



POTENSI LARVA LALAT TENTARA HITAM RENDAH LEMAK TERHADAP KECERNAAN DAN FERMENTASI RUMEN *IN VITRO* SEBAGAI BAHAN PAKAN ALTERNATIF

(The Potential of Defatted Black Soldier Fly Larvae on In Vitro Digestibility and Rumen Fermentation as an Alternative Feed Ingredient for Ruminants)

Randi Mulianda^{1*}; Rita Rosmala Dewi²; Alfath Rusdhi³; Emmy Kejora⁴; Reno Martha⁵; Ari Ashari Harahap⁶

^{1,2,3,4}Program Studi Ilmu Peternakan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Tjut Nyak Dhien, Medan

⁵Program Studi Peternakan, Fakultas Ilmu Hayati, Universitas Pahlawan Tuanku Tambusai, Bangkinang

⁶Program Studi Peternakan Universitas Muhammadiyah Tapanuli Selatan

Email:

randimulianda@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi perbedaan nilai nutrisi antara larva BSF utuh dan larva BSF rendah lemak melalui analisis kimia dan uji fermentasi rumen secara *in vitro*. Penelitian menggunakan empat perlakuan, yaitu larva BSF utuh (T1), larva BSF defatted mekanis (T2), larva BSF defatted kimia (T3), dan bungkil kedelai (T4) sebagai kontrol, masing-masing dengan empat ulangan, menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Hasil menunjukkan bahwa proses defatting meningkatkan secara signifikan ($P < 0,05$) pencernaan bahan kering, pencernaan bahan organik, dan produksi gas dibandingkan larva BSF utuh. Bungkil kedelai (T4) memberikan nilai tertinggi pada parameter tersebut. Sebaliknya, konsentrasi amonia dan total VFA tidak berbeda nyata antar perlakuan ($P > 0,05$). Disimpulkan bahwa pengurangan lemak pada larva BSF meningkatkan kualitas fermentasinya secara *in vitro*, meskipun nilai nutrisinya belum menyamai bungkil kedelai.

Kata kunci: BSF, Fermentasi, Nutrisi, *In vitro*, Ruminansia

Abstract

This study aimed to evaluate the differences in nutritional value between whole BSF larvae and defatted BSF larvae through chemical analysis and in vitro rumen fermentation. Four treatments were tested, including whole BSF larvae (T1), mechanically defatted BSF larvae (T2), chemically defatted BSF larvae (T3), and soybean meal as a control (T4), each with four replications under a completely randomized design (CRD). The results showed that defatting significantly improved ($P < 0.05$) dry matter digestibility, organic matter digestibility, and gas production compared with whole BSF larvae. Soybean meal (T4) produced the highest values for

these parameters. In contrast, ammonia concentration and total VFA did not differ significantly among treatments ($P>0.05$). It can be concluded that fat reduction in BSF larvae enhances their in vitro rumen fermentation quality, although their nutritional value has not yet matched that of soybean meal.

Keywords: BSF, Fermentation, Nutritional, In vitro, Ruminants

1 Pendahuluan

Pakan peternakan modern, sediaan mutu yang baik merupakan syarat utama keberhasilan, sebab nutrisi yang mencukupi akan memengaruhi produktivitas ternak. Tidak mengherankan apabila komponen pakan mendominasi biaya produksi, yaitu mencapai 50–70% dari total biaya usaha. Di antara nutrisi utama untuk ternak, protein menempati posisi paling mahal dalam formulasi ransum karena berperan besar dalam pertumbuhan, produksi, dan reproduksi ternak (Jayanegara *et al.*, 2017). Umumnya, kebutuhan protein ini dipenuhi dari bahan baku konvensional seperti bungkil kedelai, tepung ikan, atau tepung gluten jagung. Namun, ketergantungan terhadap bahan baku tersebut semakin problematis akibat fluktuasi harga global, tingginya persaingan antara sektor pangan dan pakan, serta keterbatasan ketersediaan sumber protein berkualitas.

