

Karakteristik kimiawi Zn-Organik dan Cu-Organik Hasil Bioproses *Saccharomyces cerevisiae* dan *Monolia sitophila* (*Chemical Characteristics of Zn-organic and Cu-organic Results of Saccharomeces cereviseae and Monolia sitophila Bioprocess*)

U Hidayat Tanuwiria, D.C. Budinuryanto, S. Darodjah dan W.S Putranto
Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Jatinangor, 40600
E-mail : uhtanuwir@yahoo.co.id

Abstrak

Penelitian bertujuan untuk mempelajari pembuatan Zn-organik dan Cu-organik hasil bioproses *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) dan *Monolia sitophila* (Ms) dilihat dari karakteristik kimiawi. Karakteristik kimiawi didasarkan pada kadar, kelarutan, fermentabilitas di rumen dan pencernaan di pascarumen *in vitro*. Penelitian dilakukan secara eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) empat perlakuan yaitu Zn-organik.Sc, Zn-organik.Ms, Cu-organik.Sc dan Cu-organik.Ms, masing-masing diulang lima kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar Zn dalam Zn-organik.Sc dan Zn-organik.Ms masing-masing $3741 \pm 93,5$ ppm dan $3726 \pm 32,1$ ppm; kadar Cu dalam Cu-organik.Sc dan Cu-organik.Ms masing-masing $1126 \pm 58,8$ ppm dan $1129 \pm 11,38$ ppm. Kelarutan Zn dan Cu pada kedua bioproses relative rendah yaitu $1,64 \pm 0,74\%$ vs $2,14 \pm 0,68\%$ dan $1,32 \pm 0,55\%$ vs $2,26 \pm 0,44\%$. Fermentabilitas semua produk tidak berbeda nyata, sedangkan pencernaan bahan kering dan bahan organik dari Cu-organik.Ms lebih rendah.

Kata kunci : Zn-organik, Cu-organik, kelarutan, fermentabilitas, pencernaan

Abstract

The research aims to study the Zn-organic and Cu-organic results of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and *Monolia sitophila* (Ms) bioprocess seen from the chemical characteristics. Chemical characteristics are based on the content and solubility, *in vitro* fermentability in the rumen and digestibility in pascarumen. The experimental arranged with Completely Randomized Design (CRD) of four treatments i.e Zn-organic.Sc, Zn-organic.Ms, Cu-organic.Sc and Cu-organic.Mn, each repeated five times. The results showed that Zn contain in Zn-organic.Sc and Zn-organic.Ms is 3741 ± 93.5 ppm and 3726 ± 32.1 ppm respectively; Cu contain in Cu-organic.Sc and Cu-organic.Ms, is 1126 ± 58.8 ppm and 1129 ± 11.38 ppm respectively. Zn and Cu solubility of all bioprocess product are relatively low at $1.64 \pm 0.74\%$ vs $2.14 \pm 0.68\%$ and $1.32 \pm 0.55\%$ vs $2.26 \pm 0.44\%$. Fermentability of all products are not significantly different, whereas the digestibility of dry matter and organic matter from the Cu-organic.Ms is lower.

Keywords: Zn-organic, Cu-organic, solubility, fermentability, digestability

Pendahuluan

Seng (Zn) sebagai komponen metaloenzim banyak terlibat dalam enzim polimerase DNA, peptidase karboksi A dan B dan fosfatase alkalis. Enzim-enzim tersebut berperan dalam proliferasi DNA, sintesis protein, proses pencernaan protein dan absorpsi asam amino, serta metabolisme energi (Larvor, 1983). Kebutuhan Zn bagi ruminansia sekitar $40-50 \text{ mg.kg}^{-1}$ (NRC, 2001) dan mikroorganisme rumen antara 130 dan 220 mg.kg^{-1} . Menurut Little (1986), Zn pada pakan ruminansia di Indonesia berkisar antara 20 dan 38 mg.kg^{-1} , dengan demikian secara alami ternak yang dipelihara di Indonesia berpotensi defisiensi Zn.

