



UNIVERSITAS INDONESIA

**KEMAMPUAN ANTIFUNGI *Lactobacillus plantarum*
TERHADAP KAPANG YANG TUMBUH PADA SILASE**

SKRIPSI

**AULIA FAUZIAH
0706263706**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**KEMAMPUAN ANTIFUNGI *Lactobacillus plantarum*
TERHADAP KAPANG YANG TUMBUH PADA SILASE**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**AULIA FAUZIAH
0706263706**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

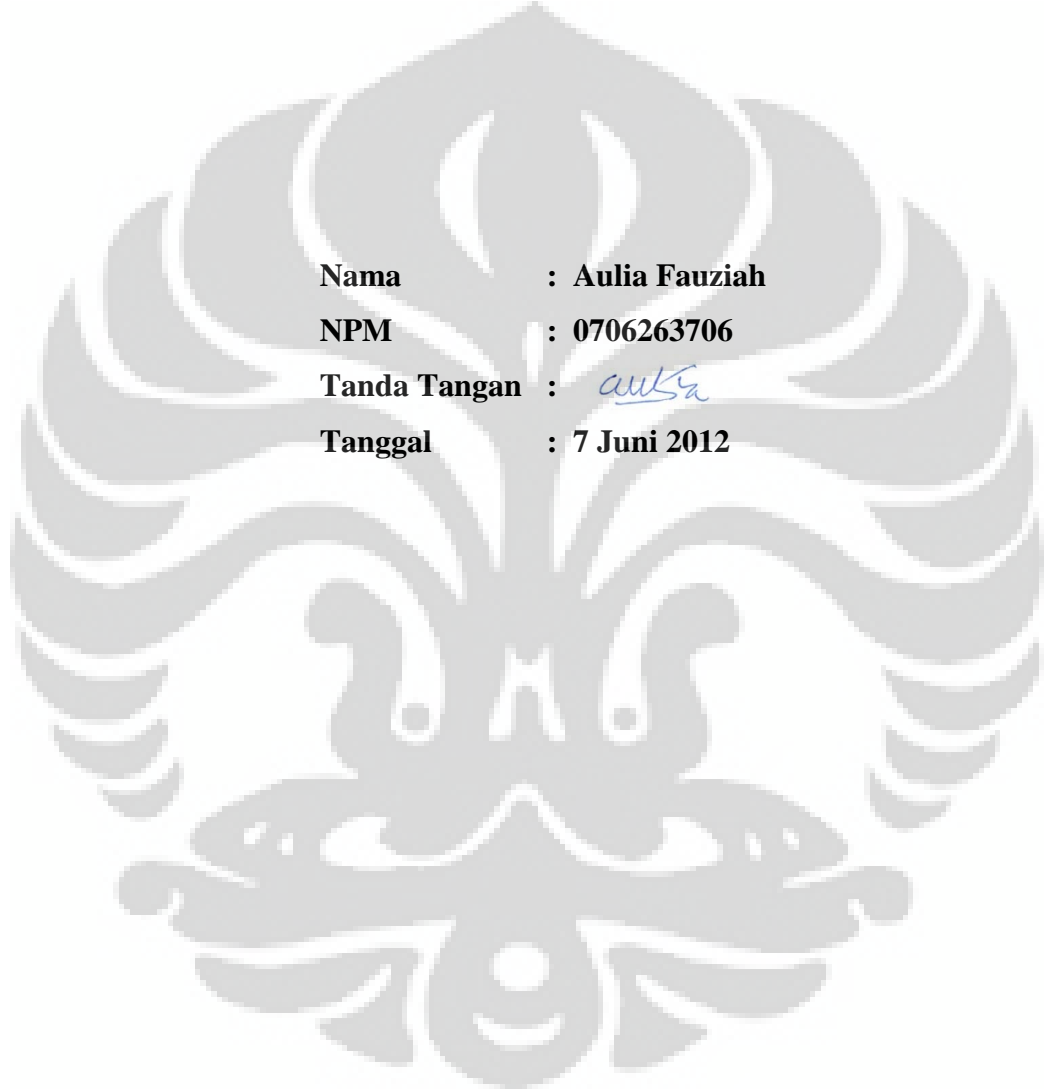
**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Aulia Fauziah

NPM : 0706263706

Tanda Tangan : *Aulia*

Tanggal : 7 Juni 2012


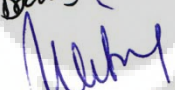
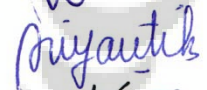
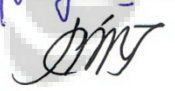


HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Aulia Fauziah
NPM : 0706263706
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Kemampuan Antifungi *Lactobacillus plantarum*
terhadap Kapang yang Tumbuh pada Silase

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Yantiyati Widyastuti ()
Pembimbing II : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. ()
Penguji I : Ariyanti Oetari, Ph.D. ()
Penguji II : Dra. Dian Hendrayanti, M.Sc. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 7 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur Penulis ucapkan kepada Allah SWT atas segala rahmat, karunia, dan kasih sayang yang diberikan sehingga Penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam Penulis sampaikan kepada Rasulullah SAW, Sang Penyelamat dan pemberi petunjuk bagi kemaslahatan seluruh umat. Penulis juga ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Dr. Yantyati Widyastuti dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. selaku Pembimbing I dan Pembimbing II atas segala bimbingan, waktu, dukungan, semangat, materi, dan perhatiannya sehingga Penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
2. Ariyanti Oetari, Ph.D. dan Dra. Dian Hendrayanti, M.Sc. selaku Penguji I dan Penguji II yang telah memberikan saran-saran selama Penulis melakukan penelitian dan penulisan skripsi.
3. Retno Lestari, M.Si. selaku Penasihat Akademik atas rasa perhatian, nasehat, dukungan, dan do'a selama penulis berkuliah.
4. Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M.Sc., dan Dra. Nining Betawati Prihatini, M.Sc. selaku Ketua dan Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI serta Dra. Titi Soedjiarti, S.U selaku Koordinator Pendidikan.
5. Seluruh staf pengajar Biologi FMIPA UI atas semua ilmu pengetahuan yang diberikan selama perkuliahan.
6. Mama, Bapak, dan keluarga besar di rumah khususnya Bi Aie yang selalu memberikan do'a, kasih sayang, dan dukungan tiada henti kepada Penulis.
7. Asri Martini, S.Si, Ahmad Priyadi, SPL., Pak Taryana, Pak Taryono, Bu Rus, Pak Arif dan seluruh staf karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan.
8. Nana, Adis, Sela, tempat berbagi segala rasa sejak awal masuk Biologi hingga saat ini. Dan teman-teman seperjuangan Dwi, Naya, Desi, dan Uvi atas motivasi yang diberikan kepada penulis.

9. Para penghuni dan mantan penghuni *Laskar Pondok Rambutan*, Param, Siti, Ka Indah, Ka Widi, Yayah, Tika, Novi, dan Dela atas segala dukungan yang diberikan.
10. Seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi Industri Bioteknologi LIPI, Mba Mira, Mba Thyssen, Mba Uci, Teh Ihat, Mba Yeti, Mba Wulan, Mega, Mas Jhoni, Mas Eko, Mas Alex, Mas Kukun dan Mas Egi atas segala persahabatan dan bimbingan selama Penulis melakukan penelitian.
11. BLOSSOM, Keluarga Besar Biologi Angkatan 2007 atas segala dukungan dan jalinan pertemanan yang diberikan.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah banyak memberikan bantuan selama penulis menyelesaikan skripsi.

Akhir kata, Penulis meminta maaf yang sebesar-besarnya atas segala kesalahan, baik yang disengaja ataupun tidak. Semoga skripsi yang telah dibuat ini dapat bermanfaat bagi setiap orang yang membacanya.

Depok, 7 Juni 2012

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aulia Fauziah
NPM : 0706263706
Program Studi : S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Kemampuan Antifungi *Lactobacillus plantarum* terhadap Kapang yang Tumbuh pada Silase

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 7 Juni 2012
Yang menyatakan



(Aulia Fauziah)

ABSTRAK

Nama : Aulia Fauziah
Program Studi : S-1 Biologi Reguler
Judul Skripsi : Kemampuan Antifungi *Lactobacillus plantarum* terhadap Kapang yang Tumbuh pada Silase

Sebanyak enam strain *Lactobacillus plantarum* diteliti untuk menguji kemampuan antifungi terhadap kapang yang tumbuh pada silase. Suspensi sel *L. plantarum* strain DSK3, DR162, dan DP142 yang diisolasi dari dadih, strain 1A2 diisolasi dari tapai, strain TSD10 diisolasi dari kotoran sapi dan strain 1BL2 diisolasi dari buah strawberi memiliki kemampuan antifungi terhadap *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1), dan *Penicillium* sp.(2), namun tidak memiliki kemampuan antifungi terhadap jamur merah dan jamur putih dengan metode *double layer agar well diffusion*. Supernatan *L. plantarum* yang diendapkan dengan amonium sulfat 60% pada pengujian *paper disc assay* menunjukkan kemampuan antifungi pada *L. plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, TSD10, dan 1BL2 terhadap *A. fumigatus*, namun tidak menunjukkan kemampuan antifungi terhadap *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1), dan *Penicillium* sp.(2). Suspensi sel semua strain *L. plantarum* menghasilkan zona hambat total terhadap *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(2) dan zona hambat parsial terhadap *Penicillium* sp.(1). Ekstrak supernatan *L. plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, TSD10, dan 1BL2 menghasilkan zona hambat parsial terhadap *A. fumigatus*.

Kata Kunci : Kapang, kemampuan antifungi, *Lactobacillus plantarum*, silase
xv + 75 hlm : 29 gambar; 7 tabel; 11 lampiran
Daftar Acuan : 69 (1962--2012)

ABSTRACT

Name : Aulia Fauziah
Program Study : S-1 Department of Biology - Regular
Title : Anti-fungi of *Lactobacillus plantarum* Against Moulds in Silage

Six strains of *Lactobacillus plantarum* were assayed to detect anti-fungi against moulds in silage. Cell suspension of *L. plantarum* strains DSK3, DR162, and DP142 which were isolated from dadih, strain 1A2 isolated from tapai, strain TSD10 isolated from dung and strain 1BL2 isolated from strawberry showed anti-fungi against *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1), *Penicillium* sp.(2), but there was no anti-fungi against red and white moulds in double layer agar well diffusion method. Supernatant of *L. plantarum* was precipitated with 60% ammonium sulfate. Supernatant extract of *L. plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, TSD10, and 1BL2, assayed with paper disc method, showed anti-fungi against *A. fumigatus*. There was no anti-fungi against *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1) and *Penicillium* sp.(2). Cell suspension of *L. plantarum* produced a total inhibition zone of *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(2) and a partial inhibition zone of *Penicillium* sp.(1), whereas the supernatant extract of *L. plantarum* produced partial inhibition zone of *A. fumigatus*.

