

Penentuan Aktivitas Biologis Tanin Beberapa Hijauan secara *in Vitro* Menggunakan 'Hohenheim Gas Test' dengan Polietilen Glikol Sebagai Determinan

A. Jayanegara^a & A. Sofyan^b

^aDepartemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, e-mail: anu_jayanegara@yahoo.com

^bBagian Pakan dan Nutrisi Ternak, Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia LIPI
(Diterima 12-09-2007; disetujui 17-01-2008)

ABSTRACT

Leaves from trees are alternative source of forage for ruminant's feed. However, most of the leaves contain high concentration of phenolic compounds, especially in the form of tannins. This experiment was aimed at quantifying biological activity of tannins using *in vitro* gas production method without and with the addition of polyethylene glycol (PEG). The leaves used in this experiment was *Salix alba*, *Rhus typhina* and *Peltiphyllum peltatum*. Several rumen fermentation variables, such as organic matter digestibility (OMD), metabolizable energy (ME) and total VFA production were measured. The results showed that crude protein, NDF and hemicellulose contents of *S. alba* leaves were the highest, while there was no difference in ADF content from the others. Biological activity of tannins in *S. alba*, *R. typhina* and *P. peltatum* were 0.7%, 45.7% and 122.6%, respectively. There was a significant correlation between total phenols and tannins' biological activity ($r=0.70$; $P<0.05$), whereas no significant correlation was found for total tannins and condensed tannins. It was concluded that the addition of PEG increased *in vitro* gas production, organic matter digestibility, metabolizable energy and total VFA production after 24 hours incubation period.

Key words: tannins, PEG, in vitro, fermentation, Hohenheim gas test

PENDAHULUAN

Salah satu penyebab rendahnya produktivitas ternak ruminansia di negara tropis seperti Indonesia adalah kurang memadainya kuantitas maupun kualitas pakan yang diberikan. Dedaunan yang berasal dari pohon merupakan salah satu alternatif yang dapat dijadikan sumber hijauan makanan ternak (HMT), khususnya di musim kemarau

pada saat produksi HMT konvensional dari jenis rerumputan dan leguminosa rendah. Namun demikian kebanyakan dedaunan tersebut mengandung senyawa fenolik dalam konsentrasi yang tinggi, khususnya dalam bentuk senyawa tanin (Makkar & Becker, 1998).

Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman. Tanin tergolong

senyawa polifenol dengan karakteristiknya yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan makromolekul lainnya. Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin yang mudah terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin yang mudah terhidrolisis merupakan polimer *gallic* atau *ellagic acid* yang berikatan ester dengan sebuah molekul gula, sedangkan tanin terkondensasi merupakan polimer senyawa flavonoid dengan ikatan karbon-karbon (Waghorn & McNabb, 2003; Westendarp, 2006).

Kemampuan tanin untuk membentuk kompleks dengan protein berpengaruh negatif terhadap fermentasi rumen dalam nutrisi ternak ruminansia. Tanin dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme rumen dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim (Smith *et al.*, 2005). Tanin juga dapat berinteraksi dengan protein yang berasal dari pakan dan menurunkan ketersediaannya bagi mikroorganisme rumen (Tanner *et al.*, 1994). Keberadaan tanin di sisi lain berdampak positif jika ditambahkan pada pakan yang tinggi akan protein baik secara kuantitas maupun kualitas. Hal ini disebabkan protein yang berkualitas tinggi dapat terlindungi oleh tanin dari degradasi mikroorganisme rumen sehingga lebih tersedia pada saluran pencernaan pasca rumen. Kompleks ikatan tanin-protein kemudian dapat lepas pada pH rendah di abomasum dan protein dapat didegradasi oleh enzim pepsin sehingga asam-asam amino yang dikandungnya tersedia bagi ternak. Hal ini menjadikan tanin sebagai salah satu senyawa untuk memanipulasi tingkat degradasi protein dalam rumen.

