

## **Emisi Metana dan Fermentasi Rumen *in Vitro* Ransum Hay yang Mengandung Tanin Murni pada Konsentrasi Rendah**

### ***In Vitro* Methane Emission and Rumen Fermentation of Hay Diet Contained Purified Tannins at Low Concentration**

**A. Jayanegara<sup>a b \*</sup>, H. P. S. Makkar<sup>a</sup>, & K. Becker<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Institute for Animal Production in the Tropics and Subtropics (480b)  
University of Hohenheim, Fruwirthstrasse 12, 70593 Stuttgart, Germany

<sup>b</sup> Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor  
Jln. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680  
(Diterima 19-01-2009; disetujui 28-02-2009)

#### **ABSTRACT**

This experiment was conducted to study the effects of addition of purified tannins at low concentration into hay diet on *in vitro* gas emission and rumen fermentation. Treatments consisted of: P0 (control hay), P1 (hay + 0.5 mg chestnut tannin/ml of incubation medium), P2 (hay + 0.5 mg/ml mimosa tannin), P3 (hay + 0.5 mg/ml quebracho tannin) and P4 (hay + 0.5 mg/ml sumach tannin). Variables measured were gas production kinetics, organic matter digestibility (OMD), methane production, expressed as percent methane in total gas and methane production per unit organic matter digested, and volatile fatty acid (VFA) production. The results showed that in most cases tannin addition at 0.5 mg/ml decreased significantly ( $P < 0.05$ ) total and rate of gas production, OMD, total VFA and iso-VFA. Tannin addition also decreased methane production ( $P < 0.05$ ). Hydrolysable tannins seemed to have better methane reduction effect than condensed tannins. The best tannin to decrease methane was chestnut tannin, which contained hydrolysable tannins. Present research should be shifted from evaluating only the effect of condensed tannins in reducing methane emission towards some potential hydrolysable tannins since the nature and the toxicity of hydrolysable tannins are quite diverse.

*Key words: methane, tannin, rumen, in vitro, hay*

#### **PENDAHULUAN**

Ruminansia menghasilkan gas metana ( $\text{CH}_4$ ) yang berkontribusi terhadap akumulasi gas rumah kaca di atmosfer. Produksi gas

metana dari ternak ruminansia berkontribusi terhadap 95% dari total emisi metana yang dihasilkan oleh ternak dan manusia, dan sekitar 18% dari total gas rumah kaca di atmosfer (Kreuzer & Soliva, 2008). Emisi metana ini tidak hanya terkait dengan masalah lingkungan, namun juga merefleksikan hilangnya sebagian energi dari ternak sehingga tidak dapat diman-

---

\* Korespondensi:  
e-mail: anu\_jayanegara@yahoo.com

faatkan untuk proses produksi. Sekitar 6%-10% dari energi bruto pakan ternak ruminansia hilang sebagai metana (Jayanegara, 2008a). Oleh karena itu perlu dikembangkan strategi pemberian pakan yang dapat mereduksi emisi metana ternak ruminansia yang bermanfaat, baik jangka panjang dalam mengurangi laju akumulasi gas rumah kaca, maupun jangka pendek dalam mengurangi kehilangan energi ternak.

Tanin atau polifenol merupakan senyawa metabolit sekunder alami yang terdapat pada tanaman dan sangat prospektif untuk digunakan dalam menurunkan emisi metana yang dihasilkan oleh ternak ruminansia. Beberapa studi telah melaporkan bahwa pemberian hijauan mengandung tanin pada ruminansia dapat mengurangi emisi metana, baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Pinares-Patino *et al.*, 2003; Woodward *et al.*, 2004; Puchala *et al.*, 2005; Jayanegara *et al.*, 2008b). Namun demikian pada penelitian-penelitian tersebut, pengurangan emisi metana juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti berubahnya komposisi dan kualitas hijauan sehingga efek yang muncul tidak hanya berasal dari tanin.

Jenis pakan berkadar serat rendah telah terbukti dapat menurunkan emisi metana per unit jumlah pakan yang dikonsumsi (Johnson & Johnson, 1995; Beauchemin & McGinn, 2005). Senyawa nutrisi lainnya seperti lemak atau minyak juga mempengaruhi produksi metana dalam rumen (Fievez *et al.*, 2003). Berdasarkan hasil-hasil penelitian tersebut, efektivitas tanin yang terdapat pada hijauan dalam menurunkan emisi metana dari ternak ruminansia masih dipertanyakan. Oleh karena itu, senyawa-senyawa lain yang dapat menurunkan metana dalam penelitian ini diabaikan melalui penggunaan tanin yang dipurifikasi sehingga efek yang muncul diharapkan hanya berasal dari penambahan tanin tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pengaruh penambahan tanin murni dari beberapa jenis sumber tanaman, yakni *chestnut* (*Castanea* sp.), mimosa (*Mimosa* sp.), *quebracho* (*Schinopsis* sp.), dan *sumach* (*Rhus typhina*) terhadap peubah-peubah emisi

metana dan fermentasi rumen secara *in vitro*. *Chestnut* dan *sumach* merupakan sumber tanin yang mudah terhidrolisis, sedangkan mimosa dan *quebracho* merupakan sumber tanin terkondensasi (Jayanegara, 2008c). Penambahan tanin murni dilakukan pada konsentrasi yang rendah, yakni 0,5 mg tanin dalam setiap ml cairan buffer rumen (0,5 mg/ml). Diharapkan pada konsentrasi rendah, tanin tidak berefek negatif terhadap produksi gas dan pencernaan pakan, namun dapat menurunkan emisi metana sebagai fokus tujuan dari penelitian ini.

