Pengaruh Suplementasi Asam Lemak Bercabang terhadap Koloni Bakteri Rumen dan Sel Protozoa

(Effect of Supplementation of Branched Chain Fatty Acid on Colony of Ruminal Bacteria and Cell of Protozoa)

W Suryapratama* dan FM Suhartati

Laboratorium Bahan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman, Jl.dr. Suparno, Purwokerto 53122, Phone 0281-638792
***Penulis koresponden email : mas_eo@yahoo.com, Hp.08882669743**

Abstract. A study was conducted to evaluate the potential of branched-chain volatile fatty acids (isobutyric, α-methylbutyric and β-methylbutiric) that supplemented into the diet on the colony of ruminal bacteria and the cell of protozoa population. Five progeny Friesian Holstein males with initial weight 348±29 kg were used in a 5x5 Latin square design (30-d periods). The basal diet composed of 55% forage and 45% concentrate containing 10.5 MJ ME/kg and 15% crude protein (CP). There were five dietary treatments where A: basal diet, B: A+139 mg urea/kg $W^{0.75}$, C: B+28 mg $CaSO_4$/kg $W^{0.75}$, D: C+0.05 mM isobutyric acid+0.05 mM β-methylbutyric acid, and E: D+0.05 mM α-methylbutyric acid. Rearing period was 30 days, consists of feed adaptation period 20 days, then growth observation was done within the last 10 days. Collection of ruminal fluid was done within the last day of observation period, and took 3-4 h after the feeding. The results showed that supplementation branched chain volatile fatty acids did not significant affect on the number of colonies of bacteria and protozoa population, but the significant effect ($P<0.05$) on the concentration of branched chain volatile fatty acids in the rumen fluid. The supplementation of α-methylbutyric ($P <0.05$) decreased of concentration of isobutyric and isovaleric in rumen fluid than the other treatments. It is concluded that supplementation of branched chain volatile fatty acids not used by rumen bacteria for their growth but for the elongation of fatty acid synthesis. The supplementation of branched chain volatile fatty acids was 0.05 mM not enough strong influence on the growth of colony of rumen bacteria.

Key Words: rumen fermentation, branched-chain fatty acid, ruminal bacteria, protozoa

Pendahuluan

Selain berperan pada proses pencernaan pakan secara fermentatif di rumen, bakteri rumen juga berperan dalam pasokan protein pada hewan inang. Besarnya pasokan protein biomassa mikroba rumen ke usus halus dapat mencapai 50-80% dari toal protein yang diabsorbsi (Bach *et al*., 2005). Dilaporkan oleh Ipharraguerre *et al*. (2005) bahwa nitrogen mikrobial yang masuk ke usus halus pada sapi laktasi dapat mencapai kisaran sebesar 251-292 g per ekor per hari. Hasil kedua peneliti tersebut menegaskan bahwa protein bagi hewan ruminansia sangatlah penting. Apalagi bagi ruminansia yang baru melahirkan, sapi perah masa awal laktasi (Lapierre *et al*., 2006) maupun masa pertumbuhan yang pesat pada hewan muda (Sullivan *et al*., 2005), lebih banyak membutuhkan nutrien yang berkualitas dan hewan-hewan tersebut akan mempunyai kinerja yang lebih baik jika mendapat pasokan protein yang berkualitas tinggi dan tahan degradasi di rumen. Hal tersebut menunjukkan bahwa komposisi asam amino dari protein pakan menjadi penting bagi hewan ruminansia seperti juga pada hewan non-ruminansia. Asam amino metionin, lisin, phenilalanin, dan treonin merupakan asam amino yang dibutuhkan bagi ruminansia (Scholljegerdes *et al*., 2005), selain itu masih ada asam amino lain yang sangat dibutuhkan hewan ruminansia yaitu valin, isoleusin, dan leusin (Volden, 1999). Ketiga asam amino ini merupakan asam amino rantai cabang yang berperan dalam aktivitas bakteri selulolitik. Ketiganya dapat berasal dari kerangka karbonnya yaitu asam lemak isobutirat (i-C_4), asam α-metilbutirat (2Me-C_4)

dan asam β-metilbutirat (i-C_5) (Russell dan Sniffen, 1984).

