

Proteksi Protein Indigofera dengan Ekstrak Tanin Kondensasi Daun Sengon terhadap Produksi Gas Metan

Rahmi Dianita, Muhammad Anjasman, Afzalani, R. A. Muthalib, dan Raguati

*Fakultas Peternakan Universitas Jambi, Jambi
 Corresponding author: afzalani@unj.ac.id*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas dari tannin kondensasi dari ekstrak daun sengon dalam memproteksi protein tepung *Indigofera zollingeriana* (TIZ) yang dilihat dari gas total dan produksi gas metan yang dihasilkan secara *in vitro*. Penelitian dilaksanakan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan empat ulangan. Perlakuan yang diterapkan terdiri dari P₀ = TIZ + 0% tanin kondensasi (TK), P₂ = TIZ + 0,5% TK, P₃ = TIZ + 1% TK, P₄ = TIZ + 1,5% TK, P₅ = TIZ + 2% TK. Peubah yang diamati terdiri dari total gas, gas metan, karbondioksida (CO₂) dan pH. Hasil penelitian menunjukkan proteksi protein TIZ dengan TK dari ekstrak daun sengon, berpengaruh nyata ($P < 0,05$) menurunkan produksi total gas, gas metan ($P < 0,05$), dan meningkatkan gas karbondioksida (CO₂) ($P < 0,05$) serta nyata, ($P < 0,05$) berpengaruh terhadap pH. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa proteksi TIZ dengan TK dari ekstrak daun sengon pada taraf 1% efektif menurunkan total produksi gas dan gas metan

Kata kunci: *gas metan, Indigofera zollingeriana, proteksi protein, tanin kondensasi*

Protection of Indigofera Protein with Condensed Tannin Extract of Sengon Leaves on Methane Gas Production

ABSTRACT

This study aims to determine the effectiveness of condensed tannin from sengon leaf extract in protecting *Indigofera zollingeriana* (TIZ) flour protein as seen from the total gas and methane gas production produced *in vitro*. The research was conducted using a completely randomised design (CRD) with 5 treatments and 4 replications. The treatments consisted of P₀ = TIZ + 0% condensed tannin (CT), P₂ = TIZ + 0.5% CT, P₃ = TIZ + 1% CT, P₄ = TIZ + 1.5% CT, P₅ = TIZ + 2% CT. The observed variables were total gas, methane gas, carbon dioxide (CO₂), and pH. The results showed that the protection of TIZ protein with CT from sengon leaf extract, significantly ($P < 0.05$) decreased the production of total gas, methane gas ($P < 0.05$), and increased carbon dioxide gas (CO₂) ($P < 0.05$) and significantly ($P < 0.05$) affected the pH. It can be concluded that the protection of TIZ with CT from sengon leaf extract at the 1% level effectively reduces total gas production and methane gas.

Key words: *condensed tannin, Indigofera zollingeriana, protein protection, methane gas*

PENDAHULUAN

Peternakan merupakan sektor yang sangat penting dalam menyediakan sumber protein hewani. Seiring dengan perkembangan sektor peternakan terdapat beberapa kendala terkait dengan produksi metan dari ternak ruminansia oleh *Archaea metanogen* yang berada di saluran pencernaan ternak, khususnya di rumen. Sekitar 28% emisi gas metana antropogenik berasal dari ternak ruminansia (Beauchemin, *et al.* 2008). Proporsi konsentrat dalam ransum dengan kandungan serat kasar rendah akan mempengaruhi

produksi gas metan (Duthie *et al.*, 2017).

Tepung daun *Indigofera zollingeriana* (*I. zollingeriana*) merupakan sumber *green concentrate*, dengan kandungan protein mencapai 27-31% dan kecernaan protein 75-87% serta memiliki komposisi asam amino dengan skor 24,56, hampir mendekati skor asam amino bungkil kedele (Abdullah, 2010; Palupi *et al.*, 2014). Namun demikian, protein *I. zollingeriana* memiliki karakteristik degradasi yang tinggi di rumen dilihat dari produksi ammonia mencapai 15,37 – 23,97 mg/dl pada taraf suplementasi 10 – 30% dari bahan kering pakan (Afzalani *et al.*,

