

## **ISOLASI DAN EKSTRAKSI DAUN *Indigofera zollingeriana* SEBAGAI KONSENTRAT TEPUNG DAUN BERDASARKAN TITIK ISOELEKTRIK, ASAMAMINO DAN ZAT ANTINUTRISI**

### ***ISOLATION AND EXTRACTION OF Indigofera zollingeriana LEAVES AS LEAF POWDER CONCENTRATE BASED ON ISOELECTRIC POINT, AMINOACIDS, AND ANTRINUTRITIONAL SUBSTANCES***

**Anugrah Eko Prasetyo\*, E. A. Rimbawanto, dan B. Hartoyo**  
Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

\*Email korespondensi: [anugrah.prasetyo@mhs.unsoed.ac.id](mailto:anugrah.prasetyo@mhs.unsoed.ac.id)  
DOI: <https://doi.org/10.20884/1.angon.2023.5.1.p68-77>

#### **ABSTRAK**

Salah satu bahan pakan dengan sumber protein tinggi adalah bungkil kedelai. Namun, saat ini bahan pakan tersebut masih di impor dari luar negeri, yang menyebabkan bungkil kedelai memiliki harga yang relatif tinggi dan jumlahnya terbatas. Pengurangan ketergantungan akan bahan pakan bungkil kedelai dilakukan dengan mengeksplorasi bahan pakan lokal dengan ketersediaan jumlah yang memadai dan memiliki kandungan nutrient yang tinggi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui titik isoelektrik, kandungan asam amino total dan kandungan zat antinutrisi tanin yang tepat pada pembuatan konsentrat protein daun *Indigofera zollingeriana* hasil dari ekstraksi dan isolasi protein. Tahapan ekstraksi dilakukan 2 tahap, NaOH 0,05 N pH 8 pada ekstraksi tahap pertama dan buffer asetat pH 4 pada tahap kedua. Penentuan isoelektrik, menurut menggunakan metode Yatno (2009) modifikasi high-performance liquid chromatography (HPLC) untuk kandungan asam amino total. Analisis protein kasar, menurut AOAC (2005) digunakan metode kjedhal, dan metode butanol-HCl digunakan pada uji kandungan zat antinutrisi tanin. Penelitian ini menghasilkan titik isoelektrik konsentrat protein pada daun *Indigofera zollingeriana* tercapai pada NaOH 0,05 N pH 8 pada ekstraksi pertama dan buffer fosfat pH 8 pada ekstraksi kedua menghasilkan endapan 0,108 g/gramBKdaun dengan kandungan protein kasar sebesar 65,98% (lebih tinggi dari bungkil kedelai) serta kandungan asam amino yang lebih lengkap dari bungkil kedelai dan tidak memiliki kandungan tanin.

**Kata Kunci :** Daun *Indigofera zollingeriana*, asam amino, protein, tanin, titik isoelektrik

#### **ABSTRACT**

One of the feed ingredients with a high protein source is soybean meal. However, currently these feed ingredients are still imported from abroad, which causes soybean meal to have a relatively high price and limited quantity. Reducing dependence on soybean meal feed ingredients is carried out by exploring local feed ingredients with adequate amounts of availability and high nutrient content. The purpose of this study was to determine the isoelectric point, total amino acid content and the exact content of tannin antinutrient substances in the manufacture of *Indigofera zollingeriana* leaf protein concentrate as a result of protein extraction and isolation. The extrasion stage was carried out in 2 stages, NaOH 0.05 N pH 8 in the first stage of extrasion and

pH 4 acetate buffer in the second stage. In isoelectric determination, according to Yatno (2009) a high-performance liquid chromatography (HPLC) modification method is used for the total amino acid content. In crude protein analysis, according to AOAC (2005) the kjedhal method is used, and the butanol-HCl method is used in the test of the content of tannin antinutrient substances. This study resulted in the isoelectric point of protein concentrate on the leaves of *Indigofera zollingeriana* reached at NaOH 0.05 N pH 8 at the first extraction and offer phosphate pH 8 in the second extraction resulted in a precipitate of 0.108 g / leave with a crude protein content of 65.98% (higher than soybean meal) as well as a more complete amino acid content than soybean meal and no tannin content.