Mikroba rumen yang mencerna pakan serat membutuhkan asam lemak bercabang tersebut, beberapa hasil studi menunjukkan bahwa penambahan asam lemak bercabang (*branched chain volatile fatty acids*) dapat meningkatkan kecernaan serat di dalam rumen (Soofi *et al*., 1982; Gorosito *et al*., 1985; Yang, 2002).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi potensi asam lemak volatil bercabang (asam isobutirat, α-metilbutirat, dan β-metilbutirat) yang disuplementasikan pada pakan terhadap pertumbuhan bakteri rumen dan populasi protozoa rumen, pada sapi yang sedang tumbuh.

Metode Penelitian

Materi yang digunakan adalah 5 ekor sapi jantan peranakan Friesian Holstein, dengan bobot awal 348±29 kg. Sapi percobaan mendapat pakan dasar dari rumput gajah 55% (3 bagian rumput segar, 2 bagian silase rumput) dan konsentrat 45% (2 bagian bungkil kelapa, 1 bagian pollard) dengan kandungan protein kasar 15% dan energi metabolis (ME) 10,5 MJ/kg. Peubah yang diamati adalah jumlah koloni bakteri rumen, populasi protozoa, dan asam lemak volatil bercabang.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Bujur Sangkar Latin. Sebagai kolom adalah individu sapi, sebagai baris adalah periode pemeliharaan. Adapun perlakuannya adalah 5 jenis suplementasi pakan yaitu : (1) A = pakan dasar tanpa suplementasi, (2) B = A + urea 139 mg/kg$W^{0,75}$, (3) C = B + kalsium sulfat 28 mg/kg$W^{0,75}$, (4) D = C + isobutirat dan β-metilbutirat 0,05 mM, dan (5) E = D + α-metilbutirat 0,05 mM. Periode pemeliharaan sapi dilakukan selama 30 hari, terdiri dari 20 hari masa adaptasi pakan dan 10 hari masa pengukuran pertumbuhan sapi. Pengambilan cairan rumen dilakukan pada hari ke 30 setiap periode pemeliharaan, dilakukan 3-4 jam setelah sapi percobaan makan. Pengambilan cairan rumen menggunakan *stomach tube*, seperti yang dilakukan oleh Erwanto (1995). Slang *stomach tube* dimasukan ke dalam rumen melalui mulut, dengan bantuan pompa vakum maka cairan rumen dapat disedot dan ditampung pada botol penampung. Cairan rumen dimasukkan ke dalam termos air panas untuk dibawa ke laboratorium. Sebelum cairan rumen dimasukkan ke dalam termos, termos diisi air panas terlebih dahulu dan pada saat cairan rumen akan dimasukkan ke dalam termos, air panas dibuang terlebih dahulu.

Pencacahan populasi bakteri rumen menggunakan media Broth mengikuti petunjuk Suryahadi (1990). Bahan media Broth terdiri dari (1) 0,1 g Xylosa, (2) 0,1 g Pepton, (3) 0,1 g Glukosa, (4) 0,1 g Pati, (5) 0,1 g Selobiosa, (6) 0,1 g Yeast, (7) 0,5 g $NaHCO_3$, dan (8) 0,02 g Sistein. Bahan nomer 1 sampai dengan 7 dimasukkan ke dalam botol khusus, dicampur dengan 50 ml aquades, 16,5 ml larutan A (3 g KH_2PO_4, 6 g NaCl, 3 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,3 g $CaCl_2$ dan 0,3 g $MgSO_4$ dalam 1 liter aquades), 16,5 ml larutan B (3 g K_2HPO_4 dalam 1 liter aquades), 16,5 ml cairan rumen (sebelum dicampur, cairan rumen di sentrifuse pada 12.000 rpm selama 15 menit, disaring dan dimasukkan botol, disterilisasi pada temperatur 121^oC selama 15 menit), 0,1 ml larutan resazurin 0,10%, dicampur hingga merata menggunakan stirer (warna akan menjadi merah). pH diatur agar menjadi 6,9-7. Dipanaskan hingga warna merah berubah menjadi coklat jernih. Sebelum api dipadamkan, botol dialiri dengan gas CO_2 beberapa saat, kemudian api dipadamkan dan tetap dialiri CO_2. Botol tersebut didinginkan di dalam ember yang berisi air es, setelah dingin sistein dimasukkan. Pipet dispenser dipasang pada botol dan botol tetap dialiri CO_2. Tabung Hungate yang telah disiapkan diisi dengan larutan Broth masing-masing 5 ml. Pada saat tabung Hungate diisi larutan Broth, dialirkan pula gas CO_2, kemudian ditutup dengan tutup karet (supaya tutup tidak lepas pada saat disterilisasi, maka diperkuat dengan isolasi). Tabung Hungate yang berisi larutan Broth kemudian disterilisasi dengan temperatur 121^oC selama 15 menit. Selain itu menyiapkan pula tabung Hungate yang diisi dengan bacto agar 1,5 g dan larutan Broth 10 ml dan disterilisasi seperti menyiapkan tabung Hungate sebelumnya. Tabung hungate berisi media agar dipanaskan dalam air mendidih sampai mencair, kemudian dimasukkan ke dalam *water bath* dengan temperatur 50^oC.