## MATERI DAN METODE

### Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini: hay yang berasal dari rumput lapang, sumber tanin yang berasal dari *chestnut*, mimosa, *quebracho* dan *sumach*, serta medium inkubasi cairan buffer rumen (Makkar *et al.*, 1995).

### Metode

**Pemurnian tanin.** Pemurnian tanin dilakukan dengan menggunakan kolom Sephadex LH-20 berdasarkan metode yang dimodifikasi dari Makkar & Becker (1994). Serbuk *chestnut*, mimosa, dan *quebracho* yang telah mengalami proses pengeringan dan penggilingan (masing-masing sebanyak 1 g) dilarutkan dalam 40 ml air terdestilasi yang mengandung 0,1% asam askorbat (dilakukan dalam gelas beaker), diaduk selama 15 menit dan kemudian ditambahkan 40 ml metanol. Khusus untuk *sumach* tanin dilakukan ekstraksi terlebih dahulu. Sebanyak 1 g *sumach* dilarutkan dalam 50 ml metanol 50% dan dimasukkan ke dalam *ultra-sonic water bath* pada daya 135 W (Branson 3210, Connecticut, USA) selama 25 menit, dilakukan sebanyak 2 kali secara berurutan untuk menghindari adanya tanin yang tidak terekstrak. Supernatan dari 2 kali ekstraksi digabungkan dan disentrifugasi pada 10.000 g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dari ekstrak *chestnut*, mimosa, *quebracho* dan

*sumach* kemudian dilewatkan pada Sephadex LH-20 yang disiapkan menggunakan larutan metanol 50%. Tanin yang terikat pada komponen Sephadex LH-50 dicuci menggunakan larutan metanol 50% sebanyak 5 kali dari volume Sephadex LH-50 untuk menghilangkan komponen-komponen selain tanin. Tanin kemudian dielusikan dengan menggunakan pelarut yang lebih kuat yakni aseton 70%. Aseton diupkan dalam vakum pada suhu 30°C dan ekstrak tanin murni diliofilisasi, dilarutkan kembali dalam air terdestilasi, dan digunakan sebagai perlakuan pada inkubasi *in vitro*.

**Inkubasi *in vitro*.** Sampel hay sebagai substrat dasar inkubasi dikeringkan dalam oven bersuhu 60°C, digiling dan disaring menggunakan alat penyaring berukuran 1 mm. Sampel kemudian 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 buffer rumen. Komposisi medium inkubasi cairan buffer rumen terdiri atas 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. 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 buffer rumen dijenuhkan untuk menjamin kondisi anaerob dalam reaksi dengan gas CO<sub>2</sub> selama 10 menit sebelum dimasukkan ke dalam tabung. Sampel dimasukkan ke dalam tabung dan ditutup dengan piston yang telah dilubrikasi oleh vaselin. Larutan tanin dalam air terdestilasi diinjeksikan ke dalam tabung *in vitro* melalui selang pada saluran keluar sehingga didapatkan konsentrasi tanin dalam sistem sebanyak 0,5 mg tanin/ml medium inkubasi buffer rumen. Sebanyak 30 ml cairan buffer rumen dimasukkan ke dalam masing-masing tabung, dan tabung segera dimasukkan ke dalam *water bath* bersuhu 39 °C.

**Rancangan percobaan dan peubah yang diamati.** Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 jenis kombinasi perlakuan dan jumlah ulangan 2-3 untuk setiap perlakuan (RAL dengan ulangan tidak sama). Susunan lengkap perlakuan yang diujikan dalam penelitian ini sebagai berikut:

P0 = Hay tanpa penambahan tanin (kontrol)

P1 = Hay + 0,5 mg/ml *chestnut* tanin

P2 = Hay + 0,5 mg/ml mimosa tanin

P3 = Hay + 0,5 mg/ml *quebracho* tanin

P4 = Hay + 0,5 mg/ml *sumach* tanin

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah: (1) produksi gas kumulatif dan kinetika produksi gas, (2) produksi gas metana, (3) kandungan VFA (volatile fatty acids) individu dan total, serta (4) pencernaan bahan organik (KBO).

**Produksi gas: akumulasi dan persamaan kinetika.** Produksi gas diamati pada jam ke-0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 dan 24 setelah dilakukan inkubasi melalui pembacaan manual pada skala yang terdapat pada tabung dan piston. Kinetika produksi gas didekati melalui persamaan eksponensial yang digagas oleh Orskov & McDonald (1979) berikut:

$$p = a + b(1 - e^{-ct})$$

dengan p adalah produksi gas kumulatif pada waktu t jam, sedangkan a, b dan c merupakan konstanta dari persamaan eksponensial tersebut. Konstanta a, b dan c dapat diinterpretasikan sebagai produksi gas dari fraksi yang mudah larut (a), produksi gas dari fraksi yang tidak larut namun dapat difermentasikan (b) dan laju reaksi pembentukan gas (c). Dengan demikian a + b dapat diartikan sebagai produksi gas maksimum yang dapat terbentuk selama proses fermentasi pada waktu t mendekati tak terhingga. Penghitungan konstanta persamaan eksponensial dilakukan dengan *curve fitting program* pada MS Excel menggunakan metode Neway (Orskov & McDonald, 1979).