Key Words : Anti-fungi, *Lactobacillus plantarum*, moulds, silage
xv + 75 pages : 29 pictures, 7 tables, 11 appendices
Bibliography : 69 (1962--2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Bakteri	4
2.2. Bakteri Asam Laktat	6
2.3. <i>Lactobacillus plantarum</i>	7
2.4. Silase	8
2.5. Morfologi Kapang	10
2.6. Kapang Penyebab Kerusakan pada Silase	13
2.7. Senyawa Bioaktif dari Bakteri Asam Laktat	15
2.8. Senyawa Antifungi dari Bakteri Asam Laktat	17
2.9. Pengendapan Senyawa Bioaktif (Protein) dengan Amonium Sulfat	19
3. METODOLOGI PENELITIAN	21
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	21
3.2. Alat dan Bahan	21
3.2.1. Alat	21
3.2.2. Bahan	21
3.2.2.1. Mikroorganisme	21
3.2.2.2. Medium	22
3.2.2.3. Bahan Kimia	22
3.2.2.4. Bahan Habis Pakai	22
3.3. Cara Kerja	22
3.3.1. Pembuatan Medium	23
3.3.1.1. <i>Man Rogosa Sharpe Broth</i> (MRS cair)	23
3.3.1.2. <i>Man Rogosa Sharpe Agar</i> (MRS agar)	23
3.3.1.3. <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	23
3.3.2. Pembuatan <i>Stock Culture</i> dan <i>Working Culture</i>	24
3.3.3. Pengamatan Morfologi <i>L. plantarum</i> secara Makroskopik dan Mikroskopik	24
3.3.4. Pengamatan Morfologi Kapang secara Makroskopik dan Mikroskopik	24

3.3.5. Penghitungan Jumlah Sel <i>L. plantarum</i> dengan Metode <i>Total Plate Count</i> (TPC)	25
3.3.6. Penghitungan Jumlah Spora Kapang dengan Metode <i>Total Plate Count</i> (TPC)	25
3.3.7. Pengujian Kemampuan Antifungi <i>L. plantarum</i> terhadap Kapang Uji	26
3.3.8. Produksi dan Pengendapan Ekstrak Supernatan <i>L. plantarum</i>	27
3.3.9. Pengujian Kemampuan Antifungi Ekstrak Supernatan <i>L. plantarum</i>	27
3.3.10. Pengolahan dan Analisis Data	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1. Pengamatan Morfologi <i>L. plantarum</i>	29
4.2. Pengamatan Morfologi Kapang	32
4.3. <i>Total Plate Count</i> (TPC) <i>L. plantarum</i> dan Kapang	42
4.4. Pengujian Kemampuan Antifungi <i>L. plantarum</i> terhadap Kapang Uji	43
4.5. Senyawa bioaktif dari Ekstrak Supernatan <i>L. plantarum</i>	51
4.6. Pengujian Kemampuan Antifungi Ekstrak Supernatan <i>L. plantarum</i> terhadap Kapang	52
5. KESIMPULAN DAN SARAN	59
5.1. Kesimpulan	59
5.2. Saran	59
DAFTAR REFERENSI	60

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.(1).	Hasil pengamatan morfologi <i>L. plantarum</i> strain DSK3, 1A2, DR162, TSD10, dan 1BL2 secara makroskopik dan mikroskopik berumur 18 jam, pada medium MRS agar, suhu 30° C	31
Tabel 4.2.(2).	Hasil pengamatan morfologi <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.(1), <i>Penicillium</i> sp.(2), jamur merah, dan jamur putih secara makroskopik dan mikroskopik berumur 7 hari, pada medium PDA, suhu 30° C	33
Tabel 4.3.(1).	Perbandingan jumlah sel bakteri dan spora kapang menggunakan metode <i>Total Plate Count</i> (TPC)	43
Tabel 4.4.(1).	Hasil pengujian kemampuan antifungi <i>L. plantarum</i> dengan metode <i>double layer agar diffusion</i> terhadap kapang uji, inkubasi 48 jam, suhu 30° C	46
Tabel 4.4.(2).	Konsentrasi <i>L. plantarum</i> yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nystatin berdasarkan perbandingan zona hambat	47
Tabel 4.6.(1).	Hasil pengujian kemampuan antifungi ekstrak supernatan <i>L. plantarum</i> dengan metode <i>paper disc assay</i> terhadap kapang uji, inkubasi 48 jam, suhu 30° C	54
Tabel 4.6.(2).	Konsentrasi ekstrak supernatan <i>L. plantarum</i> yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nystatin berdasarkan perbandingan zona hambat	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.(1).	Morfologi sel prokariotik	4
Gambar 2.1.(2).	Dinding sel bakteri Gram positif dan negatif	5
Gambar 2.4.	Silase	8
Gambar 2.5.(1).	Hifa bersekat dan tidak bersekat	11
Gambar 2.5.(2).	Morfologi <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
Gambar 2.5.(3).	Morfologi <i>Penicillium</i> sp.	13
Gambar 2.8.(1).	Mekanisme terjadinya kebocoran membran fungi oleh amphotericin B	18
Gambar 4.1.(1).	Hasil pengamatan morfologi <i>L. plantarum</i> secara makroskopik medium MRS agar, inkubasi 2 hari, suhu 30° C	30
Gambar 4.1.(2).	Hasil pengamatan morfologi <i>L. plantarum</i> secara mikroskopik perbesaran 1000x, medium MRS agar, 30° C	32
Gambar 4.2.(1).	Hasil pengamatan morfologi <i>A. fumigatus</i> secara makroskopik medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	34
Gambar 4.2.(2).	Hasil pengamatan morfologi <i>A. fumigatus</i> secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C..	35
Gambar 4.2.(3).	Hasil pengamatan morfologi <i>Aspergillus</i> sp. secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	36
Gambar 4.2.(4).	Hasil pengamatan morfologi <i>Aspergillus</i> sp.secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	36
Gambar 4.2.(5).	Hasil pengamatan morfologi <i>Penicillium</i> sp.(1) secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	37
Gambar 4.2.(6).	Hasil pengamatan morfologi <i>Penicillium</i> sp.(1) secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	38
Gambar 4.2.(7)	Hasil pengamatan morfologi <i>Penicillium</i> sp.(2) secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	39

Gambar 4.2.(8)	Hasil pengamatan morfologi <i>Penicillium</i> sp.(2) secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	39
Gambar 4.2.(9).	Hasil pengamatan morfologi jamur merah secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	40
Gambar 4.2.(10).	Hasil pengamatan morfologi jamur merah secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	40
Gambar 4.2.(11).	Hasil pengamatan morfologi jamur putih secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	41
Gambar 4.2.(12).	Hasil pengamatan morfologi jamur putih secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C	42
Gambar 4.4.(1).	Hasil pengujian kemampuan antifungi <i>L. plantarum</i> dengan <i>double layer agar well diffusion method</i> terhadap <i>A. fumigatus</i> pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C	48
Gambar 4.4.(2).	Hasil pengujian kemampuan antifungi <i>L. plantarum</i> dengan <i>double layer agar well diffusion method</i> terhadap <i>Aspergillus</i> sp. pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C	48
Gambar 4.4.(3).	Hasil pengujian kemampuan antifungi <i>L. plantarum</i> dengan <i>double layer agar well diffusion method</i> terhadap <i>Penicillium</i> sp.(1) pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C	49
Gambar 4.4.(4).	Hasil pengujian kemampuan antifungi <i>L. plantarum</i> dengan <i>double layer agar well diffusion method</i> terhadap <i>Penicillium</i> sp.(1) pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C	49
Gambar 4.4.(5).	Hasil pengujian kemampuan antifungi <i>L. plantarum</i> dengan <i>double layer agar well diffusion method</i> terhadap jamur merah pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C	50
Gambar 4.4.(6).	Hasil pengujian kemampuan antifungi <i>L. plantarum</i> dengan <i>double layer agar well diffusion method</i> terhadap jamur putih pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C	51

Gambar 4.5.(1).	Ekstrak supernatan hasil pengendapan dengan amonium sulfat yang telah dilarutkan dalam bufer fosfat	52
Gambar 4.6.(1).	Hasil pengujian kemampuan antifungi ekstrak supernatan <i>L. plantarum</i> dengan <i>paper disc assay</i> terhadap kapang uji pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C	56



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema kerja penelitian	67
Lampiran 2.	Pembuatan <i>stock culture</i> dan <i>working culture</i> <i>L. plantarum</i> dan kapang	68
Lampiran 3.	Skema cara kerja <i>Total Plate Count</i> (TPC) spora kapang	69
Lampiran 4.	Skema cara kerja <i>Total Plate Count</i> (TPC) sel bakteri ...	70
Lampiran 5.	Pengujian sifat antagonistik <i>L. plantarum</i> terhadap kapang uji dengan metode <i>double layer agar well</i> <i>diffusion</i>	71
Lampiran 6.	Skema cara kerja produksi supernatan <i>L. plantarum</i>	72
Lampiran 7.	Skema cara kerja pengendapan ekstrak supernatan <i>L. plantarum</i> dengan amonium sulfat	72
Lampiran 8.	Skema kerja uji antagonistik ekstrak supernatan dengan metode <i>paper disc assay</i>	73
Lampiran 9.	Panduan warna Castell-Polychromos No.9216	74
Lampiran 10.	Tabel jumlah sel <i>L. plantarum</i> pada menggunakan metode <i>Total Plate Count</i> (TPC)	75
Lampiran 11.	Tabel jumlah kapang menggunakan metode <i>Total Plate</i> <i>Count</i> (TPC)	76

BAB 1 PENDAHULUAN

Silase adalah hijauan pakan ternak yang diawetkan dalam proses fermentasi (Ridwan dkk. 2005: 117). Silase dengan kualitas baik membuat ternak sehat sehingga dapat menambah berat badan ternak dan susu yang dihasilkan lebih banyak (O'Brien dkk. 2010: 131). Hijauan pakan ternak yang umum digunakan dalam pembuatan silase antara lain berasal dari tanaman jagung, gandum, dan rumput (Ridwan dkk. 2005: 117).

Prinsip dasar pembuatan silase adalah proses fermentasi hijau pakan ternak dengan kelembaban tinggi dan disimpan dalam kondisi anaerobik (Ridwan dkk. 2005: 117). Selama proses pembuatan silase dapat tumbuh berbagai macam mikroorganisme seperti bakteri asam laktat (BAL), antara lain *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, dan *Pediococcus* spp. (Filya dkk. 2007: 5108). *Lactobacillus plantarum* umumnya digunakan sebagai inokulan dalam pembuatan silase (Gollop dkk. 2004: 662). Weinberg & Mug tahun 2003 (lihat Filya dkk. 2007: 5108), menggunakan *L. plantarum* sebagai inokulan pada silase karena *L. plantarum* dapat menurunkan pH silase dengan cepat dan menghasilkan asam laktat yang banyak.

Lactobacillus plantarum dapat menggunakan karbohidrat terlarut untuk menghasilkan asam laktat. Selama proses fermentasi, asam laktat akan menurunkan pH silase sehingga dapat menghambat mikroorganisme lain yang dapat merusak silase (Widyastuti 2008: 225). Mikroorganisme-mikroorganisme lain yang dapat menurunkan kualitas silase, yaitu *Enterobacteria*, *Clostridia*, kapang, dan khamir. Beberapa kapang merupakan mikroorganisme yang berbahaya dalam pembentukan silase karena menghasilkan mikotoksin yang dapat mengganggu kesehatan ternak (McDonald dkk. 1991: 80). Patulin merupakan mikotoksin yang dihasilkan oleh *Penicillium* dan *Paecilomyces* yang dapat menyebabkan hilangnya nafsu makan, menurunnya produksi susu, berkurangnya aktivitas rumen yang dapat menyebabkan rusaknya rumen flora dan penyakit *hemorrhagic* pada sapi (Guyot dkk. 2002: 1).

Upaya untuk menghambat pertumbuhan kapang perusak silase yaitu dengan menambahkan inokulum BAL. Tingginya jumlah BAL akan memberi

kesempatan BAL untuk menghambat pertumbuhan kapang. Pertumbuhan kapang yang terhambat dapat menurunkan jumlah mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang (Widyastuti 2008: 225--226).

Pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* terhadap kapang dapat dilakukan dengan metode *double layer agar well diffusion* berdasarkan Queiroz dkk. (2009: 21). Kemampuan antifungi ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar koloni yang ada di dalam sumur. Zona hambat dibentuk melalui interaksi antara senyawa antifungi yang berdifusi melalui medium yang dihasilkan oleh *L. plantarum* dalam sumur dengan kapang yang terdapat di sekitar sumur (Wu 1962: 16). Berbagai penelitian mengenai kemampuan BAL dalam menghambat kapang kontaminan pada silase telah dilaporkan. Schillinger & Villareal (2010: 109) telah menguji 69 strain BAL terhadap *Penicillium nordicum* dan 39 strain di antaranya menghasilkan zona hambat pada medium *Man Rogosa Sharpe Agar*.

Kemampuan antifungi BAL disebabkan oleh berbagai senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri antara lain hidrogen peroksida, *diacetyl*, dan bakteriosin yang bekerja secara antagonistik terhadap mikroorganisme patogen (McDonald dkk. 1991: 80). Salah satu senyawa antifungi yang ditemukan pada BAL berupa protein. Störm dkk. (2002: 4326) melaporkan bahwa *L. plantarum* MiLAB 393 memproduksi protein berupa *cyclic dipeptides cyclo* yang dapat menghambat pertumbuhan kapang. Ekstraksi protein dilakukan dengan pengendapan amonium sulfat pada supernatan *L. plantarum*, lalu dilakukan pengujian kemampuan antifungi pada ekstrak protein tersebut dengan metode *paper disc assay* (Vamanu dkk. 2010: 503).