2021). Protein *I. zollingeriana* memiliki ketahanan yang rendah terhadap degradasi oleh mikroba di rumen. Ketika perombakan protein pakan berlebihan, akibatnya efisiensi pemanfaatannya untuk produksi menurun tajam dan sejumlah besar hilang sebagai N feses, urin, dan gas N yang dapat menyebabkan efek negatif terhadap lingkungan dan menyebabkan meningkatnya biaya dan efisiensi protein yang rendah (Bach *et al.*, 2005; Ruzic-Music *et al.*, 2014). Tingginya tingkat degradasi protein dari tepung daun *I. zollingeriana* di rumen menyebabkan protein *I. zollingeriana* perlu diproteksi untuk mengurangi degradasinya di rumen, sehingga dapat digunakan lebih efisien.

Salah satu upaya dalam menurunkan produksi metan ternak ruminansia yaitu dengan menggunakan senyawa metabolit sekunder tanin dari tanaman seperti sengon (*Paraserieathes falcataria*). Kandungan nutrisi dari daun sengon dapat mensuplai kebutuhan protein mikroba dan ternak. Kandungan protein tepung daun sengon (TDS) mencapai 16,98% serta diduga mengandung tanin yang cukup tinggi (Afzalani *et al.*, 1998). Tanin kondensasi merupakan komponen metabolismik sekunder yang berperan dalam modulasi fermentasi di rumen, berikatan dengan protein dan menguranginya dari degradasi di rumen serta mampu memperbaiki efisiensi penggunaan protein (Avila *et al.*, 2020). Pemberian leguminosa kaya tanin dapat berefek positif maupun negatif, bergantung struktur kimia, konsentrasi dalam pakan, dan spesies ternak. Efek negatif tanin dalam pakan ternak terutama dapat menurunkan kecernaan karbohidrat dan nitrogen maupun kinerja produksi (Waghorn, 2008). Sebaliknya, pada konsentrasi optimum, tanin dalam pakan dapat meningkatkan kecernaan pakan dan mengendalikan parasit dalam saluran pencernaan, sehingga mendorong peningkatan kinerja produksi (Piluzza *et al.*, 2014). Penggunaan daun sengon sebagai suplementasi pakan diharapkan dapat memberikan dua manfaat, yakni tanin yang terdapat pada daun sengon dapat mengendalikan produksi gas metan. Berdasarkan uraian di atas penelitian ini sangat perlu dilakukan karena bertujuan untuk mempelajari efek proteksi *Indigofera zollingeriana* dengan tanin kondensasi dari daun sengon terhadap produksi gas dan gas metan secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Peternakan, Universitas Jambi dan pengambilan cairan rumen dilaksanakan di Rumah Potong Hewan, Kota Jambi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tepung daun sengon (TDS), tepung daun *I. zollingeriana*, cairan rumen sapi, larutan McDougall, alkohol, gas CO₂, H₂SO₄ 15%, NaOH 0,5 N, NaOH 10 N, HCl 0,5 N, indicator PP 1% dan aquades. Alat yang digunakan untuk mempersiapkan sampel ekstrak TDS yaitu mesin penggiling, saringan dan oven serta seperangkat peralatan untuk analisis *in vitro*.

Prosedur penelitian

Pembuatan ekstrak tanin kondensasi (TK) daun sengon dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama yaitu daun sengon dikeringkan dalam oven suhu 60°C, digiling halus dengan saringan berukuran 1 mm. Kemudian daun sengon yang sudah halus dimasukkan ke dalam beaker glass dan ditambahkan dengan metanol 95% dengan perbandingan 1:3 (100 g sampel: 300 ml methanol: w/v) dan dimerasi selama 12 jam. Setelah 12 jam, dilakukan penyaringan dengan kain dan ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat selanjutnya dikeringkan dalam oven suhu 40°C, guna diperoleh kristal tanin. Kadar ekstrak tanin dihitung berdasarkan bobot sampel kering oven 60°C ekstrak dengan menggunakan persamaan :

Tahap kedua yaitu dilakukan proses proteksi protein dari daun *I. zollingeriana* sebagai sumber protein bypass menggunakan tanin kondensasi dari daun sengon sebanyak 0%, 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2% dari berat kering (BK) sampel tepung daun *I. zollingeriana* yang diperoleh berdasarkan perhitungan bobot kering ekstrak tanin tepung daun sengon terhadap bobot kering tepung daun *I. zollingeriana* (% b/b BK) sehingga berat ekstrak daun sengon yang digunakan secara berturut – turut yaitu 0 g, 1,95 g, 3,90 g, 5,85 g, dan 7,80 g per 100g tepung *I. zollingeriana* (Afzalani *et al.*, 2022). Penambahan tanin pada tepung daun *I. zollingeriana* dilakukan dengan cara melarutkan tanin dengan aquades, lalu disemprotkan ke sampel menggunakan sprayer, diaduk hingga bercampur secara homogen kemudian dikering udaraikan.