**Keywords:** *Indigofera zollingeriana* leaves, amino acids, proteins, tannins, isoelectric poin

## PENDAHULUAN

Usaha peternakan merupakan salah satu bidang usaha yang sangat vital. Hal tersebut disebabkan karena usaha peternakan adalah sumber penghasil kebutuhan protein bagi kehidupan manusia. Kebutuhan protein sangat dibutuhkan manusia dalam memenuhi kebutuhan hidupnya. Berbagai macam produk hasil peternakan banyak dibutuhkan manusia untuk dikonsumsi seperti daging, telur, dan susu. Hal tersebut mendorong untuk berkembangnya industri peternakan menjadi lebih modern dan efisien. Industri peternakan yang maju akan menghasilkan produk-produk yang berkualitas pula sehingga ketika dikonsumsi oleh tubuh manusia akan memberikan efek yang lebih baik lagi. Bahan pakan merupakan faktor terpenting dalam pembuatan suatu pakan hewan ternak, baik maupun buruknya suatu pakan ternak sangat ditentukan juga dengan kualitas bahan pakan tersebut. Bahan pakan sumber protein memiliki harga yang cukup tinggi, semakin tinggi protein yang terkandung dalam bahan tersebut maka harga jual bahan tersebut akan semakin tinggi. Bahan pakan dengan kualitas baik sangat dicari oleh para produsen pakan sehingga ketersediannya terbatas.

Bungkil kedelai merupakan salah satu dari sekian banyak bahan pakan yang memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Sitompul (2004) menyatakan bahwa kandungan protein dalam bungkil kedelai sebesar 43 - 48% dan juga bungkil kedelai memiliki kandungan asam amino yang sangat bermanfaat untuk pakan unggas yaitu lisin dan triptofan yang dapat melengkapi defisiensi pada protein jagung. Hidayat et al. (2010) menyatakan bahwa bungkil kedelai sangat aman dikonsumsi oleh unggas karena zat antinutrisi yang terkandung di dalamnya akan menghilang setelah melalui proses pemanasan dan bungkil kedelai berasal dari pengolahan minyak kedelai yang diekstraksi sehingga didapatkan residu yang memiliki kandungan protein yang sangat baik.

Tumbuhan *indigofera* (*I. zolirengiana*) sudah lama dikenal di Indonesia. Abdullah (2014) mengatakan bahwa *indigofera* dibawa ke Indonesia oleh bangsa Eropa sekitar tahun 1900, dan sekarang terus berkembang secara luas. Akbarillah et al. (2010) menyatakan nilai nutrisi tepung daun *I. zollingeriana* adalah: PK 27,97%; SK 15,25%, Ca 0,22% dan P 0,18%. Safitri et al. (2020) menyatakan bahwa isolasi merupakan prosedur pemisahan suatu komponen kimia dengan komponen kontaminan sehingga didapat komponen yang diinginkan. Ramadayanti et al. (2019) menyatakan bahwa asam amino merupakan senyawa molekul yang terdiri dari

gugus fungsional karboksil dan amina. Asam amino esensial yang memiliki kandungan terbesar dalam bungkil kedelai adalah lisin. Lisin merupakan asam amino esensial yang sangat dibutuhkan oleh unggas. Rizkuna et al. (2014) menyatakan bahwa lisin memiliki fungsi yang krusial dalam perkembangan dan pertumbuhan unggas dikarenakan lisin berperan menyerap kalsium pada proses pertumbuhan tulang.

Widodo (2019) menyatakan bahwa zat antinutrisi merupakan zat yang memiliki fungsi sebagai penghambat perkembangan, pertumbuhan, tingkah laku, kesehatan, dan penyebaran populasi organisme biasanya zat anti nutrisi pada tanaman berfungsi sebagai alat perlindungan diri. Zat antinutrisi yang terkandung dalam bungkil kedelai adalah tripsin inhibitor. Menurut Nur (2019) tripsin inhibitor merupakan senyawa yang menghambat kerja enzim tripsin, sedangkan tripsin merupakan enzim yang berasal dari pankreas berfungsi untuk mencerna protein. Tripsin inhibitor dapat hilang setelah melalui proses pemanasan sehingga aman untuk dikonsumsi oleh unggas.