Ternak ruminansia membutuhkan juga mineral tembaga (Cu) untuk sejumlah enzim yang terlibat dalam sejumlah fungsi (Underwood, 1977). Tembaga dibutuhkan untuk sintesis hemoglobin yang normal. Peran biologis Cu diantaranya sebagai komponen dari seruloplasmin, superoksida dismutase (SOD), oksidase lisil dan oksidase sitokrom (NRC 2001). Defisiensi Cu dapat menyebabkan berkurangnya kecepatan pertumbuhan (Mills *et al.*, 1976) dan menurunnya ketahanan terhadap penyakit (Suttle dan Jones, 1986).

Mineral Zn dan Cu memiliki ketersediaan hayati yang tinggi jika tersedia dalam bentuk organik. Ketersediaan hayati Zn dalam bentuk Zn-proteinat lebih tinggi daripada ZnSO_4 , atau

ketersediaan hayati mineral dalam bentuk organik lebih tinggi daripada bentuk anorganik (Schell dan Kornegay, 1996). Demikian pula ketersediaan hayati Cu dalam bentuk Cu-proteinat lebih tinggi daripada CuSO_4 bagi anak sapi. Anak sapi yang diberi Cu proteinat menyebabkan Cu dalam plasma dan hati lebih tinggi (Kincaid *et al.*, 1986).

Teknologi proteksi nutrisi pakan adalah salahsatu bentuk manipulasi pakan di rumen dalam rangka memaksimalkan suplai nutrisi ke induk semang. Asam amino pakan dapat ditingkatkan ketersediaannya hayatnya melalui reaksi khelasi dengan mineral seng (Zn) atau tembaga (Cu) membentuk mineral organik.

Penelitian ini bertujuan mempelajari Zn-organik dan Cu-organik hasil bioproses. Zn-organik dan Cu-organik dibuat melalui proses fermentasi dengan melibatkan aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* dan jamur oncom (*Monilia sitophila*). Ragi atau jamur tersebut memiliki beberapa enzim diantaranya proteolitik dan amilolitik. Kedua enzim tersebut dimanfaatkan untuk menghidrolisis protein dan karbohidrat substrat menjadi protein dan karbohidrat sederhana. Melalui reaksi hipotesis maka mineral Zn dan Cu yang ditambahkan dalam substrat akan ikut termetabolisasi, atau berikatan dengan gugus karboksil protein atau polisakarida sederhana hasil hidrolisis enzim ragi atau jamur. Produk yang dihasilkan berupa ikatan kompleks mineral-protein yang sulit dirombak oleh mikroba rumen, sehingga menjadi penyedia protein atau mineral di pascarumen.

Metode

Kompleks Zn-organik dan Cu-organik

Prinsip pembuatan Zn-organik dan Cu-organik adalah terinkorporasinya Zn atau Cu ke dalam protein yeast *S. cerevisiae* atau jamur *Monilia sitophila*. Substrat dasar untuk pertumbuhan *M. sitophila* dan *S. cerevisiae* berupa campuran onggok dan bulu ayam hidrolisis pada rasio 19:1 (Tanuwiria, 2004). Substrat dicampur dengan larutan (NH_4NO_3 0,5%, KCl 0,05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0001% dalam 1000 ml) dan larutan ZnCl_2 0,1M serta CuCl_2 0,1M.

Substrat disterilisasi dalam autoklav pada suhu 121°C , 15 psi selama 15 menit. Diinokulasi pada suhu 39°C oleh inokulum *S. cerevisiae* atau *M. sitophila* dengan dosis 2% atau 2g dalam 100g substrat. Diinkubasi selama empat hari pada suhu kamar. Produk yang diperoleh dikeringkan pada oven 60°C dan digiling.

