

EFEK PENGGUNAAN POLYETHYLEN GLYCOL (PEG) DALAM RANSUM KONSENTRAT MENGANDUNG DAUN KABESAK PUTIH (*Acacia leucophloea*) TERHADAP PRODUKSI GAS DAN TOTAL VFA IN VITRO

Emma Dyelim Wie Lawa*

Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana

*Corresponding E-mail: emmalawa@staf.undana.ac.id

(diajukan: 03-05-2024; diterima: 14-05-2024; diterbitkan: 15-05-2023)

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan efek polyethylene glycol (PEG) sebagai penghambat aktivitas tannin dalam ransum konsentrat mengandung daun kabesak putih terhadap produksi gas in vitro dan produksi total asam lemak terbang (T-VFA). Penelitian menggunakan metoda teknik produksi gas. Perlakuan yang diterapkan adalah level penggunaan daun kabesak putih dalam ransum konsentrat dengan penambahan PEG. Perlakuan dimaksud adalah : R1: 10% daun kabesak putih, R2 : 20% daun kabesak putih, R3 : 30% daun kabesak putih, dan R4: 40% daun kabesak putih. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan berpengaruh nyata terhadap produksi gas dan total VFA ransum. Potensi produksi gas (mL/500 mg BK) dan laju produksi gas fraksi tak larut (mL/jam), dan produksi gas 48 jam (mL/500 mg BK) tidak menunjukkan perbedaan diantara perlakuan. Produksi T-VFA menunjukkan perlakuan R1 dan R2 nyata lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya. Disimpulkan bahwa Penambahan Polyethylene glycol (PEG) dalam ransum konsentrat mengandung daun kabesak putih meningkatkan produksi gas in vitro dan produksi asam lemak terbang (T-VFA). Keberadaan tannin dalam daun kabesak putih dapat dihambat dengan keberadaan PEG sehingga fermentasi ransum menjadi meningkat.

Kata Kunci: daun kabesak putih; konsentrat; polyethylene glycol; produksi gas; in vitro.

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of polyethylene glycol (PEG) as an inhibitor of tannin activity in concentrate rations containing white kabesak leaves on in vitro gas production and total volatile fatty acid production (T-VFA). The study used the gas production technique. The treatment applied was the level of use of white kabesak leaves in concentrate rations with the addition of PEG. The treatments were: R1: 10% white kabesak leaves, R2: 20% white kabesak leaves, R3: 30% white kabesak leaves, and R4: 40% white kabesak leaves. The results showed that the treatment significantly affected gas production and total VFA of the ration. Potential gas production (mL/500 mg DM) insoluble fraction gas production rate (mL/hour), and 48-hour gas production (mL/500 mg DM) showed no difference among treatments. T-VFA production showed that R1 and R2 treatments were significantly higher than others. It was concluded that the addition of Polyethylene glycol (PEG) in concentrate rations containing white kabesak leaves increased in vitro gas production and production of total volatile fatty acids (T-VFA). The presence of tannin in white kabesak leaves can be inhibited by the presence of PEG so ration fermentation is increased.

Keywords: white kabesak leaves; concentrate; polyethylene glycol; gas production; in vitro.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan daun leguminosa sebagai pakan dapat meningkatkan penerimaan nutrisi bagi ternak ruminansia di daerah tropis yang umumnya mengkonsumsi ransum basal berkualitas rendah asal rumput atau limbah pertanian. Menurut Olivares-Peres et al. (2011), Produktivitas ternak yang rendah di daerah tropis disebabkan oleh rendahnya ketersediaan dan rendahnya