Analisis senyawa tanin sangat diperlukan untuk mengkuantifikasi keberadaan dan aktivitas tanin pada HMT serta pengaruhnya terhadap ternak ruminansia. Beberapa metode analisis tanin yang tersedia diantaranya adalah menggunakan spektrofotometer (Inoue & Hagerman, 1988; Hartzfeld *et al.*, 2002), HPLC (Makkar, 2003) dan metode kapasitas presipitasi protein (Hoffmann *et al.*, 2002).

Analisis aktivitas tanin yang mudah dan sederhana sangat diperlukan khususnya bagi negara-negara berkembang. Salah satu analisis aktivitas tanin yang mudah dan sederhana adalah melalui inaktivasi tanin menggunakan polietilen glikol (PEG) yang efeknya diukur melalui produksi gas kumulatif secara *in vitro* (Makkar, 2005; Bueno *et al.*, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mengukur aktivitas biologis tanin tanpa atau dengan penambahan PEG pada dedaunan dari tumbuhan *Salix alba*, *Rhus typhina* dan *Peltiphyllum peltatum*. Selain itu, diamati pula pengaruh penambahan PEG terhadap beberapa peubah fermentasi rumen secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: dedaunan dari tumbuhan *S. alba*, *R. typhina* dan *P. peltatum*; medium inkubasi cairan rumen-buffer dengan komposisi 630 ml larutan buffer bikarbonat, 315 ml larutan mineral makro, 0,16 ml larutan mineral mikro, 1,6 ml larutan 0,4% resazurin, 945 ml air terdestilasi, 60 ml larutan pereduksi dan 660 ml cairan rumen (Makkar *et al.*, 1995); polietilen glikol (PEG; bobot molekul 6000, Merck No. 817007); tabung *in vitro*; dan *water bath*.

Metode

Inkubasi *in vitro*. Sampel hijauan dikeringkan dalam oven bersuhu 60 °C, digiling dan disaring menggunakan alat penyaring berukuran 1 mm. Sampel diinkubasi *in vitro* berdasarkan metode Menke *et al.* (1979) yang dimodifikasi oleh Blümmel *et al.* (1997). Sebanyak 380 mg sampel diinkubasikan ke dalam medium berupa cairan rumen-buffer dengan dan tanpa adanya PEG. Cairan rumen diambil pada pagi hari dari sapi Friesian Holstein berfistula sebelum diberi makan. Setelah koleksi, cairan rumen dibawa ke laboratorium, disaring dengan saringan

nilon berukuran 100 μm dan ditambahkan pada buffer tereduksi. Larutan rumen-buffer dijenuhkan dengan gas CO_2 selama 10 menit sebelum dimasukkan ke dalam tabung untuk menjamin kondisi anaerob dalam reaksi. Sampel dimasukkan ke dalam tabung dan ditutup dengan piston yang telah dilubrikasi dengan vaselin. Sebanyak 40 ml cairan rumen-buffer dimasukkan ke dalam masing-masing tabung, kemudian tabung segera dimasukkan ke dalam *water bath* bersuhu 39 °C. Produksi gas diamati pada jam ke-0, 4, 8 12 dan 24 setelah dilakukan inkubasi.

Rancangan percobaan dan analisis data. Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 3×2 dengan jenis hijauan sebagai faktor pertama dan penambahan PEG sebagai faktor kedua. Masing-masing perlakuan dilakukan ulangan sebanyak 3 kali. Perlakuan yang diujikan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Perlakuan 1: *S. alba*
- Perlakuan 2: *S. alba* + PEG (750 mg)
- Perlakuan 3: *R. typhina*
- Perlakuan 4: *R. typhina* + PEG (750 mg)
- Perlakuan 5: *P. peltatum*
- Perlakuan 6: *P. peltatum* + PEG (750 mg)