Saat ini *Biotechnology Culture Collection* (BTCC) telah memiliki isolat-isolat *L. plantarum* yang diisolasi dari dadih, tapai, strawberi, dan kotoran sapi. Ratnakomala dkk. (2006: 131) melaporkan bahwa *L. plantarum* strain 1A2 yang diisolasi dari tapai dan 1BL2 yang diisolasi dari strawberi merupakan koleksi dari BTCC dan telah digunakan sebagai inokulum dalam pembuatan silase karena dapat menurunkan pH silase dengan cepat. Namun demikian, kemampuan antifungi strain *L. plantarum* tersebut terhadap kapang yang umum mengontaminasi silase belum diketahui.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui kemampuan antifungi beberapa strain *L. plantarum* terhadap kapang-kapang yang tumbuh pada silase. Hipotesis penelitian adalah *L. plantarum* dapat menghasilkan senyawa antifungi yang mampu menghambat pertumbuhan kapang kontaminan pada silase. Penghambatan pertumbuhan kapang kontaminan dari silase diharapkan dapat mengurangi kerusakan silase pascapanen.

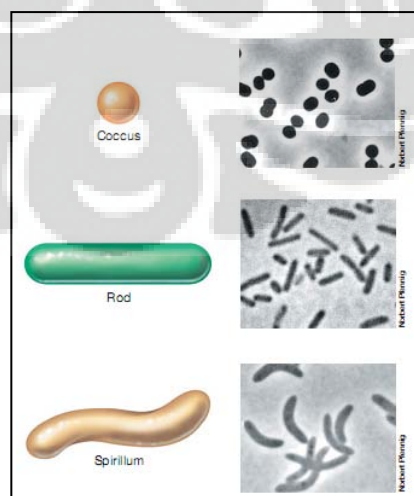


BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Bakteri merupakan organisme prokariotik yang tidak memiliki membran inti (nukleoid), dinding sel tersusun atas peptidoglikan, dan memiliki plasmid (*extra chromosomal DNA*) (Madigan dkk. 2012: 32). Sel bakteri tidak memiliki organel-organel bermembran seperti retikulum endoplasma, badan golgi dan mitokondria. Sebagian besar aktivitas organel sel bakteri dilakukan oleh ribosom (Besty & Kough 2005: 69).

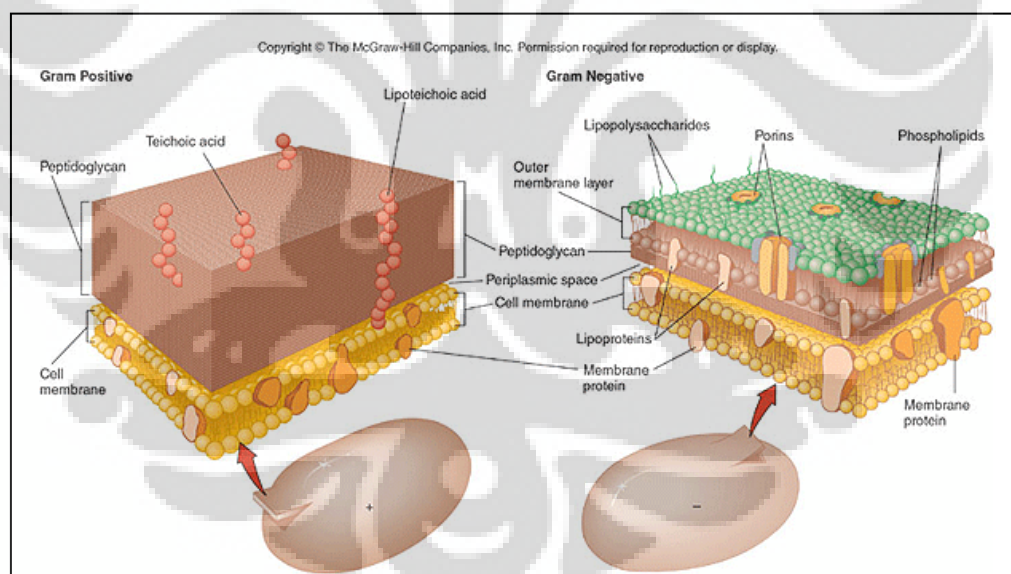
Bakteri dikelompokkan menjadi tiga bagian berdasarkan morfologinya yaitu batang (*rod*), kokus (*coccus*), dan spiral (*spirillum*) (Gambar 2.1.(1)). Bakteri berbentuk batang menyerupai tongkat pendek/ batang kecil dan silindris. Bentuk batang saling melekat satu dengan lainnya, ujung dengan ujung, sehingga memberikan penampilan rantai. Bakteri berbentuk kokus memperlihatkan bentuk bulat seperti bola-bola kecil. Bakteri berbentuk spiril memperlihatkan bentuk seperti spiral. Bakteri berbentuk spiral (*spirillum*) banyak dijumpai sebagai individu-individu sel yang tidak saling melekat. Spiral yang pendek dan tidak lengkap disebut sebagai bakteri koma atau vibrio (Waluyo 2007: 203--205; Madigan dkk. 2012: 48).



Gambar 2.1.(1). Morfologi sel prokariot

[Sumber:Madigan dkk. 2012: 48.]

Bakteri juga dibedakan menjadi dua bagian berdasarkan bahan penyusun dinding sel bakteri, yaitu Gram positif dan negatif (Gambar 2.1.(2)). Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan yang tebal yaitu 90% dari berat dinding sel, sedangkan bakteri Gram negatif hanya memiliki lapisan peptidoglikan 15--20% dari berat dinding sel. Kandungan lainnya pada dinding sel bakteri Gram positif yaitu adanya asam teikoat yang berikatan kovalen dengan asam muramik dan membuat beberapa lapisan peptidoglikan menyatu. Asam teikoat berfungsi untuk menstabilkan dinding sel. Dinding sel bakteri Gram negatif tersusun atas periplasma yang di dalamnya terdapat lapisan peptidoglikan yang tipis. Periplasma berada pada bagian luar dari membran sitoplasma. Selain itu, terdapat Braun's lipoprotein yang bersifat hidrofobik pada membran luar sehingga dapat mengikat peptidoglikan dengan kuat. Membran luar dari bakteri Gram negatif merupakan lipid bilayer yang memiliki struktur yang hampir sama dengan membran sitoplasma, yaitu mengandung lipid, protein dan lipopolisakarida (LPS) (Singh & Kapoor 2010: 31--33).



Gambar 2.1.(2). Dinding sel bakteri Gram positif dan negatif

[Sumber: Anonim 2005: 3.]

2.2. Bakteri Asam Laktat

Klasifikasi pertama bakteri asam laktat (BAL) dilakukan oleh Orla Jensen pada tahun 1919 yang membagi BAL menjadi empat genus, yaitu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Leuconostoc* (lihat McDonald dkk. 1991: 82). Beberapa karakter yang digunakan oleh Orla-Jensen pada tahun 1919 dalam klasifikasi BAL yaitu berdasarkan morfologi bakteri seperti batang, bulat, atau berbentuk tetrad, fermentasi glukosa secara homofermentatif atau heterofermentatif, dan suhu pertumbuhan bakteri. Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri Gram positif yang dapat memfermentasi karbohidrat menjadi energi dan asam laktat (Beasley 2004: 6). Sifat bakteri asam laktat lainnya antara lain, katalase negatif, berbentuk batang atau kokus, tidak memiliki spora, dan anaerob fakultatif (Jansson 2005: 7).

BAL umumnya ditemukan diantara mikrobiota saluran gastrointestinal dan genitourinari manusia dan hewan. BAL merupakan komponen esensial yang berperan dalam berbagai fungsi kesehatan seperti immunomodulasi, integritas intestinal, dan resistensi patogen. BAL juga ditemukan pada berbagai macam lingkungan yang kaya akan nutrisi, seperti susu, hasil ternak, sayuran, sereal, dan daging, sehingga BAL juga digunakan untuk probiotik dan bahan aditif berbagai komoditas makanan. Eksploitasi komersial BAL sebagai starter dan kultur prebiotik banyak dilakukan (Mozzi dkk. 2010: 3--4).

Axelsson pada tahun 2004 melaporkan bahwa BAL memiliki dua tipe jalur fermentasi heksosa monosakarida yaitu fermentasi homolaktik (glikolisis/ jalur *Embden Meyerhof Parnas*) dan fermentasi heterolaktik (*6-phosphogluconate/ 6-phosphoketolase*). Berdasarkan kedua jalur fermentasi tersebut, metabolisme BAL dibagi menjadi tiga yaitu homofermentatif obligat, heterofermentatif obligat, dan homofermentatif fakultatif. Homofermentatif obligat hanya dapat memfermentasi gula dengan jalur glikolisis dan heterofermentatif obligat hanya dapat memfermentasi dengan jalur *6-phosphogluconate*, sedangkan heterofermentatif fakultatif dapat memfermentasi gula dengan kedua jalur tersebut (lihat Aarnikunnas 2006: 10--13).

Bakteri asam laktat yang memfermentasi dengan jalur glikolisis dapat mengurai satu molekul glukosa menjadi dua molekul asam laktat serta menghasilkan dua ATP pada proses akhir metabolisme. Hal yang berbeda diperlihatkan pada jalur *6-Phosphogluconate* yang tidak hanya menghasilkan asam laktat tetapi juga menghasilkan senyawa lain seperti karbondioksida dan etanol. Pada jalur *6-phosphogluconate*, satu molekul glukosa hanya menghasilkan satu molekul ATP, yang merupakan setengah dari hasil glikolisis (McDonald dkk. 1991: 87; Jay dkk. 2005: 151). Selain asam laktat, metabolisme BAL juga dapat menghasilkan berbagai macam senyawa, seperti *diacetyl*, *acetoin*, dan *2-3-butanediol* yang dihasilkan dari asam sitrat, serta senyawa volatil dan senyawa bioaktif peptida yang berasal dari katabolisme asam amino (Mozzi dkk. 2010: 3).

2.3. *Lactobacillus plantarum*

Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes* Garrity dkk. 2004 (lihat Felis & Dellaglio 2008: 46 & 52), *Lactobacillus plantarum* diklasifikasikan sebagai berikut:

<i>Kingdom</i>	: Bacteria
<i>Phylum</i>	: Firmicutes
<i>Class</i>	: Bacilli
<i>Order</i>	: Lactobacillales
<i>Family</i>	: Lactobacillaceae
<i>Genus</i>	: <i>Lactobacillus</i>
<i>Species</i>	: <i>Lactobacillus plantarum</i> (Orla-Jensen 1919)

Lactobacillus plantarum merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif, homofermentatif, tidak bersifat patogen, serta dapat ditemukan pada berbagai habitat termasuk liur dan saluran pencernaan manusia (Stefanie dkk. 2001: 5 dan Jansson 2005: 7). Gollop dkk. (2004: 662) menyatakan bahwa *L. plantarum* merupakan salah satu BAL yang umum digunakan sebagai starter pada silase. *Lactobacillus plantarum* juga merupakan

salah satu jenis BAL yang diketahui memiliki kemampuan menghambat terhadap fungi, yang dinyatakan oleh Sjögren dkk. (2003: 7554) bahwa *L. plantarum* MiLAB 14 mampu menghasilkan antifungi berupa *3-Hydroxy fatty acid*.

2.4. Silase

Silase adalah hijauan pakan ternak yang diawetkan dengan proses fermentasi (Gambar 2.4.) (McDonald dkk. 1991: 9). Ennahar dkk. pada tahun 2003 menyatakan bahwa prinsip pembuatan silase merupakan fermentasi hijauan oleh BAL dalam kondisi anaerob. Bakteri asam laktat akan menggunakan karbohidrat yang terlarut dalam air (*water soluble carbohydrate*) dan menghasilkan asam laktat yang berperan dalam penurunan pH silase (lihat Ratnakomala dkk. 2006: 161).