Selanjutnya menanam bakteri rumen pada tabung Hungate yaitu cairan rumen sampel dari sapi percobaan diambil sebanyak 0,05 ml dari termos (dikocok dan disaring), dimasukkan ke dalam tabung Hungate yang berisi larutan Broth (tabung 1). Diambil 0,05 ml dari tabung 1 tersebut dan dimasukkan ke dalam tabung ke 2 (menggunakan spuit 1 ml dengan skala 0,01 ml), begitu seterusnya sampai tabung ke 5. Diambil 0,1 ml larutan yang telah berisi cairan rumen tersebut dari tabung 3, 4 dan 5 masing-masing dimasukkan ke dalam tabung Hungate yang berisi media agar (tabung 1, 2 dan 3). Kemudian meratakan media agar tersebut disekitar dinding tabung Hungate dengan bantuan roller, selanjutnya tabung Hungate dimasukkan ke dalam inkubator yang bersuhu 39^{o}C selama 7 hari. Setelah 7 hari koloni bakteri dihitung pada tabung 2, maka didapat per ml cairan rumen = jumlah koloni x 20 x 10^8.

Pencacahan populasi protozoa rumen mengikuti petunjuk Suryahadi (1990), menggunakan larutan *methylgreen-formalin-salin* (MSF) terdiri dari 100 ml larutan formaldehid 35%, 900 ml aquades, 0,6 g methylgreen dan 8 g NaCl (p.a.). Diambil 0,1 ml cairan rumen sampel yang telah disiapkan seperti untuk menghitung koloni bakteri, ditambahkan 0,1 ml larutan MSF dan 0,3 ml aquades. Dicampur sampai homogen (menggunakan vorteks). Kaca penutup protozoa *counter deck glass* diletakan di atas permukaan. Diambil suspensi sebanyak 0,1-0,5 ml dengan pipet Pasteur. Ujung pipet ditempelkan pada lekukan berbentuk V pada tepi kaca tutup protozoa *counter deck glass*, dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x. Dilakukan pencacahan terhadap sel protozoa pada daerah A, B, C, D dan E (misal N sel), maka jumlah sel protozoa per ml cairan rumen = N/5 x 10^4 x 5.

Konsentrasi asam lemak volatil bercabang dilakukan menggunakan metode pemisahan kromatografi gas. Cara kerjanya adalah sebagai berikut : cairan rumen yang telah diambil dengan *stomach tube* disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, kemudian diambil supernatannya. Dua mililiter supernatan dipipet ke dalam tabung plastik yang bertutup. Kemudian ditambahkan 30 mg 5-*sulphosalicylic acid* ($C_6H_3(OH)SO_3H.2H_2O$) kemudian dikocok di dalam *shake tube*. Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, kemudian disaring dengan kertas milipore, sehingga diperoleh cairan jernih. Diambil 1 µl cairan jernih tersebut dan diinjeksikan ke dalam alat gas khromatografi (GC). Sebelum sampel diinjeksikan, GC diinjeksi terlebih dahulu dengan standard *Volatile Fatty Acid* (VFA) rumen. Kondisi alat diatur sebagai berikut : suhu kolom 105^{o}C, suhu injektor 160^{o}C, suhu detektor 200^{o}C, *attenuation* 16x10^{10}, kecepatan kertas grafik 0,5 cm/menit, laju aliran N_2 30 ml/menit, laju aliran H_2 30 ml/menit, laju aliran O_2 300 ml/menit. Penghitungan asam lemak bercabang diperoleh dari tinggi puncak grafik sampel dibagi tinggi puncak grafik standard kali konsentrasi standard.