#### **METODE PENELITIAN**

Bahan kimia yang digunakan adalah natrium fosfat, asam asetat, garam asetat, NaOH, asam sulfat HCl, katalis  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , indikator bromcresolgreen 0,2%, indikator metil merah 0,1%, alkohol, buffer kalium borat, metanol, merkaptotanol, pereaksi ortoftalaldehid, aquabides. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah gelas beker 500 mL, timbangan analitik, sentrifuge CR 21GT4, pengaduk kaca, mortar, magnetic stirrer, autoclave, pH meter, hot box oven Size 2, corong kaca, tabung reaksi, kertas saring, incubator, gelas beker 250 mL, freeze dryer, pipet tetes, kertas saring milipore, aluminium foil, erlenmeyer, labu destruksi, alat destilasi, buret, statif dan HPLC. Variabel terikat yang diamati dan diukur adalah : (a) titik isoelektrik (b) asam amino total dan (c) zat antinutrisi tanin. Teknik pengukuran yang digunakan adalah pengukuran titik isoelektrik, analisis asam amino, dan analisis zat antinutrisi tanin.

#### **Pengukuran Titik Isoelektrik**

Pembuatan tepung daun rendah lemak dimulai dengan mengeringkan daun *I. zollingeriana* menggunakan leaf dryer selama 48 jam kemudian digiling hingga halus dan diayak. Proses berikutnya tepung daun dicuci menggunakan heksana selama 72 jam difiltrasi antara padat dan cair. Padatan dikeringkan menggunakan oven 40°C selama 20 jam, setelah kering dihaluskan menggunakan mortal.

Ekstraksi dilakukan dalam 2 tahap, ekstraksi pertama menggunakan NaOH 0,05 N, pH 8; pH 9; dan pH 10. Tahapan ekstraksi adalah sebagai berikut: (1) 50 g tepung *I. zollingeriana* dan 400 ml NaOH (tergantung proses pengolahan) dicampur dengan mixer hingga tercampur rata dan terbentuk pasta; (2) sampel disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan supernatan dan padatan. Supernatan ditempatkan dalam gelas Erlenmeyer untuk mendapatkan Supernatan I; (3) padatan diekstraksi kembali menggunakan 400 ml buffer asetat, pH 4, dilanjutkan dengan prosedur 2 untuk mendapatkan supernatan II; (4) Supernatan I dan Supernatan II disimpan dalam lemari es.

Tahap penentuan titik isoelektrik adalah sebagai berikut: (1) Supernatan I dan Supernatan II dibuat hingga 15 ml dan ditempatkan dalam labu Erlenmeyer; (2) pH awal larutan diukur kemudian pH 3, 4 dan 5 diatur dengan buffer sitrat sedangkan pH 6, 7 dan 8 disesuaikan dengan buffer fosfat; (3) larutan dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse dan dibiarkan dingin selama 24 jam; (4) Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 4200 rpm selama 15 menit; (5) Endapan dipisahkan dari filtratnya, kemudian dikeringkan pada suhu °C dalam oven 40°C, kemudian ditimbang. Jumlah sedimen terbesar menunjukkan titik isoelektrik dari nilai pH dan berfungsi sebagai acuan untuk pembuatan konsentrat protein daun.

Berikut ini adalah tahapan produksi konsentrat protein : (1) sisa supernatant dalam lemari pendingin dikeluarkan diambil sebanyak 15 ml; (2) larutan diukur pH awal kemudian diatur pH 3, 4 dan 5 menggunakan buffer sitrat sedangkan pH 6, 7 dan 8 menggunakan buffer phosphta sesuai titik isoelektriknya; (3) larutan dimasukkan dalam tabung sentrifuge, didiamkan selama 24 jam dalam suhu dingin; (4) sampel disentrifuge pada kecepatan 4200 rpm selama 15 menit; (5) endapan dipisahkan dari filtrate kemudian dikeringkan dengan oven suhu 40°C kemudian dianalisis kandungan asam amino dan zat antinutrisi tanin.