Pengujian Suplemen Zn-organik dan Cu-organik

Kompleks Zn-organik dan Cu-organik hasil bioproses *S. cerevisiae* dan *M. sitophila* masing-masing diukur kadar Zn dan Cu nya serta diukur kelarutannya di dalam larutan saliva buatan (buffer) McDougall (campuran 58,80g NaHCO_3 , 48g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,42g KCl, 2,82g NaCl, 0,72g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,24g CaCl_2 dalam 6 liter akuades). Masing-masing diulang sebanyak lima kali. Kadar Zn dan Cu diukur dengan AAS.

Pengukuran daya larut Zn-organik atau Cu-organik dalam larutan buffer dilakukan dengan cara melarutkan satu gram Zn-organik atau Cu-organik dalam campuran 10 ml cairan rumen dan 40 ml larutan McDougall, pada pH 6,5-6,8 dan diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 39°C . Selanjutnya disaring dengan Whatman 41, supernatant dianalisis kadar Zn atau Cu dengan AAS.

Fermentabilitas produk diukur melalui teknik *in vitro*, peubah yang diamati adalah produksi NH_3 dan VFA total. Kecernaan produk diukur melalui teknik *in vitro*, peubah yang diamati adalah kecernaan bahan kering dan bahan organik.

Teknik pengukuran fermentabilitas *in vitro* dilakukan dengan cara : satu gram sampel Zn-organik atau Cu-organik dimasukkan ke dalam tabung fermentor, kemudian ditambahkan 40 ml larutan McDougall dan 10 ml cairan rumen sapi. Kemudian dihembuskan gas CO_2 selama 30 detik untuk menciptakan suasana anaerob, selanjutnya ditutup dengan karet berventilasi yang dimasukan ke dalam air. Selanjutnya tabung diletakan dalam waterbath dan diinkubasi selama 3 jam pada suhu 39°C , setiap 30 menit dikocok. Setelah itu tutup karet dibuka dan fermentasi dihentikan dengan cara ditetesi 0,2 ml HgCl_2 jenuh. Supernatant dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Kadar NH_3 supernatant diukur dengan metode mikrodifusi Conway dan VFA total dengan metode destilasi uap.

Uji kecernaan dilakukan dengan metode Tilley dan Terry (1963). Tahapan analisis sama dengan yang dilakukan pada inkubasi fermentatif. Setelah 24 jam inkubasi, tabung fermentor dibuka dan ditetesi larutan HgCl_2 jenuh untuk membunuh mikroba. Selanjutnya ke dalam tabung tersebut ditambahkan 0,2% pepsin (aktivitas enzim 1:10.000) dalam suasana asam. Inkubasikan kembali dalam “waterbath” pada suhu 39°C dalam suasana aerob. Setelah 24 jam, isi tabung disaring dengan kertas Whatman 41. Residu dianalisis kadar bahan kering dan bahan organik.

a. Analisis NH₃ (Metode Mikrodifusi Conway)
 Satu ml supernatan diletakkan pada salahsatu sisi sekat cawan Conway yang diletakan miring ke arah sekat. Sebelumnya cawan Conway telah diberi vaselin pada kedua permukaan. Pada sisi yang lain ditempatkan satu ml larutan Na₂CO₃ jenuh, sedangkan pada bagian tengah ditempatkan satu ml asam borat berindikator, kemudian cawan Conway ditutup rapat sehingga kedap udara lalu digoyang-goyang sehingga supernatan dan Na₂CO₃ bercampur. Dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar. Amonia yang terikat dengan asam Borat dititrasi dengan H₂SO₄ 0,005 N sampai warna berubah kemerah-merahan. Produksi NH₃ dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{NH}_3 = (\text{ml titrasi} \times \text{N H}_2\text{SO}_4 \times 1000)$$

mM

Keterangan : N H₂SO₄ = Normalitas H₂SO₄

b. Analisis VFA total (Steam Destillation Method)