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah: (1) komposisi nutrisi hijauan, (2) kandungan tanin hijauan (total fenol, total tanin dan tanin terkondensasi), (3) produksi gas kumulatif, (4) aktivitas biologis tanin, (5) pencernaan bahan organik (KBO), (6) energi metabolis (EM), dan (7) kandungan asam lemak terbang total (volatile fatty acids; VFA). Komposisi nutrisi hijauan dianalisis menggunakan analisis proksimat dan serat Van Soest (Van Soest & Robertson, 1985). Kandungan total fenol dan total tanin dianalisis menggunakan metode Folin-Ciocalteu, sedangkan kandungan tanin terkondensasi dianalisa menggunakan metode butanol-HCl (Makkar, 2003). Aktivitas biologis tanin ditentukan berdasarkan peningkatan produksi gas *in vitro* dengan atau tanpa PEG pada waktu

fermentasi 24 jam. Kecernaan bahan organik dan energi metabolis ditentukan berdasarkan persamaan hasil eksperimen Menke *et al.* (1979) pada 24 jam setelah inkubasi berikut:

$$\text{KBO (\%)} = 4,88 + 0,889 \text{ Gas} + 0,45 \text{ PK} + 0,0651 \text{ Abu}; r^2=0,92$$

$$\text{EM (MJ/kg BK)} = 2,20 + 0,136 \text{ Gas} + 0,057 \text{ PK}; r^2=0,94$$

(data energi metabolis dikonversi dari satuan MJ/kg BK menjadi kkal/kg BK)

Produksi gas *in vitro* yang diukur setelah inkubasi 24 jam sangat berkorelasi secara stoikiometri dengan produksi total VFA, serta berinteraksi secara statistik dengan ada atau tidaknya PEG (Getachew *et al.*, 2000). Oleh karena itu kandungan total VFA didapatkan dari persamaan dengan atau tanpa adanya PEG berikut:

$$\text{VFA (mmol; tanpa PEG)} = 0,0239 \text{ Gas} - 0,0601; r^2=0,953$$

$$\text{VFA (mmol; dengan PEG)} = 0,0207 \text{ Gas} + 0,0207; r^2=0,925$$

(data produksi total VFA dikonversi dari satuan mmol menjadi mM)

Data yang dihasilkan kemudian diuji secara statistik menggunakan sidik ragam (analysis of variance; ANOVA) dan jika perlakuan berpengaruh nyata maka dilakukan uji Tukey (Steel & Torrie, 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Nutrien dan Kandungan Tanin Hijauan

Hasil analisis komposisi nutrisi hijauan berdasarkan analisis proksimat dan analisis serat Van Soest diperlihatkan pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 di atas terlihat bahwa kandungan protein kasar *S. alba* paling tinggi dibandingkan dua jenis hijauan lainnya. Demikian pula dengan kandungan NDF-nya

Tabel 1. Hasil analisis komposisi nutrisi hijauan (%BK)

Peubah	<i>S. alba</i>	<i>R. typhina</i>	<i>P. peltatum</i>
Bahan kering	94,2	93,9	94,0
Bahan organik	90,4	92,2	88,2
Abu	9,0	7,3	11,1
Protein kasar	16,9	14,0	11,3
Lemak kasar	1,7	5,6	2,0
NDF	32,2	22,0	19,1
ADF	18,5	17,4	18,3
Hemiselulosa	13,7	4,6	0,8

paling tinggi. Kandungan ADF ketiga hijauan relatif tidak jauh berbeda. Ini menunjukkan bahwa kandungan hemiselulosa, substrat yang mudah difermentasi dalam rumen, pada *S. alba* tinggi secara relatif yang didapatkan dari hasil pengurangan NDF oleh ADF. Komposisi ini berbeda dengan Moore *et al.* (2003) yang melaporkan bahwa kandungan protein kasar, NDF dan ADF dari *Salix* sp. secara berurutan adalah 11,3%, 47,4% dan 34,3%. Perbedaan komposisi nutrisi yang terdapat dalam hijauan dapat bervariasi dikarenakan perbedaan varietas, kondisi lingkungan di mana tanaman tersebut tumbuh, dan umur hijauan tersebut saat dipanen.

