

STUDI META ANALISIS PENGARUH SUPLEMENTASI NITRAT (NO_3^-) TERHADAP FERMENTASI RUMEN DAN KECERNAAN NUTRIEN *IN VITRO*

*The Effect of Nitrat (NO_3^-) Supplementation on Rumen Fermentation and Nutrient
Digestibility in vitro: A Meta-Analysis Study*

Siti Hadnita Rizkilia Asti*, Ujang Hidayat Tanuwiria, Yulianri Rizki Yanza

Program Studi Ilmu Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran.

Jln. Ir. Soekarno KM. 21 Jatinangor, Kab. Sumedang, Jawa Barat

*Corresponding Author: siti20029@mail.unpad.ac.id

ABSTRACT

The demand of protein feed sources for ruminants is increasing along with the increasing productivity of livestock. This condition is a challenge for ruminant farmers due to the limited availability of protein source feed at affordable prices. One solution that can be done is to provide alternative protein sources obtained from Non-Protein Nitrogen (NPN). Nitrate (NO_3^-) is one of the NPN that has the potential to provide an important source of ammonia for microbial protein synthesis in the rumen. However, the effect of nitrate concentration on rumen fermentation remains inconclusive. This study aims to determine the effect of nitrate on rumen fermentation and nutrient digestibility in vitro with a meta-analysis approach. A total of 38 publications covering 99 in vitro studies were included in this study into a database and statistically analyzed using a mixed model, where different experiments were considered as random effects and nitrate - related factors were considered as fixed effects. Results showed that nitrate supplementation significantly ($P < 0.05$) increased NH_3 - N, decreased crude protein digestibility (CPD) and TVFA/gram DM, and tended to significantly ($P = 0.09$) decrease dry matter digestibility (DMD). The conclusion of this study is that the nitrate supplementation in ruminants in vitro can modulate rumen fermentation and nutrient digestibility.

Keywords: Rumen fermentation characteristics, Nutrient digestibility, Nitrate, Methane gas production, Total gas production-

ABSTRAK

Kebutuhan akan pakan sumber protein bagi ternak ruminansia semakin meningkat seiring dengan meningkatnya produktivitas ternak. Kondisi tersebut menjadi suatu tantangan bagi peternak ruminansia mengingat terbatasnya ketersediaan pakan sumber protein dengan harga yang terjangkau. Salah satu solusi yang dapat dilakukan adalah dengan menyediakan pakan sumber protein alternatif yang didapatkan dari Nitrogen Non-Protein (NPN). Nitrat (NO_3^-) merupakan salah satu NPN yang berpotensi untuk menyediakan sumber amonia yang penting bagi sintesis protein mikroba di dalam rumen. Akan tetapi, pengaruh konsentrasi nitrat terhadap fermentasi rumen masih belum dapat disimpulkan secara pasti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh nitrat terhadap fermentasi rumen dan pencernaan nutrisi *in vitro* dengan pendekatan meta analisis. Sebanyak 38 publikasi yang mencakup 99 studi *in vitro* dimasukkan dalam penelitian ini menjadi suatu *database* dan dianalisis secara statistik dengan menggunakan model campuran, di mana percobaan yang berbeda dianggap sebagai efek acak dan faktor terkait nitrat dianggap sebagai efek tetap. Hasil menunjukkan bahwa suplementasi nitrat secara signifikan ($P < 0,05$) meningkatkan NH_3 -N, menurunkan pencernaan protein kasar (KcPK) dan TVFA/gram BK, serta cenderung berpengaruh signifikan ($P = 0,09$) menurunkan pencernaan bahan kering (KcBK). Kesimpulan dari penelitian ini adalah suplementasi nitrat pada ternak ruminansia *in vitro* dapat memodulasi fermentasi rumen dan pencernaan nutrisi.

Kata kunci: Fermentasi rumen, Kecernaan nutrisi, Nitrat, Produksi gas metan, Produksi gas total

PENDAHULUAN

Sektor peternakan berperan dalam mendukung kebutuhan pangan global dan menjadi bagian penting dalam perekonomian banyak negara di seluruh dunia saat ini. Meskipun demikian, nyatanya kini peternak mengalami kesulitan untuk mendapatkan sumber protein pakan yang cukup memenuhi kebutuhan ternak dengan harga yang terjangkau. Kondisi ini menjadi suatu tantangan bagi para peternak dalam mengelola biaya pemeliharaan ternak seiring dengan meningkatnya produktivitas ternak yang membutuhkan lebih banyak protein. Selain itu, pakan hijauan dan konsentrat terkadang memiliki kandungan nutrisi yang rendah dan tidak tetap sehingga kebutuhan nutrisi ternak ruminansia sering kali kurang tercukupi (Tadele dan Amha, 2015).

Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk menyeimbangkan kebutuhan akan pakan berkualitas dengan kemampuan finansial peternak agar peternak tidak terbebani oleh biaya pemeliharaan ternak mereka. Salah satu langkah yang dapat diambil adalah dengan mencari alternatif sumber protein yang lebih terjangkau secara ekonomis. Pakan sumber protein memiliki kandungan protein kasar minimal 20% yang terdiri dari protein murni dan Nitrogen Non-Protein (NPN). Senyawa NPN sering kali ditambahkan ke dalam pakan ternak ruminansia karena mengandung sumber nitrogen (N) bagi mikroba rumen. Hal yang mendasari penentuan nilai nutrisi senyawa NPN adalah pemanfaatan N oleh mikroba rumen dimulai dengan memecah senyawa NPN menjadi amonia yang kemudian amonia diikat ke rantai karbon untuk lebih lanjut digunakan dalam sintesis asam amino. Dengan mekanisme tersebut, sekitar 30% protein pakan dapat digantikan oleh NPN komersial untuk efisiensi sintesis protein mikroba dengan harga yang lebih terjangkau dibandingkan sumber N lainnya (Zurak *et al.*, 2023).

Maka dari itu, NPN dapat menjadi alternatif sumber protein yang lebih terjangkau secara ekonomis untuk memenuhi kebutuhan protein ternak ruminansia.