Lima ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung destilasi dan ditambahkan satu ml H₂SO₄ 15% kemudian segera ditutup. Sebelumnya telah disiapkan erlenmeyer yang berisi NaOH 0,5N sebanyak lima ml untuk menangkap VFA yang teruapkan. Tabung destilasi dihubungkan dengan labu berisi air mendidih dan dipanaskan terus selama proses destilasi. Proses destilasi dianggap selesai jika erlenmeyer berisi NaOH telah mencapai volume 300 ml. Selanjutnya ditambahkan indikator phenolphthalein sebanyak

dua tetes dan kemudian dititrasi dengan HCl 0,5 N sampai warna titran berubah dari merah menjadi bening. Dilakukan pula titrasi blanko terhadap lima ml NaOH. Produksi VFA total dihitung dengan rumus :

$$\text{VFA total} = (b - s) \times \text{N HCl} \times 1000/5$$

Keterangan : b = volume titrasi blanko

s = volume titran sampel

N = normalitas larutan HCl

Penelitian dilakukan secara eksperimental di laboratorium dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) empat perlakuan masing-masing diulang sebanyak lima kali. Perlakuan terdiri atas :

T1 = Zn-organik hasil bioproses *Saccharomyces cerevisiae*

T2 = Zn-organik hasil bioproses *Monolia sitophila*

T3 = Cu-organik hasil bioproses *Saccharomyces cerevisiae*

T4 = Cu-organik hasil bioproses *Monolia sitophila*

Peubah yang diamati :

Kandungan Zn atau Cu serta kelarutannya dalam larutan Buffer. Fermentabilitas di rumen dengan mengukur Produksi NH₃ dan VFA total (General Laboratory Procedure, 1966). Kecernaan di pascarumen dengan mengukur Kecernaan Bahan Kering dan Bahan Organik (Tilley dan Terry, 1969). Perbedaan diantara perlakuan diuji statistik dengan Sidik Ragam dan Uji Jarak Berganda Duncan (Steel dan Torrie, 1981)

Tabel. 1. Kadar Zn dan Kelarutan Zn dalam produk Zn-organik hasil bioproses *S cerevisiae* dan *M sitophila*

1. Kadar Zn dan Kelarutan Produk Zn-Proteinat hasil bioproses <i>S cerevisiae</i>			
Ulangan	Zn dalam produk	Zn terlarut	Kelarutan
	----- ppm -----	-----	----- % -----
1	3790	68	1,8
2	3801	99	2,6
3	3832	31	0,8
4	3625	72	2,0
5	3656	35	1,0
Rataan	3741 ± 93,5		1,64 ± 0,74
2. Kadar Zn dan kelarutan Zn Produk Zn-organik hasil bioproses <i>M sitophila</i>			
Ulangan	Zn dalam produk	Zn terlarut	Kelarutan (%)
	----- ppm -----	-----	----- % -----
1	3738	56	1,5
2	3759	120	3,2
3	3749	89	2,4
4	3697	70	1,9
5	3687	64	1,7
Rataan	3726 ± 32,1		2,14 ± 0,68

Tabel 2. Kadar Cu dan Kelarutan Cu dalam produk Cu-organik hasil bioproses *S cerevisiae* dan *M sitophila*

1. Kadar Cu dan Kelarutan Produk Cu-organik hasil bioproses <i>S cerevisiae</i>			
Ulangan	Cu dalam produk	Cu terlarut	Kelarutan (%)
	----- ppm -----	-----	----- % -----
1	1030	23	2,3
2	1164	13	1,1
3	1181	14	1,2
4	1137	11	1,0
5	1120	11	1,0
Rataan	1126 ± 58,8		1,32 ± 0,55
2. Kadar Cu dan kelarutan Cu Produk Zn-organik hasil bioproses <i>M sitophila</i>			
Ulangan	Cu dalam produk	Cu terlarut	Kelarutan
	----- ppm -----	-----	----- % -----
1	1144	27	2,3
2	1117	17	1,5
3	1127	28	2,5
4	1120	29	2,6
5	1137	27	2,4
	1129 ± 11,38		2,26 ± 0,44