Dalam konteks tersebut, serangga menjadi salah satu kandidat potensial yang semakin menarik perhatian peneliti dan industri pakan. Serangga dikenal memiliki kandungan protein tinggi, profil asam amino yang seimbang, serta ketersediaan sumber daya yang melimpah (Barros-Cordeiro *et al.*, 2014). Dari berbagai jenis serangga yang telah dieksplorasi, larva Black Soldier Fly (BSF, *Hermetia illucens*) menonjol sebagai spesies dengan keunggulan khusus. Larva BSF relatif mudah dibudidayakan, memiliki siklus hidup yang singkat, dan mampu beradaptasi dengan berbagai substrat pakan, termasuk limbah organik. Kandungan proteinnya dilaporkan mencapai sekitar 40%, yang menjadikannya sebanding dengan bahan pakan konvensional seperti bungkil kedelai (Liland *et al.*, 2017). Meski demikian, salah satu keterbatasan utama larva BSF adalah tingginya kadar lemak, yakni sekitar 29,65%, yang berpotensi menurunkan efisiensi pencernaan nutrisi terutama dalam sistem pencernaan ternak ruminansia.

Meskipun larva BSF memiliki potensi besar sebagai sumber protein alternatif, kadar lemaknya yang tinggi menjadi kendala utama dalam pemanfaatannya pada ternak ruminansia. Upaya yang dapat dilakukan adalah proses defatting melalui metode mekanis dan kimia untuk meningkatkan pemanfaatan nutrisi dalam sistem fermentasi rumen secara *in vitro*. Namun, hingga saat ini belum banyak penelitian yang secara komprehensif membandingkan efektivitas kedua metode defatting tersebut terhadap pencernaan dan parameter fermentasi jika dibandingkan dengan bahan pakan konvensional seperti bungkil kedelai. Kesenjangan inilah yang mendasari perlunya evaluasi langsung terhadap perubahan komposisi nutrisi dan respons fermentasi rumen akibat perlakuan defatting pada larva BSF. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menilai pengaruh proses defatting terhadap kandungan nutrisi, pencernaan *in vitro*, dan parameter fermentasi rumen larva BSF dibandingkan bungkil kedelai sebagai pembanding.

2 Metodologi

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, IPB University, Bogor, selama periode Maret hingga Mei 2025.

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan larva BSF umur 6 hari dengan empat perlakuan dan lima ulangan, yaitu larva BSF utuh (T1), larva BSF rendah lemak hasil ekstraksi mekanis (T2), larva BSF rendah lemak hasil ekstraksi kimia menggunakan n-heksana (T3), serta bungkil kedelai sebagai pembanding (T4). Defatting larva BSF dilakukan menggunakan dua metode. Pada metode mekanis, larva dikeringkan pada suhu 60–70°C, digiling hingga berbentuk tepung kasar, kemudian dipres menggunakan screw press dengan tekanan $\pm 25\text{--}35$ MPa untuk memisahkan fraksi minyak, sehingga diperoleh tepung BSF rendah lemak tanpa residu kimia.

Pada metode kimia, larva dikeringkan hingga kadar air $\leq 5\%$, digiling halus, dan diekstraksi menggunakan metode Soxhlet dengan n-heksana selama 4–8 jam, kemudian pelarut diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan tepung BSF dengan kadar lemak sangat rendah. Sampel setiap perlakuan diinkubasi secara *in vitro* menggunakan cairan rumen yang telah dibuffer, dengan dua unit inkubasi per ulangan, selama 48 jam pada suhu 39°C. Cairan rumen berasal dari sapi jantan Friesian Holstein fistula berumur sekitar tiga tahun yang diberi pakan hijauan dan konsentrat dengan rasio 60:40. Seluruh perlakuan dialokasikan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL).

Variabel yang dianalisis meliputi total gas dan metana yang dilepaskan pada interval tertentu, pencernaan bahan kering (DBK) dan bahan organik (DBO), kadar amonia (AOAC, 2005), jumlah asam lemak volatil (VFA), serta derajat keasaman (pH). Tahapan *in vitro* dilaksanakan berdasarkan metode Theodorou dan Brooks (1995).