kandungan dan kualitas nutrisi dari pakan yang digunakan sebagai pakan basal. Kondisi demikian maka peran tanaman leguminosa menjadi penting dalam meningkatkan produktivitas ternak. Tanaman leguminosa khususnya dari jenis pepohonan mempunyai kemampuan mengikat nitrogen sehingga menurunkan kebutuhan pupuk nitrogen, di lain pihak juga berguna sebagai suplemen pada hijauan berkualitas rendah karena daunnya mengandung protein yang tinggi (Rodriguez et al., 2014). Beberapa hijauan tanaman semak dan pohon leguminosa mampu menggantikan konsentrat sebahagian atau secara total tanpa menurunkan pencernaan atau pertumbuhan domba dan kambing (Dung et al., 2005; Traiyakun et al., 2011). Akan tetapi penggunaan hijauan pohon maupun semak leguminosa sebagai suplemen pakan sering terkendala oleh adanya senyawa fenolik seperti tannin dan senyawa sekunder lainnya yang dapat menurunkan nilai nutrisinya (Alonzo-Diaz et al., 2010). Menurut Mueller-Harvey (2006), terdapat efek menguntungkan dan merugikan dari tannin dalam nutrisi ruminansia. Satu efek utama yang menguntungkan adalah efeknya terhadap pencernaan protein. Sejumlah tannin dapat menurunkan jumlah protein yang didegradasi dalam rumen dan meningkatkan suplai protein pasca rumen (Waghorn et al. 1987).

Salah satu tanaman leguminosa pohon yang banyak tumbuh di pulau Timor, propinsi Nusa Tenggara Timur, dan merupakan pakan andalan bagi ternak selama musim kemarau adalah kabesak putih (*Acacia leucophloea*) (Djogo, 1988). Sebagai tanaman leguminosa, kabesak putih mengandung protein kasar yang cukup tinggi dan senyawa tannin, baik tannin hidrolisis maupun tannin kondensasi. Kandungan protein kasar daun kabesak putih sebesar 15% dan serat kasar 19% (Orwa et al., 2009). Keberadaan senyawa tannin dalam tanaman ini diduga dapat menurunkan degradasi proteinnya. Untuk mengetahui dampak senyawa tannin dapat dilakukan dengan pengujian produksi gas. Menurut Makkar (2005) Teknik produksi gas in vitro (IVGPT) adalah metode yang dapat diandalkan untuk mempelajari efek potensial, mekanisme kerja dan nasib fitokimia di dalam rumen; dan Dalam IVGPT, efek tannin pada fermentasi rumen tercermin dalam produksi gas (Getachew et al., 2002).

Peningkatan pemanfaatan tanaman yang mengandung tannin dapat dilakukan dengan penambahan bahan pengikat seperti polyehtylen glycol (PEG) (Getachew et al., 2000). Tujuan penambahan bahan pengikat tannin adalah untuk menurunkan aktivitas tannin dalam tanaman, sebagai alternatif untuk meningkatkan kualitas hijauan kemudian dapat meningkatkan produksi gas in vitro yang menggambarkan efek terhadap aktivitas tannin dalam pakan. Menurut Calabro et al. (2012) Polietilen glikol telah digunakan secara luas sebagai agen pengikat tanin untuk mempelajari efek tanin pada metabolisme rumen. Polietilen glikol berfungsi membuat tanin menjadi tidak aktif dengan membentuk kompleks tanin-PEG dan bahkan dapat menggantikan protein dari kompleks tanin-protein yang telah terbentuk sebelumnya.

Berdasarkan hal tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi efek penambahan polyethylen glycol dalam ransum konsentrat mengandung daun kabesak putih terhadap produksi gas dan Total VFA in vitro.

MATERI DAN METODE

Materi

Penelitian ini menggunakan pakan konsentrat yang terdiri dari bungkil kedelai, bungkil kelapa, dedak padi, jagung giling dan daun kabesak putih (*Acacia leucophloea*) sebagai pakan perlakuan. Daun kabesak putih dikoleksi dari wilayah sekitar kota Kupang, propinsi Nusa Tenggara Timur. Daun kabesak putih dijemur dengan mengain-anginkan selama 2 hari dan setelah kering digiling menjadi tepung. Susunan formulasi dan kandungan nutrient tertera dalam Tabel 1 dan 2. Pakan yang disusun dalamimbangan hijauan rumput alam dengan konsentrat 60:40. Uji in vitro penggunaan Polyethylen glycol (PEG) dilakukan pada pakan konsentrat yang mengandung daun kabesak putih tanpa mengikutsertakan hijauan rumput alam (dalam komposisi sebesar 60%), sehingga yang dievaluasi hanya pakan konsentrat yang mengandung daun kabesak putih (dalam komposisi sebesar 40%).