Nitrat (NO_3^-) merupakan salah satu senyawa NPN yang dapat berfungsi sebagai pengganti urea dalam pakan rendah protein untuk menyediakan sumber amonia rumen bagi sintesis protein mikroba dalam rumen, serta dapat berfungsi sebagai penampung hidrogen yang dapat mengurangi produksi metana enterik (McAllister *et al.*, 1996; Cottle *et al.*, 2011). Reduksi nitrat terjadi melalui tiga mekanisme berbeda dalam sistem anaerobik, yaitu reduksi nitrat disimilasi menjadi gas nitrogen (denitrifikasi), reduksi nitrat disimilasi menjadi amonia, dan reduksi nitrat asimilasi menjadi amonia (reduksi melalui pernafasan) (Latham *et al.*, 2016). Reduksi nitrat disimilasi menjadi amonia merupakan jalur dominan metabolisme nitrat dalam rumen (Takahashi, 2011; van Zijderveld *et al.*, 2011; Choudhury *et al.*, 2022). Mekanisme pembentukannya, yaitu nitrat direduksi menjadi nitrit ($\text{NO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$) dan kemudian direduksi lebih lanjut menjadi amonium ($\text{NO}_2^- + 3\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$) (Olijhoek *et al.*, 2016). Amonium mengalami proses deaminasi menjadi amonia ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$). Amonia yang dihasilkan dari hasil reduksi nitrat tersebut dimanfaatkan sebagai sumber N oleh mikroba rumen untuk sintesis protein mikroba dalam rumen sehingga diketahui bahwa nitrat menyediakan N untuk mendukung fermentasi rumen (Feng *et al.*, 2020).

Berdasarkan hasil penelitian *in vitro* yang telah dilakukan sebelumnya ditemukan bahwa suplementasi nitrat pada ternak ruminansia *in vitro* dapat menghasilkan peningkatan konsentrasi NH_3 dalam cairan fermentasi (Božić *et al.*, 2009; Patra dan Yu, 2015a; Nguyen *et al.*, 2015). Pemberian nitrat pada pakan menurunkan TVFA/gram dari 112 mM/g menjadi 107,12 mM/g setelah

penambahan 16 g/kg BK nitrat dalam pakan (Guyader *et al.*, 2016). Kemudian penurunan pencernaan bahan kering (KcBK) dan pencernaan protein kasar (KcPK) pun ditemukan setelah penambahan 1,2% kalsium amonium nitrat dalam pakan (Capelari *et al.*, 2018). Namun, berdasarkan beberapa penelitian tersebut menunjukkan pengaruh yang bervariasi bergantung pada sumber dan tingkat penggunaannya di dalam pakan, sehingga masih belum dapat menghasilkan kesimpulan yang jelas mengenai pengaruh suplementasi nitrat terhadap fermentasi rumen dan pencernaan nutrisi dalam rumen. Maka dari itu, penelitian ini dilakukan untuk lebih memperjelas pengaruh suplementasi nitrat terhadap fermentasi rumen dan pencernaan nutrisi dalam rumen *in vitro* dari berbagai studi yang telah dilakukan dengan pendekatan meta analisis yang *robust*.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Juni – Juli 2024 di Laboratorium Nutrisi dan Kimia Makanan Ternak, Departemen Nutrisi Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Kecamatan Jatinangor, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat.

Materi

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa *database* dari beberapa artikel jurnal yang telah diterbitkan sebelumnya di Scopus yang berkaitan dengan pengaruh suplementasi nitrat terhadap fermentasi rumen dan pencernaan nutrisi yang dilakukan dengan metode *in vitro*. Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: (i) *Hardware*, yaitu laptop untuk mencari dan mengolah data penelitian; (ii) *Software*, yaitu Microsoft Excel untuk memasukkan data hasil penelitian dari beberapa artikel jurnal yang telah didapatkan, SAS 9.4 untuk mengolah data, serta Webplot untuk membaca data grafik.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengamati fermentasi rumen dan pencernaan nutrisi yang dianalisis menggunakan metode meta analisis. Pendekatan yang digunakan dalam metode meta analisis mengikuti pedoman *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) atau tinjauan sistematis dan meta analisis (Liberati *et al.*, 2009). Pedoman PRISMA disajikan dalam Gambar 1.

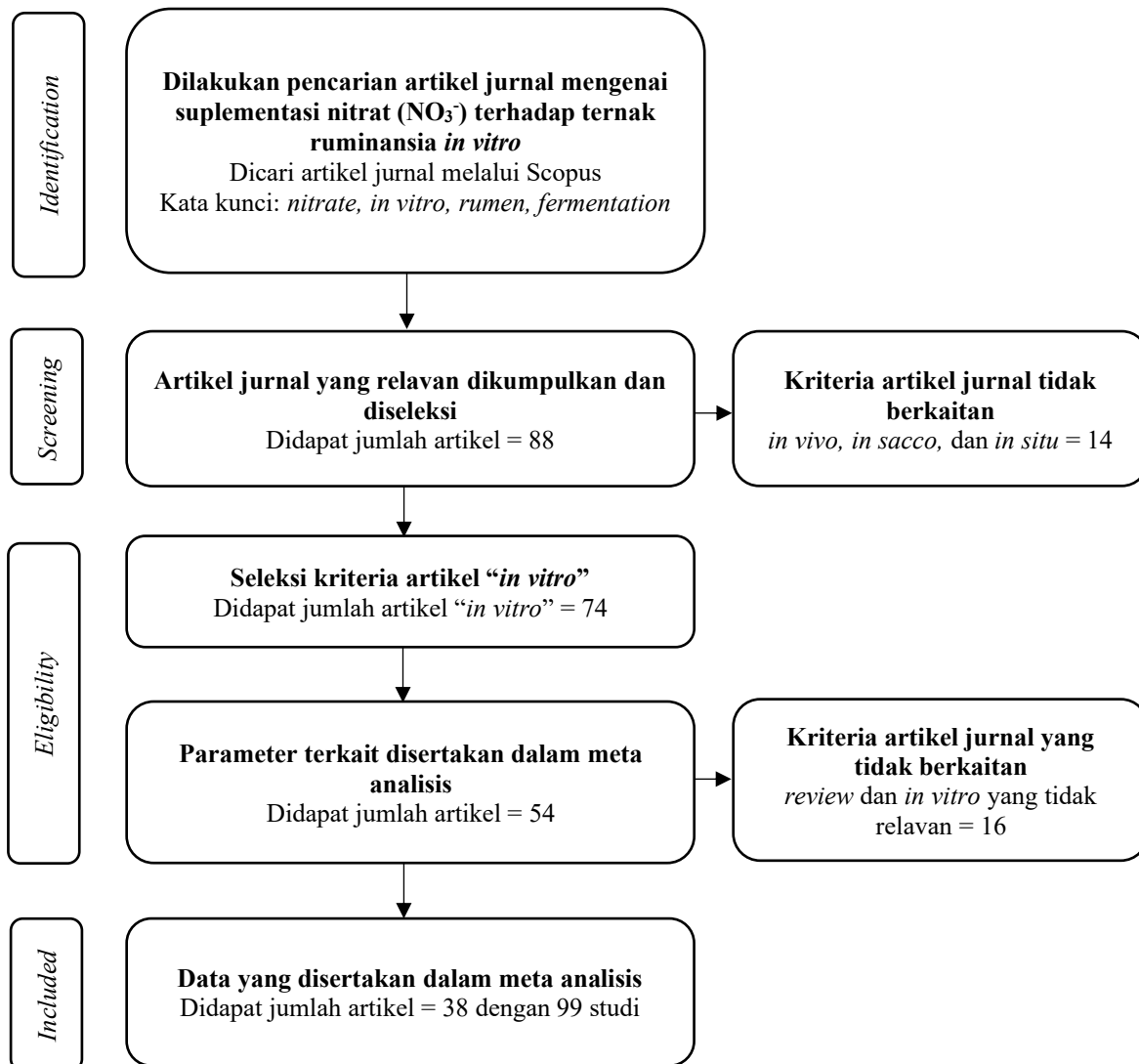
Dalam penelitian ini, diperoleh data hasil penelitian dari berbagai literatur menggunakan mesin pencarian koleksi jurnal internasional Scopus. Proses pengumpulan artikel jurnal dilakukan dalam empat langkah utama, yaitu *identification*, *screening*, *eligibility*, dan *included*. Data hasil penelitian terdiri dari fermentasi rumen dan pencernaan nutrisi yang dipengaruhi oleh suplementasi nitrat. Kata kunci yang digunakan adalah "nitrate", "*in vitro*", "*rumen*", dan "*fermentation*".