Gambar 2.4. Silase

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Proses pembuatan silase berlangsung dalam empat fase, yaitu fase aerob, fase fermentasi, fase stabil, dan fase panen atau pengeluaran untuk diberikan kepada ternak. Fase aerob merupakan fase saat proses respirasi tanaman akan tetap berlangsung selama masih tersedia oksigen. Fase fermentasi merupakan fase saat mikroorganisme anaerob mulai tumbuh. Mikroorganisme yang umum tumbuh akan berkompetisi untuk mendapatkan nutrisi. Bakteri asam laktat harus

bisa berkompetisi, sehingga dapat menghasilkan asam dan menekan pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Fase stabil merupakan fase lanjutan dari fase fermentasi. Pada fase tersebut BAL harus bisa berkompetisi dengan mikroorganisme lain untuk mempertahankan lingkungannya agar tetap asam. Fase panen merupakan fase saat oksigen mulai masuk kembali ke dalam silo, yang menyebabkan mikroorganisme aerob seperti kapang akan tumbuh dan berkembang pesat. Mikroorganisme tersebut akan merusak kualitas silase sehingga terjadi kehilangan gizi dan timbulnya racun atau toksin yang membahayakan ternak yang mengkonsumsi silase tersebut (Jansson 2005: 8).

Beberapa faktor yang memengaruhi kualitas silase antara lain kandungan air dan gula pada bahan baku pakan, kondisi anaerobik saat fermentasi terjadi, dan adanya BAL. Tolak ukur yang digunakan dalam menentukan kualitas silase dapat dilihat dari kecepatan fermentasi asam laktat oleh BAL dan konsentrasi kandungan asam laktat yang dihasilkan. Konsentrasi kandungan asam laktat yang semakin banyak akan menurunkan pH yang dapat menekan pertumbuhan kapang sehingga meningkatkan kualitas silase (Ohmomo dkk. 2002: 61--62). Selain pH dan asam laktat, kualitas silase yang baik diperlihatkan melalui beberapa parameter seperti warna, tekstur, dan suhu. Warna dan tekstur yang baik pada silase akan berwarna kuning kecokelatan dengan tekstur yang halus. Suhu yang menunjukkan kualitas silase yang baik berkisar 26--28° C. Suhu yang menurun sampai 5--10° C dan meningkat melebihi 30° C, maka silase tersebut telah terkontaminasi oleh mikroorganisme lainnya (Ridwan dkk. 2005: 119).

Bahan baku utama silase antara lain, tanaman jagung, gandum, dan rerumputan. Tanaman tersebut mengandung jumlah mikroorganisme yang tinggi (Ridwan dkk. 2005: 117). Miskovic dan Rasovic 1989 melaporkan jumlah mikroorganisme yang terkandung pada silase berkisar 10^6 -- 10^9 CFU/ml (lihat McDonald dkk. 1991: 81). Mikroorganisme-mikroorganisme yang dapat tumbuh pada saat pembuatan silase, antara lain BAL, enterobacteria, clostridia, *Bacillus* spp., khamir, dan kapang. Mikroorganisme tersebut akan tumbuh dan berkompetisi untuk mendapatkan nutrisi. Jika kondisi lingkungan sesuai, BAL akan dengan cepat mengasamkan lingkungan sehingga mikroorganisme yang lainnya tidak dapat tumbuh dan kondisi lingkungan akan stabil pada pH rendah.

Namun demikian, jika BAL tidak mengasamkan lingkungan dengan cepat, mikroorganisme yang tidak diinginkan akan tumbuh dan menurunkan kualitas silase (McDonald dkk. 1991: 80).

Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme utama yang berperan dalam keberhasilan pembuatan silase. Nilsson dan Nilsson pada tahun 1956 melaporkan bahwa spesies utama yang umum ditemukan dalam proses fermentasi silase adalah *Streptococci* dan *Lactobacilli*, dan *L. plantarum* merupakan spesies yang paling banyak diisolasi dari silase (lihat McDonald dkk. 1991: 83).

Berdasarkan tipe fermentasinya, *L. plantarum* termasuk ke dalam *Lactobacilli* homofermentatif. *Lactobacilli* homofermentatif dapat mengurai satu molekul glukosa menjadi dua molekul asam laktat dan menghasilkan dua ATP pada proses akhirnya. Berbeda dengan *Lactobacilli* heterofermentatif yang hanya menghasilkan satu ATP pada proses akhirnya (McDonald dkk. 1991: 87 dan Jay dkk. 2005: 151). Tingginya jumlah asam laktat dapat menekan pertumbuhan kapang kontaminan pada silase. Bakteri asam laktat yang umum digunakan sebagai starter adalah *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* dan *Pediococcus pentosaceus*. Sebagian besar BAL tersebut bersifat mesofilik, bersifat homofermentatif, serta dapat menurunkan pH silase menjadi 4 (Stefanie dkk. 2001: 5 dan Jansson 2005: 9).

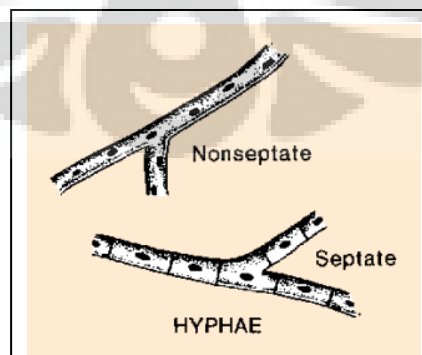
2.5. Morfologi Kapang

Kapang merupakan mikroorganisme eukariotik dan termasuk dalam fungi multiseluler. Fungi multiseluler memiliki struktur benang atau filamen yang disebut hifa. Kumpulan hifa yang saling berhubungan membentuk seperti jala disebut miselium. Kapang memiliki miselium yang dapat dibedakan atas miselium vegetatif dan generatif. Miselium vegetatif berfungsi menyerap nutrisi dari lingkungan, sedangkan miselium generatif berfungsi dalam reproduksi (Gandjar dkk. 2006: 10--11).

Kapang merupakan fungi yang berasal dari filum *Ascomycota*, *Zygomycota* dan *Basidiomycota*. Filum-filum tersebut dapat dibedakan berdasarkan struktur alat reproduksi seksual atau spora seksual. Filum *Ascomycota* bereproduksi secara seksual menghasilkan askospora yang berada di dalam askus. Filum *Zygomycota* memiliki spora seksual yang disebut zigospora. Filum *Basidiomycota* bereproduksi secara seksual dengan membentuk basidium yang menghasilkan basidiospora. Selain itu, spora aseksual pada filum *Ascomycota* disebut konidiospora yang dihasilkan oleh sel konidiogenus sedangkan pada filum *Zygomycota* disebut sporangiospora yang dihasilkan oleh sporangium (Benson 2001: 48--49).

Fungi hidup dalam berbagai fase. Apabila bentuk yang dihasilkan merupakan reproduksi secara seksual, seperti askospora pada *Ascomycota*, maka kapang tersebut berada pada fase teleomorf. Sebaliknya, apabila bentuk yang dihasilkan merupakan struktur spora aseksual, maka kapang tersebut berada pada fase anamorf (Webster & Weber 2007: 32).

Filum *Ascomycota* termasuk ke dalam fungi tingkat tinggi (*higher fungi*) karena memiliki hifa yang bersekat atau hifa *septate*. Sekat membagi hifa menjadi kompartemen-kompartemen dan setiap kompartemen terdapat satu inti sel sehingga disebut hifa *monocytic* (Benson 2001: 48). Sebaliknya, filum *Zygomycota* termasuk ke dalam fungi tingkat rendah (*lower fungi*) karena hifa yang dimiliki tidak bersekat. Hifa yang tidak bersekat disebut juga hifa *aseptate*, yang memiliki sejumlah inti sel yang tersebar di dalam sitoplasma sehingga disebut hifa *coenocytic* (Gambar 2.5.(1)) (Deacon 2006: 23).



Gambar 2.5.(1). Hifa bersekat dan tidak bersekat

[Sumber: Benson 2001: 48.]

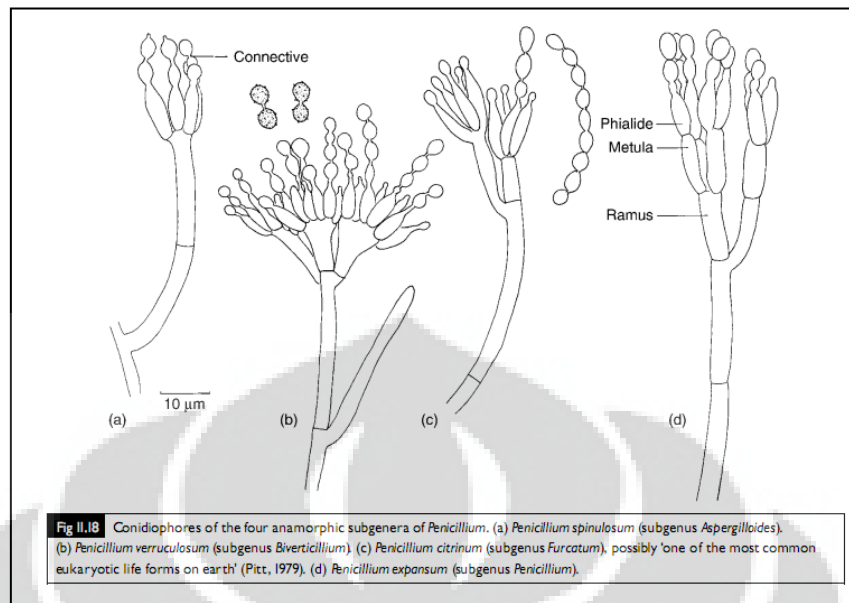
Kapang yang termasuk ke dalam filum *Ascomycota* adalah *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. *Aspergillus fumigatus* merupakan salah satu spesies dari genus *Aspergillus*, berwarna hijau tua karena adanya pigmen yang terdapat pada konidia. Kepala konidia khas berbentuk kolumnar. Konidiofor pendek, berdinding halus, dan berwarna hijau. Vesikula berbentuk gada yang lebar berdiameter 20--30 μm . Fialid terbentuk langsung pada vesikula, sehingga memiliki tipe sterigmata uniseriate. Konidia berbentuk bulat hingga semibulat berdiameter 2.5--3 μm serta berdinding kasar hingga berduri (Gambar 2.5.(2)) (Gandjar dkk. 1999: 24).



Gambar 2.5.(2). Morfologi *Aspergillus fumigatus*

[Sumber: Samson dkk. 2006: S135.]

Penicillium sp. dapat memiliki konidia berbentuk bulat, lonjong, atau silindris, konidiofor bertipe tunggal (*mononemateous*) atau berikatan (*synnemateous*). Konidiofor menunjang fialid yang berbentuk silindris dan di beberapa konidiofor dapat terjadi percabangan untuk membentuk metula. Percabangan konidiofor dapat terlihat dengan satu percabangan, dua percabangan, dan lebih dari tiga percabangan (Gambar 2.5.(3)) (Samson dkk. 1984: 98).



Gambar 2.5.(3). Morfologi *Penicillium* sp.

[Sumber: Webster & Weber 2007: 311.]

2.6. Kapang Penyebab Kerusakan pada Silase

Pertumbuhan kapang dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan antara lain kelembapan, suhu, keasaman substrat, dan kehadiran nutrisi-nutrisi yang diperlukan. Kapang dapat bersifat merugikan bagi kesehatan karena dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik atau dikenal sebagai mikotoksin, sedangkan gejala keracunannya dikenal sebagai mikotoksikosis. Mikotoksin tersebut bersifat karsinogenik atau berpotensi kanker setelah dilakukan pengujian pada hewan percobaan (Gandjar dkk. 2006: 99--103).

Kapang dapat berasosiasi dengan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang umum digunakan sebagai bahan baku silase. Selain itu juga, kapang banyak ditemukan di tanah, udara, dan air yang dapat mengontaminasi saat proses pembuatan silase. Tingginya jumlah kapang menyebabkan banyaknya spora kapang yang ikut dalam proses pembuatan silase, sehingga silase akan terkontaminasi oleh kapang (Rai & Varma 2010: 51). Keberadaan kapang sangat tidak diinginkan, karena kapang menghasilkan mikotoksin seperti aflatoxin, patulin, dan zearalenone yang berbahaya bagi hewan dan manusia (McDonald dkk. 1991: 129).

Menurunnya kesehatan hewan ternak yang disebabkan oleh kapang umumnya belum banyak diketahui. Tingkat kerusakan yang dilakukan oleh kapang tergantung pada jenis-jenis mikotoksin yang dihasilkan. Driehuis dan Elferink pada tahun 2000 menyatakan bahwa pemberian pakan yang mengandung mikotoksin dapat menyebabkan gangguan pencernaan, kemandulan, serta kerusakan hati dan ginjal pada hewan (*lihat McDonell & Kung 2006: 3*).