Metode

Metode penelitian menggunakan eksperimen. Penelitian in vitro ini menggunakan metode *In vitro Gas Production* (IVGP) sesuai Makkar et al. (1995). Metode penentuan produksi gas

menggunakan model modifikasi dari Ørskov dan McDonald (1979), yaitu : $Y = b(1 - e^{-ct})$ dimana b : produksi gas dari fraksi mudah terfermentasi; c : laju produksi gas konstan fraksi tak larut (ml/jam); t : waktu inkubasi (jam) dan Y : produksi gas dalam waktu. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK) dengan 4 perlakuan dan diulang 3 kali sebagai kelompok berdasarkan perbedaan waktu pengambilan cairan rumen.

Perlakuan dengan penambahan PEG disusun sebagai berikut:

R1 : konsentrat 30% + tepung daun kabesak putih 10% + PEG

R2 : konsentrat 20% + tepung daun kabesak putih 20% + PEG

R3 : konsentrat 10% + tepung daun kabesak putih 30% + PEG

R4 : tepung daun kabesak putih 40% + PEG

Analisis Kimia Pakan

Cuplikan sampel dari daun kabesak putih dan komponen konsentrat lain seperti bungkil kedelai, bungkil kelapa, jagung giling halus, dedak padi dan rumput alam diambil sebanyak 200 g untuk dianalisis secara kimia untuk menentukan kandungan bahan kering, protein kasar, serat kasar, lemak kasar dan abu, sesuai metode yang ditetapkan A.O.A.C (2000). Selulosa, hemiselulosa, acid detergent fibre (ADF), dan neutral detergent fibre (NDF), dari daun kabesak putih ditentukan menggunakan metode Van Soest and Robertson (1976).

Analisis kimia keberadaan faktor anti-nutrisi seperti tanin, total tanin dan total fenol dari tepung daun kabesak putih menggunakan metode Vanillin-HCl (Makkar and Becker, 1993).

Tabel 1. Susunan Formulasi Bahan Pakan Penelitian

Bahan Pakan (%)	Perlakuan			
	R1	R2	R3	R4
Bungkil kedelai	4,0	3,0	2,0	0,0
Bungkil kelapa	6,0	5,0	4,0	0,0
Dedak padi	10,0	7,0	2,0	0,0
Jagung giling	10,0	5,0	2,0	0,0
Daun kabesak putih	10,0	20,0	30,0	40,0
Jumlah	40	40	40	40

Tabel 2. Kandungan Nutrien Pakan Perlakuan

Kandungan Nutrien (%)	Perlakuan			
	R1	R2	R3	R4
Bahan kering	89,89	89,84	89,88	90,06
Bahan organik	87,86	88,19	88,47	88,50
Protein kasar	12,13	12,25	12,38	11,72
Serat kasar	28,32	28,64	31,12	34,54

Kandungan total tanin, CT, total fenol dan komponen serat kasar tepung daun kabesak putih tertera dalam Tabel 3.

Tabel 3. Kandungan Tanin dan Serat Kasar Tepung Daun Kabesak Putih (%)

Total Tanin	Tanin Kondensasi (CT)*	Total Fenol*	NDF*	ADF*	Selulosa*	Hemiselulosa*
0,97	0,49	3,52	46,88	34,89	23,55	11,98

Keterangan : *Hasil analisis Laboratorium BPT Ciawi, Bogor (2015) menggunakan metode Spektrofotometri

** Hasil analisis Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya (2014)

Bahan pakan konsentrat, daun kabesak putih dan penambahan Polyethylene glycol (PEG 6000 MW, Sigma®) Zur Synthese $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ merck Schachardt, sebagai pengikat senyawa tanin dengan perbandingan PEG dan sampel yang digunakan 2 g PEG : 1 g sampel (Waghorn, 2008; Bagheripour et al., 2008).