Tabel 1. Data yang dimasukkan dalam meta analisis suplementasi nitrat (NO_3^-) pada ternak ruminansia *in vitro*

No.	Penulis	Tahun	Studi	Donor	Metode	Tipe Nitrat	Level nitrate (g/kg BK)
1	Bryant, A. M.	1965	1 - 13	Sapi	BC	KNO_3	0 - 221,34
2	Sar <i>et al.</i>	2005	14 - 15	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 110,97
3	Božić <i>et al.</i>	2009	16	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 3,65
4	Guo <i>et al.</i>	2009	17 - 18	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 91,92
5	Lin <i>et al.</i>	2011	19 - 22	Sapi	BC	NaNO_3	32,83 - 91,92
6	Sakthivel <i>et al.</i>	2012	23 - 26	Kerbau	BC	NaNO_3	0 - 93,01
7	Zhou <i>et al.</i>	2012	27	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 148,81
8	Lin <i>et al.</i>	2013	28 - 36	Sapi	BC	NaNO_3	91,92
9	Lund <i>et al.</i>	2014	37	Sapi	BC	$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0 - 2,30
10	Mamvura <i>et al.</i>	2014	38	Sapi	BC	NO_3	0 - 130,21
11	Patra dan Yu	2015a	39 - 40	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 31,00
12	Patra dan Yu	2015b	41 - 42	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 31,00
13	Nguyen <i>et al.</i>	2015	43 - 44	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 14,59
14	Wang <i>et al.</i>	2016	45	Kambing	BC	NaNO_3	0 - 24,80
15	Guyader <i>et al.</i>	2016	46 - 47	Sapi	BC	NH_4NO_3	0 - 37,20
16	Mbiriri <i>et al.</i>	2017	48 - 55	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 140,13
17	Sun <i>et al.</i>	2017	56	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 22,85
18	Capelari dan Powers	2017	57 - 62	Sapi	BC	$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0 - 2,87
19	Guyader <i>et al.</i>	2017	63 - 64	Sapi	RTC	$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3$	0 - 14,74
20	Adejoro dan Hassen	2017	65 - 66	Kambing	BC	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0 - 30,91
21	Correa <i>et al.</i>	2017	67	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 49,60
22	Lee <i>et al.</i>	2017	68	Sapi	BC	$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0 - 20,66
23	Capelari <i>et al.</i>	2018	69 - 72	Sapi	RTC	$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0 - 2,87
24	Yang <i>et al.</i>	2019	73 - 76	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 364,76
25	Wu <i>et al.</i>	2019	77	Sapi	BC	NaNO_3	0 - 31,00
26	Chagas <i>et al.</i>	2019	78	Sapi	BC	NO_3	0 - 21,00
27	Natel <i>et al.</i>	2019	79 - 80	Domba	BC	$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0 - 5,16
28	Hassan <i>et al.</i>	2021	81	Kerbau	BC	NaNO_3	0 - 87,54

No.	Penulis	Tahun	Studi	Donor	Metode	Tipe Nitrat	Level nitrate (g/kg BK)
29	Henry <i>et al.</i>	2021	82	Sapi	BC	5Ca(NO ₃) ₂ .NH ₄ NO ₃ .10H ₂ O	0 - 2,75
30	Mejia-Turcios <i>et al.</i>	2021	83 - 84	Sapi	BC	5Ca(NO ₃) ₂ .NH ₄ NO ₃ .10H ₂ O	0 - 2,55
31	Sharifi <i>et al.</i>	2022	85 - 88	Sapi	BC	5Ca(NO ₃) ₂ .NH ₄ NO ₃ .10H ₂ O	0 - 4,02
32	Natel <i>et al.</i>	2022	89	Domba	BC	5Ca(NO ₃) ₂ .NH ₄ NO ₃ .10H ₂ O	0 - 3,44
33	Thao <i>et al.</i>	2022	90 - 91	Sapi	BC	KNO ₃	0 - 42,93
34	Guo <i>et al.</i>	2022a	92	Kerbau	BC	NaNO ₃	0 - 175,08
35	Guo <i>et al.</i>	2022b	93	Kerbau	BC	NaNO ₃	0 - 87,54
36	Braidot <i>et al.</i>	2023	94 - 97	Sapi	BC	NaNO ₃	0 - 99,04
37	Vadroňová <i>et al.</i>	2023	98	Sapi	BC	NaNO ₃	0 - 22,63
38	Joch <i>et al.</i>	2023	99	Sapi	RTC	NaNO ₃	0 - 11,32

Keterangan: NO₃ = nitrat bebas; NaNO₃ = natrium nitrat; KNO₃ = kalium nitrat; Ca(NO₃)₂, kalsium nitrat = 5Ca(NO₃)₂. NH₄NO₃, kalsium amonium nitrat; 5Ca(NO₃)₂.NH₄NO₃.10H₂O = kalsium amonium nitrat dehidrat; NH₄NO₃ = amonium nitrat; BC = *batch culture*; RTC = *rusitec*



Gambar 1. Diagram prisma

Analisis Statistik

Semua parameter dianalisis menggunakan metodologi model campuran dalam meta analisis ini. Perangkat lunak SAS 9.4 digunakan untuk menjalankan model PROC MIXED. Tingkat nitrat diperlakukan sebagai efek tetap, sedangkan studi diperlakukan sebagai efek acak. Baik variabel kontinu, maupun diskret dikenai pemodelan statistik (St-Pierre, 2001; Jayanegara *et al.*, 2014; Yanza *et al.*, 2021). Tingkat nitrat dikategorikan sebagai variabel prediktor kontinu. Model statistik yang digunakan adalah :

$$Y_{ij} = B_0 + B_1X_{ij} + B_2X_{ij}^2 + s_i + b_iX_{ij} + e_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = variabel dependen

B_0 = *intercept* keseluruhan di semua studi (efek tetap)

B_1 = koefisien regresi linier Y pada X (efek tetap)

