

# Perbedaan Kandungan Tanin Daun Pala (*Myristica fragrans Houtt*) Jantan Dan Betina Serta Potensinya Sebagai protektor Protein Pakan

Monica Canadianti

Jurusan Peternakan, Politeknik Pertanian Negeri Kupang, Kupang, NTT, Indonesia  
\*Corresponding Author: [mcanadianti@gmail.com](mailto:mcanadianti@gmail.com)

## Article Info

### Article history:

Received 23 Januari 2024

Received in revised form 12 Juni 2024

Accepted 25 Juli 2024

### DOI:

<https://doi.org/10.32938/ja.v9i3.6204>

### Keywords:

Tanin, Daun Pala

*Myristica fragrans Houtt*

Proteksi Protein

Bovine Serum Albumin

## Abstrak

Tanin adalah senyawa metabolit sekunder yang dapat berikatan dengan makromolekul lain, seperti protein. Tanin dapat dijadikan sebagai salah satu agensia untuk memproteksi protein bahan pakan berkualitas tinggi atau protein by-pass bagi ternak ruminansia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis pohon pala jantan dan betina terhadap kandungan tanin pada daunnya, serta optimalisasi pengikatan tanin dengan protein bovine serum albumin (BSA). Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan jenis daun pala yang berbeda, yaitu daun pala dari pohon jantan dan betina. Penelitian ini terdiri dari dua tahapan, yaitu daun pala sebagai sumber tanin diekstrak dan dianalisis kandungan taninnya, kemudian diuji ikatan antara tanin daun pala dengan protein BSA. Hasil pengukuran kandungan senyawa fenolik, yaitu total fenol, total tanin, dan tanin terhidrolisis daun pala pohon betina nyata lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan daun pala pohon jantan, sedangkan kandungan fenol non-tanin, serta tanin terkondensasi tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) di antara kedua jenis daun tersebut. Tanin dari 1 g daun pala pohon betina dapat mengikat protein BSA sebanyak 14,33%, dan tanin kondensasi dapat mengikat 31,56% protein BSA.

## 1. Pendahuluan

Pakan adalah salah satu komponen utama dalam peternakan sebagai sumber nutrisi yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produktivitas ternak secara langsung. Pakan yang diberikan ke ternak harus mengandung nutrisi yang lengkap dan seimbang sehingga mampu mencukupi kebutuhan ternak serta dapat digunakan untuk berproduksi. Pemberian pakan dengan kandungan protein yang tinggi pada ternak, umumnya ditujukan sebagai sumber asam amino yang dapat meningkatkan produktivitas ternak, namun pemberiannya pada ternak ruminansia harus memperhatikan berbagai faktor. Hal ini berkaitan dengan proses pencernaan protein pada ruminansia yang berbeda dengan ternak lainnya. Ternak ruminansia dapat mensintesis asam amino dengan bantuan mikrobia rumen namun kualitas dan kuantitasnya terbatas, sehingga terkadang tidak dapat memenuhi kebutuhan ternak, terutama pada ternak perah untuk mendapatkan produksi susu yang maksimal. Pemenuhan kebutuhan protein ini dapat dilakukan dengan suplementasi pasokan protein atau asam amino dari makanan atau asam amino sintetis, dalam bentuk yang tidak mudah terdegradasi oleh mikrobia rumen (McDonald *et al.*, 2011)

Salah satu tindakan modifikasi pakan untuk meningkatkan efisiensi pemanfaatan protein pada ternak ruminansia ini adalah dengan melakukan proteksi protein atau dikenal dengan *bypass* protein atau *Rumen Undegradable Protein* (RUP). Proteksi protein dapat dilakukan dengan beberapa teknik, seperti teknik pemanasan, perlakuan kimia, enkapsulasi, atau menggunakan agensia yang dapat digunakan untuk memanipulasi bioproses fermentasi dalam rumen, diantaranya yaitu menggunakan formaldehida, tanin, dan saponin (Chalupa, 1975); (Walli, 2005); (Ani *et al.*, 2015).

Tanin adalah senyawa fenolik yang dapat berikatan dengan protein dan melindunginya dari proses degradasi oleh mikrobia dalam rumen. Tanin dibagi menjadi dua, yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis (Makkar, 2003a). Tanin terkondensasi dapat berikatan dengan protein dan stabil pada pH yang cenderung netral di dalam rumen. Ikatan antara tanin terkondensasi dengan protein tersebut dapat terlepas pada pH yang asam seperti pada organ pencernaan pascarumen, sehingga protein tersebut diserap di usus halus dan dapat dimanfaatkan sebagai sumber asam amino secara langsung oleh ternak (Jayanegara *et al.*, 2019).