Variabel yang diukur meliputi produksi gas pada inkubasi jam ke 48 jam dan konsentrasi total VFA pada inkubasi 48 jam.

Prosedur Penentuan Produksi Gas (Makkar et al., 1995)

Pengukuran produksi gas dilakukan melalui tahapan :

- 1) Sampel perlakuan digiling dengan ukuran 1 mm dan ditimbang sebanyak 0,5 g BK dan dimasukkan dalam dasar syringe. Selanjutnya piston yang telah diolesi vaselin dimasukkan ke dalam syringe. Ujung dari syringe dihubungkan dengan karet silikon dan ditutup dengan klip plastik.
- 2) Cairan rumen yang diambil dari satu ekor sapi PFH betina disaring menggunakan kain kasa berlapis 4, kemudian cairan rumen dicampur dengan larutan buffer dengan perbandingan 1:4. Larutan buffer (tiap 1 liter) terdiri dari NaHCO_3 35 g + NH_4HCO_3 4 g, dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan makromineral (tiap 1 liter) terdiri dari $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5,7 g + KH_2PO_4 6,2 g + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g + NaCl 2,22 g dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan mikromineral (tiap 100 ml) terdiri dari $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13,2 g + $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 g + $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g + $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8 g, dilarutkan dalam aquades sampai volume 100 ml. Larutan resazurin didapatkan dari 0,1 g resazurin dilarutkan dengan aquades sampai volume 100 ml dan reduktor terdiri dari $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,58 g + NaOH 1 M 3,7 ml + aquades 60 ml.
- 3) Campuran larutan buffer terdiri dari: aquades sebanyak 1316 ml, buffer 878 ml, makro mineral 439 ml, mikro mineral 0,28 ml, resazurin 1,20 ml, reduktor 72,13 ml. Campuran larutan buffer dimasukkan dalam labu kemudian dipanaskan pada suhu 39°C dalam wadah waterbath
- 4) Masukkan aquades sebanyak 1316 ml ke dalam erlenmeyer diikuti dengan larutan di atas dan mengalirkan gas CO_2 . Larutan akan berwarna kebiru-biruan kemudian berubah menjadi pink selanjutnya menjadi tidak berwarna. Cairan rumen sebanyak 793 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer apabila indikator sudah tidak berwarna. Penambahan CO_2 diteruskan setelah cairan rumen tercampur kemudian dipanaskan pada temperatur 39°C . Larutan campuran buffer dengan cairan rumen tersebut dimasukkan dalam syringe dengan menggunakan pipet otomatis sebanyak 50 ml. Selanjutnya klip plastik pada selang silikon ditutup dan dibaca volumenya (V_0), kemudian syringe ditempatkan dalam waterbath pada suhu 39°C . Blanko dibuat dengan cara seperti di atas tetapi tanpa penambahan sampel. Volume gas dicatat setelah inkubasi 0,2, 4, 8, 12, 24 dan 48 jam. Sampel rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) digunakan sebagai standard.
- 5) Produksi gas dihitung dengan menggunakan rumus :
$$V \text{ blanko} = V \text{ blanko} - V_0$$
$$\text{Produksi gas} = (V_t - V_0 - V \text{ blanko})$$

Prosedur Penentuan Konsentrasi Total VFA

Sebanyak 0,6 ml campuran buffer dan cairan sampel dari masing-masing tabung dideproteinase dengan ditambahkan 3 ml larutan asam methaposporat 25% kemudian disentrifus pada 9000 rpm selama 15 menit dan supernatannya disimpan pada temperatur -20°C untuk dianalisis Total-VFA menggunakan kromatografi gas.