B_2 = koefisien regresi kuadratik Y pada X (efek tetap)

X_{ij} = nilai variabel prediktor kontinu (tingkat nitrat)

s_i = nilai efek acak studi i

b_i = efek acak studi pada koefisien regresi Y pada X dalam studi i

e_{ij} = *residual error*

Pernyataan CLASS dibuat menggunakan tingkat nitrat dan variabel studi, sementara pernyataan RANDOM dibuat berdasarkan berbagai studi (Yanza *et al.*, 2021). Model - model ini dilakukan dengan memberikan bobot pada jumlah replikat dalam eksperimen. Model dianggap signifikan pada $P \leq 0,05$ dan cenderung signifikan pada $0,05 < P \leq 0,10$. Ketika model regresi kuadratik masing-masing tidak signifikan pada $P \leq 0,05$, model regresi linear diterapkan (Jayanegara *et al.*, 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Deskriptif Pengaruh Suplementasi Nitrat (NO_3^-) terhadap Fermentasi Rumen dan Kecernaan Nutrien

Analisis deskriptif dilakukan untuk mengetahui rata-rata nilai parameter serta nilai minimum dan maksimum parameter yang diamati. Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa secara keseluruhan, rentang nilai parameter yang diamati berada dalam kisaran nilai yang diharapkan. Pada parameter fermentasi rumen, produksi $\text{NH}_3\text{-N}$ memiliki nilai rata-rata 17,31 mg/dL dan *Total Volatile Fatty Acid* per gram Bahan Kering (TVFA/gram BK) nilai rata-ratanya adalah 177,16 mM/g. Sedangkan untuk kecernaan nutrien dihasilkan KcBK dengan nilai rata-rata 65,76% dan KcPK dengan nilai 86,10%.

Analisis Meta Regresi Pengaruh Suplementasi Nitrat (NO_3^-) terhadap Fermentasi Rumen dan Kecernaan Nutrien

Analisis meta regresi digunakan untuk mengevaluasi pengaruh suplementasi nitrat (NO_3^-) terhadap parameter fermentasi rumen dan kecernaan nutrien. Hasil analisis yang tertera dalam Tabel 3 menunjukkan pengaruh yang berbeda pada berbagai parameter yang diamati.

Hasil analisis meta regresi menunjukkan bahwa suplementasi nitrat pada ternak ruminansia *in vitro* memberikan pengaruh yang bervariasi pada parameter fermentasi rumen, yaitu secara linear berpengaruh signifikan ($P \leq 0,05$) meningkatkan $\text{NH}_3\text{-N}$ dan menurunkan TVFA/gram BK.

Peningkatan $\text{NH}_3\text{-N}$ terjadi karena suplementasi nitrat mampu mendorong pertumbuhan bakteri pereduksi nitrat yang dapat mengubah pola pemanfaatan hidrogen. Dalam hal ini, bakteri pereduksi nitrat bersaing dengan metanogen dalam pemanfaatan hidrogen untuk memproduksi produk yang lebih menguntungkan yaitu amonia yang dihasilkan melalui mekanisme reduksi nitrat disimilasi (Latham *et al.*, 2016). Nitrat dalam rumen menyebabkan hidrogen lebih banyak digunakan dalam proses reduksi nitrat daripada CO_2 , sehingga mengurangi produksi metana dan meningkatkan produksi NH_3 (Guo *et al.*, 2022a). Nitrat yang dikonsumsi oleh ternak ruminansia akan mengalami proses reduksi berurutan oleh mikroba rumen menjadi nitrit dan kemudian direduksi lebih lanjut menjadi amonium (Olijhoek *et al.*, 2016). Amonium mengalami proses deaminasi menjadi amonia. Amonia tersebut digunakan oleh mikroba sebagai sumber nitrogen (N) untuk membentuk asam amino dan protein mikrobial baru (Rohma *et al.*, 2021). Oleh karena itu nitrat berperan sebagai Nitrogen Non-Protein (NPN) di dalam rumen.

Peningkatan $\text{NH}_3\text{-N}$ tersebut mendukung aktivitas sintesis protein mikroba di dalam rumen sehingga menghasilkan lebih banyak protein mikrobial yang diserap di usus halus ruminansia sebagai sumber asam amino bagi hewan inang (Putri *et al.*, 2021). Dengan demikian, nitrat mampu menyediakan alternatif sumber asam amino bagi ternak ruminansia. Hasil penelitian Hassan *et al.* (2021)

Tabel 2. Hasil analisis deskriptif dari kumpulan data yang digunakan dalam meta analisis suplementasi nitrat (NO_3^-) pada ternak ruminansia *in vitro*

Parameter	n	Min	Max	Mean	SEM
Karakteristik Fermentasi Rumen					
NH ₃ -N (mg/dL)	248	0.34	66.95	17.31	68.34
TVFA/gram BK (mM/g)	276	0.88	911.00	177.16	20.88
Kecernaan Nutrien					
KcBK (%)	105	25.00	85.60	65.76	31.48
KcPK (%)	16	69.50	97.91	86.10	5.15

Keterangan: NH₃-N = amonia; TVFA/gram BK = *total volatile fatty acid* per gram bahan kering; KcBK = kecernaan bahan kering; KcPK = kecernaan protein kasar; n = jumlah data; Min = hasil minimum, Max = hasil maksimum; Mean = rata-rata; SEM = *standard error of means*.

Tabel 3. Hasil analisis meta regresi pengaruh suplementasi nitrat (NO_3^-) pada ternak ruminansia *in vitro* terhadap fermentasi rumen dan kecernaan nutrien

Parameter	n	Rs	Int	SE Intercept	Slope	SE Slope	P value	RMSE	AIC
Karakteristik Fermentasi Rumen									
NH ₃ -N (mg/dL)	248	L	16,10	1,57	0,01	0,01	0,03	2,36	1532,6
TVFA/gram BK (mM/g)	276	L	184,34	19,11	-0,13	0,03	<0,01	19,03	2950,2
Kecernaan Nutrien									
KcBK (%)	105	L	65,62	2,02	-0,05	0,03	0,09	4,69	733,3
KcPK (%)	16	L	85,63	3,76	-0,24	0,10	0,05	1,21	93,1

Keterangan: NH₃-N = amonia; TVFA/gram BK = *total volatile fatty acid* per gram bahan kering; KcBK = kecernaan bahan kering; KcPK = kecernaan protein kasar; n = jumlah data; Rs = respons statistik, L = linear; Int = *intercept*; SE = *standard of errors*; RMSE = *root mean square of errors*; AIC = *akaike information criterion*

mengungkapkan bahwa suplementasi nitrat baik sendiri, maupun dalam kombinasi dengan metionin rendah (0,28%), secara signifikan meningkatkan konsentrasi asam amino esensial dan non-esensial, termasuk iso-leusin, histidin, lisin, leusin, metionin, fenilalanin, triptofan, treonin, dan valin.