**Penentuan kandungan gas metana.** Kandungan gas metana diukur pada waktu 24 jam setelah inkubasi menggunakan *infrared methane analyzer* (Pronova Analysentechnik GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) yang dikalibrasi dengan gas metana murni berkadar 10,6% (Goel *et al.*, 2008). Saluran keluar dari tabung *in vitro* dimasukkan ke dalam saluran masuk dari *methane analyzer* setelah dilakukan pengamatan terhadap volume gas total. Data yang diperoleh berupa persentase kandungan metana dalam kandungan gas total.

**Analisis kandungan VFA individu dan total.** Analisis kandungan VFA dilakukan menurut metode Hoeltershinken *et al.* (1997). Sebanyak 1 ml volume cairan rumen dipipet ke dalam tabung eppendorf berkapasitas 1,5 ml setelah 24 jam waktu inkubasi, dan disimpan pada wadah berisi pecahan es batu untuk menghentikan proses fermentasi. Sampel kemudian disentrifugasi (30.000 g, 10 menit, 4 °C), supernatan dan residu dipisahkan. Sebanyak 630 µl supernatan ditransfer ke dalam tabung eppendorf yang lain dan ke dalamnya ditambahkan 70 µl standar internal berupa asam metilvalerat, yakni komponen asam lemak rantai pendek yang tidak terdapat dalam rumen secara natural. Sampel disimpan selama satu malam dalam refrigerator bersuhu 4 °C untuk mengendapkan protein yang terlarut.

Sebanyak 500 µl sampel ditransfer ke dalam tabung gelas berukuran 1,5 ml (VWR/Merck 548-0003) untuk dilakukan analisis VFA individu menggunakan GC (GC 14A, Shimazu Corp., Kyoto, Japan) dengan kolom berisi 10% SP<sup>TM</sup>-1000, 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Chromosorb WAW (Suppelco Inc. Bellafonte, PA, USA). Kuantifikasi VFA individu dilakukan dengan cara membandingkan kurva yang dihasilkan dengan kurva dari standar eksternal, terdiri atas VFA individu yang telah diketahui konsentrasinya. Satuan VFA individu yang diperoleh adalah dalam µmol/ml atau mM. Kandungan total VFA dan total iso-VFA didapatkan melalui penjumlahan masing-masing VFA individu penyusunnya.

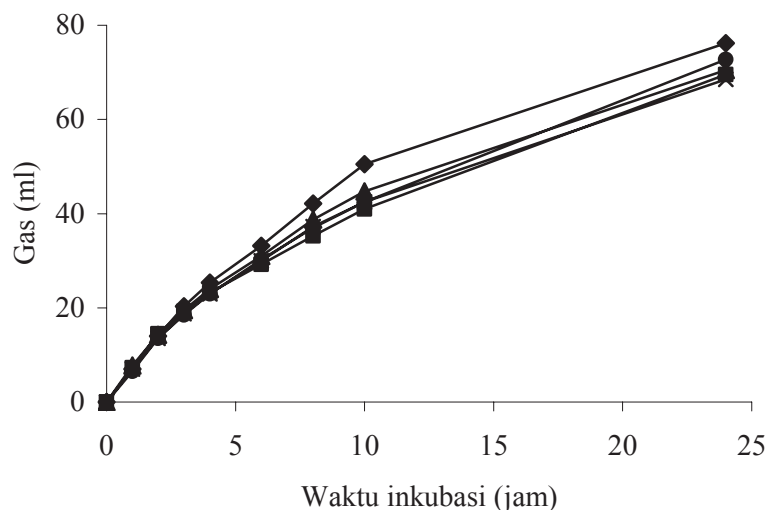
**Penentuan kecernaan bahan organik (KBO).** Setelah 24 jam inkubasi, residu pakan dalam tabung dikeluarkan dan dicampurkan dengan larutan detergen netral, ditransfer ke dalam cawan, dibilas, dikeringkan dan diabukan. Nilai kecernaan bahan organik (KBO) didapatkan melalui selisih kandungan bahan organik awal sebelum inkubasi dan setelah inkubasi, proporsional terhadap kandungan bahan organik sebelum inkubasi tersebut (Blümmel *et al.*, 1997).