Analisa Data

Data hasil penelitian ditabulasi dan dianalisis statistik menggunakan ANOVA sesuai Rancangan Acak Kelompok. Uji Duncan (Duncan's Multiple Range Test = DMRT) digunakan untuk melihat perbedaan diantara perlakuan menggunakan General Linear Model (GLM) Procedure Statisical Analysis System (SAS 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata nilai potensi produksi gas (b), laju produksi gas fraksi tak larut (c) dan produksi gas 48 jam (y) dari perlakuan penggunaan daun kabesak putih dalam konsentrat dengan penambahan *Polyethylen glycol* (PEG) tertera dalam Tabel 3.

Tabel 1. Rata-rata Kandungan Selulosa, Hemiselulosa dan lignin Pada Tiap Perlakuan

Variabel yang diukur	Perlakuan			
	R1	R2	R3	R4
b : Potensi produksi gas (mL/500 mg BK)	160,25±8,59	195,33±27,96	179,90±16,50	209,81±24,49
c : Laju produksi gas fraksi tak larut (mL/jam)	0,038±0,005	0,037±0,005	0,039±0,005	0,037±0,002
y : Produksi gas 48 jam (mL/500 mg BK)	127,13±2,16	151,53±28,88	141,12±8,88	160,42±22,11
Produki-VFA 48 jam (mM/L)	89,79±0,69 ^b	86,14±0,83 ^{ab}	86,08±3,19 ^a	83,69±1,41 ^a

Kandungan Selulosa

Tujuan penambahan PEG dalam media fermentasi in vitro adalah menginaktifkan senyawa tanin yang ada dalam tanaman leguminosa dengan membentuk kompleks PEG-tanin. Senyawa PEG merupakan polimer sintetik non nutritif yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap senyawa fenolik sehingga menginaktifkan fungsinya dan meningkatkan ketersediaan nutrisi bagi mikroba khususnya ketersediaan nitrogen (Getachew et al., 2000).

Efek penambahan PEG pada perlakuan daun kabesak putih dalam konsentrat tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap produksi gas in vitro (nilai b, c dan y). Penggunaan level daun kabesak putih 10% sampai 40% dalam konsentrat cenderung meningkatkan nilai potensi produksi gas (b) tetapi secara statistik tidak terdapat perbedaan diantara level tersebut. Potensi produksi gas dengan penambahan PEG terendah pada penggunaan daun kabesak putih 10% (R1) dan tertinggi pada penggunaan 40% (R2). PEG merupakan senyawa yang dapat mengikat tanin sehingga mengurangi efeknya dalam menghambat degradasi pakan oleh mikroba rumen. Menurut Mlambo et al. (2007), senyawa PEG mengikat tanin dengan pengikatan yang sangat tinggi dibanding pengikatan tanin terhadap protein, sehingga protein dapat dimanfaatkan oleh mikroba.

Laju produksi gas dari fraksi tak larut (c) menunjukkan nilai yang bervariasi dan secara statistik tidak berbeda ($P>0,05$). Produksi gas pada masa inkubasi 48 jam dengan penambahan PEG menunjukkan peningkatan walaupun secara statistik tidak terdapat perbedaan diantara perlakuan ($P>0,05$). Produksi gas pada perlakuan dengan PEG meningkat seiring dengan meningkatnya level daun kabesak putih. Menurut Sallam et al. (2010) dan Olivares et al. (2013), penambahan PEG dapat mengurangi efek merugikan dari tanin terhadap ketersediaan nutrisi seperti ditunjukkan dengan meningkatnya produksi gas kumulatif karena PEG mempunyai pengikatan yang tinggi terhadap tanin dalam bentuk kompleks PEG-tanin yang menginaktifkan tanin. Lebih rendahnya produksi gas pada R1 karena sedikitnya tanin dalam perlakuan tersebut. Hal ini juga dibuktikan Sallam et al. (2010) bahwa tanaman alfalfa dan atriplex sedikit menghasilkan gas dengan adanya PEG karena tidak adanya senyawa penghambat dalam tanaman sedangkan keberadaan PEG meningkatkan produksi gas pada tanaman eucalyptus, leucaena dan acacia yang mengandung tanin tinggi sebesar 20,9; 28,1 dan 87,1 %. Beberapa penelitian dengan jelas menunjukkan bahwa suplementasi PEG pada pakan yang mengandung tanin meningkatkan volume gas yang dihasilkan dan total produksi asam lemak terbang (T-VFA) (Seresinhe & Iben, 2003). Peningkatan produksi gas dengan adanya PEG diduga disebabkan oleh peningkatan nutrisi yang tersedia untuk mikroorganisme rumen, terutama N. Menurut Davies et al. (2000), jumlah gas yang dihasilkan tergantung pada jumlah substrat yang difermentasi dan jumlah serta proporsi molar VFA yang dihasilkan.