Kandungan total fenol dan total tanin hijauan memperlihatkan urutan: *R. typhina* > *P. peltatum* > *S. alba* (Tabel 2). Meskipun kandungan total fenol dan total tanin pada *R. typhina* paling tinggi dibandingkan hijauan lainnya, namun kandungan tanin terkondensasinya paling rendah. Ini mengindikasikan bahwa bentuk tanin yang dominan terdapat pada hijauan ini adalah jenis tanin terhidrolisis. *S. alba* mengandung total fenol dan total tanin yang relatif rendah, dengan proporsi tanin terkondensasi yang cukup tinggi. Berdasarkan komposisi nutrisi dan kandungan tanin di atas, maka *S. alba* merupakan hijauan yang paling potensial dikembangkan sebagai hijauan makanan ternak alternatif dibandingkan dengan *R. typhina* ataupun *P. peltatum*.

Hal ini diperkuat oleh penelitian Pitta *et al.* (2007), McWilliam *et al.* (2005) dan Moore *et al.* (2003) yang mengamati potensi *Salix* sp. sebagai suplemen hijauan ternak ruminansia pada musim kemarau di Selandia Baru.

Produksi Gas *in Vitro* dan Aktivitas Biologis Tanin

Pola peningkatan produksi gas dari ketiga jenis dedaunan yang difermentasi selama 24 jam ditunjukkan pada Gambar 1. Gas yang dihasilkan pada metode ini berasal dari fermentasi substrat secara langsung (CO₂ dan CH₄) dan berasal dari produksi gas secara tidak langsung melalui mekanisme *buffering* VFA yakni berupa gas CO₂ yang dilepaskan dari buffer bikarbonat yang diproduksi selama proses fermentasi (Getachew *et al.*, 1998). Laju produksi gas *in vitro* pada semua perlakuan semakin berkurang seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi. Hal ini disebabkan substrat yang dapat difermentasi juga semakin berkurang jumlahnya. Berkurangnya jumlah substrat yang dapat difermentasi selama masa inkubasi kemudian berdampak pada laju produksi VFA yang semakin berkurang, sebagai indikasi menurunnya ketersediaan energi bagi ternak ruminansia (Hungate, 1966; Jayanegara *et al.*, 2006).

Produksi gas ketiga hijauan tanpa

Tabel 2. Kandungan total fenol, total tanin dan tanin terkondensasi pada hijauan (%BK)

Hijauan	Total fenol ^a	Total tanin ^a	Tanin terkondensasi ^b
<i>S. alba</i>	5,65	3,55	1,45
<i>R. typhina</i>	22,16	20,93	0,08
<i>P. peltatum</i>	20,00	14,68	1,57

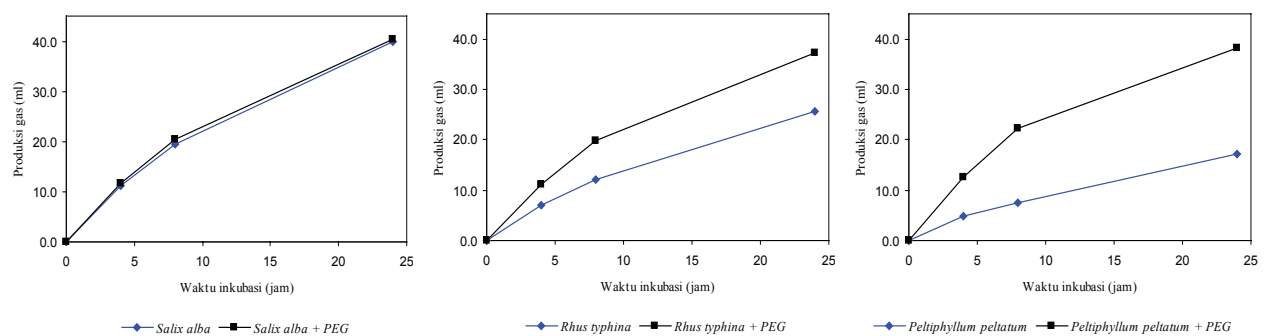
Keterangan: ^a sebagai ekuivalen *tannic acid*; ^b sebagai ekuivalen *leucocyanidin*