**Analisis statistik.** Data yang dihasilkan dari percobaan di atas dianalisa secara statistik menggunakan analisis ragam (analysis of variance, ANOVA) dan jika terdapat perbedaan nyata di antara perlakuan maka dilakukan uji fischer (Steel & Torrie, 1980). Analisis data dilakukan menggunakan software statistik STATISTICA versi 6.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kinetika Produksi Gas

Kurva produksi gas selama 24 jam waktu inkubasi terdapat pada Gambar 1. Secara umum produksi gas semakin meningkat seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi. Gas yang dihasilkan pada metode ini berasal dari fermentasi substrat secara langsung (CO<sub>2</sub> dan CH<sub>4</sub>) dan berasal dari produksi gas secara tidak langsung melalui mekanisme *buffering* VFA yakni berupa gas CO<sub>2</sub> yang dilepaskan dari buffer bikarbonat yang diproduksi selama proses fermentasi (Getachew *et al.*, 1998). Laju produksi gas *in vitro* pada semua perlakuan semakin berkurang 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).



Gambar 1. Produksi gas kumulatif perlakuan P0 (-◆-), P1 (-■-), P2 (-▲-), P3 (-×-) dan P4 (-●-) selama 24 jam waktu inkubasi. P0=hay tanpa penambahan tanin (kontrol); P1=hay + 0,5 mg/ml tanin *chestnut*; P2=hay + 0,5 mg/ml tanin mimosa; P3=hay + 0,5 mg/ml tanin *quebracho*; P4=hay + 0,5 mg/ml tanin *sumach*.

Produksi gas total selama inkubasi 24 jam serta koefisien kinetika produksi gas berdasarkan persamaan eksponensial Orskov & McDonald (1979), yakni produksi gas maksimum (a + b) dan laju produksi gas (c) ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Produksi gas antar perlakuan masih terlihat sama (Gambar 1) hingga 4 jam waktu inkubasi. Mulai jam ke-6 waktu inkubasi, perlakuan kontrol yakni hay tanpa penambahan tanin terlihat lebih tinggi produksi gasnya dibandingkan dengan

perlakuan penambahan tanin, yang berarti bahwa penambahan tanin pada 0,5 mg/ml mengurangi produksi gas. Perlakuan penambahan jenis tanin yang berbeda tidak menghasilkan profil produksi gas yang berbeda selama waktu inkubasi 24 jam. Penambahan tanin pada hay menurunkan produksi total gas secara nyata pada waktu inkubasi 24 jam ( $P < 0,05$ ), kecuali tanin yang berasal dari *sumach* (P4). Laju produksi gas (koefisien c) juga menurun pada penambahan tanin dari *chestnut* dan *sumach*

Tabel 1. Kinetika produksi gas dan emisi metana ( $\text{CH}_4$ ) ransum hay yang mengandung tanin murni konsentrasi rendah

Peubah		Perlakuan					SEM
		P0	P1	P2	P3	P4	
Gas <sub>24jam</sub>	(ml)	76,2 <sup>b</sup>	69,5 <sup>a</sup>	70,5 <sup>a</sup>	68,5 <sup>a</sup>	72,8 <sup>ab</sup>	1,040
a + b	(ml)	88,7	86,8	82,7	81,5	92,0	1,560
c	(ml/jam)	0,082 <sup>c</sup>	0,065 <sup>ab</sup>	0,078 <sup>bc</sup>	0,076 <sup>abc</sup>	0,064 <sup>a</sup>	0,003
$\text{CH}_4$	(ml)	12,0 <sup>b</sup>	9,7 <sup>a</sup>	10,2 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>	0,290
$\text{CH}_4$	(%)	14,7 <sup>c</sup>	13,3 <sup>a</sup>	13,8 <sup>b</sup>	13,9 <sup>b</sup>	13,5 <sup>ab</sup>	0,170
$\text{CH}_4/\text{KBO}$	(ml/100 mg)	5,07 <sup>c</sup>	4,37 <sup>a</sup>	4,58 <sup>ab</sup>	4,44 <sup>ab</sup>	4,65 <sup>b</sup>	0,088

Keterangan: superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ); P0=hay tanpa penambahan tanin (kontrol); P1=hay + 0,5 mg/ml tanin *chestnut*; P2=hay + 0,5 mg/ml tanin mimosa; P3=hay + 0,5 mg/ml tanin *quebracho*; P4=hay + 0,5 mg/ml tanin *sumach*; a + b=produksi gas maksimum; c=laju produksi gas; KBO=kecernaan bahan organik.

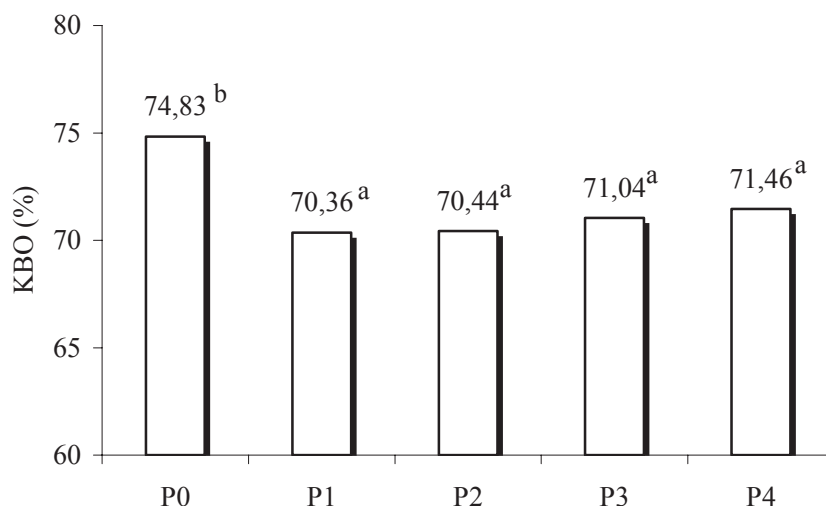
( $P < 0,05$ ), namun tidak berbeda nyata pada penambahan tanin dari mimosa dan *quebracho*. Produksi gas maksimum (koefisien  $a + b$ ) tidak berbeda nyata pada semua perlakuan (Tabel 1).