Hasil dan Pembahasan

Kadar dan Kelarutan Zn-organik dan Cu-organik

Bioproses *Saccharomyces cerevisiae* dan *Monolia sitophila* pada pembuatan mineral-organik menghasilkan produk yang relatif sama dilihat dari kandungan Zn dan Cu. Kadar Zn dan kelarutan Zn dalam produk hasil bioproses *S cerevisiae* dan *M sitophila* disajikan pada Tabel 1. Kadar Cu dan kelarutan Cu dalam produk hasil bioproses *S cerevisiae* dan *M sitophila* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. menunjukkan bahwa kadar Zn dalam Zn-organik hasil bioproses *S cerevisiae* relatif lebih tinggi daripada hasil bioproses *M sitophila* (3741 vs 3726 ppm), sedangkan kelarutan dalam larutan buffer lebih rendah (1,64 vs 2,14 persen). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ketersediaan Zn dalam Zn-organik hasil bioproses *S cerevisiae* di pascarumen lebih baik. Daya larut yang rendah pada larutan buffer menunjukkan bahwa Zn dalam Zn-organik hasil bioproses *S cerevisiae* lebih mantap dalam mengikat mineral, sehingga sedikit kemungkinan dapat dirombak oleh mikroba rumen.

Tabel 2. menunjukkan bahwa kadar Cu dalam Cu-organik hasil bioproses *S cerevisiae* relatif sama dengan hasil bioproses *M sitophila* (1126 vs 1129 ppm), sedangkan kelarutan dalam larutan buffer lebih rendah (1,32 vs 2,26 persen). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ketersediaan Cu

dalam Cu-organik hasil bioproses *S cerevisiae* di pascarumen lebih baik. Daya larut yang rendah pada larutan buffer menunjukkan bahwa Cu dalam Cu-organik hasil bioproses *S cerevisiae* lebih mantap dalam mengikat mineral, sehingga sedikit kemungkinan dapat didegradasi oleh mikroba rumen.

Pemanfaatan yeast *S cerevisiae* pada bioproses pembuatan mineral organik memiliki beberapa keuntungan, di samping meningkatkan nilai manfaat mineral organik, yeast tersebut dapat berperan sebagai probiotik dalam sistem pencernaan ternak ruminansia. Hasil beberapa peneliti terdahulu menunjukkan bahwa pemberian *S cerevisiae* sebanyak 0,1% dalam ransum meningkatkan populasi bakteri sebesar 51-61% dan bakteri selulolitik sebesar 16-50% dari populasi awal (Dawson, 1993, Kumar *et al.*, 1994, Yoon dan Stern, 1996).

Fermentabilitas dan Kecernaan *in vitro*

Nilai fermentabilitas pakan di rumen menunjukkan mudah tidaknya pakan tersebut didegradasi oleh mikroba rumen. Nilai fermentabilitas dicerminkan oleh produksi NH_3 dan VFA total yang dihasilkan. Nilai kecernaan pakan di pascarumen menunjukkan mudah tidaknya pakan tersebut dicerna oleh alat pencernaan pascarumen. Fermentabilitas dan kecernaan mineral organik hasil bioproses disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Fermentabilitas dan Kecernaan Kompleks Zn-organik dan Cu-organik *in vitro*