penambahan PEG memperlihatkan pola yang sangat berbeda antara satu dengan yang lainnya (Gambar 1). *S. alba* menghasilkan laju produksi gas yang tertinggi, kemudian diikuti oleh *R. typhina* dan *P. peltatum*. Hasil ini sangat unik mengingat kandungan ADF ketiga jenis hijauan relatif sama. ADF merupakan fraksi yang sulit didegradasi dan difermentasi oleh mikroba rumen (Reeves, 1985) sehingga jika kandungan ADF-nya sama maka produksinya pun diperkirakan sama. Ini menunjukkan bahwa ada senyawa lain dalam hijauan *R. typhina* dan *P. peltatum* yang berperan dalam menghambat fermentasi rumen.

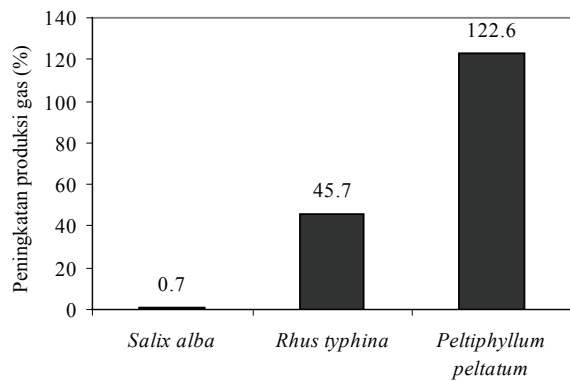
Produksi gas ketiga hijauan ketika dilakukan penambahan PEG memperlihatkan pola yang sama, dan pada 24 jam setelah fermentasi menghasilkan produksi gas kumulatif sekitar 40 ml. PEG merupakan polimer sintetik non nutritif yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap senyawa fenolik, khususnya tanin, sehingga dapat

menginaktivasi tanin dengan cara membentuk kompleks tanin-PEG (Garrido *et al.*, 1991; Makkar *et al.*, 1995; Getachew *et al.*, 2001). Oleh karena kapasitasnya yang spesifik dalam mengikat tanin, penambahan PEG dapat membebaskan ikatan makromolekul lainnya dengan tanin. Tidak berbedanya kandungan ADF ketiga hijauan dan telah diikatnya tanin oleh PEG, maka produksi gas yang dihasilkan relatif sama untuk ketiga jenis hijauan yang diujikan.

Produksi gas ketiga hijauan memiliki respon yang berbeda ketika ditambahkan PEG dari respon awalnya (tanpa ditambahkan PEG). Peningkatan produksi gas dari *S. alba*, *R. typhina* dan *P. peltatum* ketika ditambahkan PEG secara berurutan adalah 0,7%, 45,7% dan 122,6% (Gambar 2). Nilai ini juga menunjukkan aktivitas biologis tanin karena PEG yang ditambahkan hanya berinteraksi dan mengikat tanin, tidak dengan makromolekul lainnya seperti karbohidrat,



Gambar 1. Produksi gas *in vitro* *Salix alba*, *Rhus typhina* dan *Peltiphyllum peltatum* dengan/tanpa penambahan PEG



Gambar 2. Aktivitas biologis tanin pada *Salix alba*, *Rhus typhina* dan *Peltiphyllum peltatum*

protein maupun lemak. Aktivitas biologis tanin dapat ditentukan dengan melihat perbedaan antara perlakuan yang ditambahkan PEG dan perlakuan yang tidak ditambahkan PEG (Makkar, 2005; Bueno *et al.*, 2008). Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas biologis tanin dari *P. peltatum* paling tinggi jika dibandingkan dengan *R. typhina*, sedangkan *S. alba* hampir tidak menunjukkan aktivitas tanin. Respon ini sesuai dengan Muetzel & Becker (2006) yang melaporkan bahwa kandungan dan aktivitas biologis tanin pada *S. alba* sangat rendah, setelah dikonfirmasi dengan menggunakan beberapa metode analisis tanin.