Tahapan analisis menggunakan metode HPLC : (1) sampel dihidrolis dengan 5 – 10 ml HCl 6 N setelah itu dioven dengan suhu 100°C selama 24 jam; (2) sampel dibilas dengan 30 ml cairan pengering yang didalamnya berisi picolotiocianat, methanol, dan trietilamin; (3) cairan bilasan ditambahkan kedalam labu evaporator kemudian dikeringkan dengan rotary evaporator dalam waktu 15 – 30 menit; (4) larutan derivatisasi sebanyak 30 kemudian ditambah pada sampel yang sudah dikeringkan yang memiliki kandungan Na asetat, trimetilamin, dan methanol; (5) larutan dilakukan pengenceran dengan ditambahkan Na asetat 1 M dan 10 ml asetonitril 60%;

larutan kemudian diinjeksi dalam HPLC sebanyak 5 µl.

Analisis zat antinutrisi tanin memakai metode butanol-HCL untuk mencari kandungan “condensed tanin”. Tanin kondensasi, dengan tahapan sebagai berikut : (1) sampel bahan sebanyak 0,2 g diekstrak dengan 10 ml aseton 70% dalam ultrasonik selama 20 menit; (2) hasil ekstrak disentrifuge hingga supernatan dan residu terpisah. Supernatan sebanyak 0,5 ml diambil menggunakan pipet kemudian dipindahkan dalam tabung reaksi; (3) supernatan kemudian ditambahkan 3 ml larutan butanol-HCL perbandingan (95:5) dan 0,1 ml larutan ferriamonium sulfat kemudian divortex hingga tercampur; (4) larutan dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam kemudian didinginkan; (5) larutan diukur absorbansi dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Titik Isoelektrik Konsentrat Protein Daun *Indigofera zollingeriana*

Titik isoelektrik konsentrat protein daun *I. zollingeriana* adalah kondisi ketika endapan paling banyak dihasilkan. Titik isoelektrik merupakan kondisi yang menyebabkan molekul protein mengalami pengendapan karena molekul protein memiliki muatan nol.

Tabel 1. Hasil Analisis Endapan Protein Daun *L. zollingeria* yang diekstraksi dengan Larutan NaOH pH 8, 9, 10 dan Buffer Asetat pH 4,5,6 dan Buffer Fosfat pH 6,7,8

Ekstraksi NaOH pH dan Buffer Asetat pH	pH Buffer Fosfat	Daun Leguminosa Indigofera (gram)
4		
8	3	0,091
	4	0,069
	5	0,062
	6	0,026
	7	0,083
	8	0,108
9	3	0,064
	4	0,088
	5	0,029
	6	0,096
	7	0,076
	8	0,105
10	3	0,069
	4	0,059
	5	0,022
	6	0,079
	7	0,077
	8	0,086

Hasil penelitian berdasarkan Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstraksi NaOH pH 8 dan buffer asetat pH 4 pada daun *I. zollingeriana* dengan penambahan buffer sitrat pH 3, 4 dan 5 serta buffer fosfat pH 6, 7 dan 8 menunjukkan hasil endapan protein daun *I. zollirengiana* terbanyak pada buffer fosfat pH 8 sebanyak 0,108 gram. Penelitian Wahyudi *et al.* (2022) dengan perlakuan yang sama yaitu ekstraksi protein daun kaliandra menggunakan NaOH pH 8 dan buffer asetat pH 4 memiliki endapan terbanyak pada buffer fosfat pH 8 sebanyak 0,039 gram. Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan buffer asetat yang bersifat asam dan diberi tambahan buffer fosfat yang memiliki sifat basa akan mengekstrak seluruh komponen tertinggal sehingga menghasilkan endapan yang lebih banyak.