Adams (2007:1) melaporkan bahwa silase yang terkontaminasi kapang dapat menurunkan produksi susu pada sapi. Hal tersebut disebabkan nutrisi yang ada pada silase telah digunakan oleh kapang, sehingga nutrisi yang diserap oleh sapi lebih sedikit. Selain itu, Berger pada tahun 2005 melaporkan bahwa biaya produksi silase yang terkontaminasi mikotoksin pada industri susu Vermont merugi antara 4,5 sampai 9 juta dollar per tahun (*lihat McDonell & Kung 2006: 3-4*).

Guyot dkk. (2002: 1) melaporkan bahwa kapang yang mengontaminasi silase dapat mencapai 1,6 juta CFU/g silase. Kapang-kapang tersebut umumnya merusak kualitas silase. Kapang yang umum tumbuh pada silase yaitu *Arthrimum phaesperum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Byssochlamys sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium sp.*, *Geotrichum candidum*, *Mucor ramannianus*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Monilia sp.*, *Monascus sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.*, *Petriellidium boydii*, *Sordaria sp.*, *Scopulariopsis sp.*, *Trichoderma sp.* (McDonald dkk. 1991: 130 dan Biro dkk. 2009: 229).

Spesies *Aspergillus* telah dikenal sebagai kapang kontaminan yang umum menyerang pakan ternak seperti *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ochraceus*, dan *Aspergillus ustus*. Menurut Ghiasian dan Maghsoud (2011: 517), jumlah spesies-spesies *Aspergillus* tersebut sebesar 37,4% dari 1542 isolat kapang yang diambil dari pakan ternak dan merupakan spesies terbanyak yang ditemukan pada pakan ternak. Selain itu, spesies *Aspergillus* tersebut juga menghasilkan aflatoksin dan mikotoksin lainnya yang sangat berbahaya bagi kesehatan ternak dan manusia.

Aspergillus fumigatus merupakan kapang yang umum ditemukan pada rumput dan silase dan diketahui menyebabkan *mycotic pneumonia*, mastitis, aborsi, dan agen patogenik yang berasosiasi dengan *mycotic hemorrhagic bowel syndrome* (HBS) pada ternak sapi (Cole dkk. 1997: 826). *Aspergillus fumigatus* menghasilkan beberapa mikotoksin antara lain gliotoksin dan *termogens* yang bersifat toksik pada hewan ternak. Gejala hewan ternak yang mengonsumsi silase yang mengandung mikotoksin tersebut berupa kekurangan protein, kekurangan nutrisi, diare, iritasi, tingkah laku yang tidak normal, bahkan kematian.

Gliotoksin merupakan penekan sistem imun yang ditemukan pada hewan dan dapat mempengaruhi fermentasi rumen serta menurunkan kecepatan pencernaan (Bauer dkk. 1989: 45). Valentina dkk. (2003: 133) juga melaporkan bahwa *A. fumigatus* dapat menghasilkan *fumitremogens* B dan C, *fumigaclavines* B dan C.

Genus *Penicillium* merupakan kapang yang paling dominan yang ada pada suatu sampel silase. *Penicillium* merupakan kapang dengan jumlah paling banyak yang ada pada silase dibandingkan dengan kapang lainnya (Auerbach dkk. 1998: 565). *Penicillium* juga toleran terhadap pH rendah sehingga tahan terhadap keadaan asam (Lavermicocca dkk. 2000: 4327).

Salah satu kapang yang umum terdapat pada silase adalah *Penicillium roqueforti* yang dapat menghasilkan metabolit sekunder seperti *roquefortine C*, *isofumiclavines* A dan B, PR toksin, *macrofortines*, dan *mycophenolic acid*. *Roquefortine C* dan *mycophenolic acid* sering kali ditemukan pada silase (Schneweis dkk. 2000: 3639). Magnusson dkk. (2003: 130) menyatakan bahwa *Penicillium commune* dan *Penicillium roqueforti* merupakan jenis-jenis *Penicillium* yang dapat merusak pakan.

2.7. Senyawa Bioaktif dari Bakteri Asam Laktat

Senyawa bioaktif merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan mikroorganisme dan merupakan senyawa yang tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan. Produksi metabolit sekunder dapat berperan sebagai antimikroba (Carlile dkk. 2001 :303). Bakteri asam laktat telah diteliti mampu menghasilkan antimikroba lebih dari 80 tahun yang lalu. Bakteri asam laktat digunakan dalam

fermentasi untuk memelihara kualitas nutrisi berbagai macam makanan. Efek antimikroba yang digunakan BAL adalah asam laktat dan penurunan pH (Ammor dkk. 2006: 454-456). De Vyust dan Vandamme pada tahun 1994 melaporkan bahwa BAL telah lama diketahui dapat menghasilkan asam organik, seperti asam asetat, asam laktat, dan asam organik lainnya (*lihat* Muynck dkk. 2004: 344). Asam organik dapat berpenetrasi melalui dinding sel mikroorganisme dalam keadaan nilai pH di bawah pKa masing-masing asam organik tersebut. Nilai pKa asam yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat umumnya di bawah 5.0. Nilai pKa dari asam laktat, asetat, *3-phenyllactic acid*, dan *caproic acid* adalah 3,8, 4,7, 3,5, dan 4,9 sehingga asam organik berperan dalam aktivitas antifungi yang dihasilkan (Muynck dkk. 2004: 345).

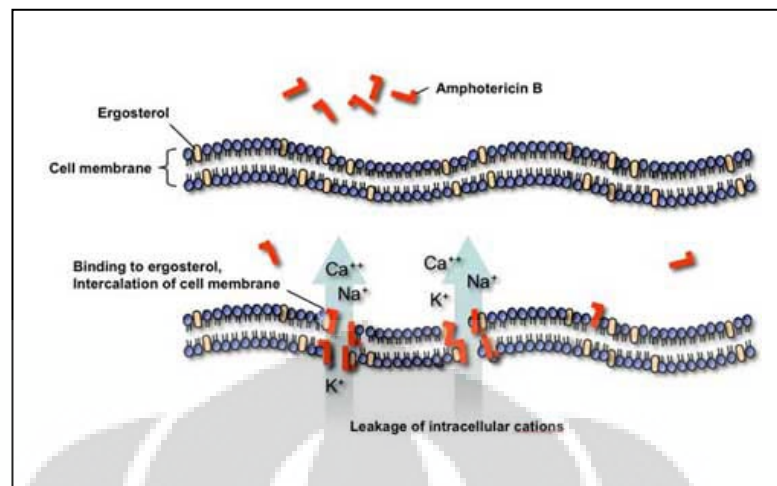
Senyawa lainnya yang ditemukan pada BAL adalah *diacetyl*. *Diacetyl* diidentifikasi oleh Van Niel sebagai komponen aroma dan rasa *butter*. Pada tahun 1927, Lemoigne melaporkan bahwa *diacetyl* dapat menjadi agen antimikroba yang dapat melawan *Bacillus*. *Diacetyl* dihasilkan dari genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Jumlah *diacetyl* akan meningkat jika asam sitrat dimetabolisme. Asam sitrat diubah melalui piruvat menjadi *diacetyl* (Caplice 1999: 138).

Senyawa antifungi yang umum ditemukan pada *L. plantarum* adalah *3-phenyllactic acid*. Menurut Li dkk. pada tahun 2007, *3-phenyllactic acid* merupakan hasil metabolisme *phenylalanine* pada BAL. *Phenylalanine* ditransaminasi menjadi *phenylpyruvic acid* (PPA), lalu PPA akan direduksi menjadi *3-phenyllactic acid* (*lihat* Mu dkk. 2009: 5226). Broberg dkk. (2007: 5549) melaporkan bahwa *Penicillium anomala* dan *Penicillium roqueforti* mampu dihambat oleh *L. plantarum* strain MiLAB393 dan MiLAB14 karena menghasilkan senyawa antifungi berupa *3-phenyllactic acid*. *3-phenyllactic acid* merupakan asam organik yang dihasilkan oleh beberapa strain BAL dan dikenal sebagai agen antimikroba dengan aktivitas spektrum yang luas melawan bakteri dan fungi yang bersifat patogen (Lavermicocca dkk. 2000: 4088 dan Magnusson & Schnürer 2001: 4).

2.8. Senyawa Antifungi dari Bakteri Asam Laktat

Agen antifungi merupakan agen yang mampu menghambat biodeteriorasi dan mencegah terjadinya penyakit yang disebabkan oleh fungi. Antifungi dihasilkan dari fermentasi mikroorganisme (Carlile dkk. 2001: 175). Odds dkk. pada tahun 2003 menyatakan mekanisme kerja penghambatan antifungi terbagi menjadi empat cara, yaitu menghambat sintesis dinding sel, mengganggu fungsi membran, menghambat sintesis protein, dan menghambat pembelahan sel. Penghambatan sintesis β -glukan dan sintetase kitin merupakan mekanisme utama suatu senyawa dalam menyerang dinding sel kapang. Senyawa antimikroba juga dapat mengganggu membran sel dalam beberapa cara yaitu dengan mengikat sterol sehingga fungsi membran terganggu atau dengan menghambat biosintesis sterol. Penghambatan juga dapat terjadi pada sintesis protein, seperti *blasticidin* yang dapat menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom. *Blasticidin* merupakan antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces griseochromogenes* yang berpotensi dalam menghambat sel prokariot dan eukariot. Cara lainnya yaitu penghambatan pada saat pembelahan sel dengan mengganggu kumpulan mikrotubuli selama pembelahan sel (lihat Störm 2005: 13).

Nistatin adalah antifungi yang berasal dari famili *polyene*, yang telah ditemukan sejak tahun 1950. *Polyene* merupakan famili obat tertua yang digunakan sebagai obat antifungi. *Polyene* menyerang membran sel fungi dengan cara berasosiasi dengan ergosterol (Gambar 2.6.1.(1)). Nistatin juga merupakan grup *polyene* yang paling banyak digunakan selain amphotericin B. Nistatin berasal dari *Streptomyces noursei*. Nistatin mempunyai aktivitas fungisidal atau fungistatika terhadap berbagai jenis fungi (Semis dkk. 2009: 334).



Gambar 2.8.(1). Mekanisme terjadinya kebocoran membran fungi oleh amphotericin B

[Sumber: Lewis 2010: 2.]

Störm dkk. (2002: 4322) telah mengisolasi *L. plantarum* dari silase yang memiliki sifat antifungi. Substansi antifungi yang telah diproduksi dari *L. plantarum* MiLAB 393 tersebut telah diisolasi serta strukturnya telah ditentukan. Substansi tersebut telah diidentifikasi sebagai *3-phenyllactic acid* dengan rasio 9/1 dari isomer L dan D, dua *cyclic dipeptides* *cyclo (L-Phe-L-Pro)* dan *cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro)*.

Niku-Paavola dkk. pada tahun 1999 melaporkan bahwa *L. plantarum* dapat menghasilkan substansi molekul berukuran kecil seperti *benzoic acid*, *methylhydantoin*, *mevalonolactone*, and *cyclo-(Glycyl-L-Leucyl)* yang aktif melawan *Fusarium avenacum* dan bakteri Gram negatif seperti *Pantoea agglomerans* (lihat Magnusson & Schnürer 2001: 1). Lavermicocca dkk. (2000: 4085) juga telah mengisolasi senyawa antifungi dari *L. plantarum*, yaitu *phenyllactic acid* and *4-hydroxy phenyllactic acid*. Spesies lainnya seperti *L. pentosus* mampu menghasilkan senyawa fungistatik seperti bakteriosin yaitu pentocin TV35b yang telah diisolasi oleh Okkers dkk. pada tahun 1999 (lihat Störm dkk. 2002: 4322). Magnusson dan Schnürer (2001: 1) juga memproduksi senyawa antifungi proteinaseus yang didapat dari *Lactobacillus coryniformis* strain Si3.

2.9. Pengendapan Senyawa Bioaktif (Protein) dengan Amonium Sulfat

Pengendapan protein dilakukan dengan tujuan memisahkan protein dari monosakarida, oligosakarida, nukleotida, asam amino bebas, dan protein lainnya yang masih tertinggal di dalam larutan. Proses pengendapan dilakukan dengan melibatkan pH dan konsentrasi senyawa organik atau konsentrasi garam dari medium. Garam yang sering digunakan untuk meningkatkan efektifitas pemisahan dan presipitasi protein adalah amonium sulfat (Rosenberg 1996: 125).