Prosedur In Vitro

Sampel berupa larva BSF diinkubasi dengan cairan rumen dan campuran buffer bikarbonat (Theodorou & Brooks, 1990), masing-masing dilakukan dalam lima ulangan. Cairan rumen terlebih dahulu disaring sebelum digunakan untuk menghilangkan partikel hijauan berukuran besar. Sekitar 750 mg sampel dimasukkan ke dalam botol serum berkapasitas 150 ml, kemudian ditambahkan 15 ml cairan rumen dan 60 ml buffer bikarbonat. Masing-masing botol serum diberi aliran gas CO₂ selama setengah menit, lalu ditutup rapat dengan karet butil dan segel aluminium. Setelah itu, inkubasi berlangsung dalam water bath bersuhu 39°C selama 48 jam. (Theodorou *et al.*, 1994). Gas dilepaskan dan dicatat secara teratur pada interval waktu tertentu menggunakan spuit. Pengocokan dilakukan secara manual setiap kali pengukuran produksi gas. Sampel gas kemudian diinjeksi ke dalam kromatograf gas untuk mengukur konsentrasi metana.

Setelah 48 jam inkubasi, dilakukan pemisahan antara supernatan dan residu menggunakan sentrifugasi. Supernatan diambil untuk analisis pH, konsentrasi amonia, populasi total bakteri, dan total asam lemak volatil (VFA) (Laconi & Jayanegara, 2015). Residu ditambahkan dengan 75 ml campuran pepsin-HCl dan dimasukkan kembali ke dalam water bath selama 48 jam berikutnya. Setelah inkubasi, residu dikeringkan pada oven bersuhu 60°C selama 24 jam, kemudian diabukan dalam tanur pada suhu 550°C. Tahapan tersebut digunakan untuk menentukan pencernaan bahan kering (DBK) dan organik (DBO) secara *in vitro* sebagaimana dijelaskan oleh Tilley & Terry. (Tilley & Terry, 1963).

Analisis Data

Data penelitian dianalisis dengan analisis varians (ANOVA) menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics. Jika ditemukan perbedaan yang signifikan pada taraf $P < 0,05$, maka analisis dilanjutkan dengan uji Duncan untuk melihat perbedaan antar perlakuan.

3 Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini menunjukkan bahwa degradasi bahan organik cenderung meningkat seiring dengan bertambahnya degradasi bahan kering (Tabel 1). Keterkaitan tersebut wajar karena bahan organik merupakan komponen utama dari bahan kering. Menurut (Suardin *et al.*, 2014), terdapat hubungan positif antara pencernaan bahan organik dan bahan kering. Kondo *et al.*, (2021) juga melaporkan bahwa mayoritas komponen bahan kering berasal dari bahan organik. Secara biologis, tingkat degradasi bahan organik sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim selulolitik yang dihasilkan oleh mikroba rumen. Kandungan lemak yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba tersebut, sehingga menurunkan efisiensi degradasi bahan organik dalam sistem rumen *in vitro*.

Nilai degradasi bahan kering (DBK) dan bahan organik (DBO) tertinggi diperoleh pada perlakuan T4, dan hasil tersebut masih dalam batas normal. (Firsoni *et al.*, 2008). Rendahnya kandungan serat pada perlakuan ini diduga menjadi penyebab tingginya koefisien degradasi, sehingga memudahkan mikroba rumen dalam memecah komponen pakan.

Tabel 1. Degradasi bahan kering (DBK), degradasi bahan organik (DBO), dan nilai pH dari perlakuan BSF.

Perlakuan	Degradasi bahan kering	Degradasi bahan organik	pH
T1	13.35 ^a ± 1.08	11.18 ^a ± 0.98	6.74 ^b ± 0.05
T2	42.22 ^c ± 1.76	41.19 ^c ± 1.42	7.20 ^c ± 0.01
T3	26.04 ^b ± 3.29	24.22 ^b ± 3.32	6.74 ^b ± 0.01
T4	72.55 ^c ± 3.66	71.01 ^d ± 2.36	6.64 ^a ± 0.02

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada taraf ($P < 0,05$); T1 = larva BSF utuh; T2 = larva BSF rendah lemak melalui ekstraksi mekanis; T3 = larva BSF rendah lemak melalui ekstraksi kimia; T4 = bungkil kedelai.