Salah satu tanaman yang menghasilkan senyawa tanin dalam jumlah yang tinggi adalah pala. Kandungan total tanin pada daun pala adalah 175 g/kg BK dengan kandungan tanin terkondensasi sebesar 72 g/kg BK dan tanin terhidrolisis sebesar 103 g/kg BK (Jayanegara *et al.*, 2011). Hal ini menunjukkan bahwa daun pala berpotensi sebagai penghasil senyawa tanin yang dapat dimanfaatkan untuk memproteksi protein pakan berkualitas tinggi. Tanaman pala merupakan salah satu tanaman berumah dua, yaitu antara tanaman jantan dan betina berada pada pohon yang berbeda. Pohon pala betina umumnya lebih produktif dalam menghasilkan buah dibandingkan dengan pohon pala jantan (Wahyuni & Bermawie, 2015). Perbedaan antara kedua jenis pohon tersebut memungkinkan terjadinya perbedaan kandungan tanin diantara keduanya. Hal tersebut menggambarkan pentingnya analisis kandungan tanin pada daun dari pohon jantan dan pohon betina.

Beberapa penelitian sebelumnya mengenai penggunaan tanin untuk proteksi protein secara *in vitro* dapat menurunkan hasil fermentasi rumen. Beberapa diantaranya proteksi bungkil biji kedelai dengan tanin kondensasi daun kaliandra yang dikominasikan dengan urea-zeolit dengan imbang 2/1 dan 3/1 % ransum basal memiliki kecernaan BK dan PK dalam rumen yang paling rendah dan kecernaan tertinggi pada tahap pepsin-HCl (Rimbawanto & Hartoyo, 2021). Penelitian mengenai proteksi protein bungkil kedelai dengan tanin lainnya yaitu dengan menggunakan daun sengon sebagai sumber tanin, hasilnya yaitu penggunaan tanin 2, 4, 6% dapat menurunkan produksi gas, produksi metan, kecernaan bahan kering, kecernaan bahan organik, energi metabolis, dan produksi protein mikrobia secara signifikan dibandingkan kontrol tanpa penambahan tanin (Ganesa *et al.*, 2023).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan antara pohon pala jantan dan betina, perbedaan kandungan tanin antara daun pala pohon jantan dan betina, serta kadar tanin daun pala yang optimal untuk mengikat protein, yang kemudian dapat dijadikan sebagai dasar penentuan persentase untuk proteksi protein pakan.

## 2. Metode

### 2.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Kebun Ngobo Afdeling Gebungan PTPN IX dan Laboratorium Biokimia Nutrisi, Bagian Nutrisi Makanan Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada pada bulan September sampai November 2018

### 2.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan timbangan digital, oven, alat ultrasonik Bandelin Sonopulse untuk ekstraksi tanin, seperangkat alat analisis proksimat, seperangkat alat untuk analisis kandungan fenol, tanin, tanin terkondensasi dan seperangkat alat uji pengikatan tanin dengan BSA. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pala jantan dan betina dari Kebun Ngobo Afdeling Gebungan PTPN IX, bahan-bahan kimia untuk analisis fenol, tanin, tanin terkondensasi, serta pengikatan tanin dengan BSA.

### 2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahapan yaitu penentuan kadar tanin total dan tanin terkondensasi, dan optimalisasi pengikatan tanin dengan protein BSA. Daun pala yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bagian daun muda (pucuk) yang dikoleksi dari daun pohon pala jantan dan betina..