Proses presipitasi menggunakan amonium sulfat dapat dikelompokkan menjadi dua bagian yaitu *salting-in* dan *salting-out*. Metode *salting-in* dilakukan dengan menambahkan garam yang tidak jenuh atau pada konsentrasi rendah sehingga protein menjadi bermuatan dan larut dalam larutan garam. Kelarutan protein akan terus meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam. Apabila konsentrasi garam terus meningkat, maka kelarutan protein akan turun sehingga konsentrasi garam akan lebih tinggi dan protein akan mengendap. Proses penambahan garam amonium sulfat jenuh dinamakan *salting-out*. Pengendapan pada metode *salting-out* terjadi karena proses persaingan antara garam dan protein dalam mengikat air. Kelompok ion pada permukaan protein akan menarik banyak molekul air dan berikatan dengan sangat kuat. Amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam larutan protein akan menyebabkan tertariknya molekul air oleh ion garam. Hal tersebut disebabkan ion garam memiliki densitas muatan yang lebih besar dibandingkan dengan protein (Englard & Seifter 1990: 291--292).

Proses penambahan garam amonium sulfat jenuh bertujuan untuk menarik molekul air yang berikatan dengan protein sehingga protein akan saling berinteraksi, beragregasi, kemudian mengendap. Larutnya molekul air pada garam disebabkan ion garam memiliki densitas muatan yang lebih besar dibandingkan dengan protein (Englard & Seifter 1990: 291--292). Selain itu, amonium sulfat juga diketahui sebagai garam yang dapat menstabilkan struktur protein. Proses penambahan amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit dan di-*stirrer* perlahan pada suhu rendah, agar tidak terjadi denaturasi pada protein (Hedammar dkk. 2005: 11).

Pengendapan protein dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0 %, 20%, 40%, dan 60% telah dilakukan oleh Atta dkk. (2009: 117) dari supernatan *Lactobacillus plantarum* NRRLB-227 untuk mendapatkan antibiotik berupa peptida. Selain itu, Vamanu dkk. (2010: 502) melakukan pengendapan pada supernatan *Lactobacillus paracasei* strain YR dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, dan 60%. Ekstrak supernatan dari endapan tersebut mampu melawan beberapa jenis bakteri. Hasil yang didapat yaitu ekstrak supernatan pada kejenuhan 60% menunjukkan diameter zona hambat tertinggi terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, dan *Listeria innocua* dibandingkan dengan konsentrasi lainnya.



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Industri, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI. Penelitian berlangsung selama satu tahun, terhitung sejak Maret 2011 hingga Maret 2012.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian, antara lain gunting, jarum ose, botol alkohol, pembakar spirtus, spatel *Drygalski*, inkubator, *hot plate*, *microwave*, autoklaf [ärmstrong], *laminar air flow* [Esco], vorteks [Whirhlmixer], *corning tube*, *microtube* [Eppendorf], mikropipet 100-1000 µl [Thermo labsystem], *yellow tips* dan *blue tips* [Fisher], sentrifugasi [Eppendorf], *shaker incubator*, lemari pendingin [Sharp], timbangan digital [AND EK-200i], pH meter [Microprocesor pH meter], bejana gelas 50 ml [Iwaki Pyrex], erlenmeyer 300 ml [Iwaki Pyrex], tabung ukur 100 ml [Iwaki Pyrex], kamera [Sony], laptop [Compaq], *marker pen*, rak tabung, pipet pasteur, batang pengaduk, dan *magnetic stirrer*.

3.2.1. Bahan

3.2.1.1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah bakteri asam laktat (BAL) dan kapang uji. Bakteri asam laktat yang digunakan adalah *L. plantarum* DSK3, *L. plantarum* 1A2, *L. plantarum* 1BL2, *L. plantarum* TSD10, *L. plantarum* DR162, dan *L. plantarum* DP142. Kapang uji yang digunakan adalah *Aspergillus* sp., *A. fumigatus*, *Penicillium* sp.(1), *Penicillium* sp.(2), jamur merah, jamur putih.

Bakteri asam laktat dan kapang uji berasal dari koleksi *Biotechnology Culture Collection* (BTCC), kecuali *A. fumigatus* yang diperoleh dari *Institut Pertanian Bogor Culture Collection* (IPBCC).

3.2.1.2. Medium

Man Rogosa Sharpe Broth (MRS cair) digunakan untuk menumbuhkan bakteri. *Man Rogosa Sharpe Agar* (MRS agar) digunakan untuk pengujian antagonisme dan enumerasi sel bakteri. *Potato Dextrose Broth* (PDB) digunakan untuk menumbuhkan kapang. *Potato Dextrose Agar* (PDA) digunakan untuk enumerasi spora kapang.

3.2.1.3. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain, *peptone* [Difco], *Lab. lemco powder* [Oxoid], *yeast extract* [Difco], glukosa [Merck], K_2HPO_4 [Merck], sodium asetat [Merck], diamonium sitrat [Merck], $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [Merck], Mangan [Merck], *tween 80* [Merck], $CaCO_3$ [Merck], *Potato dextrose agar* [Oxoid], agar [CICA], dan alkohol 70%.

3.2.1.4. Bahan Habis Pakai

Bahan-bahan habis pakai yang digunakan meliputi, cawan petri, aluminium foil, akuades, tisu, kapas, *seal*, karet, kertas filter, plastik tahan panas, dan kertas label.

3.3. Cara kerja

Skema cara kerja penelitian terdapat pada Lampiran 1--8.

3.3.1. Pembuatan medium

3.3.1.1. *Man Rogosa Sharpe Broth* (MRS cair)

Sebanyak 1 g *peptone*, 0,8 g *Lab. lemco powder*, 0,4 g *yeast extract*; 2 g glukosa, 0,2 g K_2HPO_4 , 0,315 g sodium asetat, 0,2 g diamonium sitrat, 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,005 g mangan, 0,1 ml *tween* 80 dilarutkan dalam 100 ml akuades. Pembuatan medium MRS cair dilakukan dengan cara medium dipanaskan pada *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut, kemudian medium dipipet ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml. Medium digunakan untuk *stock culture* dan *working culture*. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.1.2. *Man Rogosa Sharpe Agar* (MRS agar)

Sebanyak 1 g *peptone*, 0,8 g *Lab. lemco powder*, 0,4 g *yeast extract*; 2 g glukosa, 0,2 g K_2HPO_4 , 0,315 g sodium asetat, 0,2 g diamonium sitrat, 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,005 g mangan, 0,1 mL *tween* 80, 1,8 g agar dilarutkan dalam 100 ml akuades. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium yang telah steril didiamkan hingga suhu mencapai $\pm 45^\circ C$, kemudian medium dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan mengeras.

3.3.1.3. *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Medium PDA dibuat berdasarkan petunjuk kemasan. Sebanyak 2,4 g PDA dilarutkan dalam 100 ml akuades. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium yang telah steril didiamkan hingga suhu mencapai $\pm 45^\circ C$, kemudian medium dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan mengeras.

3.3.2. Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture*

Pembuatan *stock culture L. plantarum* dengan cara 1 ose *L. plantarum* diinokulasi ke dalam 3 ml MRS cair dan pembuatan *working culture L. plantarum* dengan cara 0,1 ml *L. plantarum* dipipet ke dalam 3 ml MRS cair, kemudian diinkubasi selama 18 jam. Pembuatan *stock culture* dan *working culture* kapang dilakukan dengan cara digores secara zig-zag sebanyak 15 gores pada medium PDA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama 4 hari. *Stock culture L. plantarum* dan kapang kemudian disimpan dalam lemari es bersuhu 4° C, sedangkan *working culture* disimpan dalam suhu 28° C--30° C.

3.3.3. Pengamatan Morfologi *L. plantarum* secara Makroskopik dan Mikroskopik

Lactobacillus plantarum ditumbuhkan pada medium MRS agar yang diinkubasi selama 18 jam. Pengamatan makroskopik *L. plantarum* meliputi warna, tekstur, permukaan koloni, profil, dan tepi koloni. Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan mengamati pewarnaan Gram, bentuk dan ukuran sel pada mikroskopik okuler dengan perbesaran 10 x 40.

3.3.4. Pengamatan Morfologi Kapang secara Makroskopik dan Mikroskopik

Pengamatan makroskopik dan mikroskopik kapang berdasarkan Gandjar dkk. (1999: 4--5). Pengamatan makroskopik kapang antara lain warna berdasarkan warna Castell-Polychromos No.9216, tekstur, sporulasi, zonasi, tetes eksudat (*exudate drops*), garis-garis radial (*radial furrow*), zona pertumbuhan (*growing zone*), dan sebalik koloni (*reverse colony*) pada medium PDA yang diinkubasi selama tujuh hari. Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan mengamati septum pada hifa, fialid, metula, kepala konidia (bentuk, ukuran dan tipe), vesikel, dan konidia (ukuran, bentuk). Pengamatan dilakukan pada perbesaran 10 x 40.

3.3.5. Penghitungan Jumlah Sel *L. plantarum* dengan Metode *Total Plate Count* (TPC)

Penghitungan jumlah sel *L. plantarum* menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Madigan dkk. (2002: 146--147). Sebanyak 0,1 ml biakan BAL dari *working culture* dipipet ke dalam 3 ml medium MRS cair, lalu diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam. Biakan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil peletnya. Pelet ditambahkan akuades steril sebanyak 100 µl sampai menjadi suspensi sel. Sebanyak 30 µl suspensi sel diambil dan diencerkan dengan akuades steril hingga tingkat pengenceran 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹. Sel *L. plantarum* dari masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml, kemudian disebar dengan spatel *drygalski* ke dalam cawan petri yang berisi medium MRS agar. Penanaman sel *L. plantarum* dilakukan secara duplo untuk setiap pengenceran. Sel *L. plantarum* diinkubasi selama dua hari. Penghitungan hasil TPC berdasarkan Gandjar dkk. (1992:40):

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Rerata jumlah koloni pada cawan petri}}{\text{Tingkat pengenceran} \times \text{Volume inokulum}}$$

3.3.6. Penghitungan Jumlah Spora Kapang dengan Metode *Total Plate Count* (TPC)

Penghitungan jumlah spora kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Madigan dkk. (2002: 146--147). Biakan kapang dari *working culture* digores secara zig-zag pada medium PDA miring, lalu diinkubasi pada suhu 30° C selama 4 hari. Biakan ditambahkan 5 ml akuades steril lalu dikerik sampai menjadi suspensi spora dan diencerkan sebanyak 20x pengenceran dengan akuades steril untuk *A. fumigatus*, *Penicillium* sp.(1), dan jamur merah, sebanyak 30x pengenceran untuk *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp.(2), serta jamur putih yang tidak diencerkan. Hasil pengenceran suspensi spora tersebut diencerkan kembali hingga tingkat pengenceran 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. Spora kapang dari masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml, kemudian disebar dengan spatel *drygalski* ke dalam cawan petri yang berisi medium PDA. Penanaman spora

kapang dilakukan secara duplo untuk setiap pengenceran. Sel kapang diinkubasi selama empat hari. Penghitungan hasil TPC berdasarkan Gandjar dkk. (1992:40):

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Rerata jumlah koloni pada cawan petri}}{\text{Tingkat pengenceran} \times \text{Volume inokulum}}$$

3.3.7. Pengujian Kemampuan Antifungi *L. plantarum* terhadap Kapang Uji

Pengujian kemampuan antifungi dilakukan dengan metode *double layer agar well diffusion* berdasarkan Queiroz dkk. (2009: 21). Kontrol positif yang digunakan adalah nystatin dengan konsentrasi 1000 ppm (b/v), sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah akuades steril. Preparasi pengujian kemampuan antifungi dilakukan dengan menuang MRS agar pada cawan petri, kemudian dibiarkan hingga mengeras. MRS agar tersebut berfungsi sebagai lapisan bawah. Selanjutnya, sebanyak 0,1 ml suspensi spora kapang dipipet ke dalam 10 ml medium MRS agar bersuhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ yang berfungsi sebagai lapisan atas. Medium MRS yang telah berisi spora kapang dikocok perlahan, kemudian dituang ke dalam cawan petri yang telah berisi medium MRS agar lapisan bawah. Setelah agar mengeras, sumur dibuat pada lapisan atas agar dengan diameter 6 mm menggunakan sedotan steril.

