

EVALUASI PAKAN SECARA IN VITRO

SUPARJO

jatayu66@yahoo.com

Laboratorium Makanan Ternak
Fakultas Peternakan Univ. Jambi

PENDAHULUAN

Penelitian dengan menggunakan cairan rumen melalui *Artificial rumen technique* yang sekarang lebih dikenal dengan fermentasi rumen *in vitro* atau teknik *in vitro* pertama kali dilakukan oleh Clark dan Mott dari Purdue University dan dilaporkan oleh Clark pada tahun 1952. Teknik *in vitro* ditujukan untuk mempelajari teknik fermentasi di dalam rumen dan sejumlah proses yang terjadi karena

aktivitas mikrobial. Teknik *in vitro* banyak digunakan dalam mengevaluasi bahan pakan terutama hijauan. Pada teknik ini mikroba dipisahkan secara total dari kontrol dan pengaruh induk semangnya. Sejalan dengan perkembangannya, teknik *in vitro* mempunyai beberapa sistem yaitu sistem aliran kontinu, sistem tertutup dan teknik kultur murni.

Sistem aliran kontinu biasanya menggunakan *chemostat* yang dilengkapi dengan alat pemberi pakan

dan pengeluaran produk akhir yang teratur. Sementara itu pada sistem tertutup digunakan tabung *fermentor* yang diisi dengan bahan pakan tanpa ada pengeluaran produk fermentasi kecuali gas. Teknik kultur murni lebih ditujukan pada penelitian tentang peran mikroba dalam metabolisme.

Sistem tertutup merupakan teknik yang paling luas pemakaiannya untuk mengukur pencernaan suatu pakan. Teknik ini dikembangkan oleh Tilley dan Terry

pada tahun 1963. Teknik pencernaan *in vitro* dua fase dari Tilley dan Terry merupakan salah satu teknik *in vitro* yang banyak diterima kalangan peneliti. Teknik ini tidak hanya mengukur fraksi serat yang dapat dicerna tetapi juga mengukur fraksi lain yang mudah larut sehingga diakui secara umum sebagai metode yang cocok untuk memprediksi pencernaan semua jenis hijauan dan sering juga dijadikan standar yang sangat baik bagi prosedur lainnya dalam mengestimasi pencernaan hijauan.

Tilley dan Terry (1963) membagi proses pencernaan ruminansia secara *in vitro* menjadi 2 fase, yaitu:

- a. *Fase pencernaan fermentatif.* Pada fase pertama ini bahan makanan difermentasikan secara anaerob dalam cairan rumen dan larutan buffer selama 48 jam. Proses degradasi pakan dalam rumen dengan waktu inkubasi tersebut sebenarnya belum selesai. Degradasi akan lebih sempurna jika waktu inkubasi ditingkatkan, tetapi waktu inkubasi 48 jam sudah merupakan kesepakatan bersama bahwa hasil yang diperoleh selama waktu tersebut setara dengan hasil yang diperoleh dengan cara *in vivo* dalam waktu yang sama.
- b. *Fase pencernaan hidrolitik.* Fase kedua ini merupakan kelanjutan dari fase pertama dimana residu mengalami pencernaan hidrolitik atau enzimatis yaitu pencernaan oleh larutan asam pepsin-HCl dengan tujuan untuk menghilangkan protein bakteri dan protein pakan yang tidak mengalami degradasi di dalam rumen.

Kondisi fase kedua tidak serawan kondisi fase pertama dan lama inkubasinya sekitar 24 jam.

FERMENTASI RUMEN IN VITRO

Teknik *in vitro* merupakan suatu usaha simulasi proses dalam penentuan pencernaan secara *in vivo*. Proses fermentasi berlangsung di dalam suatu bejana (*fermentor*) dan dilakukan peniruan terhadap kondisi rumen. Seperti diketahui aktivitas pencernaan bahan pakan terjadi mulai dari mulut ke retikulorumen dan bahan pakan itu dicerna secara fermentatif oleh mikroba rumen. Proses pencernaan oleh mikroba anaerob terjadi pada suhu rumen (39°C) dengan pH netral (6.9-7.0). pH yang netral dijaga dengan adanya saliva rumen yang mengandung fosfat dan bikarbonat yang bersifat buffer (penyangga). Selain itu protein di dalam abomasum dan usus halus juga dicerna secara hidrolisis oleh enzim proteolitik HCl-pepsin.

Tempat inkubasi sampel atau *fermentor* dapat terbuat dari kaca atau polietilen. Namun menurut beberapa hasil penelitian jenis fermentor dapat mempengaruhi hasil yang diperoleh. Sayre dan Van Soest (1972) melaporkan bahwa tabung sentrifuge kaca menghasilkan pencernaan bahan kering lebih rendah dibanding dengan menggunakan erlenmeyer. Mereka menduga penggunaan tabung sentrifuge menyebabkan banyak sampel yang menempel pada tutup saat penggoncangan. Mereka juga melaporkan bahwa ada interaksi antara jenis *fermentor* dengan ukuran sampel.