Data yang diperoleh dianalisis ragam, dan dilanjutkan dengan uji orthogonal kontras untuk perlakuan yang berpengaruh nyata. Prosedur analisis mengikuti petunjuk Steel dan Torrie (1993).

Hasil dan Pembahasan

Rataan pH cairan rumen, cacahan koloni bakteri, cacahan sel protozoa, dan konsentrasi asam lemak bercabang tertera pada Tabel 1. Rataan jumlah koloni bakteri berkisar antara 6,29-7,74 x10^{11}/ml. Rataan tersebut lebih tinggi daripada yang dikemukakan oleh DiLorenzo *et al*. (2006), yaitu 1,2-1,7 x10^{10}/ml maupun oleh Benchaar *et al*. (2007), yaitu 1,4-4,9 x10^{9}/ml. Perbedaan tersebut dapat terjadi karena menurutnya jumlah bakteri dipengaruhi oleh tercukupinya nutrien untuk mendukung sintesis biomassa bakteri. Perlakuan yang diuji dalam percobaan merupakan suplementasi nutrien untuk sintesis biomassa bakteri. Rataan tertinggi dicapai oleh perlakuan B, yaitu pakan dasar yang ditambah urea sebesar 139 mg/kg $W^{0,75}$, meskipun secara statistik tidak nyata, penambahan urea merupakan upaya menyediakan nitrogen untuk sintesis protein mikroba rumen. Penambahan tersebut mampu meningkatkan jumlah koloni bakteri rumen sebesar 23%, hal ini menegaskan kembali bahwa amonia di dalam rumen merupakan pusat dari seluruh aspek kegiatan metabolisme oleh mikroba rumen maupun kegiatan pencernaan nitrogen di rumen. Hasil

fermentasi urea di dalam rumen adalah amonia, jadi dengan adanya penambahan urea, jumlah amonia di dalam rumen juga akan meningkat dan meningkatkan jumlah koloni bakteri.

Penambahan *branched chain fatty acids* (*isoacids*) yaitu asam isobutirat, α-metil-butirat dan β-metilbutirat secara statistik tidak nyata berpengaruh terhadap pH, jumlah koloni bakteri dan populasi protozoa yang diamati. Penambahan ke tiga asam tersebut belum mengganggu pH cairan rumen, kisaran pH cairan rumen juga mendukung untuk pertumbuhan biomassa bakteri. Tidak adanya pengaruh yang nyata terhadap jumlah koloni bakteri rumen diduga ada dua kemungkinan yang menyebabkannya, yaitu jumlah penambahan yang terlalu sedikit (0,05 mM) atau penambahan *isoacids* diduga tidak digunakan untuk prekursor sintesis asam amino bakteri (pertumbuhan koloni bakteri), tetapi digunakan untuk sintesis asam lemak rantai panjang. Seperti yang dilaporkan oleh Or-Rashid *et al*. (2007) bahwa total asam lemak rantai cabang (*branched chain fatty acids*) pada bakteri rumen mencapai 16,50% dari total asam lemak, sedangkan pada protozoa 11%. Dari total tersebut, proporsi rantai karbon 17:0 (*anteiso*) pada bakteri sebesar 1,40% dan pada protozoa 2,90%. Berdasarkan hal tersebut penambahan *branched chain fatty acid* lebih banyak digunakan untuk sintesis asam lemak rantai panjang daripada untuk sintesis protein mikroba baik pada bakteri rumen maupun pada protozoa rumen. Pola hubungan antara bakteri rumen dengan produk fermentasi rumen asam valerat (C_5), isobutirat dan isovalerat (*isoacids*) tertera pada Gambar 1. Pola hubungan tersebut berbentuk kuadrater dengan persamaan $Y = 106 - 25\ X + 1{,}6\ X^2$ (R^2=0,85). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan *branched chain fatty acid* tidak langsung digunakan untuk pertumbuhan populasi bakteri, namun digunakan dahulu untuk memenuhi kebutuhan pemanjangan asam lemak baru kemudian setelah ketersediaan isoacids tercukupi akan digunakan untuk pertumbuhan bakteri rumen.