## 2.4 Prosedur Penelitian

### A. Penentuan Kadar Fenol, Total Tanin, dan Tanin Terkondensasi (Makkar, 2003b)

- **Preparasi Sampel.** Daun pala dipotong-potong dan dikeringkan dengan menggunakan oven oven 55°C selama 3 x 24 jam. Sampel daun pala tersebut kemudian digiling dengan menggunakan *wiley mill* dengan ukuran diameter lubang saringan 1 milimeter untuk kemudian diekstraksi dan dianalisis kandungan taninnya. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan aseton 70%. Sampel daun pala sebanyak 20 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan ukuran 15 ml dan ditambah dengan 10 ml aseton 70%. Sampel tersebut kemudian dimasukkan dalam alat ultrasonik selama 2 x 10 menit dengan diistirahatkan selama 5 menit diantaranya pada suhu kamar. Sampel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *chilling room*, kemudian disentrifuse pada 3000 g selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifuse tersebut kemudian diambil untuk dianalisis kadar taninnya.
- **Penentuan Kadar Fenol.** Penentuan ini dilakukan dengan menggunakan reagen folin-ciocalteu dengan prinsip reaksi oksidasi reduksi. Supernatan hasil ekstraksi diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen folin dan 2,5 ml sodium karbonat. Sampel tersebut kemudian dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan pada suhu kamar selama 40 menit. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 725 nm. Perhitungan kadar tanin dilakukan dengan dimasukan dalam persamaan regresi dari pembuatan kurva standar.
- **Penentuan Kadar Tanin.** Penentuan kadar tanin dilakukan dengan menggunakan polivinilpolipyrrolidone (PVPP) sebanyak 100 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml aquades dan 1 ml ekstrak tanin, kemudian diinkubasi selama 15 menit dalam refrigerator. Sampel tersebut kemudian disentrifuse pada 3000 g selama 10 menit dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk dianalisis total fenol non tanin seperti langkah sebelumnya. Nilai total tanin diperoleh dari: Tanin = Total Fenol - Total Fenol Non Tanin
- **Penentuan Kadar Tanin Terkondensasi.** Penentuan kandungan tanin terkondensasi dilakukan dengan metode yang berprinsip pada reaksi depolimerisasi oksidatif tanin kondensasi dalam butanol-HCl. Sampel daun pala sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam tabung *hungtube* dan ditambahkan 2 ml aseton 70%, kemudian ditambah dengan 3 ml reagen butanol-HCl dan 0,1 ml dari reagen ferric dan divortex. Tabung tersebut kemudian ditutup dan dimasukkan ke dalam *water bath* pada suhu 97 – 100 °C selama 60 menit. Tabung didinginkan pada suhu ruang kemudian dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Nilai tanin terkondensasi dihitung dengan rumus: Tanin Terkondensasi = Absorbansi 550 nm x 78,26 x Faktor Pengenceran %DM

### B. Optimalisasi Pengikatan Tanin Dengan Protein BSA (Makkar, 2003b)

Tahapan pengujian ini berdasarkan prinsip metode tanin presipitat protein menurut Makkar (2003b). Tabung reaksi sebanyak 6 buah diisi dengan masing-masing larutan BSA sebanyak 2 ml dan ditambahkan metanol 50% sebanyak 0,95; 0,90; 0,85; 0,80; 0,75; 0,70 ml secara berurutan pada tiap tabung, kemudian ditambah dengan tanin hasil ekstraksi dari daun pala sebanyak 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 ml secara berurutan pada tiap tabung. Sampel tersebut kemudian divortex dan diinkubasi dalam refrigerator selama semalam. Endapan yang terbentuk dipisahkan melalui sentrifugasi pada 3000 g selama 10 menit kemudian ditambahkan dengan 1,5 ml larutan SDS 1% dan divortex kembali.

Larutan yang telah divortex tersebut kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 ml SDS TEA dan 1 ml reagen ferric chloride. Larutan sampel dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm selama 15 – 20 menit. Hasil absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan regresi dari standar asam tanat.

### 2.5 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah kandungan senyawa fenol daun pala dan optimalisasi peningkatan tannin daun pala betina dengan protein BSA.

### 2.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan dan pengukuran ditabulasi menggunakan Microsoft Excel selanjutnya dilakukan pengujian analisis variansi, jika terdapat perbedaan diantara perlakuan maka dilakukan uji perbandingan t- test (Stell & Torrie, 1989).

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Gambaran Umum

Daun pala yang digunakan berasal dari PTPN XI unit kerja kebun Ngobo Afdeling Gebungan yang terletak di desa Waringinputih, Kecamatan Bergas, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Pohon pala terdiri dari dua jenis berdasarkan kelamin bunganya, yaitu pohon pala jantan dan betina. Pohon betina umumnya lebih produktif dibandingkan dengan pohon jantan. Perbedaan kedua jenis pohon tersebut dapat dilihat dari penampakan fisik pohonnya pada Gambar 1 dan Gambar 2. Ciri fisik yang dapat diamati yaitu pada pohon pala jantan lebih banyak terdapat bunga pala dibandingkan dengan buahnya, sedangkan pada pala betina lebih banyak buahnya dibandingkan dengan bunganya. Anatomi bunga jantan dan bunga betina juga berbeda, diantaranya yaitu jumlah kelopak bunga pada bunga jantan lebih banyak dibanding pada bunga betina, selain itu pada bunga jantan memiliki benang sari dan pada bunga betina memiliki putik.