	Perlakuan			
	Zn-org <i>S c</i>	Zn-org. <i>M s</i>	Cu-org. <i>S c</i>	Cu-org. <i>M s</i>
NH ₃ (mM.g.BK ⁻¹)	3,24 ^a	2,94 ^a	3,07 ^a	3,52 ^a
VFA total (mM.g BK ⁻¹)	136 ^a	120 ^a	124 ^a	122 ^a
KcBK (%)	68,1 ^a	66,3 ^{ab}	70,2 ^a	62,6 ^b
KcBO (%)	68,6 ^a	67,0 ^{ab}	70,8 ^a	63,1 ^b

Keterangan : Superskrip yang sama dalam satu baris menunjukkan berbeda tidak nyata (P<0,05)

Tabel 3 menunjukkan bahwa produksi NH₃ hasil degradasi mineral organik oleh mikroba rumen berkisar 2,94-3,52 mM, satu sama lainnya tidak berbeda nyata (P<0,05). Secara umum, produksi NH₃ hasil degradasi Zn-organik dan cu-organik relative rendah di bawah kebutuhan normal untuk pertumbuhan mikroba rumen. Hal tersebut didasarkan pada pernyataan Sutardi (1979) bahwa konsentrasi ammonia optimum di dalam rumen untuk menunjang sintesis protein mikroba adalah antara 4 dan 12 mM. Dipandang dari kualitas protein, Zn-organik dan Cu-organik termasuk pada suplemen bersifat bypass atau sulit didegradasi di rumen (UDP = *undigestible protein*). Hal ini mmberikan petunjuk bahwa bioproses menggunakan *S cerevisiae* atau *M sitophila* menghasilkan mineral organik yang proteinnnya sulit didegradasi oleh mikroba rumen, atau dengan kata lain protein hasil bioproses berikatan kuat dengan mineral Zn atau Cu, sehingga mikroba rumen menjadi tidak mampu mendegradasinya menjadi NH₃. NH₃ di rumen berasal dari degradasi protein, peptide, bahan N terlarut, urea, asam urat, nitrat dan asam nukleat (Preston dan Leng, 1987).

Produksi VFA total berasal dari degradasi bahan organik pakan oleh mikroba rumen. Pada Tabel 3, produksi VFA total dari degradasi Zn-organik atau Cu-organik hasil bioproses *S cerevisiae* atau *M sitophila* satu sama lainnya tidak berbeda nyata (P<0,05). Secara umum produksi VFA totalnya berkisar 120-136 mM, sedangkan VFA yang baik untuk pertumbuhan optimum mikroba rumen adalah 80–160 mM (Sutardi, 1979). Hal ini memberikan indikasi bahwa kecuali protein, bahan organik lainnya yang terdapat dalam Zn-organik maupun Cu-organik mudah didegradasi oleh mikroba rumen menjadi VFA total. Berdasarkan hal tersebut memberikan petunjuk bahwa proses pembentukan mineral organik melalui bioproses lebih mengarah pada pembentukan chelate Zn-protein atau Cu-protein.

Nilai kecernaan bahan kering dan bahan organik dapat dijadikan indikator tingkat kemudahan pakan didegradasi di rumen dan

dicerna oleh enzim pencernaan di pascarumen. Rataan nilai kecernaan bahan kering mineral organik hasil bioproses *S cerevisiae* lebih tinggi daripada hasil bioporses *M sitophila*. Kecernaan bahan kering dan bahan organik Cu-organik hasil bioproses *M sitophila* lebih rendah (P<0,05) daripada produk lainnya. Hal ini memberikan indikasi bahwa bioproses yang tepat untuk menghasilkan mineral organik adalah dengan menggunakan *S cerevisiae*

Kesimpulan

Kadar Zn dan Cu dalam Zn-organik dan Cu-organik tidak dipengaruhi oleh jenis mikroba yang digunakan pada bioproses. Kelarutan Zn atau Cu dari produk Zn-organik atau Cu-organik dalam larutan buffer relative rendah. Fermentabilitas semua produk tidak berbeda nyata, sedangkan kecernaan bahan kering dan bahan organik dari Cu-organik hasil bioproses *M sitophila* lebih rendah.