Hasil penelitian berdasarkan Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstraksi NaOH pH 10 dan buffer asetat pH 4 pada protein daun *I. zollirengiana* dengan menambahkan buffer sitrat pH 3, 4 dan 5 serta buffer fosfat pH 6, 7 dan 8 menunjukkan hasil endapan protein daun *I. zollirengiana* terbanyak pada buffer fosfat pH 8 sebanyak 0,086. Hasil tersebut menunjukkan penurunan jumlah endapan dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan NaOH pH 8 dan 9. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Sudrajat *et al.*, (2016) menyatakan bahwa larutan yang mengalami keadaan basa akan mengakibatkan OH<sup>-</sup> mengikat OH<sup>+</sup> yang terkandung dalam gugus amina protein koro bengkok, tetapi kondisi yang semakin basa akan terjadi meningkatkan kelarutan protein sehingga endapan yang dihasilkan semakin sedikit.

Hasil penelitian berdasarkan tabel 1 menunjukkan bahwa endapan terbesar pada ekstraksi pH 8, 9 dan 10 sebesar 0,108 g, 0,105 g dan 0,086 g. Hasil tersebut menunjukkan bahwa titik isoelektrik terjadi pada ekstraksi NaOH pH 8 dan dengan menggunakan buffer fosfat pH 8 karena endapan yang dihasilkan paling banyak. Yatno *et al.* (2018) menyatakan bahwa pada pembuatan konsentrat daun kaliandra total endapan terbanyak yang berasal dari pengaturan pH presipitasi dengan menggunakan HCl/NaOH 0,1N yaitu pada pH 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 menunjukkan bahwa keadaan tersebut telah mencapai pH isoelektrik protein. Kandungan protein terbesar terdapat pada pH 8. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan NaOH pH 8, 9 dan 10 akan menunjukkan hasil endapan terbesar pada buffer fosfat pH 8. Titik isoelektrik berada pada NaOH pH 8 dan buffer fosfat pH 8. Pratiwi (2018) menyatakan bahwa ekstraksi protein apabila menggunakan larutan pH yang tinggi maka protein yang diekstrak akan semakin besar tetapi terdapat kemungkinan terjadi hidrolisis kembali pada protein.

### **Analisis Asam Amino Konsentrat Protein Daun *Indigofera zollingeriana***

Tabel 2 Hasil Analisis Proksimat Daun *Indigofera (I. zollingeriana)*

Daun Leguminosa	BK (%)	PK (%)	LK (%)	SK (%)	ABU (%)	BETN (%)
Indigofera ( <i>I. zollingeriana</i> )	97,24	27,82	2,48	19,15	10,93	39,62

*I. zollingeriana* mengalami kenaikan dibandingkan protein kasar tepung daun *I. zollingeriana* dengan protein awal sebesar 27,82%. Hasil ekstraksi menggunakan NaOH pH 8, 9 dan 10 menyebabkan protein kasar meningkat menjadi sebesar 65,98%, 61,28% dan 53,28%. Protein kasar konsentrat protein daun *I. zollingeriana* memiliki kandungan protein kasar yang lebih besar dibandingkan dengan bungkil kedelai. Besaran protein kasar konsentrat protein daun *I. zollingeriana* yang terbesar adalah 65,98% dan terkecil sebesar 53,28% jumlah tersebut lebih besar dibandingkan protein kasar yang dimiliki oleh bungkil kedelai sebesar 43%. Pratiwi *et al.* (2018) menambahkan bahwa kandungan protein kasar konsentrat kacang gude sebesar 86,15%.

Tabel 3. Hasil Analisis Komposisi Asam Amino Konsentrat Protein Daun *Indigofera zollingeriana*

Asam Amino	Indigofera	Bungkil Kedelai
Esensial		
Methionin	2,25	0,72
Arginin	6,06	3,59
Threonin	2,61	1,94
Histidin	3,71	1,33
Isoleusin	3,55	2,20
Leusin	5,75	3,77
Lisin	4,23	3,02
Phenilalanin	3,92	2,51
Valin	4,34	2,29
Non-esensial		
Aspartat	6,27	5,62
Glutamin	14,52	8,70
Serin	2,14	2,22
Glisin	1,88	1,91
Tirosin	1,99	1,84
Alanin	2,77	2,22
Total	65,98	43,88