Nilai DBK dan DBO terendah ditemukan pada perlakuan T1. Rendahnya tingkat degradasi pada perlakuan ini kemungkinan besar berkaitan dengan tingginya kandungan serat pada larva BSF, termasuk kitin. Kitin merupakan resistant polysaccharide yang sulit dihidrolisis oleh enzim rumen karena memiliki ikatan β -1,4-glikosidik yang kuat dan struktur kristalin yang kompleks, sehingga membatasi akses enzim selulolitik dan menurunkan efisiensi degradasi bahan organik dalam sistem rumen *in vitro*. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kandungan serat kasar pada BSF mencapai 29,58% (Riswandi *et al.*, 2021). Hal ini menjelaskan bahwa komposisi fraksi serat memiliki pengaruh besar terhadap proses fermentasi pakan dalam rumen. Selaras dengan hal tersebut, (Rymera *et al.*, 2005) juga menemukan bahwa kadar serat kasar berhubungan negatif dengan tingkat pencernaan.

Nilai pH cairan rumen pada penelitian ini berkisar antara 6.64 hingga 7.20, yang masih berada dalam kisaran optimal untuk aktivitas mikroba rumen (6.2–7.0). Kondisi ini menunjukkan bahwa proses fermentasi berlangsung stabil selama inkubasi *in vitro*. Nilai pH yang terlalu rendah dapat menghambat aktivitas mikroba selulolitik, sedangkan pH yang terlalu tinggi dapat menurunkan produksi asam lemak volatil (VFA). Perbedaan pH antar perlakuan diduga dipengaruhi oleh kandungan lemak pada larva BSF, karena lemak tinggi dapat menurunkan aktivitas fermentatif dan produksi asam organik, sehingga menyebabkan pH cenderung lebih tinggi (Jayanegara *et al.*, 2017; Kondo *et al.*, 2021)

Sebaliknya, rendahnya kadar serat kasar pada perlakuan T4 meningkatkan degradasi bahan kering dan bahan organik, sebab mikroba rumen dapat lebih mudah memecah komponen pakan. Temuan ini sesuai dengan pernyataan (Rudini & Ayustaningwarno, 2013) yang menyebutkan bahwa kadar serat kasar dalam bungkil kedelai hanya sebesar 7,28%. Selain itu, nilai pH pada

sistem fermentasi rumen *in vitro* juga mengalami perubahan akibat perlakuan yang diberikan. Pada sistem batch *in vitro*, medium inkubasi dirancang dengan kapasitas buffer yang cukup agar pH dapat tetap stabil hingga akhir proses inkubasi (Rudini & Ayustaningwarno, 2013; Rymer & Givens, 2002).

Tabel 2. Produksi gas total pada 24 dan 48 jam dari perlakuan BSF

Perlakuan	24 jam (ml)	48 jam (ml)
T1	47.4 ^c ± 0.62	66.0 ^a ± 1.89
T2	35.8 ^a ± 1.62	78.0 ^b ± 0.96
T3	41.6 ^b ± 0.63	68.0 ^a ± 0.76
T4	90.4 ^d ± 3.54	163 ^d ± 0.63

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada taraf ($P < 0,05$); T1 = larva BSF utuh; T2 = larva BSF rendah lemak melalui ekstraksi mekanis; T3 = larva BSF rendah lemak melalui ekstraksi kimia; T4 = bungkil kedelai.

Perbedaan produksi gas antar perlakuan menunjukkan adanya variasi dalam tingkat fermentabilitas substrat oleh mikroba rumen. Perlakuan dengan bungkil kedelai (T4) menghasilkan gas total tertinggi baik pada 24 maupun 48 jam inkubasi, yang mencerminkan tingginya ketersediaan karbohidrat mudah terfermentasi. Sebaliknya, perlakuan dengan larva BSF, terutama larva utuh (T1), menunjukkan produksi gas yang lebih rendah karena tingginya kandungan lemak dan kitin yang dapat menghambat aktivitas mikroba rumen. Lemak dalam jumlah tinggi dapat membentuk lapisan pada permukaan partikel pakan, sehingga mengurangi kontak antara substrat dan enzim fermentatif. Selain itu, kitin bersifat resistant polysaccharide yang sulit dihidrolisis, sehingga menurunkan degradasi bahan organik. Hubungan positif antara produksi gas dan tingkat degradasi substrat juga terlihat, di mana perlakuan dengan nilai DBK lebih tinggi menghasilkan gas total yang lebih besar. Hal ini sejalan dengan konsep bahwa semakin tinggi degradasi bahan kering, semakin banyak substrat yang difermentasi menjadi asam lemak volatil (VFA), CO₂, dan CH₄ sebagai produk utama fermentasi rumen *in vitro*.