Gambar 1. Pohon Pala Jantan



Gambar 2. Pohon Pala Betina

Ciri fisik lain yang dapat diamati yaitu pohon pala jantan dewasa memiliki sudut antara cabang bagian luar dengan batang lebih dari lebar sedangkan pada betina sudutnya lebih sempit. Perbedaan lain antara kedua jenis pohon pala tersebut terletak pada daunnya; pada pohon betina memiliki daun yang lebih lebar dibandingkan dengan pada pohon jantan. Wahyuni & Bermawie (2015)

menyatakan bahwa pohon pala jantan umumnya mempunyai percabangan dengan sudut cabang yang sempit sehingga pertumbuhan tajuknya cenderung tegak ke atas, posisi daun agak tegak dan daunnya terlihat lebih langsing sedangkan pohon pala betina memiliki percabangan yang hampir mendatar atau cenderung horisontal, posisi daun agak mendatar sampai merunduk dengan ukuran daun yang lebih besar dan lebar.

### 3.2 Kandungan Senyawa Fenol Daun Pala

Daun pala dari pohon jantan dan betina yang digunakan dalam penelitian ini dianalisis komposisinya kimianya, kemudian dianalisis kandungan fenolnya yang meliputi total fenol, fenol non-tanin, serta tanin, baik tanin terkondensasi maupun terhidrolisis. Hasil analisisnya dapat diamati pada Tabel 1. Daun pala jantan memiliki kadar BK 34,36 % dan BO 91,36 %, sedangkan daun pala betina memiliki BK 32,05% dan BO 93,26%.

Tabel 1. Kandungan total fenol, fenol non-tanin, total tanin, tanin terkondensasi, dan tanin terhidrolisis daun pala jantan dan betina (%BK).

Perlakuan	Total fenol	Fenol non-tanin	Total tanin	Tanin terkondensasi	Tanin terhidrolisis
Daun Pala Pohon Jantan	7,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,02	4,84 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,23	1,99 ± 0,24 <sup>a</sup>
Daun Pala Pohon Betina	12,76 ± 0,36 <sup>b</sup>	3,16 ± 0,06	9,60 ± 0,42 <sup>b</sup>	4,35 ± 0,41	5,24 ± 0,83 <sup>b</sup>

Keterangan:<sup>a, b</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Kandungan total fenol, total tanin, dan tanin terhidrolisis pada daun pala betina nyata lebih tinggi dibandingkan dengan daun pala jantan (P<0,05), sedangkan untuk kandungan fenol non-tanin dan tanin terkondensasinya tidak berbeda nyata (P>0,05). Senyawa fenolik merupakan senyawa yang disintesis secara alami oleh tanaman sebagai hasil metabolit sekunder. Salah satu senyawa fenolik yang dihasilkan oleh tanaman adalah tanin yang memiliki karakteristik mampu membentuk senyawa kompleks dengan makromolekul lain, seperti protein (Jayanegara & Sofyan, 2008).

Tanin terbagi menjadi dua, berdasarkan struktur penyusunnya, yaitu tanin terkondensasi dan terhidrolisis. Hasil analisis kandungan tanin daun pala jantan dan betina menunjukkan bahwa pada daun pala jantan kandungan tanin terkondensasinya lebih tinggi dibanding tanin terhidrolisis, sedangkan pada daun betina lebih rendah dibanding tanin terhidrolisisnya. Perbedaan struktur kedua jenis tanin tersebut yaitu tanin terhidrolisis terdiri dari inti berupa karbohidrat yang berikatan ester dengan asam karbosilik fenolik, sedangkan tanin terkondensasi terdiri dari oligomer dua atau lebih flavan-3-ols (Makkar *et al.*, 2007).

Perbedaan struktur penyusun tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis mengakibatkan terjadinya perbedaan kemampuan pengikatannya dengan molekul lain. Tanin terkondensasi lebih memiliki peranan untuk berikatan dengan protein dibandingkan dengan tanin terhidrolisis. Kandungan tanin terkondensasi daun pala, baik jantan maupun betina tergolong cukup tinggi. Hasil analisis kandungan fenol dan tanin daun pala yang berbeda ditunjukkan dari penelitian lain, yaitu Tempomona *et al.*, (2015) menyatakan bahwa daun pala mengandung total fenolik 62,959 mg asam galat/kg sampel, total flavonoid sebesar 6,870 mg kuersetin/ kg sampel, serta total tanin 26,959 mg katekin/ kg sampel.