Namun demikian hubungan antara kandungan tanin hijauan (total fenol, total tanin dan tanin terkondensasi) belum tentu linier dengan aktivitas biologis tanin. Pada penelitian ini hubungan yang linier secara signifikan hanya didapatkan dari peubah total fenol dengan aktivitas biologis tanin ($r=0,70$; $p<0,05$), sedangkan total tanin ($r=0,51$) dan tanin terkondensasi ($r=0,22$) tidak signifikan pada taraf $\alpha=5\%$. Hal ini disebabkan karena struktur tanin sangat kompleks serta sangat bervariasi antara hijauan yang satu dengan hijauan yang lainnya. Khusus untuk kandungan taninterkondensasi, Makkar (2003) menyatakan bahwa kandungan tanin terkondensasi yang dianalisis berdasarkan metode butanol-

HCl tidak merefleksikan aktivitas biologis tanin. Hal tersebut didasarkan pada beberapa eksperimen yang menunjukkan rendahnya korelasi antara keduanya. Aktivitas biologis tanin tersebut dianalisa menggunakan metode kapasitas presipitasi protein. Jayanegara *et al.* (2008) melaporkan bahwa terdapat korelasi yang sangat kuat dan signifikan ($r=-0,99$; $p<0,001$) antara aktivitas biologis tanin dengan konsentrasi gas metan dalam total produksi gas, sedangkan kandungan total fenol, total tanin dan tanin terkondensasi memperlihatkan korelasi yang lemah dan tidak signifikan. Ini menunjukkan bahwa aktivitas biologis tanin hijauan dalam rumen lebih memiliki arti secara fisiologis pada ternak ruminansia dibandingkan dengan hanya kandungan taninnya dalam hijauan.

Kecernaan Bahan Organik, Energi Metabolis dan Produksi Total VFA

Produksi total VFA yang dihasilkan dari ketiga jenis hijauan baik dengan atau tanpa PEG berkisar antara 8-22 mM (Tabel 3), sangat rendah jika dibandingkan dengan produksi VFA di rumen yang dapat mencapai 150 mM. Total VFA dalam rumen yang dihasilkan dari hijauan berkisar 50-100 mM dan konsentrat berkisar 80-150 mM (Owens & Goetsch, 1988), sedangkan dari jagung dapat mencapai 156 mM (Sharp *et al.*, 1982). Nilai produksi VFA rumen yang lebih tinggi dibandingkan total VFA secara *in vitro* lebih disebabkan pada sistem fermentasi rumen yang bersifat *continuous*, sehingga memungkinkan mikroba rumen beradaptasi terhadap pakan yang diberikan serta lebih mampu dalam mendegradasi pakan (Owens & Goetsch, 1988). Produk fermentasi pada teknik *in vitro* dengan sistem tertutup terakumulasi dalam sistem, sehingga dapat berdampak negatif terhadap aktivitas mikroba rumen.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara faktor hijauan dan faktor penambahan PEG pada peubah KBO, EM

Tabel 3. Efek penambahan PEG pada *S. alba*, *R. typhina* dan *P. peltatum* terhadap peubah KBO, EM dan total VFA

Hijauan	PEG (mg)	KBO (%)	EM (kkal/kg BK)	Total VFA (mM)
<i>S. alba</i>	0	58,6 ± 0,53 ^{de}	2055,2 ± 18,9 ^{cd}	22,4 ± 0,34 ^d
<i>S. alba</i>	750	58,9 ± 2,62 ^e	2064,3 ± 96,2 ^d	21,4 ± 1,53 ^{cd}
<i>R. typhina</i>	0	44,4 ± 0,40 ^b	1546,3 ± 13,9 ^b	13,8 ± 0,25 ^b
<i>R. typhina</i>	750	54,8 ± 1,12 ^{cd}	1925,7 ± 41,8 ^c	19,8 ± 0,67 ^c
<i>P. peltatum</i>	0	35,9 ± 1,56 ^a	1235,8 ± 57,8 ^a	8,7 ± 1,06 ^a
<i>P. peltatum</i>	750	54,5 ± 1,04 ^c	1918,0 ± 37,9 ^c	20,2 ± 0,60 ^{cd}