Kemudian, suplementasi nitrat (NO_3^-) pada ternak ruminansia *in vitro* mempengaruhi penurunan konsentrasi TVFA/gram BK. Penelitian (Guyader *et al.*, 2016) menunjukkan penurunan TVFA/gram BK dari 112 mM/g menjadi 107,12 mM/g setelah penambahan 16 g/kg BK nitrat dalam pakan. Jumlah dan proporsi TVFA sangat berperan dalam efisiensi pemanfaatan energi dari pakan karena VFA berfungsi sebagai sumber energi utama bagi ternak ruminansia. Penurunan TVFA tersebut berkaitan dengan efek toksik nitrit terhadap mikroba rumen pada proses fermentasi rumen (Guo *et al.*, 2022b; Ortiz-Chura *et al.*, 2021). Akumulasi nitrit yang dihasilkan berimplikasi pada penurunan populasi

bakteri selulolitik yang berperan penting dalam fermentasi serat dan produksi VFA. Penelitian Marais *et al.* (1988) menemukan bahwa suplementasi nitrat mampu mempengaruhi akumulasi nitrit dalam rumen yang berdampak pada pengurangan populasi mikroba, yaitu 64% bakteri selulolitik, 25% bakteri xilanolitik, dan 57% bakteri lain yang hidup di dalam rumen. Hal tersebut berdampak langsung pada menurunnya aktivitas fermentasi serat sehingga mengurangi produksi VFA. Selain itu, nitrit juga berpotensi mengganggu populasi mikroba lainnya, seperti metanogen yang berperan dalam stabilitas fermentasi rumen (Zhou *et al.*, 2012; Asanuma *et al.*, 2015; Latham *et al.*, 2016). Metanogen berperan dalam proses metanogenesis di dalam rumen. Metanogenesis merupakan jalur untuk mengoksidasi kembali kofaktor dalam rumen yang apabila proses metanogenesis terganggu maka akan berimplikasi pada tingginya konsentrasi H₂ yang dapat menghambat re-oksidasi kofaktor sehingga proses fermentasi pun menjadi

terhambat (Ungerfeld, 2020; Yu *et al.*, 2021). Hal ini dikarenakan fermentasi di rumen bergantung pada re-oksidasi kofaktor untuk mengubah bahan organik menjadi VFA (Thao *et al.*, 2022).

Suplementasi nitrat pada ternak ruminansia *in vitro* mempengaruhi pencernaan nutrisi dalam rumen, yaitu cenderung berpengaruh signifikan ($P = 0,09$) terhadap penurunan pencernaan bahan kering (KcBK) dan berpengaruh signifikan ($P \leq 0,05$) terhadap pencernaan protein kasar (KcPK).

Penurunan pencernaan terjadi akibat akumulasi produk hasil reduksi nitrat yaitu nitrit yang dapat mempengaruhi ekosistem rumen melalui penghambatan sistem transpor elektron mikroba dengan mengalihkan H_2 metabolik ke dalam sintesis nitrogen dan protein mikroba (Zhou *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2021). Nitrat yang tereduksi menjadi nitrit (NO_2^-) di rumen menghambat aktivitas mikroba selulolitik dan xilanolitik yang bertanggung jawab atas degradasi serat pakan seperti *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, dan *Butyrivibrio fibrisolvens* sehingga aktivitas enzim selulase dan xilanase pun menjadi menurun disertai dengan penurunan KcBK (Marais *et al.*, 1988; Capelari dan Powers, 2017). Hal ini menunjukkan bahwa nitrit merupakan faktor utama yang memengaruhi pencernaan di rumen.

Aktivitas penghambatan yang terjadi menandakan adanya efek toksik nitrit terhadap aktivitas mikroba terutama bakteri selulolitik yang cenderung terjadi pada konsentrasi nitrat dengan kadar tinggi (> 12 mmol/L) (Zhou *et al.*, 2012; Patra dan Yu, 2015b). Sebaliknya, suplementasi nitrat pada konsentrasi rendah (5 mmol/L) tidak menunjukkan efek toksik karena terbukti meningkatkan populasi bakteri selulolitik seperti *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, dan *Fibrobacter succinogenes* (Patra dan Yu, 2013; Patra dan Yu, 2015b). Selain itu, efek toksik

nitrat pun berdampak pada bakteri yang berperan mencerna protein kasar sehingga menghasilkan penurunan KcPK. Capelari *et al.* (2018) menunjukkan penurunan KcPK hingga 0,7% setelah suplementasi nitrat. Tidak hanya itu, penelitian Guyader *et al.* (2017) pun menunjukkan efek suplementasi nitrat yang sama yaitu penurunan KcPK hingga 7,9%.

Meski demikian, penurunan KcPK menandakan adanya peningkatan fraksi protein yang tidak terdegradasi di rumen atau *Rumen Undegradable Protein* (RUP) sehingga sekitar 80% protein dapat dicerna dan diserap sebagai asam amino oleh inang bersama dengan protein mikrobial di usus halus (Putri *et al.*, 2021; Morsy *et al.*, 2022). RUP menyediakan asam amino berkualitas tinggi untuk ruminansia dengan tingkat pertumbuhan dan produksi yang tinggi dibandingkan dengan protein mikrobial (Tandon *et al.*, 2008; Owens *et al.*, 2014; Putri *et al.*, 2021). Dengan demikian, efek suplementasi nitrat terhadap penurunan KcPK tersebut tetap dapat memberikan keuntungan bagi ternak ruminansia melalui peningkatan RUP yang efektif untuk memenuhi kebutuhan asam amino berkualitas tinggi.

KESIMPULAN

Suplementasi nitrat pada ternak ruminansia *in vitro* dapat meningkatkan NH_3-N , menurunkan TVFA/gram BK dan KcPK, serta cenderung menurunkan KcBK yang dipengaruhi oleh adanya perubahan jalur metabolisme dalam rumen serta perubahan populasi mikroba rumen (bakteri selulolitik, xilanolitik, proteolitik, dan metanogen) akibat efek toksik nitrat. Dengan demikian, suplementasi nitrat pada ternak ruminansia *in vitro* dapat memodulasi fermentasi rumen dan pencernaan nutrisi *in vitro*. Selain itu, nitrat mampu menjadi alternatif sumber protein yang menyediakan asam amino tambahan bagi ternak ruminansia, khususnya bagi