Air dipanaskan hingga suhunya mencapai 39°C kemudian dimasukkan ke dalam termos. Hal ini dilakukan untuk mempertahankan suhu termos tetap 39°C. Cairan rumen diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Dinas Peternakan dan Ketahanan Pangan Kota Jambi. Untuk mendapatkan cairan rumen, bolus diambil terlebih dahulu dalam rumen sapi, kemudian bolus diperas dan disaring dengan menggunakan dua lapis kain kasa ke dalam termos. Sebelum itu, air di dalam termos dibuang terlebih dahulu. Cairan rumen dibawa ke Laboratorium Fakultas Peternakan Universitas Jambi. Cairan rumen

disaring kembali dengan menggunakan empat lapis kain kasa ke dalam labu ukur kapasitas 1000 ml lalu diletakkan ke dalam waterbath suhu 39-40°C dan dialirkan CO₂ untuk menjaga kondisi tetap anaerob.

Pelaksanaan inkubasi berdasarkan prosedur Tilley and Terry (1963). Fermentasi dilakukan dalam botol serum 100 ml. Sampel dimasukkan ke dalam botol serum sebanyak 1 g sebagai substrat sesuai dengan perlakuan. Campuran cairan rumen dan larutan McDoughall ditambahkan dengan perbandingan 1:4 (v/v) sebanyak 40 ml dan dialirkan gas CO₂. Perlakuan blanko dibuat pada botol serum yang hanya berisi cairan rumen dan larutan blanko tanpa substrat. Semua perlakuan diulang 5 kali. Kemudian sampel diinkubasikan dalam incubator selama periode waktu 3, 6, 9, 12, 24, 48 jam pada suhu 39°C. pH diperlakukan pada kisaran 6,8-7,0. Setiap botol serum diinjeksi dengan syringe melalui karet penutup untuk mengeluarkan gas sebagai titik awal dimulainya inkubasi. Pengukuran produksi gas dilakukan di setiap periode waktu inkubasi. Setelah diinkubasi selama 48 jam, kemudian fermentasi dihentikan menggunakan es batu, lalu pengukuran pH dilakukan.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini didesain menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari lima perlakuan dan empat ulangan. Perlakuan yang dilakukan disusun sebagai berikut:

$$P_0 = I. zollingeriana + 0\% \text{ tanin kondensasi (TK)}$$

$$P_1 = I. zollingeriana + 0,5\% \text{ tanin kondensasi (TK)}$$

$$P_2 = I. zollingeriana + 1 \% \text{ tanin kondensasi (TK)}$$

$$P_3 = I. zollingeriana + 1,5\% \text{ tanin kondensasi (TK)}$$

$$P_4 = I. zollingeriana + 2 \% \text{ tanin kondensasi (TK)}$$

Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah fermentabilitas rumen berupa, produksi gas total, gas metan, dan pengukuran pH.

Pengamatan produksi gas dilakukan pada jam ke-3, 6, 9, 12, 24 dan 48 jam dengan menyuntikan Hypodermic Glass Syringe pada penutup karet botol serum. Pada produksi gas diamati dengan melihat perubahan

skala yang ada pada syringe. Total produksi gas dihitung setelah dikoreksi dengan blanko. Untuk mempermudah perhitungan tersebut, maka digunakan program NEWAY. Profil produksi gas kumulatif dihitung menggunakan model Ørskov dan McDonald (1979).

Pengukuran produksi gas metana dilakukan dengan metode trapping CH₄ modifikasi Afzalani *et al.* (2017) menggunakan larutan NaOH 4 M. 400 ml NaOH dimasukkan ke dalam washing gas bottle (DuranTM) kapasitas 500 ml. Gas hasil pengukuran menggunakan syringe, selanjutnya dimasukkan ke dalam saluran in-let selang pada washing gas dengan cara mendorong piston syringe dengan melewati larutan NaOH untuk menangkap gas CO₂, dan pada saluran out-let dipasang glass syringe untuk mengukur gas metana yang tidak diserap oleh larutan NaOH.

Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter yang dilakukan pada akhir inkubasi dengan menggunakan elektroda dari pH meter. Kemudian nilai dibaca pada monitor pH meter

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis ragam (ANOVA). Apabila perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) maka dilanjutkan dengan Uji Duncan's Multiple Range Test.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian proteksi protein *Indigofera* dengan ekstrak tanin kondensasi daun sengon terhadap profil gas dan gas metan secara *in vitro* tercantum pada Tabel 1.

Produksi gas total

Pengukuran produksi gas fermentasi pakan di rumen dapat digunakan sebagai dasar untuk menilai kualitas pakan dan fermentabilitas pakan oleh mikroba rumen. Mitsumori and Sun (2008) menyatakan bahwa bakteri dan protozoa rumen memanfaatkan karbohidrat sebagai sumber energi dengan merombaknya menjadi VFA, CH₄, CO₂ dan H₂. Semakin meningkat produksi gas fermentasi pakan menunjukkan semakin meningkatnya jumlah protein pakan yang dapat didegradasi oleh mikroba rumen.

Tabel 1. Efek Proteksi Protein *I. zollingeriana* dengan Ekstrak TK dari Daun Sengon terhadap Total Gas, Gas Metan (CH₄), CO₂ dan pH

Parameter	Perlakuan					SEM	p-value
	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄		
Total Gas (ml)	98,67 ^a	77,05 ^b	70,10 ^c	70,38 ^c	76,20 ^b	1,312	<0,000
CH ₄ (ml)	43,55 ^a	38,65 ^b	35,90 ^c	36,95 ^c	36,55 ^c	0,632	<0,000
CO ₂ (ml)	17,25 ^b	12,50 ^{cd}	11,75 ^d	13,50 ^c	23,250 ^a	0,446	<0,000
pH	6,89 ^c	6,97 ^b	6,98 ^b	7,03 ^{ba}	7,03 ^a	0,220	<0,002

Keterangan:

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata ($P < 0,05$)

Hasil pengukuran produksi gas total selama 48 jam dapat dilihat pada Tabel 1. Analisis ragam menunjukkan proteksi protein TIZ dari TDS nyata ($P<0,05$) berpengaruh menurunkan produksi gas total. Tabel 1 menunjukkan gas total yang dihasilkan Po yang tidak diberikan tanin cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain, sedangkan perlakuan P2 (1% TK) lebih rendah dibandingkan dengan yang lain. Menurut Makkar *et al.* (2007) keberadaan tanin pada taraf tertentu dapat mengurangi produksi gas dalam sistem *in vitro*, karena interaksi tanin dengan komponen-komponen pakan yang berkontribusi terhadap produksi gas khususnya protein dan serat. Selain itu, penurunan produksi gas total disebabkan oleh pengaruh tanin dalam menghambat kinerja enzim yang dihasilkan oleh mikroba (Wiyono *et al.*, 2017).

Produksi gas metan

Gas metana terbentuk di rumen akibat reduksi CO_2 oleh H_2 yang dikatalis enzim dari bakteri metanogenensis (Raguati *et al.*, 2018). Tabel 1 menunjukkan hasil analisis ragam proteksi protein TIZ dari TDS berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap persentase gas metan. Jika dilihat dari rasio gas metan yang dihasilkan dari jumlah gas total, terlihat perlakuan P2 (1% TK) menunjukkan persentase gas metan lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Beberapa laporan menunjukkan bahwa proteksi hijauan yang kaya tanin mereduksi metan yang dihasilkan di rumen, karena tanin bersifat sebagai antimetanogenik serta berperan dalam menghambat protozoa (Hristov *et al.*, 2013).