Hasil analisis ragam menunjukkan pula suplementasi *branched chain fatty acids* tidak berpengaruh nyata terhadap populasi protozoa Hasil pengamatan populasi protozoa diketahui berkisar dari 3,03-3,94 $x10^5$ sel/ml cairan rumen, hasil ini tidak berbeda jauh dari yang dilaporkan oleh Benchaar *et al*. (2007) 4,04-5,38 $x10^5$ sel/ml.

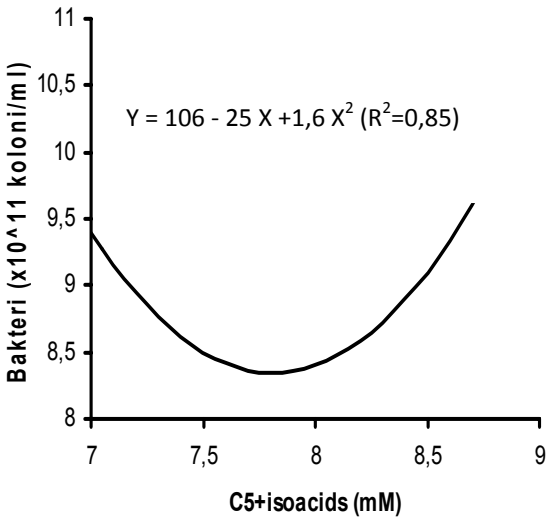
Hasil analisis ragam pada peubah konsetrasi asam lemak bercabang menunjukkan ada perbedaan yang nyata dari perlakuan yang diuji (Tabel 1). Berdasarkan uji kontras orthogonal ternyata penambahan α-metilbutirat nyata (P<0,05) meningkatkan kembali konsentrasi valerat, namun juga nyata (P<0,05) menurunkan kembali konsentrasi isovalerat.

Tabel 1. Rataan pH cairan rumen, jumlah koloni bakteri rumen, populasi protozoa, dan asam lemak volatil bercabang cairan rumen

Peubah	Perlakuan[+]				
	A	B	C	D	E
pH cairan rumen	6,43	6,39	6,31	6,55	6,46
Bakteri rumen, $x10^{11}$ koloni/ml	6,29	7,74	6,57	7,30	7,30
Protozoa, $x10^5$ sel/ml	3,03	3,19	3,08	3,54	3,94
Valerat (C_5), mM	$1{,}81^c$	$1{,}38^a$	$1{,}60^b$	$1{,}62^b$	$1{,}80^c$
Isovalerat,mM	$2{,}59^b$	$2{,}69^b$	$2{,}79^b$	$2{,}54^b$	$2{,}06^a$
Isobutirat, mM	$3{,}89^b$	$4{,}85^b$	$4{,}16^b$	$2{,}86^a$	$3{,}38^a$

[a,b,c] Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan ada perbedaan pada P<0,05

[+] A = pakan dasar tanpa suplementasi
B = A + urea 139 mg/kg $W^{0,75}$
C = B + $CaSO_4$ 28 mg/kg $W^{0,75}$
D = C + isobutirat dan β-metilbutirat 0,05 mM
E = D + α-metilbutirat 0,05 mM



Gambar 1. Hubungan antara bakteri rumen dengan C_5+*isoacids*

Hal ini diduga penambahan asam lemak tersebut digunakan oleh mikroba rumen untuk sintesis pemanjangan asam lemak rantai cabang, seperti yang dilaporkan oleh Vlaeminck *et al*. (2006). Dikatakan bahwa ada hubungan antara kandungan asam lemak rantai cabang pada bakteri yang meninggalkan rumen (asam lemak rantai C_{13}-C_{17}) dengan konsentrasi proporsi *volatile fatty acids.* Fenomena tersebut menegaskan kembali bahwa untuk pertumbuhan bakteri rumen dibutuhkan berbagai nutrien yang cocok dan tepat, sehingga keseimbangan nutrien di dalam cairan rumen perlu diperhatikan agar tidak kekurangan maupun kelebihan. Penambahan asam lemak volatil bercabang sebanyak 0,05 mM kurang mencukupi kebutuhan untuk perkembangan bakteri rumen, suplementasi sebesar itu baru sebatas untuk pemanjangan rantai asam lemak pada bakteri rumen maupun pada protozoa.