Keterangan: superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

dan total VFA (P<0,05). Hal ini menunjukkan bahwa respon penambahan PEG sangat bergantung pada jenis hijauan yang diujikan. Kecuali pada *S. alba*, penambahan PEG terlihat meningkatkan secara nyata (P<0,05) KBO, EM dan produksi total VFA. Peningkatan ini lebih nyata terjadi pada *P. peltatum* dibandingkan dengan *R. typhina*. Meningkatnya nilai ketiga peubah tersebut dengan penambahan PEG disebabkan terbebasnya makromolekul dari tanin dikarenakan tanin berikatan dengan PEG yang afinitasnya lebih kuat dibandingkan nutrien dalam hijauan (Makkar *et al.*, 1995). Berdasarkan hal tersebut nutrien seperti karbohidrat, protein dan lemak dapat lebih didegradasi dan lebih tersedia bagi mikroba rumen yang kemudian berkontribusi bagi peningkatan KBO, EM dan total VFA.

Khusus pada *S. alba*, penambahan PEG tidak nyata dalam mempengaruhi perubahan peubah KBO, EM dan total VFA dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan PEG. Hal ini disebabkan kandungan dan aktivitas biologis tanin pada *S. alba* sangat rendah (Muetzel & Becker, 2006) sehingga ketika tanin diinaktivasi oleh PEG, kontribusinya terhadap perubahan ketiga peubah yang diamati juga tidak nyata. Berdasarkan data di atas maka dapat disimpulkan bahwa *S. alba* memiliki keunggulan komparatif dibandingkan dengan *R. typhina* dan *P. peltatum*, yakni dengan karakteristiknya yang tinggi kandungan

protein kasar, tinggi hemiselulosa dan rendah kandungan serta aktivitas biologis taninnya.

KESIMPULAN

Kandungan protein kasar dan NDF *S. alba* paling tinggi dibandingkan dengan *R. typhina* dan *P. peltatum*, sedangkan kandungan ADF-nya relatif tidak berbeda. Kandungan tanin (total fenol dan total tanin) dan aktivitas biologis tanin *S. alba* sangat rendah berdasarkan metode produksi gas *in vitro* tanpa dan dengan penambahan PEG, sehingga *S. alba* memiliki keunggulan komparatif dibandingkan dua hijauan lainnya. Kandungan total fenol hijauan berkorelasi signifikan dengan aktivitas biologis tanin, sedangkan kandungan total tanin dan tanin terkondensasi tidak menunjukkan korelasi yang signifikan. Metode penentuan aktivitas senyawa antinutrien tanin berdasarkan produksi gas *in vitro* merupakan metode yang mudah, cepat dan sederhana sehingga dapat diterapkan secara luas khususnya di negara berkembang seperti Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. K. Becker dan Prof. H.P.S. Makkar dari University of Hohenheim-Germany atas bimbingannya, dan kepada Dr. Myint Wynn, Dr. Gunjan Goel dan Mr.