Sebanyak 30 μl suspensi sel *L. plantarum* dimasukkan ke dalam sumur. Medium pengujian diamati selama 2 hari untuk melihat kemampuan BAL dalam menghambat pertumbuhan kapang. Pengujian kemampuan antifungi tersebut dinyatakan positif apabila disekitar koloni *L. plantarum* terdapat zona hambat (daerah yang tidak ditumbuhi oleh kapang). Diameter zona hambat diukur dengan jangka sorong, lalu dihitung rata-rata dan standar deviasi dari dua pengulangan yang dilakukan. Estimasi konsentrasi *L. plantarum* yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nystatin berdasarkan perbandingan zona hambat dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{Diameter } L. \text{ plantarum rata-rata}}{\text{Konsentrasi } L. \text{ plantarum}} = \frac{\text{Diameter nystatin rata-rata}}{\text{Konsentrasi nystatin}}$$

3.3.8. Produksi dan Pengendapan Ekstrak Supernatan *L. plantarum*

Lactobacillus plantarum diinokulasi sebanyak 2 ose ke dalam 5 ml MRS cair, lalu diinkubasi selama 18 jam pada suhu 30° C. Kemudian 5 ml BAL dituang ke dalam 100 ml MRS cair dan diinkubasi kembali selama 18 jam pada suhu 30° C. Kultur BAL disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C untuk memisahkan sel dan supernatan.

Sebanyak 100 ml supernatan dipekatkan dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 60%. Supernatan ditambahkan dengan amonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada kondisi dingin. Ekstrak supernatan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C untuk memisahkan endapan dengan supernatan. Endapan yang didapat disuspensikan dalam 500 µl buffer fosfat 50 mM, pH 7 (Rosenberg 1996: 124).

3.3.9. Pengujian Kemampuan antifungi Ekstrak Supernatan *L. plantarum*

Pengujian kemampuan antifungi ekstrak supernatan *L. plantarum* dilakukan dengan menggunakan *paper disc assay* berdasarkan Coolborn (2009: 569) terhadap empat kapang uji, yaitu *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1) dan *Penicillium* sp.(2). Kontrol positif yang digunakan adalah nystatin dengan konsentrasi 1000 ppm (b/v), sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah amonium sulfat dalam buffer. Preparasi pengujian kemampuan antifungi dilakukan dengan menuang MRS agar pada cawan petri, kemudian dibiarkan hingga mengeras. MRS agar tersebut berfungsi sebagai lapisan bawah. Selanjutnya, sebanyak 0,1 ml suspensi spora kapang dipipet ke dalam 10 ml medium MRS agar bersuhu ± 45° C yang berfungsi sebagai lapisan atas. Medium MRS yang telah berisi spora kapang dikocok perlahan, kemudian dituang ke dalam cawan petri yang telah berisi medium MRS agar lapisan bawah. Sebanyak 10 µl ekstrak supernatan *L. plantarum* dipipet ke dalam kertas cakram yang berdiameter 5 mm, kemudian medium pengujian diinkubasi selama 18 jam untuk melihat kemampuan ekstrak supernatan *L. plantarum* dalam menghambat pertumbuhan

kapang. Diameter zona hambat diukur dengan jangka sorong, lalu dihitung rata-rata dan standar deviasi dari dua pengulangan yang dilakukan. Estimasi konsentrasi *L. plantarum* yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nystatin berdasarkan perbandingan zona hambat dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{Diameter } L. \textit{plantarum} \text{ rata-rata}}{\text{Konsentrasi } L. \textit{plantarum}} = \frac{\text{Diameter nystatin rata-rata}}{\text{Konsentrasi nystatin}}$$

3.3.10. Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa data kualitatif dan data kuantitatif yang disusun dalam bentuk Tabel dan Gambar dan dianalisis secara deskriptif. Data kualitatif meliputi data hasil pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik *L. plantarum* dan kapang, dan hasil pengendapan ekstrak supernatan. Data kuantitatif meliputi data hasil TPC sel *L. plantarum* dan spora kapang, hasil perhitungan rata-rata diameter zona hambat kemampuan antifungi *L. plantarum* dengan *double layer agar well assay*, hasil perhitungan rata-rata diameter zona hambat kemampuan antifungi ekstrak supernatan *L. plantarum* dengan *paper disc assay*.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

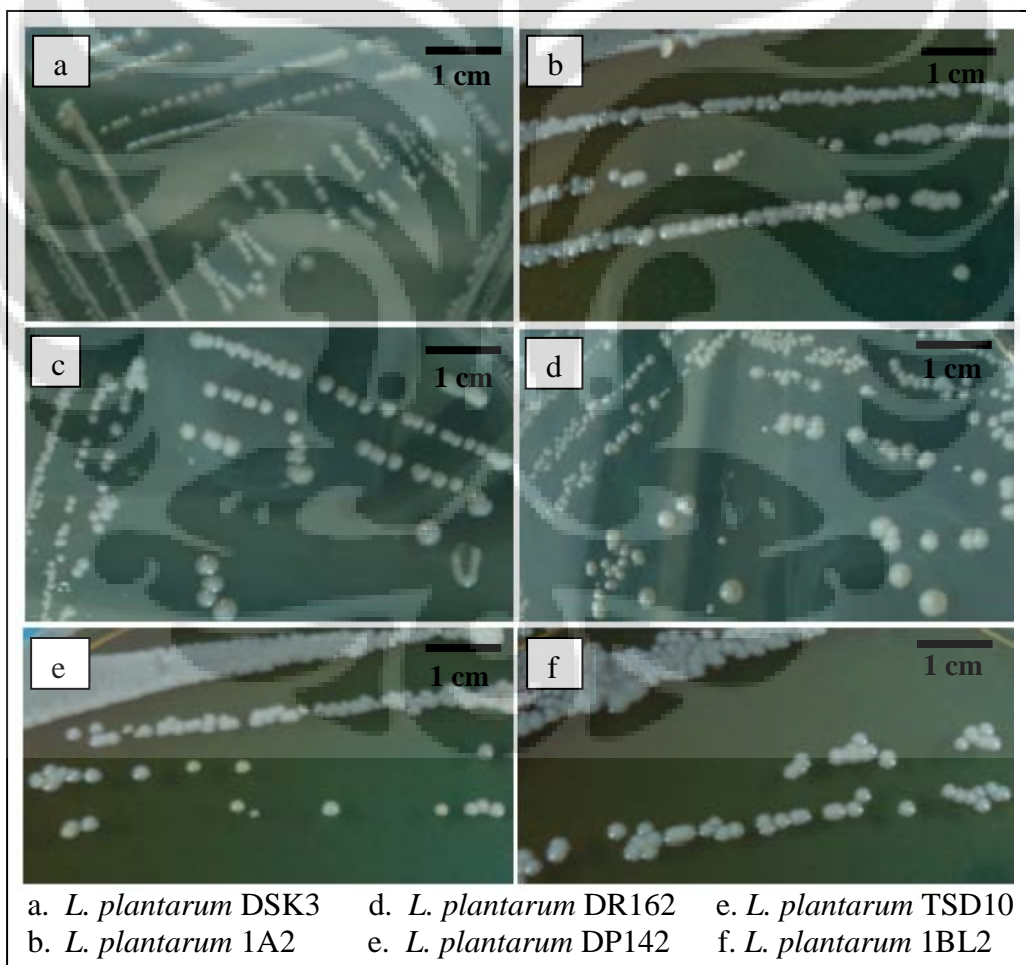
4.1. Pengamatan Morfologi *L. plantarum*

Pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik dilakukan pada *Lactobacillus plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, DP142, TSD10, dan 1BL2 yang ditumbuhkan pada medium MRS agar, suhu 30° C selama 48 jam. Strain-strain *L. plantarum* merupakan koleksi BTCC yang diisolasi dari sampel yang berbeda. *Lactobacillus plantarum* DSK3, DR162 dan DP142 diisolasi dari dadih di Sulawesi, Riau, dan Pekanbaru, *L. plantarum* 1A2 diisolasi dari tapai, *L. plantarum* TSD10 diisolasi dari kotoran sapi, dan *L. plantarum* 1BL2 diisolasi dari strawberi.

Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik, koloni semua strain *L. plantarum* berwarna putih susu. Tekstur koloni seperti mentega (*butyrous*). Permukaan koloni mengkilap. Profil koloni menggantung. Tepi koloni lurus. Hasil pengamatan makroskopik *L. plantarum* dapat dilihat pada Tabel 4.1.(1) dan Gambar 4.1.(1). Menurut Madigan dkk. (2012: 519), BAL tidak memiliki *porphyrin* dan *cytochrome* yang dapat berfungsi sebagai pigmen.

Hasil pewarnaan Gram pada *L. plantarum* berwarna ungu yang artinya bereaksi positif terhadap pewarnaan. Bakteri Gram positif dan negatif akan memberikan reaksi penampakan yang berbeda terhadap cat dalam pengecatan Gram. Kristal violet-iodium kompleks akan terikat kuat dalam sel bakteri Gram positif yang memiliki peptidoglikan dalam jumlah besar pada dinding selnya. Kompleks tersebut tidak hilang walau telah dicuci dengan alkohol dan menyebabkan sel tetap berwarna ungu karena cat penutup (safranin) tidak dapat mengubah warna sel menjadi merah. Bakteri Gram negatif memiliki lapisan lipid yang lebih tebal pada dinding selnya. Pori-pori dinding sel Gram negatif akan mengembang bila sel dibasahi dengan alkohol dan kristal violet-iodium kompleks akan terlarut keluar sel sehingga sel tidak berwarna. Hal tersebut menyebabkan sel akan berwarna merah saat ditambahkan cat penutup (safranin) di akhir pengecatan (Sutedjo dkk. 1991: 310).

Strain-strain *L. plantarum* yang digunakan dalam penelitian berbentuk batang serta ukuran panjang dan lebar sel *L. plantarum* berbeda-beda. Ukuran sel *L. plantarum* strain DSK3 yaitu (2--6)x(1,2--1,5) μm , strain 1A2 (2--5,5)x(1,2--1,5) μm , strain DR162 sebesar (1,5--5)x(1--2) μm , strain DP142 sebesar (2--5)x(1--2) μm , strain TSD10 sebesar (1,5--5,5)x(1,2--1,5) μm , strain 1BL2 sebesar (1,5--5)x(1--1,5) μm . Berdasarkan Vos dkk. (2009: 506) dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ukuran sel *L. plantarum* berkisar (3--8)x(0,9--1,2) μm . Menurut Madigan dkk. (2012: 520), *Lactobacillus* memiliki bentuk batang, panjang bervariasi dari panjang tipis sampai pendek dan bentuk batang yang membengkok. Selain itu, sel batang pada *Lactobacillus* umumnya membentuk rantai. Hasil pengamatan mikroskopik *L. plantarum* dapat dilihat pada Tabel 4.1.(1) dan Gambar 4.1.(2).