Bioproses pada pembuatan mineral organik selanjutnya sebaiknya menggunakan *S cerevisiae*

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini merupakan sebagian data dari penelitian HBXIV/1 tahun 2006 yang didanai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, DEPDIKNAS no. 013/SP3/PP/DP2M/II/2006, atas kepercayaan dan bantuan penulis haturkan terima kasih kepada Ditjen DIKTI.

Daftar Pustaka

- Dawson, K.A. 1993. Current and future role yeast culture in animal production: A review of research over the last seven years. In : TP. Lyons Ed. Biotechnology in the feed industry. Altech Technical Publications, Nicholasville, K.Y. Vol.IX:269-291
- General Laboratory Procedure. 1966. Department of Dairy Science, University of Wisconsin
- Kincaid, R.L., R.M. Blauwikel, and J.D. Cronrath. 1986. Supplementation of copper sulfate or copper proteinate for growing calves fed forages containing molybdenum. *J. Dairy. Sci.* 69:160.
- Kumar, U., V.K. Sareen and S.Singh. 1994. Effect of *Sacharromyces cerevisiae* yeast culture

- supplement on ruminal metabolism in Buffalo calves given a high concentrate diet. *J. Anim. Prod.* 59:209-215
- Larvor, P. 1983. The Pools as Cellular Nutrients : Mineral. In : *Dynamic Biochemistry of Animal Production*. Ed. P.M. Riis, Elsevier, Amsterdam.
- Little, D.A. 1986. The Mineral Content of Ruminant Feeds and Potential for Mineral Supplementation in South-East Asia with Particular Reference to Indonesia. Di dalam : R.M. Dixon, editor. *Ruminant Feeding Systems Utilizing Fibrous Agricultural Residues* 1985. Canberra : IDP
- Mills, C.F., A. Dalgarno, and G. Wenham. 1976. Biochemical and pathological changes in tissue of Freisian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Br. Nutr.* 35:309.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. Seventh revised Ed. National Academy Press, Washington D.C.
- Preston, T.R, and R.A. Leng. 1987. Matching Ruminant Production System with Available Resources in The Tropic and Sub-Tropic. Penambul Book Armidale, New South Wales Australia. P.21-28
- Schell, T.C., and E.T. Kornegay. 1996. Zinc concentration in tissue and performance of weanling pigs fed pharmacological levels of zinc from ZnO, Zn-methionine, Zn-lysine, or ZnSO₄. *J. Anim. Sci.* 74(7) : 1584-1593.
- Steel, R.G. and J.H. Torrie. 1981. Principles and Procedure of Statistics. 2nd Ed McGraw-Hill International Book Co., Singapore
- Sutardi, T. 1979. Ketahanan protein bahan makanan terhadap degradasi oleh mikroba rumen dan manfaatnya bagi peningkatan produktivitas ternak. Di dalam : *Prosiding Seminar Penelitian dan Penunjang Peternakan*. Bogor : LPP IPB.
- Suttle, N.F., and D.G. Jones. 1986. Copper and disease resistance in sheep : A rare natural confirmation of interaction between a specific nutrient and infection. *Proc. Nutr. Soc.* 45:317
- Tanuwiria, U.H. 2004. Suplemen Seng dan Tembaga Organik serta Kompleks Kalsium Minyak Ikan dalam Ransum berbasis Limbah Industriagro untuk Pemacu Pertumbuhan dan Produksi Susu pada Sapi Perah. (Desertasi). Institut Pertanian Bogor, Sekolah Pascasarjana, Program Studi Ilmu Ternak.
- Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1967. A two stage technique for in the in vitro digestion of forage crops. *J. Grassland Soc.* 18 : 104
- Underwood, E..J. 1977. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 4th Ed. New York : Academic Press.
- Yoon, I.K and M.D. Stern. 1996. Effect of *Sacharromeces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* culture on ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 79:411-417