ternak dengan pertumbuhan dan produksi yang tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada rekan-rekan satu tim penelitian meta analisis atas bantuan dan kerja samanya dalam pelaksanaan penelitian ini. Peneliti pun mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Nutrisi dan Kimia Makanan Ternak, Departemen Nutrisi Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran atas dukungan dan fasilitas yang diberikan kepada peneliti untuk melaksanakan penelitian studi meta analisis ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adejoro, F. A., dan Hassen, A. (2017). Effect of Supplementing or Treating *Eragrostis curvula* Hay With Urea or Nitrate on Its Digestibility and In Vitro Fermentation. *South African Journal of Animal Science*, 47(2), 168–177.
<https://doi.org/10.4314/sajas.v47i2.8>
- Asanuma, N., Yokoyama, S., dan Hino, T. (2015). Effects of Nitrate Addition to a Diet on Fermentation and Microbial Populations in the Rumen of Goats, With Special Reference to *Selenomonas ruminantium* Having the Ability to Reduce Nitrate and Nitrite. *Animal Science Journal*, 86(4), 378–384.
<https://doi.org/10.1111/asj.12307>
- Božić, A. K., Anderson, R. C., Carstens, G. E., Ricke, S. C., Callaway, T. R., Yokoyama, M. T., Wang, J. K., dan Nisbet, D. J. (2009). Effects of The Methane-inhibitors Nitrate, Nitroethane, Lauric acid, Lauricidin® and The Hawaiian Marine Algae *Chaetoceros* on Ruminant Fermentation In Vitro. *Bioresource Technology*, 100(17), 4017–4025.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.061>
- Braidot, M., Sarnataro, C., dan Spanghero, M. (2023). Dynamics of In Vitro Rumen Methane Production After Nitrate Addition. *Archives of Animal Nutrition*, 77(6), 512–523.
<https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2282348>
- Bryant, A. M. (1965). The Effect of Nitrate on the In Vitro Fermentation of Glucose by Rumen Liquor. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8(1), 118–125.
<https://doi.org/10.1080/00288233.1965.10420028>
- Capelari, M., Johnson, K. A., Latack, B., Roth, J., dan Powers, W. (2018). The Effect of Encapsulated Nitrate and Monensin on Ruminal Fermentation Using a Semi-Continuous Culture System. *Journal of Animal Science*, 96(8), 3446–3459.
<https://doi.org/10.1093/jas/sky211>
- Capelari, M., dan Powers, W. (2017). The Effect of Nitrate and Monensin on In Vitro Ruminal Fermentation. *Journal of Animal Science*, 95(11), 5112–5123.
<https://doi.org/10.2527/jas2017.1657>
- Chagas, J. C., Ramin, M., dan Krizsan, S. J. (2019). In Vitro Evaluation of Different Dietary Methane Mitigation Strategies. *Animals*, 9(12), 1120.
<https://doi.org/10.3390/ani9121120>
- Choudhury, P. K., Jena, R., Tomar, S. K., dan Puniya, A. K. (2022). Reducing Enteric Methanogenesis through Alternate Hydrogen Sinks in the Rumen. *Methane*, 1(4), 320–341.
<https://doi.org/10.3390/methane1040024>
- Correa, A. C., Trachsel, J., Allen, H. K., Corral-Luna, A., Gutierrez-Bañuelos, H., Ochoa-Garcia, P. A., Ruiz-Barrera, O., Hume, M. E.,

- Callaway, T. R., Harvey, R. B., Beier, R. C., Anderson, R. C., dan Nisbet, D. J. (2017). Effect of Sole or Combined Administration of Nitrate and 3-Nitro-1-Propionic Acid on Fermentation and Salmonella Survivability in Alfalfa-Fed Rumen Cultures In Vitro. *Bioresource Technology*, 229, 69–77.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.012>
- Cottle, D. J., Nolan, J. V., dan Wiedemann, S. G. (2011). Ruminant Enteric Methane Mitigation: a Review. *Animal Production Science*, 51(6), 491–514.
<https://doi.org/10.1071/AN10163>
- Feng, X. Y., Dijkstra, J., Bannink, A., van Gastelen, S., France, J., dan Kebreab, E. (2020). Antimethanogenic Effects of Nitrate Supplementation in Cattle: A Meta-Analysis. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 11375–11385.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18541>
- Guo, W. S., Schaefer, D. M., Guo, X. X., Ren, L. P., dan Meng, Q. X. (2009). Use of Nitrate-nitrogen as a Sole Dietary Nitrogen Source to Inhibit Ruminal Methanogenesis and to Improve Microbial Nitrogen Synthesis In vitro. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(4), 542–549.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2009.80361>
- Guo, Y., Hassan, F., Li, M., Tang, Z., Peng, L., Peng, K., dan Yang, C. (2022a). Effect of Hydrogen-Consuming Compounds on In Vitro Ruminal Fermentation, Fatty Acids Profile, and Microbial Community in Water Buffalo. *Current Microbiology*, 79(8), 220.
<https://doi.org/10.1007/s00284-022-02904-7>
- Guo, Y., Hassan, F., Li, M., Xie, H., Peng, L., Tang, Z., dan Yang, C. (2022b). Effect of Sodium Nitrate and Cysteamine on In Vitro Ruminal Fermentation, Amino Acid Metabolism and Microbiota in Buffalo. *Microorganisms*, 10, 2038.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10102038>
- Guyader, J., Tavendale, M., Martin, C., dan Muetzel, S. (2016). Dose-Response Effect of Nitrate on Hydrogen Distribution Between Rumen Fermentation End Products: An In Vitro Approach. *Animal Production Science*, 56(3), 224.
<https://doi.org/10.1071/AN15526>
- Guyader, J., Ungerfeld, E. M., dan Beauchemin, K. A. (2017). Redirection of Metabolic Hydrogen by Inhibiting Methanogenesis in the Rumen Simulation Technique (RUSITEC). *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00393>
- Hassan, F., Guo, Y., Li, M., Tang, Z., Peng, L., Liang, X., dan Yang, C. (2021). Effect of Methionine Supplementation on Rumen Microbiota, Fermentation, and Amino Acid Metabolism in In Vitro Cultures Containing Nitrate. *Microorganisms*, 9(8), 1717.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081717>
- Henry, D. D., Ciriaco, F. M., Araujo, R. C., Garcia-Ascolani, M. E., Fontes, P. L. P., Oosthuizen, N., Sanford, C. D., Schulmeister, T. M., Ruiz-Moreno, M., Lamb, G. C., dan DiLorenzo, N. (2021). Encapsulated Nitrate Replacing Soybean Meal Changes In Vitro Ruminal Fermentation and Methane Production in Diets Differing in Concentrate-to-Forage Ratio. *Animal*, 15(5), 100195.