Sementara itu, konsentrasi amonia dan total VFA tidak menunjukkan perbedaan antar perlakuan pakan (Tabel 3). Asam lemak volatil (VFA) merupakan produk akhir dari fermentasi karbohidrat di dalam rumen yang berfungsi sebagai sumber energi utama bagi ruminansia. Proses fermentasi karbohidrat juga menghasilkan gas CO₂ dan CH₄ [14]. Dalam penelitian ini, total VFA yang diperoleh masih berada dalam kisaran normal (80–160 mM) untuk mendukung pertumbuhan mikroba rumen (Sutardi, 1979). Adapun konsentrasi NH₃ rumen, yang merupakan produk antara metabolisme protein, akan meningkat seiring dengan meningkatnya degradasi protein (Wahyuni *et al.*, 2014). Dalam penelitian ini, konsentrasi amonia masih berada pada rentang yang cukup untuk memenuhi kebutuhan mikroba, yakni 6,0 – 17,65 mM.

Tabel 3. Konsentrasi NH₃ dan total VFA pada berbagai perlakuan BSF

Perlakuan	Ammonia/NH ₃ (mM)	VFA Total (mM)
T1	49.50 ± 3.88	102.9 ± 4.57
T2	57.36 ± 11.30	128.6 ± 15.5
T3	73.11 ± 10.13	148.3 ± 4.83
T4	96.46 ± 11.08	165.6 ± 6.56

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada taraf ($P < 0,05$); T1 = larva BSF utuh; T2 = larva BSF rendah lemak melalui ekstraksi mekanis; T3 = larva BSF rendah lemak melalui ekstraksi kimia; T4 = bungkil kedelai.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi amonia (NH₃) dan total VFA tidak berbeda nyata antar perlakuan pakan. Kondisi ini mengindikasikan bahwa ketersediaan nitrogen dalam cairan rumen relatif seimbang, sehingga masih mampu mendukung proses sintesis protein

mikroba. Amonia berperan penting sebagai prekursor utama pembentukan asam amino oleh mikroba rumen; apabila konsentrasinya berada pada kisaran optimal (5–25 mg/100 ml), maka pertumbuhan mikroba dan aktivitas fermentatif dapat berlangsung secara efisien. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi total VFA berada pada kisaran normal, yaitu 80–160 mM (Sutardi, 1979), sehingga dapat dikatakan bahwa fermentasi rumen berlangsung efektif untuk mendorong perkembangan serta aktivitas mikroba.

Selain itu, produksi gas berupa CO₂ dan CH₄ yang dihasilkan sebagai produk samping fermentasi karbohidrat juga menunjukkan bahwa jalur fermentasi tetap berjalan secara normal meskipun terjadi variasi sumber protein pakan. Tidak adanya perbedaan nyata pada konsentrasi NH₃ antar perlakuan menunjukkan bahwa proses deaminasi dan pemanfaatan nitrogen oleh mikroba relatif stabil meskipun terdapat variasi komposisi pakan, termasuk penggunaan larva BSF dengan kadar lemak berbeda. Di sisi lain, konsentrasi NH₃ rumen yang diperoleh masih termasuk dalam rentang yang memadai bagi kebutuhan mikroba, yaitu 6,0–17,65 mM. (Wahyuni *et al.*, 2014). NH₃ merupakan produk antara dari degradasi protein, sehingga konsentrasi yang terukur menggambarkan ketersediaan nitrogen untuk sintesis protein mikroba. Konsentrasi yang tidak berbeda antar perlakuan menunjukkan bahwa substitusi sebagian protein pakan dengan larva BSF tidak memengaruhi degradasi protein maupun pemanfaatan nitrogen dalam rumen. Temuan ini penting karena menegaskan bahwa meskipun kandungan lemak BSF relatif tinggi, penggunaannya dalam formulasi pakan tidak mengganggu keseimbangan fermentasi rumen, sehingga tetap berpotensi dimanfaatkan sebagai sumber protein alternatif bagi ternak ruminansia.