Hermann Baumgärtner atas bantuannya secara teknis selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Blümmel, M., H. Steingass & K. Becker.** 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and N-15 incorporation and its applications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Bri. J. Nutr.* 77: 911-921.
- Bueno, I.C.S., D.M.S.S. Vitti, H. Louvandini & A.L. Abdalla.** 2008. A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* Volume 141: 153-170.
- Garrido, A., A. Gomez-Cabrera, J.E. Guerrero & J.M. van der Meer.** 1991. Effects of treatment with polyvinylpyrrolidone and polyethylene glycol on Faba bean tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 35: 199-203.
- Getachew, G., M. Blümmel, H.P.S. Makkar & K. Becker.** 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.
- Getachew, G., H.P.S. Makkar & K. Becker.** 2000. Stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production in presence and absence of polyethylene glycol for tannin containing browses. EAAP Satellite Symposium, Gas production: fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity, 18-19 August, Wageningen, The Netherlands.
- Getachew, G., H.P.S. Makkar & K. Becker.** 2001. Method of polyethylene glycol application to tannin-containing browses to improve microbial fermentation and efficiency of microbial protein synthesis from tannin-containing browses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 92: 51-57.
- Hartzfeld, P.W., R. Forkner, M.D. Hunter, & A.E. Hagerman.** 2002. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1785-1790.
- Hoffmann, E.M., S. Muetzel & K. Becker.** 2002. A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feed. *Br. J. Nutr.* 87: 421-426.
- Hungate, R.E.** 1966. *The Rumen and Its Microbes.* Academic Press, New York.
- Inoue, K.H. & A.E. Hagerman.** 1988. Determination of gallotannins with rhodanine. *Anal. Biochem.* 169: 363-369.
- Jayanegara, A., A.S. Tjakradidjaja & T. Sutardi.** 2006. Fermentabilitas dan pencernaan *in vitro* ransum limbah agroindustri yang disuplementasi kromium anorganik dan organik. *Med. Pet.* 29 : 54-62.
- Jayanegara, A., H.P.S. Makkar & K. Becker.** 2008. Methane reduction potential of tannins-containing plants using an *in vitro* rumen fermentation system. *Proc. Soc. Nutr. Physiol, Goettingen, Germany,* 17: 159.
- Makkar, H.P.S., M. Blümmel & K. Becker.** 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone and polyethylene glycol with tannins and their implications in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *Brit. J. Nutr.* 73: 897-913.
- Makkar, H.P.S. & K. Becker.** 1998. Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity? *Agroforestry Syst.* 40: 59-68.
- Makkar, H.P.S.** 2003. *Quantification of Tannin in Tree and Shrub Legumes; A Laboratory Manual.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Makkar, H.P.S.** 2005. Use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on tanniniferous tree foliage: achievements, result implications, and future research. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122: 3-12.
- McWilliam, E.L., T.N. Barry, N. Lopez-Villalobos, P.N. Cameron & P. D. Kemp.** 2005. Effect of willow (*Salix*) versus poplar (*Populus*) supplementation on the reproductive performance of ewes grazing low quality drought pasture during mating. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119: 69-86.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz & W. Schneider.** 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.* 93: 217-222.
- Moore, K. M., T.N. Barry, P.N. Cameron, N. Lopez-Villalobos & D. J. Cameron.** 2003.

- Willow (*Salix* sp.) as a supplement for grazing cattle under drought conditions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104: 1-11.
- Muetzel, S. & K. Becker.** 2006. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 125: 139-149.
- Owens, F. N. & A. L. Goetsch.** 1988. Ruminal fermentation. In: Church, D.C. (Ed). *The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Pitta, D.W., T.N. Barry, N. Lopez-Villalobos, & P.D. Kemp.** 2007. Willow fodder blocks – an alternate forage to low quality pasture for mating ewes during drought? *Anim. Feed Sci. Technol.* 133: 240-258.
- Reeves, J.B.** 1985. Lignin composition and *in vitro* digestibility of feeds. *J. Anim. Sci.* 60:316-322.
- Sharp, W.M., R.R. Johnson & F.N. Owens.** 1982. Ruminal VFA production with steers fed whole or ground corn grain. *J. Anim. Sci.* 55 : 1505-1514.
- Smith, A.H., E. Zoetendal, & R.I. Mackie.** 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb. Ecol.* 50 : 197-205.
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie.** 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. McGraw-Hill, New York.
- Tanner, G.J., A.E. Moore & P.J. Larkin.** 1994. Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 74: 947-958.
- Van Soest, P.J. & J.B. Robertson.** 1985. Analysis of forage fibrous. *A Laboratory Manual for Animal Science*. Vol. 613. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Waghorn, G.C. & W.C. McNabb.** 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 62 : 383-392.
- Westendarp, H.** 2006. Effects of tannins in animal nutrition. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 113: 264-268.