, Upadhyay RC, Sirohi SK, Kundu SS, Wanapat M, Puniya K. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 31-44.
- Machmuller A, Soliva CR, Kreuzer M. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reprod Nutr Dev* 43: 41-55.
- McDonald P, Edwards R, Greenhalgh J. 2002. *Animal Nutrition*. 6th Edition. New York.
- Menke KH, Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 28: 7-55.
- Milford R, Haydock KPH. 1965. The nutritive value of protein in subtropical pasture species grown in South-East Queensland. *Aust J Exp Agric* 5: 13-17
- Morgavi DP, Martin C, Jouany JP, Ranilla MJ. 2011. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause – effect relationship. *Br J Nutr* 107: 388-397.
- Moss AR, Jouany JP, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootech* 49: 231-253

- Navidshad B, Liang JB, Jahromi MF. 2012. Correlation coefficients between different methods of expressing bacterial quantification using real time PCR. *Int J Mol Sci* 13: 2119-2132.
- Patra AK, Saxena J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222.
- Reksohadiprodjo S. 1988. *Pakan Ternak Gembala*. Cetakan Pertama.
- Rira M, Chentli A, Boufenera S, Bousseboua H. 2015. Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of sheep *in vitro*. *Energy Procedia* 74: 15-24.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip & Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik*. Jakarta. Gramedia Pustaka Utama.
- Tian H, Lu C, Ciais P, Michalak AM, Canadell JG, Saikawa E, Huntzinger DN, Gurney KR, Sitch S, Zhang B. 2016. The terrestrial biosphere as a net source of greenhouse gases to the atmosphere. *Nature* 531: 225–228.
- Van Soest PJ. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd Ed. Ithaca. Cornell University Press, USA.
- Wina E, Muetzel S, Hoffmann EM, Makkar HPS, Becker K. 2005. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol* 121: 59-174.
- Wojciechowski K, Orczyk M, Gutberlet T, Geue T. 2016. Complexation of phospholipids and cholesterol by triterpenic saponins in bulk and in monolayers. *Biochim Biophys Acta* 1858: 363-373.
- Zhou YY, Mao HL, Jiang F, Wang JK, Liu JX, McSweeney CS. 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Anim Feed Sci Technol* 166: 93-100.