Keberadaan tanin dapat mengurangi produksi gas dalam sistem fermentasi *in vitro* karena interaksi tanin dengan komponen-komponen pakan yang berkontribusi terhadap produksi gas, khususnya protein dan serat (Makkar, 2003; Makkar *et al.*, 2007). Dengan terhambatnya degradasi protein dan serat mengakibatkan terhambatnya produksi gas yang merupakan hasil samping dari proses fermentasi nutrisi pada pakan. Respon yang serupa didapatkan oleh Getachew *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa penambahan tanin dalam bentuk asam tanat dan asam galat menurunkan laju produksi gas *in vitro*. Sementara itu Hervas *et al.* (2000) melaporkan bahwa penambahan asam tanat menurunkan produksi gas maksimum (koefisien  $a + b$ ). Pada penelitian ini penambahan semua jenis tanin murni tidak berpengaruh terhadap produksi gas maksimum, yang berbeda dengan hasil yang diperoleh oleh Hervas *et al.* (2000). Perbedaan efek penambahan tanin terhadap produksi gas ini dapat disebabkan oleh perbedaan dosis tanin, substrat dasar dan jenis tanin yang digunakan. Meskipun konsentrasi tanin

yang diujikan pada penelitian ini sudah relatif rendah yakni 0,5 mg/ml namun telah dapat menurunkan produksi gas secara signifikan.

### Kecernaan Bahan Organik

Data kecernaan bahan organik (KBO) perlakuan pada penelitian ini terdapat pada Gambar 2. Penambahan tanin pada level 0,5 mg/ml secara nyata ( $P < 0,05$ ) menurunkan KBO dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Tidak terdapat perbedaan nilai KBO di antara jenis tanin yang berbeda pada level penambahan 0,5 mg/ml, dengan nilai KBO berkisar antara 70,4% hingga 71,5%. Dengan demikian didapatkan penurunan KBO dibandingkan perlakuan kontrol berkisar antara 4,4% hingga 5,9%. Penjelasan dari respon berkurangnya KBO melalui penambahan tanin sama halnya dengan berkurangnya produksi gas, yaitu tanin berinteraksi dan menghambat proses degradasi protein dan serat (Makkar, 2003; Makkar *et al.*, 2007). Pengaruh negatif tanin terhadap kecernaan bahan organik pakan ini lebih signifikan terhadap komponen protein dibandingkan dengan komponen-komponen lainnya (Santos *et al.*, 2000; Frutos *et al.*, 2004a; Getachew *et al.*, 2008).



Gambar 2. Kecernaan bahan organik (KBO) ransum hay yang mengandung tanin murni konsentrasi rendah. P0=hay tanpa penambahan tanin (kontrol); P1=hay + 0,5 mg/ml tanin *chestnut*; P2=hay + 0,5 mg/ml tanin mimosa; P3=hay + 0,5 mg/ml tanin *quebracho*; P4=hay + 0,5 mg/ml tanin *sumach*.

## Emisi Metana

Data produksi metana perlakuan terdapat pada Tabel 1. Peubah metana dalam hal ini diekspresikan dalam persen metana dalam total gas dan dalam produksi metana per unit bahan organik tercerna. Secara umum penambahan semua jenis tanin murni pada level 0,5 mg/ml menurunkan produksi metana ( $P < 0,05$ ), baik persentase metana dalam total gas maupun produksi metana per unit bahan organik tercerna. Tanin *chestnut* merupakan yang paling efektif dalam menurunkan persentase metana dibandingkan jenis tanin lainnya. Tanin yang mudah terhidrolisis menghasilkan persentase metana berkisar antara 13,3%-13,5%, sedangkan tanin terkondensasi menghasilkan persentase metana berkisar antara 13,8%-13,9%. Berdasarkan data tersebut terlihat bahwa tanin mudah terhidrolisis lebih mampu menurunkan emisi metana dibandingkan dengan tanin terkondensasi. Hal ini berkaitan dengan kapastitas presipitasi protein dari tanin, yaitu bahwa tanin mudah terhidrolisis dapat lebih banyak mengendapkan protein BSA dibandingkan dengan tanin terkondensasi (Jayanegara, 2008c). Namun demikian jika peubah metana diekspresikan sebagai produksi metana per unit bahan organik tercerna, maka pola ini tidak terlihat lagi karena tanin *sumach* menghasilkan emisi tertinggi di antara semua jenis tanin yakni 4,65 ml metana diproduksi untuk setiap 100 mg bahan organik yang tercerna. Nilai ini secara statistik tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanin terkondensasi, baik tanin mimosa maupun tanin *quebracho*.