4 Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penghilangan lemak dari larva BSF, baik dengan metode mekanis maupun kimia, mampu meningkatkan pemanfaatannya pada sistem fermentasi rumen secara *in vitro*. Meski demikian, kualitas nutrisi BSF rendah lemak masih belum menyamai nilai nutrisi bungkil kedelai.

5 Daftar Pustaka

- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18th Ed.). 18th Ed.
- Barros-Cordeiro, K., B  o, S. N., & Pujol-Luz, J. R. (2014). Intra-pupal development of the black soldier fly, *Hermetia illucens*. *Journal of Insect Science*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1673/031.014.34>
- Firsoni, J., Sulistyono, A. S., Tjakradijaja, H., & Suharyono. (2008). Uji fermentasi *in vitro* terhadap pengaruh suplemen pakan dalam pakan komplit. *Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi BATAN*, 233–240.
- Jayanegara, A., Novandri, B., Yantina, N., & Ridla, M. (2017). Use of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) to substitute soybean meal in ruminant diet: An *in vitro* rumen fermentation study. *Veterinary World*, 10(12), 1439–1446. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1439-1446>
- Kondo, M., Mulianda, R., Matamura, M., Shibata, T., Mishima, T., Jayanegara, A., & Isono, N. (2021). Validation of a phenol–sulfuric acid method in a microplate format for quantification of soluble sugars in ruminant feeds. *Animal Science Journal*, 92(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/asj.13530>
- Laconi, E. B., & Jayanegara, A. (2015). Improving nutritional quality of cocoa pod (*Theobroma cacao*) through chemical and biological treatments for ruminant feeding: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(3), 343–350. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0278>

- Liland, N. S., Biancarosa, I., Araujo, P., Biemans, D., Bruckner, C. G., & Waagbø, R. (2017). Modulation of nutrient composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLOS ONE*, 12(8), e0183188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183188>
- Riswandi, A., Abrar, A., Wijaya, A., & Hamzah, B. (2021). *The effect of supplementation of cassava leaves, palm oil sludge and yeast in kumpai grass-based rations on ruminal fermentation and gas methane concentration in vitro*. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 11(5), 1921–1927. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.11.5.11999>
- Rudini, R., & Ayustaningwarno, F. (2013). Kadar protein, serat, triptofan, dan mutu organoleptik kudapan ekstrusi jagung dengan substitusi kedelai protein. *Journal of Nutrition College*, 2(4), 373–381. <https://doi.org/10.14710/jnc.v2i4.3904>
- Rymer, C., & Givens, D. I. (2002). Relationship between patterns of rumen fermentation measured in sheep and in situ degradability and the in vitro gas production profile of the diet. *Animal Feed Science and Technology*, 101(1–4), 31–34. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00218-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00218-4)
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., & Givens, D. I. (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 9–30. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.055>
- Suardin, N., Sandiah, N., & Aka, R. (2014). *Kecernaan bahan kering dan bahan organik campuran rumput mulato (Brachiaria hybrid cv. Mulato) dengan jenis legum berbeda menggunakan cairan rumen sapi*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.33772/jitro.v1i1.357>
- Sutardi, T. (1979). Ketahanan protein bahan makanan terhadap degradasi oleh mikroba dan populasi protozoa rumen dan pemanfaatannya bagi produktivitas ternak. *Prosiding Seminar Penelitian dan Pengembangan Peternakan*, pages unavailable.
- Theodorou, M. K., & Brooks, A. E. (1990). Evaluation of a new laboratory procedure for estimating the fermentation kinetics of tropical feeds. *Annual Report. AFRC Institute for Grassland and Animal Production*.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4), 185–197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, 18(2), 104–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Wahyuni, I. M. D., Muktiani, A., & Christiyanto, M. (2014). Dry matter and organic matter digestibility and fiber degradability in feed with tannin and saponin supplementation. *Agripet*, 2(2), 115–124.