Kesimpulan

Potensi asam lemak volatil bercabang yang ditambahkan pada pakan sebesar 0,05 mM kurang kuat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri rumen. Suplementasi asam lemak volatil bercabang sebesar 0,05 mM baru sebatas untuk pemanjangan rantai asam lemak pada mikroba rumen.

Daftar Pustaka

Bach A, S Calsamiglia, and MD Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci*. 88(E. Suppl.): E9-E21.

Benchaar C, HV Petit, R Berthiaume, DR Ouellet, J Chiquette, and PY Chouinard. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk Production, and milk composition in dairy cows fed Alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci*. 90(2): 886-897.

DiLorenzo N, F Diez-Gonzalez, and A DiCostanzo. 2006. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. *J. Anim. Sci*. 84(8): 2178-2185.

Erwanto. 1995. Optimalisasi Sistem Fermentasi Rumen Melalui Suplementasi Sulfur, Defaunasi, Reduksi Emisi Metan dan Stimulasi Pertumbuhan Mikroba pada Ternak Ruminansia. [Disertasi]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Gorosito AR, JB Russell, and PJ Van Soest. 1985. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on digestion of plant cell wall in vitro. *J.Dairy Sci*. 68(4): 840-847.

Ipharraguerre IR, JH Clark, and DE Freeman. 2005. Varying protein and starch in the diet of dairy cows. I. Effects on ruminal fermentation and intestinal supply of nutrients. *J. Dairy Sci*. 88(7): 2537-2555.

Lapierre H, D Pacheco, R Berthiaume, DR Ouellet, CG Schwab, P Dubreuil, G Holtrop, and GE Lobley. 2006. What is the true supply of amino acids for a dairy cow? *J. Dairy Sci*. 89(E. Suppl.1): E1-E14.

Or-Rashid MM, NE Odongo, and BW McBride. 2007. Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid, vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. *J. Anim. Sci*. 85(5): 1228-1234.

Russell JB and CJ Sniffen. 1984. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria in vitro. *J.Dairy Sci*. 67(5): 987-994.

Scholljegerdes EJ, TR Weston, PA Ludden, BW Hess. 2005. Supplementing a ruminally undegradable protein supplement to maintain essential amino acid supply to the small intestine when forage intake is restricted in beef cattle. *J. Anim. Sci*. 83(9): 2151-2161.

Soofi R, GC Fahey Jr, LL Berger, and FC Hinds. 1982. Effect of branched chain volatile fatty acids, Trypticase,® urea, and starch on in vitro dry matter disappearance of soybean stover. *J.Dairy Sci*. 65(9): 1748-1753.

Steel RGD dan JH Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistik Suatu Pendekatan Biometrik. Terjemahan oleh Sumantri B. Principles and Procedures of Statistics. PT. Gramedia Utama, Jakarta.

Sullivan HM, JK Bernard, and HE Amos. 2005. Ruminal fermentation and amino acid flow in Holstein steers fed whole cottonseed with elevated concentrations of free fatty acids in the oil. *J. Dairy Sci.* 88(2): 690-697.

Suryahadi. 1990. Penuntun Praktikum Ilmu Nutrisi Ruminansia. PAU Ilmu Hayat, IPB, Bogor.

Vlaeminck B, V Fievez, S Tamminga, RJ Dewhurst, A van Vuuren, D De Brabander, and Demeyer. 2006. Milk odd-and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *J.Dairy Sci*. 89(10): 3954-3964.

Volden H. 1999. Effects of level of feeding and ruminally undegraded protein on ruminal bacterial protein synthesis, escape of dietary protein intestinal amino acid profile, and performance of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 77: 1905-1918.

Yang CMJ. 2002. Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides. *J.Dairy Sci*. 5(5): 1183-1190.