Produksi karbondioksida (CO_2)

Karbondioksida (CO_2) termasuk kelompok gas rumah kaca yang juga dihasilkan melalui proses fermentasi pakan di rumen. Hasil pengukuran karbondioksida (CO_2) (Tabel 1) selama 48 jam yaitu berkisar antara 11,750 – 23,250 ml. Analisis ragam menunjukkan proteksi protein TIZ dari TDS nyata ($P<0,05$) berpengaruh terhadap produksi karbondioksida (CO_2). Produksi karbondioksida (CO_2) perlakuan P4 nyata ($P<0,05$) lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Kondisi ini terjadi disebabkan karena pada perlakuan P4 gas CO_2 tidak banyak yang digunakan dalam proses reduksi H_2 menjadi gas metan oleh metanobakteria. Disamping itu, kemungkinan terjadi perubahan pola produk fermentasi di rumen dengan proporsi asam propionat yang meningkat dan asam asetat yang menurun. Menurut Thalib (2008) pembentukan gas metana di dalam rumen terjadi melalui proses reduksi CO_2 oleh H_2 yang dikatalisis oleh enzim yang dihasilkan oleh bakteri metanogenik. Sementara itu, Monteny *et al.* (2006) menyatakan

bahwa tanin dapat berperan dalam merubah produk fermentasi di rumen dimana terjadi peningkatan proporsi asam propionat dan penurunan proporsi asam asetat.

Nilai pH

Kondisi pH di rumen, merupakan faktor yang berpengaruh terhadap proses fermentasi pakan oleh mikroba rumen. Nilai pH rumen dari hasil pengukuran pH rumen (Tabel 1) berkisar 6,98-7,03. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan proteksi protein dari *I. zollingeriana* menggunakan TK dari ekstrak daun sengon nyata ($P>0,05$) mempengaruhi nilai pH rumen. Nilai pH yang diperoleh masih berada pada batas pH yang ideal untuk aktivitas mikroba di rumen (Van Soest, 1994), dan pH di atas 6,0 yang dibutuhkan untuk sintesis protein mikroba (Russell *et al.*, 1992). Disamping itu, beberapa hasil penelitian menunjukkan senyawa tanin kondensasi yang terdapat pada ekstrak maupun pada hijauan, lebih berperan dalam membentuk ikatan kompleks dengan makro molekul seperti protein maupun dengan karbohidrat, serta tidak menyebabkan terjadinya perubahan nilai pH rumen (Cieslak *et al.*, 2014; Afzalani *et al.*, 2022). Dehority (2004) menyatakan tidak berpengaruhnya pH rumen disebabkan karena bekerjanya sistem buffer yang ditambahkan dalam proses fermentasi *in vitro*. Hal ini sejalan dengan yang dinyatakan Afzalani *et al.* (2023) dimana buffer rumen yang ditambahkan berfungsi sebagai pengatur kestabilan pH selama proses fermentasi yang berlangsung.

SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa proteksi TIZ dengan tanin kondensasi (TK) dari ekstrak daun sengon pada taraf 1% efektif menurunkan produksi gas dan gas metan fermentasi di rumen.

Untuk penelitian ini perlu dilakukan kajian lebih lanjut untuk melihat efek implementasi penggunaan *I. zollingeriana* terproteksi tanin kondensasi (TK) pada ternak ruminansia dilihat dari performan dan kualitas produk yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, L., and Suharlina. 2010. Herbage yield and quality of two vegetative parts of *Indigofera* at different times of first regrowth defoliation. Jurnal Media Peternakan. 33 (1): 44-49.
- Afzalani, R. Dianita, S. Apriani, Raguati, R.A. Muthalib, dan E. Musnandar. 2023. Optimalisasi produksi protein mikroba rumen melalui suplementasi ek-