- <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100195>
- Jayanegara, A., Wina, E., dan Takahashi, J. (2014). Meta-analysis on Methane Mitigating Properties of Saponin-rich Sources in the Rumen: Influence of Addition Levels and Plant Sources. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(10), 1426–1435.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14086>
- Joch, M., Vadroňová, M., Češpiva, M., Zabloudilová, P., Výborná, A., Tyrolová, Y., Kudrna, V., Tichá, D., Plachý, V., dan Hroncová, Z. (2023). Capric and Lauric Acid Mixture Decreased Rumen Methane Production, While Combination With Nitrate Had No Further Benefit in Methane Reduction. *Annals of Animal Science*, 23(3), 799–808.
<https://doi.org/10.2478/aoas-2023-0010>
- Latham, E. A., Anderson, R. C., Pinchak, W. E., dan Nisbet, D. J. (2016). Insights on Alterations to the Rumen Ecosystem by Nitrate and Nitrocompounds. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00228>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., dan Beauchemin, K. A. (2017). In Situ and In Vitro Evaluations of a Slow-Release Form of Nitrate for Ruminants: Nitrate Release Rate, Rumen Nitrate Metabolism, and the Production of Methane, Hydrogen, and Nitrous Oxide. *Animal Feed Science and Technology*, 231, 97–106.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.07.005>
- Liberati, A., Altman, D. G., Tetzlaff, J., Mulrow, C., Gøtzsche, P. C., Ioannidis, J. P. A., Clarke, M., Devereaux, P. J., Kleijnen, J., dan Moher, D. (2009). The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration. *Annals of Internal Medicine*, 151(4), 65–94.
- Lin, M., Schaefer, D. M., Guo, W. S., Ren, L. P., dan Meng, Q. X. (2011). Comparisons of In vitro Nitrate Reduction, Methanogenesis, and Fermentation Acid Profile among Rumen Bacterial, Protozoal and Fungal Fractions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(4), 471–478.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10288>
- Lin, M., Schaefer, D. M., Zhao, G. Q., dan Meng, Q. X. (2013). Effects of Nitrate Adaptation by Rumen Inocula Donors and Substrate Fiber Proportion on in Vitro Nitrate Disappearance, Methanogenesis, and Rumen Fermentation Acid. *Animal*, 7(7), 1099–1105.
<https://doi.org/10.1017/S1751731113000116>
- Lund, P., Dahl, R., Yang, H. J., Hellwing, A. L. F., Cao, B. B., dan Weisbjerg, M. R. (2014). The Acute Effect of Addition of Nitrate on in Vitro and in Vivo Methane Emission in Dairy Cows. *Animal Production Science*, 54(9), 1432.
<https://doi.org/10.1071/AN14339>
- Mamvura, C. I., Cho, S., Mbiriri, D. T., Lee, H. G., dan Choi, N. J. (2014). Effect of Encapsulating Nitrate in Sesame Gum on In vitro Rumen Fermentation Parameters. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(11), 1577–1583.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14280>
- Marais, J. P., Therion, J. J., Mackie, R. I., Kistner, A., dan Dennison, C. (1988). Effect of Nitrate and Its Reduction Products on the Growth and Activity of the Rumen

- Microbial Population. *British Journal of Nutrition*, 59(2), 301–313.
<https://doi.org/10.1079/bjn19880037>
- Mbiriri, D. T., Cho, S., Mamvura, C. I., dan Choi, N. J. (2017). Effects of a Blend of Garlic Oil, Nitrate, and Fumarate on In Vitro Ruminal Fermentation and Microbial Population. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(4), 713–722.
<https://doi.org/10.1111/jpn.12508>
- McAllister, T. A., Okine, E. K., Mathison, G. W., dan Cheng, K. J. (1996). Dietary, Environmental and Microbiological Aspects of Methane Production in Ruminants. *Can J Anim Sci*, 76, 231–243.
- Mejia-Turcios, S. E., Osorio-Doblado, A. M., Ciriaco, F. M., Urso, P. M., Araujo, R. C., Woerner, D. R., Johnson, B. J., Dubeux, J. C. B., Sarturi, J. O., DiLorenzo, N., dan Henry, D. D. (2021). Effects of Bismuth Subsalicylate and Encapsulated Calcium-Ammonium Nitrate on Feedlot Beef Cattle Production. *Journal of Animal Science*, 99(10).
<https://doi.org/10.1093/jas/skab269>
- Morsy, T. A., Gouda, G. A., dan Kholif, A. E. (2022). In Vitro Fermentation and Production of Methane and Carbon Dioxide from Rations Containing Moringa oleifera Leaf Silage as a Replacement for Soybean Meal: In Vitro Assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(46), 69743–69752.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-20622-2>
- Natel, A. S., Abdalla, A. L., Araujo, R. C. D., Paim, T. P., Abdallafilho, A. L., Louvandini, P., Lima, M. K., dan Piza, P. (2022). Encapsulated Nitrate Replacing Soybean Meal in Diets With and Without Monensin on In Vitro Ruminal Fermentation. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 94(4).
<https://doi.org/10.1590/0001-3765202220200213>
- Natel, A. S., Abdalla, A. L., de Araujo, R. C., McManus, C., Paim, T. d. P., de Abdalla Filho, A. L., Louvandini, P., dan Nazato, C. (2019). Encapsulated Nitrate Replacing Soybean Meal Changes In Vitro Ruminal Fermentation and Methane Production in Diets Differing in Concentrate-to-Forage Ratio. *Animal Science Journal*, 90(10), 1350–1361.
<https://doi.org/10.1111/asj.13251>
- Nguyen, S. H., Li, L., dan Hegarty, R. S. (2015). Effects of Rumen Protozoa of Brahman Heifers and Nitrate on Fermentation and In vitro Methane Production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(6), 807–813.
<https://doi.org/10.5713/ajas.15.0641>
- Olijhoek, D. W., Hellwing, A. L. F., Brask, M., Weisbjerg, M. R., Højberg, O., Larsen, M. K., Dijkstra, J., Erlandsen, E. J., dan Lund, P. (2016). Effect of Dietary Nitrate Level on Enteric Methane Production, Hydrogen Emission, Rumen Fermentation, and Nutrient Digestibility in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6191–6205.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10691>
- Ortiz-Chura, A., Gere, J., Marcoppido, G., Depetris, G., Cravero, S., Faverín, C., Pinares-Patiño, C., Cataldi, A., dan Cerón-Cucchi, M. E. (2021). Dynamics of the Ruminal Microbial Ecosystem and Inhibition of Methanogenesis and Propiogenesis in Response to Nitrate Feeding to Holstein Calves. *Animal Nutrition*, 7(4), 1205–1218.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.07.005>