Kandungan total fenol dan tanin daun pala yang digunakan relatif lebih rendah dibandingkan literatur. Salah satu faktor lingkungan yang berperan dalam bervariasinya kandungan tanin pada tanaman adalah jenis tanah dimana tanaman tersebut tumbuh. Kandungan tanin daun nangka yang tumbuh pada jenis tanah mediteran lebih tinggi dibandingkan pada daun nangka yang tumbuh pada jenis tanah latosol dengan nilainya berturut-turut adalah 7,08% dan 4,76% (Sasongko, 2010). Tanah pada kebun Ngobo termasuk dalam jenis latosol (Oktavianingsih, 2010). Faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi perbedaan hasil analisis kandungan fenol dan tanin dari suatu tanaman yaitu varietas atau jenis tanaman serta lingkungan tumbuhnya tanaman tersebut. Jayanegara & Sofyan (2008) menyatakan bahwa perbedaan komposisi nutrisi dalam tanaman dipengaruhi oleh varietas, kondisi lingkungan, serta umur saat pemanenan.

### 3.3 Optimalisasi Pengikatan Tanin Daun Pala Betina dengan Protein BSA

Tahapan ini merupakan lanjutan dari tahap sebelumnya, yaitu daun pala yang telah dianalisis kandungan senyawa fenoliknya digunakan untuk pengujian kemampuan mengikat protein BSA dengan metode presipitasi. Daun pala yang digunakan adalah daun pala betina yang memiliki kandungan tanin lebih tinggi dibandingkan daun pala jantan. Hasil pengukurannya dapat diamati pada Tabel 2.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak daun pala yang ditambahkan maka jumlah protein yang terikat juga semakin banyak, namun apabila dilihat kemampuan pengikatan protein dari setiap daun yang ditambahkan mengalami penurunan. Hal ini berarti semakin banyak substrat yang ditambahkan maka akan mencapai titik jenuh tertentu kemudian mengalami penurunan kemampuan dalam mengikat protein, pada penelitian ini pada penambahan 5 mg paling tinggi, kemudian setelah itu mengalami sedikit penurunan.

Tabel 2. Pengukuran kadar protein BSA yang terikat oleh tanin daun pala pohon betina.

Tb	Larutan ekstrak (µl)	Daun pala (mg)	Jumlah protein terikat (mg)	Jumlah protein terikat (mg/mg daun)	Protein terikat (g/g tanin)	Protein terikat (g/g tanin kondensasi)
1	50	1	1,38	1,38	14,33	31,56
2	100	2	1,49	0,75	7,78	17,13
3	150	3	1,67	0,56	5,79	12,76
4	200	4	1,75	0,44	4,56	10,03
5	250	5	1,98	0,40	4,14	9,11
6	300	6	1,94	0,32	3,38	7,43

Kemampuan optimal 1 g tanin daun pala pohon betina adalah mengikat 14,33 g protein BSA, sedangkan 1 g tanin terkondensasi mengikat 31,56 g protein BSA. Hal ini menunjukkan bahwa tanin terkondensasi memiliki kemampuan mengikat yang lebih tinggi dibandingkan dengan total tanin yang masih mengandung tanin terhidrolisis. Kemampuan tanin dalam mengikat protein dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu kuantitas dan struktur penyusun tanin tersebut (Dawra *et al.*, 1988). Tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis daun pala sama-sama memiliki kontribusi dalam pengikatan protein. Proses terjadinya ikatan antara tanin dengan protein terjadi melalui empat jenis pengikatan. Ikatan-ikatan ini meliputi ikatan hidrogen yang terjadi pada gugus hidroksil dari grup fenolik dengan oksigen dari grup ketoimida pada protein, ikatan yang kedua yaitu antara bagian hidrofobik cincin aromatik pada fenol dengan bagian hidrofobik protein, ikatan yang ketiga yaitu ikatan ionik yang terjadi pada sisi anion fenolat tanin dengan sisi kation protein, serta ikatan yang terakhir yaitu ikatan kovalen yang terjadi pada kuinon yang terkondensasi subsekuen dengan gugus nukleofilik protein (Kumar & Singh, 1984).