Kondisi anaerob pada fase fermentatif diusahakan dengan cara mengaliri gas CO₂ (*bubbling*) dan ditutup dengan penutup karet *Bunsen valve*. Prinsip penutup *Bunsen valve* ini sama dengan prinsip pentil pada ban sepeda yaitu hanya bisa membebaskan udara di dalam tabung *fermentor* tapi udara di luar tabung sendiri tidak bisa masuk.

Sumber inokulum mikroba diperoleh dari cairan rumen. Inokulum merupakan sumber keragaman yang tidak dapat dikontrol dalam teknik *in vitro*. Untuk mengontrolnya diperlukan sampel standar untuk mengukur keragaman antar *run* dan untuk menentukan kapan seluruh *run* harus diganti. Kemampuan inokulum rumen mungkin dipengaruhi oleh spesies ternak, breed, individu ternak dan variasi ternak dari waktu ke waktu. Bentuk dan tipe ransum ternak donor seringkali berpengaruh terhadap efisiensi inokulum. Beberapa ahli berpendapat bahwa ternak donor sebaiknya tidak diberi pakan butiran dalam ransumnya untuk mencapai pencernaan *in vitro* terbaik dengan keragaman minimum. Pemberian pakan dengan butiran yang tinggi dalam ransum akan menurunkan aktivitas bakteri selulolitik meskipun tidak sampai menurunkan jumlah bakteri itu sendiri.

Keseragaman inokulum rumen dapat dilakukan dengan penyaringan cairan rumen melalui kain katun tipis. Jumlah inokulum di atas minimum tidak mempengaruhi hasil pencernaan asalkan ratio substrat dan buffer konstan.

Asam lemak terbang (*volatile fatty acids*) yang dihasilkan selama proses fermentasi *in vitro* dapat menurunkan pH. Kecernaan *in vitro* tertinggi diperoleh pada pH 6.7 dan terendah pada 6.1 (McLeod dan Minson, 1969). Untuk mempertahankan pH pada kisaran normal diperlukan buffer. Saliva rumen yang mempunyai sifat buffer diperoleh dari McDougalls' yang dibuat dengan komposisi dan sifat-sifat mirip saliva rumen. Adanya sifat buffer dari larutan McDougalls' karena mengandung fosfat dan bikarbonat. Larutan buffer-nutrien tersebut mengontrol pH dan suplai zat makanan bagi mikroorganisme selama fermentasi. Suplementasi buffer dengan N (urea atau amonia sulfat) sangat dianjurkan untuk bahan pakan yang mengandung karbohidrat tinggi. Nelson dkk. (1972) melaporkan bahwa efisiensi cairan rumen dipengaruhi oleh pakan ternak donor kecuali jika urea dan glukosa ditambahkan ke inokulum.

Ukuran sampel kadangkala mempengaruhi kecernaan *in vitro* namun variasi tersebut dapat dikontrol jika konsentrasi buffer-nutrien dan inokulum rumen dipertahankan dalam rasio yang konstan dengan jumlah substrat. Tilley dan Terry (1963) menggunakan sampel sebanyak 500mg, tetapi beberapa peneliti banyak yang menggunakan 250mg sampel.

Pengeringan dan penggilingan mempengaruhi fermentasi seperti kebanyakan pengujian laboratorium lainnya. Pengeringan dengan temperatur yang tinggi menghasilkan bahan yang tak tercerna, dan

pemanasan yang disarankan adalah pada suhu 65°C atau kurang. Penggilingan hingga 0.5 mm sangat diharapkan namun ukuran partikel 1 mm sudah memberikan hasil yang cukup baik. McLeod and Minson (1969) melaporkan bahwa kecernaan 5 jenis rumput meningkat jika ukuran partikel diturunkan dari 2 mm menjadi 0.4 mm.

Biasanya kurva laju kecernaan *in vitro* fase pertama dalam bentuk sigmoid, dengan *lag phase* hingga 12 jam. Kurva akan mendatar pada 18-24 jam dan sering membentuk garis lurus hingga 48 jam. Meski inkubasi bahan pakan pada fase pertama ini biasanya dianjurkan hingga 48 jam, namun kondisi tersebut juga sangat tergantung pada jenis sampel yang diuji. Laju degradasi awal legum lebih cepat dibandingkan rumput dan kecernaan tertinggi lebih cepat tercapai pada legum (Marten dan Barnes, 1979). Hal ini disebabkan legum mempunyai kandungan isi sel terlarut lebih tinggi dibanding rumput. Pengurangan waktu inkubasi fase kedua dari 48 menjadi 24 jam disusun untuk mendukung pelaksanaan analisis rutin. Seiring dengan pengurangan waktu inkubasi, kecernaan *in vitro* bahan kering juga menurun namun masih memberikan hasil yang cukup baik dalam mengukur hubungan kecernaan *in vitro* dan *in vivo*.

Gerakan rumen ditiru dengan menempatkan sistem fermentasi dalam penangas air bergoyang (*shaker bath water*) yang bersuhu konstan 38.5-39°C atau dengan penggoyangan manual 4 jam sekali.