Reduksi emisi metana oleh tanin mudah terhidrolisis yang didapatkan dalam penelitian ini berbeda dengan hasil yang didapatkan oleh Sliwinski *et al.* (2002). Sliwinski *et al.* (2002) melaporkan bahwa penambahan 2 dan 12 g/kg ekstrak tanin *chestnut* pada ransum basal (terdiri atas silase rumput, hay, barley, dan bungkil kedelai) tidak menurunkan produksi metana secara signifikan. Ada dua kemungkinan yang dapat menjelaskan perbedaan ini. Pertama, konsentrasi tanin yang ditambahkan pada penelitian tersebut lebih rendah dibandingkan dengan penelitian ini sehingga belum menca-

pai limit konsentrasi yang cukup untuk menurunkan kadar metana. Kedua, ekstrak tanin yang digunakan dalam penelitian tersebut tidak mengalami proses purifikasi sehingga efek tanin *chestnut* dipengaruhi oleh komponen-komponen lain yang terdapat dalam ekstrak.

Mekanisme penghambatan produksi metana pada ternak ruminansia oleh senyawa tanin telah digagas oleh Tavendale *et al.* (2005), yakni (1) secara tidak langsung melalui penghambatan pada pencernaan serat yang mengurangi produksi  $H_2$ , dan (2) secara langsung yang menghambat pertumbuhan dan aktivitas metanogen. Lebih lanjut Jayanegara (2008c) menambahkan bahwa tanin terkondensasi menurunkan metana melalui mekanisme pertama dari yang digagas oleh Tavendale *et al.* (2005), sedangkan tanin yang mudah terhidrolisis lebih berperan pada mekanisme yang kedua. Selain itu tanin juga menghambat pertumbuhan protozoa yang menjadi salah satu inang utama metanogen (Goel *et al.*, 2008). Meskipun tanin mudah terhidrolisis sangat cepat didegradasi di dalam rumen secara anaerobik, derivatnya seperti asam galat dan asam galotanat tetap dapat menurunkan produksi metana. Mekanismenya masih belum diketahui secara pasti, namun diduga derivat dari tanin mudah terhidrolisis dapat mengendapkan protein (diantaranya adalah enzim) yang terdapat pada metanogen (McSweeney *et al.*, 2001).

Meskipun tanin mudah terhidrolisis mempunyai efek yang lebih besar dalam menurunkan persentase metana, namun sejauh ini penelitian-penelitian yang dilakukan lebih banyak terhadap tanin terkondensasi. Hal ini disebabkan tanin terkondensasi mempunyai efek toksik yang lebih rendah daripada tanin mudah terhidrolisis (McSweeney *et al.*, 2003; Beauchemin *et al.*, 2008). Sebenarnya mikroorganisme rumen dapat mendegradasi tanin mudah terhidrolisis. Namun efek toksik yang disebabkan produk degradasi tanin ini diserap ke dalam pembuluh darah dan terakumulasi dalam konsentrasi yang melebihi kapasitas hati untuk proses detoksifikasinya (Makkar, 2003; Makkar *et al.*, 2007). Namun demikian struktur

senyawa tanin sangat bervariasi antar tanaman dan dapat jadi terdapat sumber tanin mudah terhidrolisis yang tidak menyebabkan toksik pada ternak. Sebagai contoh, penambahan ekstrak tanin *chestnut* sebanyak 20,8 g/kg BK pada domba merino tidak menyebabkan efek toksik dan penurunan performa. Tidak terdapat perbedaan nyata antara domba yang diberi perlakuan ekstrak tanin dan perlakuan kontrol terhadap konsumsi ransum, konversi pakan, pertambahan bobot badan dan periode penggemukan, demikian pula dengan analisis histopatologi yang juga tidak berbeda nyata (Frutos *et al.*, 2004b). Penelitian lainnya yaitu penambahan daun oak (*Quercus pyrenaica*) hingga 5,2 kg per hari yang juga tinggi kandungan tanin mudah terhidrolisisnya tidak menyebabkan gangguan fisiologis dan kerusakan organ pada sapi (Frutos *et al.*, 2007).

### Produksi VFA

Produksi VFA ransum perlakuan terdapat pada Tabel 2. Penambahan tanin murni secara umum menurunkan produksi asam asetat, propionat, butirrat dan valerat ( $P < 0,05$ ), meskipun pada beberapa perlakuan tidak berbeda nyata

dengan kontrol. Tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan pada peubah rasio antara asetat dan propionat ( $C_2/C_3$ ). Adapun penambahan tanin tidak memberikan efek yang signifikan terhadap produksi asam lemak iso-butirat. Produksi iso-valerat memiliki pola yang hampir sama dengan isomernya yakni asam valerat.

Total VFA yang diproduksi di dalam rumen selama proses fermentasi merupakan indikator ketersediaan energi bagi ternak. Komponen VFA seperti asam asetat, propionat dan butirrat akan diabsorpsi melalui dinding rumen dan digunakan sebagai sumber energi di berbagai organ tubuh ternak melalui oksidasi dalam siklus asam trikarboksilat (Hungate, 1966). Total VFA yang diproduksi pada penelitian ini menurun dengan penambahan tanin murni, dengan besarnya penurunan berkisar antara 5,7%-11,7% dibandingkan dengan perlakuan kontrol ( $P < 0,05$ ). Tidak terdapat perbedaan produksi total VFA antara perlakuan tanin mudah terhidrolisis dan tanin terkondensasi.