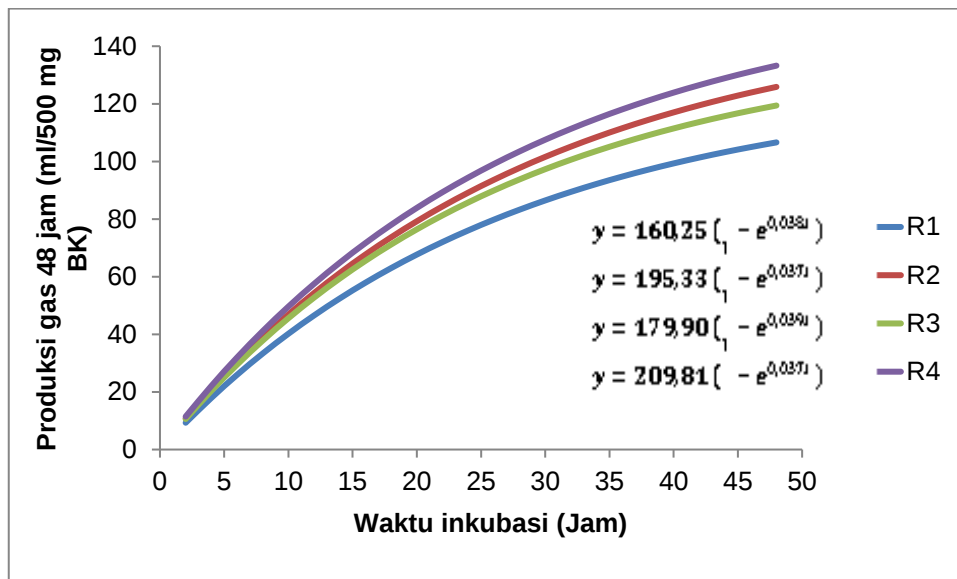
Penambahan PEG mengakibatkan terlepasnya kompleks tanin-bahan organik dalam pakan karena PEG membentuk kompleks PEG-tanin sehingga banyak bahan organik dapat diserang mikroba untuk menghasilkan gas yang tinggi.

Penggunaan PEG nyata ($P<0,05$) pengaruhnya terhadap produksi total VFA ransum mengandung daun kabesak putih. Penggunaan PEG dalam penelitian ini menunjukkan perlakuan

R1 (10% daun kabesak putih dalam konsentrat) lebih tinggi dari R2, R3 dan R4. Secara statistic tidak terdapat perbedaan antara R1 dengan R2 dan antara R2 dengan R3 dan R4. Konsentrasi total VFA dengan penambahan PEG menunjukkan bahwa jumlah tannin dalam daun kabesak putih tidak berpengaruh terhadap fungsi mikroba merombak bahan organik ransum. Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan Besharati and Taghizadeh (2011) bahwa penambahan PEG pada pakan yang mengandung tannin meningkatkan produksi gas, total VFA dan degradasi nitrogen secara in vitro.