- strak tepung daun sengon (*Albizia falcata*) yang mengandung tanin kondensasi. *Jurnal Agripet* 23 (1): 107-113.
- Afzalani, A., R.A. Muthalib, R. Dianita, F. Hoesni, R. Raguati, dan E. Musnandar. 2021. Evaluasi suplementasi *Indigofera zollingeriana* sebagai sumber green protein concentrate terhadap produksi gas metan, amonia dan sintesis protein mikroba rumen. *Jurnal Ilmiah Universitas Batanghari Jambi* 21(3); 1455-1461
- Afzalani, A., R.A. Muthalib, R. Raguati, E. Syahputri, L. Suhaza, dan E. Musnandar. 2022. Supplemental effect of condensed tannins from sengon leaves (*Albizia falcata*) on *in vitro* gas and methane production. *J Anim. Plant. Sci.* 32, 1513–1520. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2022.6.0559>
- Afzalani, T. Kaswari, dan A. Yani. 1998. Kajian berbagai sumber protein pakan berdasarkan ketahannya terhadap degradasi oleh mikroba rumen. Laporan Penelitian. Kerjasama Universitas Jambi dengan Bagian Pembinaan Kelembagaan Penelitian dan Pengembangan Pertanian/ARM-II Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Avila, A.S., M.A. Zambom, A. Faccenda, M.L. Fischer, F.A. Anschau, T. Venturini, R.C.R. Tinini, J.G. Dessbesel, dan A.P. Faciola. 2020. Effects of black wattle (*Acacia mearnsii*) condensed tannins on intake, protozoa population, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in Jersey steers. *Animals* 10(6), 1011.
- Bach, A., S. Calsamigli, dan M.D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J Dairy Sci* 88, E9–E21.
- Beauchemin, K.A., M. Kreuzer, F. O’ara, dan T.A. McAllister . 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48(2): 21–27
- Cieslak, A., P. Zmor, E. Pers-Kamczyc, A. Stochmal, A. Sadowinska, A.Z.M. Salem, D. Kowalczyk, P. Zbonik, M. Szumacher-Strabel. 2014. Effects of two sources of tannins (*Quercus L.* and *Vaccinium vitis idaea L.*) on rumen microbial fermentation: an *in Vitro* Study. *Ital. J. Anim. Sci.* 13: 3133.
- Dehority. dan Tirabasso. 2001. Effect of feeding frequency on bacterial and fungal concentrations, pH, and other parameters in the rumen dalam Syahrir S, K.G. Wiryawan, A. Parakkasi, M. Winugroho, dan O.N.P. Sari. 2009. Efektivitas daun *Murbei* sebagai pengganti konsentrat dalam sistem rumen *in vitro*. *media peternakan*. 32:2. 112-119.
- Duthie, C. A., M. Haskell, J.J. Hyslop, A. Waterhouse, R.J. Wallace, R. Roehe, & J.A. Rooke. 2017. The impact of divergent breed types and diets on methane emissions, rumen characteristics, and performance of finishing beef cattle. *animal*, 11(10), 1762-1771.
- Hristov, A.N., A. Bannink, L.A. Crompton, P. Huhtanen, M. Kreuzer, M. McGee, P. Nozière, C.K. Reynolds, A.R. Bayat, D.R. Yáñez-Ruiz, J. Dijkstra, E. Kebreab, A. Schwarm, K.J. Shingfield, Z. Yu. 2019. Invited review: nitrogen in ruminant nutrition: a review of measurement techniques. *J Dairy Sci* 102, 5811–5852.
- Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Journal of Small Ruminant Research*. 49:241–256
- Mitsumori, M., W. Sun. 2008. Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 21 (1): 144-154.
- Monteny G.J., A. Bannink, D. Chadwick. 2006. Strategi pengurangan gas rumah kaca untuk peternakan. *Pertanian, Ekosistem dan Lingkungan*, 112 (2–3):163–170. doi: 10.1016/j.agee.2005.08.015
- Palupi, R., L. Abdullah, D. A Astuti, dan Sumiati. 2014. Potensi dan pemanfaatan tepung pucuk *Indigofera* sp. sebagai bahan pakan substitusi bungkil kedelai dalam ransum ayam petelur. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 19(3); 210-219
- Pilizza, G., L. Sulas, S. Bullitta. 2014. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science*.
- Raguati, Afzalani, E. Musnandar. 2018. Penggunaan probiotik dari kulit nenas sebagai sumber pakan tambahan untuk ternak ruminansia. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan* 21, 110–120.
- Russell, J. B., J. D. O’Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Rumen fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3551-3561.
- Ružić-Muslić, D., M.P. Petrović, M.M. Petrović, Z. Bijelić, V. Caro-Petrović, N. Maksimović, V. Mandić. 2014. Protein sources in diets for ruminant nutrition. *J. Biotechnology in Animal Husbandry* 30 (2): 175-184
- Thalib, A., Y. Widiawati, dan B. Haryanto. 2010. Penggunaan complete rumen modifier (CRM) pada ternak domba yang diberi hijauan pakan berserat tinggi. *JITV*. 15:97-104.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 147, 116–139.