- Owens, F. N., Pas, S. Q., dan Sapienza, D. A. (2014). Protein Nutrition of Ruminants Classical CP Requirements. *The Professional Animal Scientist*, 30, 150–159.
- Patra, A. K., dan Yu, Z. (2013). Effective Reduction of Enteric Methane Production by a Combination of Nitrate and Saponin Without Adverse Effects on Feed Degradability, Fermentation, or Bacterial and Archaeal Communities of the Rumen. *Bioresource Technology*, 148, 352–360.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.140>
- Patra, A. K., dan Yu, Z. (2015a). Effects of Adaptation of In vitro Rumen Culture to Garlic Oil, Nitrate, and Saponin and Their Combinations on Methanogenesis, Fermentation, and Abundances and Diversity of Microbial Populations. *Frontiers in Microbiology*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01434>
- Patra, A. K., dan Yu, Z. (2015b). Effects of Garlic Oil, Nitrate, Saponin, and Their Combinations Supplemented to Different Substrates on In Vitro Fermentation, Ruminant Methanogenesis, and Abundance and Diversity of Microbial Populations. *Journal of Applied Microbiology*, 119(1), 127–138.
<https://doi.org/10.1111/jam.12819>
- Putri, E. M., Zain, M., Warly, L., dan Hermon, H. (2021). Effects of Rumen-Degradable-to-Undegradable Protein Ratio in Ruminant Diets on In Vitro Digestibility, Rumen Fermentation, and Microbial Protein Synthesis. *Veterinary World*, 14(3), 640–648.
<https://doi.org/10.14202/VETWOR.LD.2021.640-648>
- Rohma, M. R., Zubairi, I., Aryono, A. D., Nasrullah, L., dan Widianingrum, D. C. (2021). Nitrat: Karakteristik Antinutrisi, Dampak Negatif, Potensi Aditif, dan Efektivitas Agen Defaunasi. *ANIMPRO: Conference of Applied Animal Science Proceeding Series*, 24–31.
<https://doi.org/10.25047/animpro.2021.3>
- Sakthivel, P. C., Kamra, D. N., Agarwal, N., dan Chaudhary, L. C. (2012). Effect of Sodium Nitrate and Nitrate Reducing Bacteria on In vitro Methane Production and Fermentation with Buffalo Rumen Liquor. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(6), 812–817.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11383>
- Sar, C., Mwenya, B., Pen, B., Morikawa, R., Takaura, K., Kobayashi, T., dan Takahashi, J. (2005). Effect of Nisin on Ruminant Methane Production and Nitrate/Nitrite Reduction In Vitro. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(8), 803.
<https://doi.org/10.1071/AR04294>
- Sharifi, M., Taghizadeh, A., Hosseinkhani, A., Palangi, V., Macit, M., Salem, A. Z. M., Elghndour, M. M. M. Y., dan Abachi, S. (2022). Influence of Nitrate Supplementation on In-Vitro Methane Emission, Milk Production, Ruminant Fermentation, and Microbial Methanotrophs in Dairy Cows Fed at Two Forage Levels. *Annals of Animal Science*, 22(3), 1015–1026.
<https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0087>
- St-Pierre, N. R. (2001). Invited Review. Integrating Quantitative Findings from Multiple Studies Using Mixed Model Methodology. *Journal of Dairy Science*, 84(4), 741–755.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74530-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74530-4)
- Sun, Y. K., Yan, X. G., Ban, Z. B., Yang, H. M., Hegarty, R. S., dan Zhao, Y. M. (2017). The Effect of Cysteamine

- Hydrochloride and Nitrate Supplementation on In-Vitro and In-Vivo Methane Production and Productivity of Cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 232, 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.03.016>
- Tadele, Y., dan Amha, N. (2015). Use of Different Non Protein Nitrogen Sources in Ruminant Nutrition: a Review. 29.
- Takahashi, J. (2011). Some Prophylactic Options to Mitigate Methane Emission from Animal Agriculture in Japan. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(2), 285–294.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2011.r.03>
- Tandon, T., Siddique, R. A., dan Ambwani, T. (2008). Role of Bypass Proteins in Ruminant Production. *Dairy Planner*, 4(10), 11–14.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16615.04003>
- Thao, N. T., Phesatcha, K., Matra, M., Phesatcha, B., dan Wanapat, M. (2022). Sources of Rumen Enhancers Including Nitrate, Chitosan Extract, and Shrimp Shell Meal Could Modulate Nutrient Degradability and In Vitro Gas Fermentation. *Journal of Applied Animal Research*, 50(1), 394–399.
<https://doi.org/10.1080/09712119.2022.2088540>
- Ungerfeld, E. M. (2020). Metabolic Hydrogen Flows in Rumen Fermentation: Principles and Possibilities of Interventions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 589.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>
- Vadronová, M., Šťovíček, A., Jochová, K., Výborná, A., Tyrolová, Y., Tichá, D., Homolka, P., dan Joch, M. (2023). Combined effects of nitrate and medium-chain fatty acids on methane production, rumen fermentation, and rumen bacterial populations in vitro. *Scientific Reports*, 13(1), 21961.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-49138-6>
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. . J., Dijkstra, J., Newbold, J. R., Hulshof, R. B. A., dan Perdok, H. B. (2011). Persistency of Methane Mitigation by Dietary Nitrate Supplementation in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 4028–4038.
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4236>
- Wang, M., Wang, R., Yang, S., Deng, J. P., Tang, S. X., dan Tan, Z. L. (2016). Effects of Three Methane Mitigation Agents on Parameters of Kinetics of Total and Hydrogen Gas Production, Ruminal Fermentation, and Hydrogen Balance Using In Vitro Technique. *Animal Science Journal*, 87(2), 224–232.
<https://doi.org/10.1111/asj.12423>
- Wu, H., Meng, Q., Zhou, Z., dan Yu, Z. (2019). Ferric Citrate, Nitrate, Saponin and Their Combinations Affect In Vitro Ruminal Fermentation, Production of Sulphide and Methane and Abundance of Select Microbial Populations. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 150–158.
<https://doi.org/10.1111/jam.14286>
- Yang, C., McKain, N., McCartney, C. A., dan Wallace, R. J. (2019). Consequences of Inhibiting Methanogenesis on the Biohydrogenation of Fatty Acids in Bovine Ruminal Digesta. *Animal Feed Science and Technology*, 254, 114189.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.05.012>
- Yanza, Y. R., Szumacher-Strabel, M., Jayanegara, A., Kasenta, A. M., Gao, M., Huang, H., Patra, A. K., Warzych, E., dan Cieślak, A. (2021). The Effects of Dietary Medium-

- chain Fatty Acids on Ruminant Methanogenesis and Fermentation In Vitro and In Vivo: A Meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105(5), 874–889.
<https://doi.org/10.1111/jpn.13367>
- Yu, G., Beauchemin, K. A., dan Dong, R. (2021). A Review of 3-Nitrooxypropanol for Enteric Methane Mitigation from Ruminant Livestock. *Animals*, 11(12), 3540.
<https://doi.org/10.3390/ani11123540>
- Zhou, Z., Yu, Z., dan Meng, Q. (2012). Effects of Nitrate on Methane Production, Fermentation, and Microbial Populations in In Vitro Ruminant Cultures. *Bioresour Technol*, 103(1), 173–179.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.013>
- Zurak, D., Kristina, K., dan Aladrović, J. (2023). Metabolism and Utilisation of Non-Protein Nitrogen Compounds in Ruminants: a Review. *Journal of Central European Agriculture*, 24(1), 1–14.
<https://doi.org/10.5513/JCEA01/24.1.3645>