Hubungan Waktu Inkubasi dengan Produksi Gas 48 Jam dengan Penambahan PEG

Hubungan antara waktu inkubasi 48 jam dengan produksi gas pada perlakuan level daun kabesak putih dalam konsentrat menggunakan PEG, menunjukkan adanya korelasi positif pada perlakuan level daun kabesak putih dalam konsentrat seperti dalam gambar 1. Nilai keeratan (r) hubungan tersebut berkisar 0,88-0,98%. Nilai keeratan yang tinggi tersebut mengindikasikan bahwa produksi gas dengan penambahan PEG erat kaitannya dengan waktu inkubasi.



Gambar 1. Hubungan waktu inkubasi dengan produksi gas 48 jam dengan PEG

Gambar 1 menjelaskan bahwa semakin lama masa inkubasi produksi gas makin meningkat pada setiap level penggunaan daun kabesak putih dalam konsentrat dengan penambahan PEG. Meningkatnya produksi gas karena dengan adanya senyawa PEG, bahan organik yang terikat tanin menjadi lebih mudah dimanfaatkan mikroba sehingga produksi gas meningkat. Inaktivasi tanin meningkat dengan meningkatnya level tepung daun kabesak putih karena produksi gas meningkat sesuai level daun kabesak putih.

Persamaan hubungan antara produksi gas dengan waktu inkubasi diperoleh untuk masing-masing perlakuan sebagai berikut, = R1 : $y = 160,25(1 - e^{-0,038t})$, $y = 127,13$; R2 : $y = 195,33(1 - e^{-0,037t})$, $y = 151,53$; R3 : $y = 179,90(1 - e^{-0,039t})$, $y = 141,12$; R4 : $y = 209,81(1 - e^{-0,037t})$, $y = 160,42$. Meningkatnya produksi gas kumulatif disebabkan oleh terlepasnya ikatan tanin-makromolekul oleh senyawa PEG sehingga banyak komponen mudah didegradasi menghasilkan gas.

KESIMPULAN

Penambahan Polyethylene glycol (PEG) dalam ransum konsentrat mengandung daun kabesak putih meningkatkan produksi gas in vitro dan produksi asam lemak terbang (T-VFA). Keberadaan tannin dalam daun kabesak putih dapat dihambat dengan keberadaan PEG sehingga fermentasi ransum menjadi meningkat.

DAFTAR PUSTAKA

- Alonzo-Diaz, M.A., J.F.J. Torres-Acosta., C.A. Sandoval-Castro and H. Hoste. 2010. Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: A friendly foe? *Small Rum. Resc.* 89:164-173.
- A.O.A.C. 2000. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist.* 11th ed. Washington D.C.
- Bagheripour, E., Y. Rouzbehan and D. Alipour. 2008. Effects of ensiling, air-drying, and addition of polyethylene glycol in vitro gas production of pistachio by-products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 146:327-336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.01.002>.
- Besharati, M. and A. Taghizadeh. 2011. Effect of tannin-binding agents (polyethylene glycol and polyvinylpyrrolidone) supplementation on in vitro gas production kinetics of some grape yield byproducts. *International Scholarly Research Network (ISRN)*. 1-8. Doi:10.5402/2011/780540.
- Calabro S, A. Guglielmelli, F. Lannaccone, P. P. Danieli, R. Tudisco, C. Ruggiero, G. Piccolo, M. I. Cutrignelli and F. Infascelli. 2012. Fermentation kinetics of sainfoin hay with and without PEG. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96:842–849.
- Davies, Z.S., D. Mason, A.E. Brooks, G.W. Griffith, R. J. Merry and M.K. Theodorou. 2000. An automated system for measuring gas production from forage incubated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 83: 205-221.
- Djogo, T. 1988. Penganekaragaman Tanaman Pengganti Lamtoro dengan Tanaman Lokal Tahan Kering untuk Perhutanan (Agroforestry) di Kabupaten Kupang. Dalam: *Prinsip-prinsip Produksi dan Metode Penelitian Peternakan*. Kumpulan Materi Kursus. Sub Balai Penelitian Ternak, Lili-Kupang bekerjasama dengan Proyek P3NT : 139-154.
- Dung, N.T., N.T. Mui and I. Ledin. 2005. Effect of replacing a commercial concentrate with cassava hay (*Manihot esculenta* Crantz) on the performance of growing goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 119:271-281.
- Getachew, G., H.P.S. Makkar and K. Becker. 2000. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Brit. J. Nutr.*, 84:73-83.
- Getachewa, G, G.M. Crovetto, M. Fondevila, U. Krishnamoorthy, B. Singh, M. Spanghero, H. Steingass, P.H. Robinson, M.M. Kailas. 2002. Laboratory variation of 24 h in vitro gas production and estimated metabolizable energy value of ruminant feeds. *Animal Feed Sci Technol.* 102:169-80. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00212-2).
- Makkar, H.P.S. and K. Becker. 1993. Vanillin-Hcl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Chem Ecol*;19(4): 613-21.
- Makkar, H.P.S., M. Blümmel and K. Becker. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implications in gas production and true digestibility in In vitro techniques. *Br. J. Nutr.*, 73: 897-933.
- 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. Summary of the FAO/IAEA Coordinated Research Project. *Anim. Feed Sci. Tech.* 122:3-12.