Lisin merupakan asam amino esensial yang sangat penting pada komposisi asam amino pakan hewan sehingga kandungannya sangat diperhatikan. Hasil penelitian berdasarkan Tabel 3 konsentrat protein daun *I. zollingeriana* memiliki kandungan lisin sebesar 4,23% angka tersebut menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibanding kandungan lisin bungkil kedelai sebesar 3,02%. Rizkuna *et al.* (2014) menambahkan bahwa lisin memiliki fungsi sebagai asam amino pembatas pada unggas. Hasil penelitian berdasarkan Tabel 3 menunjukkan bahwa asam amino total



konsentrat protein daun *I. zollingeriana* sebesar 65,98% hasil tersebut jauh lebih besar dibandingkan kandungan asam amino total bungkil kedelai hanya sebesar 43,88%. Saraswati *et al.* (2017) menambahkan bahwa semakin besar nilai asam amino total maka akan menyebabkan nilai biologis protein meningkat.

Hasil penelitian menunjukkan kadar protein kasar daun *I. zollingeriana* menjadi 65,98% pada ekstraksi dengan NaOH pH 8. 61,28% ekstraksi dengan NaOH pH 9 dan 53,28% ekstraksi dengan NaOH pH 10. Peningkatan protein disebabkan karena protein terbebas dari bahan lainnya. Kandungan protein kasar konsentrat protein daun *I. zollingeriana* lebih besar dibanding bungkil kedelai yang memiliki kandungan protein kasar sebesar 43-48% (Wati *et al.* 2018). Hewan ternak dapat mencapai produksi dan perkembangan yang baik apabila mendapatkan asupan pakan ternak yang cukup dan seimbang.

### **Analisis Zat Anti Nutrisi Konsentrat Protein Daun *Indigofera Zollingeriana***

Zat anti nutrisi berupa tanin adalah salah satu faktor penghalang penggunaan konsentrat hijauan pada unggas. Tanin merupakan salah satu senyawa organik yang memiliki kandungan berupa campuran senyawa polifenol kompleks tersusun dari elemen H, C dan O selain itu membentuk molekul besar dengan berat lebih dari 2000. Kurniawati *et al.* (2016) menambahkan Mekanisme antijamur yang terdapat dalam kandungan tanin disebabkan tanin dapat menghambat sintesis khitin yang berfungsi sebagai pembentuk dinding sel jamur serta dapat merusak membrane sel menyebabkan jamur mengalami keterhambatan pertumbuhan.

Antinutrisi yang terkandung dalam tumbuhan hijauan berupa tanin dapat menyebabkan terhambatnya efisiensi nutrisi yang diserap oleh unggas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun *I. zollingeriana* tidak mengandung tanin sehingga aman untuk dikonsumsi unggas. Zaki *et al.* (2019) menambahkan bahwa batas toleran kandungan tanin yang terdapat pada sebuah ransum unggas sebanyak 0,33%. Tarigan dan Ginting (2011) menambahkan bahwa daun *Indigofera* memiliki kadar kandungan tanin yang termasuk rendah sehingga tidak akan menghambat aktivitas mikroba.

### **KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian, di dapat kesimpulan bahwa titik isoelektrik konsentrat protein daun *I. zollingeriana* tercapai pada NaOH 0,05 N pH 8 pada ekstraksi pertama dan bufer fosfat pH 8 pada ekstraksi kedua menghasilkan endapan 0,108 g/daun dengan kandungan protein kasar sebesar 65,98% (lebih tinggi dari bungkil kedelai) serta kandungan asam amino yang lebih lengkap dari bungkil kedelai dan tidak memiliki kandungan tanin.

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Abdullah, L. 2014. Prospektif Agronomi dan Ekofisiologi *Indigofera zollingeriana* sebagai Tanaman Penghasil Hijauan Pakan Berkualitas Tinggi. *Pastura* 3(2):79-83.
- Akbarillah, T., K. Kusuyah, & H. Hidayat. 2010. Pengaruh penggunaan daun *indigofera* segar sebagai suplemen Pakan Terhadap Produksi dan Warna Yolok