Sisa sampel bahan makanan yang tidak larut setelah proses fermentatif dan hidrolisis (endapan=residu) merupakan bahan makanan yang tidak tercerna. Dengan demikian selisih antara berat awal sampel dengan berat endapan yang tidak larut merupakan kecernaan suatu sampel yang diuji.

Endapan terakhir dari proses pencernaan ini kemungkinan juga bukan hanya berasal dari sampel yang diuji tetapi juga berasal dari bahan lain seperti cairan rumen, larutan Mc Dougalls' dan sebagainya, maka pengukuran koefisien cerna perlu dikoreksi dengan menggunakan blanko. Blanko merupakan proses pengujian fermentasi inokulum tanpa sampel yang diuji. Dengan cara ini maka nilai koefisien cerna yang kita peroleh lebih mendekati sebenarnya.

Untuk mengetahui berjalannya proses percobaan *in vitro* dalam satu run, McLeod (1972) menyarankan untuk menggunakan bahan pakan yang telah diketahui koefisien cernanya secara *in vivo*. Contoh standar juga digunakan untuk menduga kecernaan *in vivo* dari bahan pakan yang telah diketahui kecernaan *in vitro*nya melalui persamaan regresi. Persamaan tersebut hanya valid bila koefisien korelasinya tinggi dan simpangan baku tidak lebih dari 2 persen. Jumlah tabung fermentor standar paling sedikit 8 untuk setiap klasifikasi pakan, dengan demikian cukup untuk membuat regresi antara kecernaan *in vitro* dan *in vivo*. Dengan intrapolasi bahan pakan atau ransum yang telah diketahui kecernaan *in vitro* maka dapat diestimasi kecernaan *in vivo* bahan pakan tersebut.

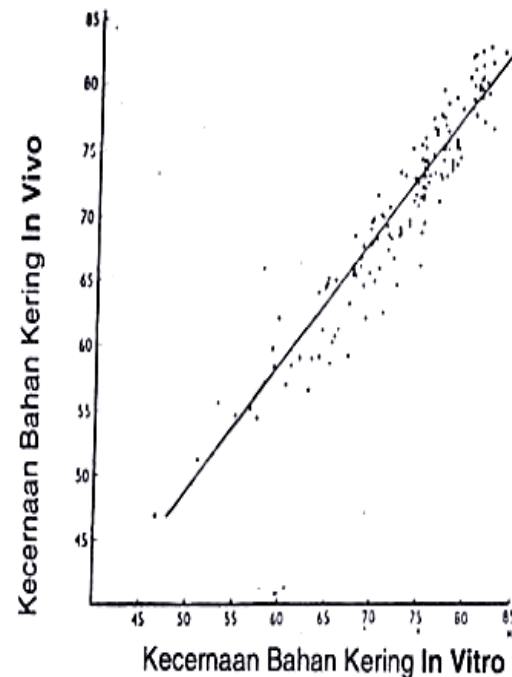
KORELASI KECERNAAN IN VITRO DAN IN VIVO

Kecernaan in vitro mempunyai korelasi yang cukup tinggi dengan kecernaan in vivo.

Menurut Tilley dan Terry, hubungan kecernaan in vitro dengan in vivo dapat dinyatakan dengan persamaan $Y = 0.99X - 1.01$ dan persamaan ini dapat diaplikasikan untuk semua species hijauan. Standar deviasi persamaan ini lebih kurang 2.31. Sementara dari data yang dihimpun Barnes (1973) ditemukan bahwa koefisien korelasi (r) pengukuran kecernaan secara in vitro dengan in vivo adalah 87 % atau lebih tinggi dan tidak pernah lebih kecil dari 71% dengan standar deviasi penduga lebih kecil dari 3. Hubungan kecernaan bahan kering in vitro dengan in vivo pada 130 sampel hijauan dan 18 cover dan lucerna terlihat pada gambar di bawa ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1963. Two stage technique for in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104-111.
- Sayre, K.D. and P.J. Van Soest. 1972. Comparison of types of fermentation vessels for an in vitro artificial rumen procedure. *J. Dairy. Sci.* 55:1496-1498.
- McLeod, M.N. and D.J. Minson. 1969. Source of variation in the in vitro digestibility of tropical grasses. *J. Br. Grassl. SOC.* 24:244-249.



- Nelson, D.B., H.D. Elzey, C. Montgomery and E.B. Morgan. 1972. Factors affecting the variability of an in vitro rumen fermentation technique for estimating forage quality. *J. Dairy. Sci.* 55:358-366.
- Marten, G.C. and R.F. Barnes. 1979. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzymes system. *Proc. of a Workshop held in Ottawa, Canada:* 61-71.

Barnes, R.F. 1973. Laboratory methods of evaluating feeding value of herbages. In: Butler, G.W. and R.W. Bailey (eds). *Chemistry and Biochemistry of Herbages*. Academic Press Inc. Ltd. London.

Soebarinoto, S. Chuzaemi dan Mashudi. 1990. *Praktikum Gizi Ruminansia*. LUW-Universitas Brawijaya. Animal Husbandry Project. Malang.