Iso-VFA merupakan produk dari degradasi protein yang berasal dari asam amino bercabang, baik yang berasal dari pakan maupun yang berasal dari mikroba rumen, sehingga

Tabel 2. Produksi asam lemak terbang (VFA) ransum hay yang mengandung tanin murni konsentrasi rendah

Peubah	Perlakuan					SEM
	P0	P1	P2	P3	P4	
$C_2$ (mM)	30,0 <sup>b</sup>	26,8 <sup>a</sup>	27,5 <sup>a</sup>	26,3 <sup>a</sup>	27,9 <sup>a</sup>	0,480
$C_3$ (mM)	11,2 <sup>b</sup>	10,7 <sup>ab</sup>	10,3 <sup>a</sup>	10,2 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>	0,130
$C_4$ (mM)	3,83 <sup>b</sup>	3,46 <sup>a</sup>	3,38 <sup>a</sup>	3,34 <sup>a</sup>	3,96 <sup>b</sup>	0,083
iso- $C_4$ (mM)	0,25	0,20	0,19	0,20	0,23	0,012
$C_5$ (mM)	0,51 <sup>b</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,50 <sup>b</sup>	0,011
iso- $C_5$ (mM)	0,18 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,23 <sup>c</sup>	0,012
Total VFA (mM)	46,0 <sup>c</sup>	41,7 <sup>ab</sup>	42,0 <sup>ab</sup>	40,6 <sup>a</sup>	43,4 <sup>b</sup>	0,670
iso-VFA (mM)	0,43 <sup>b</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,33 <sup>a</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,021
$C_2/C_3$	2,69	2,49	2,67	2,58	2,64	0,028

Keterangan: superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ); P0=hay tanpa penambahan tanin (kontrol); P1=hay + 0,5 mg/ml tanin *chestnut*; P2=hay + 0,5 mg/ml tanin mimosa; P3=hay + 0,5 mg/ml tanin *quebracho*; P4=hay + 0,5 mg/ml tanin *sumach*; C2=asam asetat; C3=asam propionat; C4=asam butirrat; C5=asam valerat.



iso-VFA dapat digunakan sebagai salah satu indikator degradasi protein yang terjadi dalam rumen (Hoffmann *et al.*, 2008). Penambahan tanin mengurangi produksi iso-VFA secara nyata ( $P < 0,05$ ), kecuali pada perlakuan tanin dari *sumach* yang tidak berbeda nyata dengan kontrol. Keberadaan tanin akan mengikat protein sehingga sebagian protein menjadi tidak dapat didegradasi oleh mikroba rumen. Mekanisme ini telah dimanfaatkan untuk melindungi protein berkualitas tinggi dari degradasi dalam rumen sehingga protein menjadi tersedia pada saluran pencernaan pasca rumen tanpa mengalami modifikasi asam amino penyusunnya (Makkar, 2003). Namun di sisi lain jika konsentrasinya tidak diatur secara optimal maka pencernaan dan absorpsi nutrisi secara keseluruhan dapat terganggu karena tanin tidak hanya berinteraksi dengan protein, melainkan juga dengan serat dan komponen-komponen lain seperti vitamin dan mineral.

### KESIMPULAN

Penambahan jenis tanin murni yang berbeda pada level 0,5 mg/ml telah dapat mengurangi produksi gas pada waktu inkubasi 24 jam, laju pembentukan gas, pencernaan bahan organik, total VFA dan iso-VFA. Tanin pada level ini telah menimbulkan efek negatif terhadap proses pencernaan di dalam rumen. Namun demikian pada level ini tanin juga mengurangi produksi metana sebagai gas yang berkontribusi signifikan terhadap efek rumah kaca. Jenis tanin yang mudah terhidrolisis (*chestnut* dan *sumach*) lebih mampu menurunkan persen metana dalam total gas dibandingkan dengan jenis tanin terkondensasi (*mimosa* dan *quabrado*).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada DAAD (German Academic Exchange Service) atas bantuan finansialnya melalui program beasiswa selama penulis studi di Jerman. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Mr. Herrmann

Baumgärtner dan Mrs. Beatrix Fischer atas bantuan teknisnya selama penelitian berlangsung.