- Itik. Jurnal Sain Peternakan Indonesia 5(1): 27-33.
- AOAC. 2005. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist (AOAC) 18th ed. Maryland: AOAC International, William Harwitz (ed), United States of America.
- Hidayat, M., D. Kurnia, M. Sujatno, N. Sutadipura, and S. Setiawan. 2010. Perbandingan Kandungan Makronutrisi dan Isoflavon dari Kedelai Detam 1 dan Wilis Serta Potensinya dalam Menurunkan Berat Badan. *Bionatura* 12(1): 218114.
- Kurniawati, A., A. Mashartini, I. S. Fauzia. 2016. Perbedaan Khasiat Anti Jamur antara Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabur L.*) dengan nistatin terhadap Pertumbuhan *Candida Albicans*. *Jurnal PDGI* 65(3): 74-77.
- Nur, M.R.N.I.R. 2019. Pengaruh Penerapan Disiplin Kerja dan Komitmen Kerja Terhadap Kinerja Karyawan pada Pabrik Pengolahan Kedelai Di Desa Laren Lamongan. *JPIM (Jurnal Penelitian Ilmu Manajemen)*, 4(2): 987-998.
- Pratiwi H., N. L. A. Yusasrini, dan I. N. K. Putra. 2018. Pengaruh pH Ekstraksi Terhadap Rendemen, Sifat Fisiko-Kimia Dan Fungsional Konsentrat Protein Kacang Gude (*Cajanus cajan (L.) Millsp.*), *Jurnal ITEPA* 7 (1) : 1 – 11.
- Ramayanti, R.A., F. Swastawati, and S. Suharto. 2019. Profil Asam Amino Dendeng Giling Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) dengan Penambahan Konsentrasi Asap Cair yang Berbeda (Amino Acid Profiles of Dumbo Catfish (*Clarias gariepinus*) Jerked Meat Processed with Different Concentration of Liquid Smoke). *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology* 14(2): 136-140.
- Sitompul, S. 2004. Analisis asam amino dalam tepung ikan dan bungkil kedelai. *Buletin Teknik Pertanian* 9(1): 33-37.
- Sudrajat, A., N. Diniyah, R. R. Fauziah. 2016. Metode Ekstraksi Alkali pada Isolat Protein Koro Benguk (*Mucuna pruriens*). In: *Prosiding Seminar Nasional APTA Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, Jember*. p 192-198.
- Tarigan, A., & S. P. Ginting. 2011. Pengaruh taraf pemberian *Indigofera sp.* terhadap konsumsi dan pencernaan pakan serta pertambahan bobot hidup kambing yang diberi rumput *Brachiaria ruziziensis*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 16(1): 25-32.
- Wahyudi, I., E. A. Rimbawanto, B. Hartoyo. 2022. Isolasi dan Ekstraksi Daun Kaliandra (*Calliandra Calothyrsus*) sebagai Konsentrat Protein Daun ditinjau dari Titik Isoelektrik, Asam Amino, dan Zat Antinutrisi. *Journal of Animal Science and Technology* 4(2): 204-212.
- Wati A. K., Z. Zuprizal, K. Kustantinah, E. Indarto, N. D. Dono dan W. Wihandoyo. 2018. Performan Ayam Broiler dengan Penambahan Tepung Daun dalam Pakan. *Sains Peternakan: Jurnal Penelitian Ilmu Peternakan* 16(2) : 74-79.
- Widodo, W. 2019. Ilmu Nutrisi Ternak Unggas. Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang.
- Yatno. 2009. Isolasi Protein Bungkil Inti Sawit dan Kajian Nilai Biologinya Sebagai Alternatif Bungkil Kedelai Pada Puyuh . Tesis Magister, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- 
- Yatno, Nelson, R. Murni, Suparjo dan H.L. Syarifah. 2018. Isolasi Protein dan Analisis Asam Amino Konsntrat Protein Daun Kaliandra Sebagai Upaya Penyediaan Suplemen Pakan Ternak: 1. Kualitas Asam Amino Konsentrat Protein Hasil Ekstrasi Daun Kaliandra. In : Prosiding Seminar Nasional Fakultas Pertanian Universitas Jambi, Jambi. p 699-707.
- Zaki M. T., Riyanti, R. Sutrisna dan D. Septinova. 2019. Pengaruh Pemberian *Indigofera zollingeriana* dalam Ransum Terhadap Performa Itik Peking. Jurnal Riset dan Inovasi Peternakan 3 (3) : 8 - 13.