## 4. Simpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa pohon pala jantan dan betina memiliki perbedaan ciri fisik. Daun pala dari pohon jantan dan betina memiliki kandungan total fenol, total tanin, dan tanin terhidrolisis daun pala pohon betina lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan dengan daun pala pohon jantan, sedangkan kandungan fenol non-tanin, serta tanin terkondensasi tidak berbeda nyata (P>0,05) antara kedua jenis daun tersebut. Kemampuan 1 g tanin daun pala pohon betina dapat mengikat 14,33 g protein BSA dan 1 g tanin terkondensasi mampu mengikat 31,56 g.

## Pustaka

- Ani, A. S., Pujaningsih, R. I., & Widiyanto. 2015. Perlindungan Protein Menggunakan Tanin dan Saponin Terhadap Daya Fermentasi Rumen dan Sintesis Protein Mikrob. *Jurnal Veteriner*. 16(3): 439-447.
- Chalupa, W. 1975. Rumen Bypass and Protection of Proteins and Amino Acids. *Journal of Dairy Science*. 58(8): 1198-1218.
- Dawra, R. K., Makkar, H. P. S., & Singh, B. 1988. Protein-binding capacity of microquantities of tannins. *Analytical Biochemistry*. 170(1): 50-53.
- Ganesa, R. P., Afzalani, A., Hermiseptia, F., Raguati, R., & Hoesni, F. (2023). Evaluasi Tepung Kedele Terproteksi Tanin Kondensasi dari Ekstrak Daun Sengon (*Albizia falcataria*) terhadap Ketahanan Degradasi oleh Mikroba di Rumen. *Jurnal Ilmiah Universitas Batanghari Jambi*. 23(1): 406-413.
- Jayanegara, A., & Sofyan, A. 2008. Penentuan Aktivitas Biologis Tanin Beberapa Hijauan secara in Vitro Menggunakan 'HohenheimGas Test' dengan Polietilen Glikol Sebagai Determinan. *Media Peternakan*. 31(1): 44-52.
- Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C. R., Marquadt, S., Kreuzer, M., & Leiber, S. 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology*. 163(2-4): 231-243.
- Jayanegara, A., Ridla, M., Laconi, E. B., & Nahrowi. 2019. Komponen Antinutrisi Pada Pakan. Bogor: IPB Press.
- Kumar, R., & Singh, M. 1984. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32(3): 447-453.
- Makkar, H. P. S. 2003a. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49: 241-256.
- Makkar, H. P. S. 2003b. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage: A Laboratory Manual. Dordrecht: Springer Science+Business Media Netherlands.
- Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P., & Becker, K. 2007. Plant Secondary Metabolites. New Jersey: Humana Press.
- McDonald, P., Edward, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. 2011. Animal Nutrition (7th ed). Harlow: Prentice Hall/Pearson.
- Oktavianingsih, E. 2010. Analisis Break Even Point (BEP) Komoditas Minyak Pala di PT. Perkebunan Nusantara IX (Persero) Kebun Ngobo Semarang tahun 2004-2008. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Rimbawanto, E. A., & Hartoyo, B. 2021. Degradasi Protein Ransum Basal yang Disuplementasi Undegraded Dietary Protein dan Rumen Degradabel Protein Secara In Vitro. *Prosiding Seminar Teknologi dan Agribisnis Peternakan VIII: Peluang dan Tantangan Pengembangan Peternakan Terkini untuk Mewujudkan Kedaulatan Pangan*. Purwokerto. Pp. 403-409.
- Sasongko, W. T. 2010. Pemanfaatan tanin daun nangka untuk meningkatkan nilai rumen undegraded protein pada bahan pakan protein tinggi. [Tesis]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Stell, R. G. D., & Torrie, J. H. 1989. Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik (B. Sumantri, Trans.; Kedua). Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Tempomona, Y., Rorong, J. A., & Wuntu, A. D. 2015. Fotoreduksi Besi Fe<sup>3+</sup> Menggunakan Ekstrak Limbah Daun, Kulit, dan Cangkang Biji Pala (*Myristica fragrans*). *Jurnal MIPA*. 4(1): 46-50.
- Wahyuni, B., & Bermawie, N. 2015. Deteksi Tanaman Pala Jantan dan Betina Secara Dini Berbasis Kearifan Lokal. *Warta Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Industri*. 21: 28-31.