- Mlambo, V., J.L.N. Sikosana., F.L. Mould., T. Smith., E. Owen and I. Mueller-Harvey. 2007. The effectiveness of adapted rumen fluid versus PEG to ferment tannin-containing substrates in vitro. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 136:128-136.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unraveling the Conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food. Agric.*, 86 : 2010-2037.
- Olivares-Peres, J., F. Aviles-Nova., S. Rojas-Hernandez., B. Albarran-Portilo and O.A. Castelan-Ortega. 2011. Identification uses and measurement of offers legumes trees in south farmers of the State of Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.*, 14:739-748. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93931761006>.
- Olivares, P.J., N.F. Aviles., P.B. Albarran., O.O.A. Castelan and H.S. Rojas. 2013. Use of three fodder trees in the feeding of goats in the subhumid tropics in Mexico. *Tropical Animal Health and Production.*, 45:821-828.
- Orskov, E.R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci. Cambridge.*, 92:499-503.
- Orwa, C.A., A. Mutua., R. Kindt., Jamnadass and A. Simons. 2009. *Agroforestry database: a tree reference and selection guide version 4.0*.
- Rodriguez, R., N. Gonzalez, A. Ramirez, S. Gomes, O. Moreira, L. Sarduy and Y. Medina. 2014. Tannins of tropical shrub-like legumes: their effect on protein protection of soybean meal. *Cuban J. Agric. Sci.* 48(3): 247-252.
- SAS. 1998. *User's Guide: Statistics, Version 7th Edition*. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sallam, S.M.A.H., I.C. da Silva Bueno., P.B. de Godoy., E.F. Nozella., D.M.S.S. Vitti and A.L. Abdalla. 2010. Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browse using a semi-automated gas production technique. *Tropical and Sub Tropical Agroecosystems.*, 12:1-10. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93913074001>.
- Seresinhe, T. & C. Iben. 2003. In vitro quality assessment of two tropical shrub legumes about their extractable tannins content. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 87, 109-115.
- Traiyaakun, S., W. Harakord., C. Yuangklang and P. Paengkoum. 2011. *Leucaenleucocephala* meal as a replacement for soybean meal in growing goat diets. *J. Agric. Sci. and Technol. A.*, 1:1150-1154.
- Van Soest, P. J., and J. B. Robertson 1976. Chemical and physical properties of dietary fibre. Page 13 in *Proc. Miles Symp. Nub. Soc. Can. Halifax, NS, Can.*
- Waghorn, G.C., A. John., W.T. Jones, and I.D. Shelton. 1987. Nutritive value of *Lotus corniculatus* L. containing low and medium concentrations of condensed tannins for sheep. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 47 : 25-30.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, 147:116-139. www.elsevier.com/locate/anifeedsci.