### DAFTAR PUSTAKA

- Beauchemin, K. A. & S. M. McGinn.** 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.* 83: 653-661.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara & T. A. McAlister.** 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 21-27.
- Blümmel, M., H. Steingass & K. Becker.** 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and  $^{15}\text{N}$  incorporated and its implication for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.* 77: 911-921.
- Fievez, V., F. Dohme, M. Danneels, K. Raes & D. Demeyer.** 2003. Fish oil as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104: 41-58.
- Frutos, P., G. Hervas, F. J. Giraldez & A.R. Mantecon.** 2004a. An *in vitro* study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows, and deer. *Aust. J. Agric. Res.* 55: 1125-1132.
- Frutos, P., M. Raso, G. Hervas, A.R. Mantecon, V. Perez & F.J. Giraldez.** 2004b. Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs? *Anim. Res.* 53: 127-136.
- Frutos, P., R.R. Doce, G. Hervas, P.G. Toral, F.J. Giraldez, A.R. Mantecon & V. Perez.** 2007. The consumption of a large amount of immature oak leaves (*Quercus pyrenaica*) is not necessarily toxic for cattle. XXXVIII Jornadas de Estudio, XII Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, Spain, 16-17 Mayo, 2007. Tomo I and II Zaragoza: Gobierno de Aragón, Servicio de Investigación Agroalimentaria, 2007, 282-284.
- 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., W. Pittroff, D. H. Putnam, A. Dandekar, S. Goyal & E. J. De Peters.**

2008. The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140: 444-461.
- Goel, G., H. P. S. Makkar & K. Becker.** 2008. Effect of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147: 72-89.
- Hervas, G., P. Frutos, E. Serrano, A. R. Mantecon & F. J. Giraldez.** 2000. Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *J. Agric. Sci.* 135: 305-310.
- Hoeltershinken, M., U. Plitt, F. C. Tammen, P. Hoffmann & H. Scholz.** 1997. Influence of mouldy grass on fermentation and thiamine metabolism in bovine rumen fluid (*in vitro*). *Deutsche Tierarzt. Wochen.* 104: 17-22.
- Hoffmann, E. M., N. Selje-Assmann & K. Becker.** 2008. Dose studies on anti-proteolytic effects of a methanol extract from *Knautia arvensis* on *in vitro* ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 285-301.
- Hungate, R. E.** 1966. *The Rumen and Its Microbes.* Academic Press, New York.
- Jayanegara, A., A. S. Tjakradidjaja & T. Sutardi.** 2006. Fermentabilitas dan kecernaan *in vitro* ransum limbah agroindustri yang disuplementasi kromium anorganik dan organik. *Med. Pet.* 29: 54-62.
- Jayanegara, A.** 2008a. Reducing methane emissions from livestock: nutritional approaches. Proceedings of Indonesian Students Scientific Meeting (ISSM), Institute for Science and Technology Studies (ISTECS) European Chapter, 13-15 May 2008, Delft, the Netherlands: 18-21.
- Jayanegara, A., N. Togtokhbayar, H. P. S. Makkar & K. Becker.** 2008b. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. *Anim. Feed Sci. Technol.* (in press), doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.10.011.
- Jayanegara, A.** 2008c. Methane reduction effect of polyphenol containing plants, simple phenols and purified tannins in *in vitro* rumen fermentation system. Master Thesis. University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Johnson, K. A. & D. E. Johnson.** 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.
- Kreuzer, M. & C. R. Soliva.** 2008. Nutrition: key to methane mitigation in ruminants. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 17: 168-171.
- Makkar, H. P. S. & K. Becker.** 1994. Isolation of tannins from leaves of some trees and shrubs and their properties. *J. Agric. Food Chem.* 42: 731-734.
- Makkar, H. P. S., M. Blümmel & K. Becker.** 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Br. J. Nutr.* 73: 897-913.
- 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. *Small Rum. Res.* 49: 241-256.
- Makkar, H. P. S., G. Francis & K. Becker.** 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal* 1: 1371-1391.
- McSweeney, C. S., B. Palmer, D. M. McNeil & D. O. Krause.** 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 83-93.
- McSweeney, C. S., H. P. S. Makkar & J. D. Reed.** 2003. Modification of rumen fermentation for detoxification of harmful compounds. International Symposium on Nutrition of Herbivores, pp. 239-270, Merida, Yucatan, Mexico, 20-24 October.
- 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 feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J. Agric. Sci.* 93: 217-222.
- Orskov, E. R. & I. McDonald.** 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92: 499-503.
- Pinares-Patino, C. S., M. J. Ulyatt, G. C. Waghorn, K. R. Lassey, T. N. Barry, C. W. Holmes & D. E. Johnson.** 2003. Methane emission by alpaca and sheep fed on lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *J. Agric. Sci.* 140: 215-226.
- Puchala, R., B. R. Min, A. L. Goetsch & T. Sahl.** 2005. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission in goats. *J. Anim. Sci.* 83: 182-186.

- Santos, G. T., R. L. Oliveira, H. V. Petit, U. Cecato, L. M. Zeoula, L. P. Rigolon, J. C. Damasceno, A. F. Branco & V. Bett.** 2000. Effect of tannic acid on composition and ruminal degradability of bermudagrass and alfalfa silages. *J. Dairy Sci.* **83**: 2016-2020.
- Sliwinski, B. J., C. R. Soliva, A. Machmüller & M. Kreuzer.** 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* **101**: 101-114.
- Steel, R. G. D. & J. H. Torrie.** 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. McGraw-Hill, New York.
- Tavendale, M. H., L. P. Meagher, D. Pacheco, N. Walker, G. T. Attwood & S. Sivakumaran.** 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubation with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123/124**: 403-419.
- Woodward, S. L., G. C. Waghorn & P. Laboyre.** 2004. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.* **64**: 160-164.