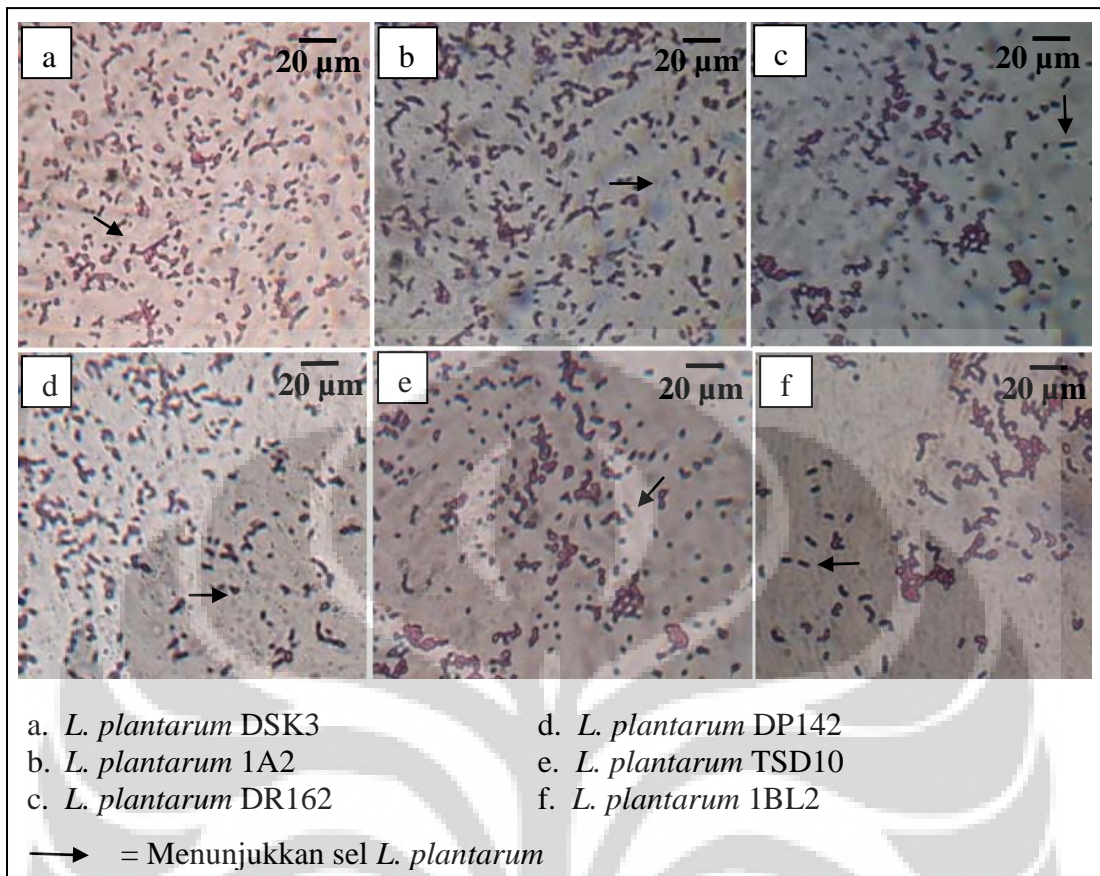


Gambar 4.1.(1). Hasil pengamatan morfologi *L. plantarum* secara makroskopik, medium MRS agar, inkubasi 2 hari, suhu 30° C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.1.(1). Hasil pengamatan morfologi *L. plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, DP142, TSD10, dan 1BL2 secara mikroskopik dan makroskopik berumur 18 jam, pada medium MRS agar, suhu 30° C

Karakter Morfologi	<i>L. plantarum</i> (strain)					
	DSK3	1A2	DR162	DP142	TSD10	1BL2
Mikroskopik						
a. Bentuk sel	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang
b. Ukuran sel	(2--6)x(1,2--1,5) μ m	(2--5,5)x(1,2--1,5) μ m	(1,5--5)x(1--2) μ m	(2--5)x(1--2) μ m	(1,5--5,5)x(1,2--1,5) μ m	(1,5--5)x(1--1,5) μ m
c. Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
Makroskopik						
a. Warna koloni	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu
b. Permukaan	Mengilap	Mengilap	Mengilap	Mengilap	Mengilap	Mengilap
c. Tekstur	Mentega (<i>butyrous</i>)	Mentega (<i>butyrous</i>)	Mentega (<i>butyrous</i>)	Mentega (<i>butyrous</i>)	Mentega (<i>butyrous</i>)	Mentega (<i>butyrous</i>)
d. Tepi koloni	Lurus	Lurus	Lurus	Lurus	Lurus	Lurus
e. Profil koloni	Menggunung	Menggunung	Menggunung	Menggunung	Menggunung	Menggunung



Gambar 4.1.(2). Hasil pengamatan morfologi *L. plantarum* secara mikroskopik perbesaran 1000x, medium MRS agar, 30° C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.2. Pengamatan Morfologi Kapang

Kapang yang digunakan dalam penelitian adalah *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1), *Penicillium* sp.(2), jamur merah, dan jamur putih.

Kapang-kapang tersebut merupakan koleksi BTCC yang diisolasi dari silase, kecuali *A. fumigatus* yang berasal dari IPBCC. Pengamatan makroskopik dan mikroskopik kapang dilakukan pada medium PDA selama 7 hari pada suhu 30° C. Elshanwany dkk. (2005: 281) mengisolasi 43 spesies kapang yang terdiri dari 17 genus dari 40 sampel silase. Kapang yang umum ditemukan adalah genus *Aspergillus* dan *Penicillium* yang diikuti *Fusarium* dan *Gibberella*.

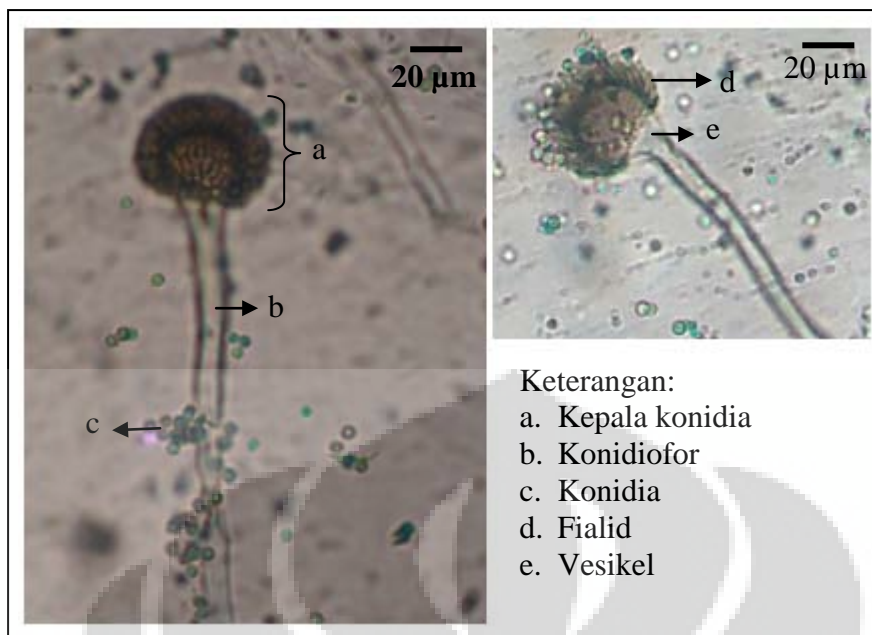
Tabel 4.2.(1). Hasil pengamatan morfologi *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1), *Penicillium* sp.(2), jamur merah, dan jamur putih secara mikroskopik dan makroskopik berumur 7 hari, pada medium PDA, suhu 30° C

Karakter Morfologi	Kapang					
	<i>A.fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.(1)	<i>Penicillium</i> sp.(2)	Jamur merah	Jamur putih
Mikroskopik						
a. Bentuk kepala konidia	Kolumnar	-	-	-	-	-
b. Tipe kepala konidia						
b. Ukuran kepala konidia	(36--60)x(44--68) µm	(96--168)x(100--180) µm	-	-	-	-
c. Ukuran fialid	-	-	22--26 µm	20--28 µm	-	-
d. Tipe percabangan	-	-	<i>Biverticillate</i>	<i>Terverticillate</i>	-	-
e. Bentuk konidia	Semibulat hingga bulat	Semibulat hingga bulat	Semibulat hingga bulat	Semibulat hingga bulat	Bulat	-
f. Diameter konidia	3--6 µm	8--12 µm	2--6 µm	8--12 µm	8--20 µm	-
g. Jenis hifa	Bersekat	Bersekat	Bersekat	Bersekat	Bersekat	Tidak bersekat
h. Diameter hifa	12--32 µm	16--32 µm	8--18 µm	4--10 µm	12--18 µm	2--12 µm
Makroskopik						
a. Warna koloni	Hijau cemara	Hitam	Cokelat jangat	Hijau cemara	Hartal emas	Putih
b. Tekstur koloni	<i>Velvety</i>	Granular	Granular	<i>Velvety</i>	<i>Wooly</i>	<i>Wooly</i>
c. Sporulasi	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Tidak ada
d. Zonasi	Tidak ada	Ada	Tidak ada	Ada	Tidak ada	Tidak ada
e. <i>Exudate drops</i>	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Ada	Ada	Ada
f. <i>Radial furrow</i>	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
g. <i>Growing zone</i>	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada
h. Warna sebalik koloni	Hialin	Hialin	Hialin	Kuning langsung	Hartal rentung	Hialin

Hasil pengamatan karakter morfologi *A. fumigatus* secara makroskopik yaitu, koloni berwarna hijau cemara, sebalik koloni tidak berwarna, koloni bertekstur beludru (*velvety*), terdapat *growing zone*, serta tidak terdapat *radial furrow*, zonasi, dan *exudate drops*. Pengamatan morfologi *A. fumigatus* secara mikroskopik memperlihatkan konidia berupa sel tunggal, berbentuk semibulat hingga bulat (3--6 μm), fialid melekat pada vesikel. Kepala konidia kolumnar berukuran (36--60) x (44--68) μm dan uniseriate. Hifa bersepta dengan lebar berkisar 12--32 μm . Hasil yang diperoleh sesuai dengan deskripsi kapang *A. fumigatus* oleh Samson dkk. (1984: 60) dalam *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Menurut Samson dkk. (1984: 60), *A. fumigatus* memiliki warna koloni hijau, kepala konidia kolumnar, fialid langsung melekat pada vesikel dan konidia berbentuk semibulat hingga bulat dengan ukuran 2,5--3 μm . Hasil pengamatan morfologi *A. fumigatus* secara makroskopik dan mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 4.2.(1) serta Gambar 4.2.(1) dan Gambar 4.2.(2).



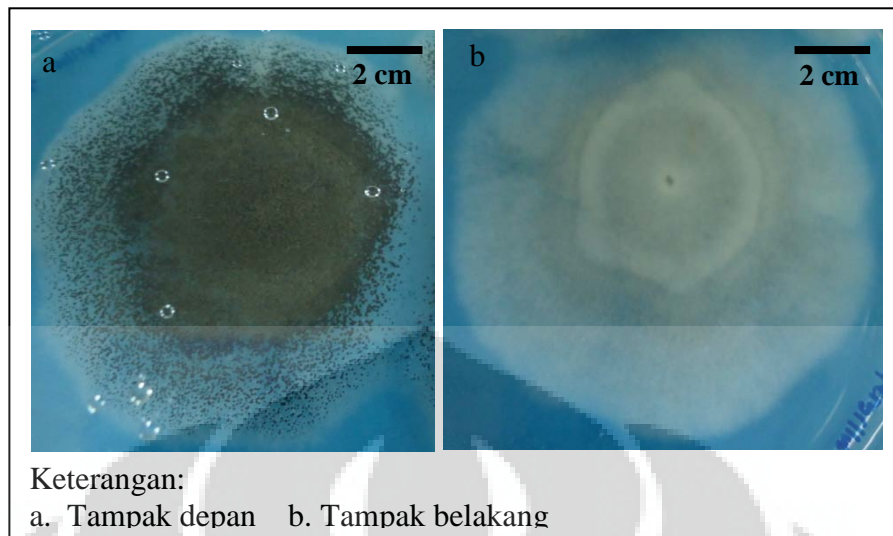
Gambar 4.2.(1). Hasil pengamatan morfologi *A. fumigatus* secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]



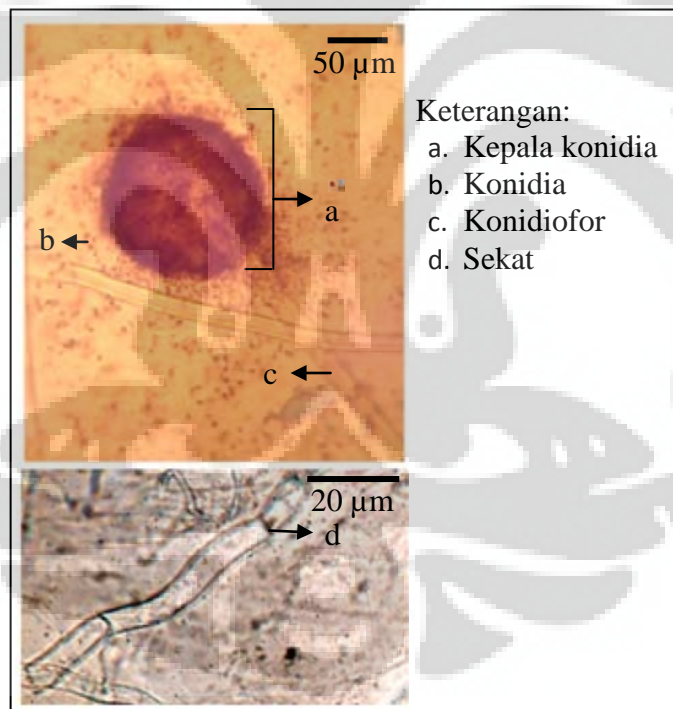
Gambar 4.2.(2). Hasil pengamatan morfologi *A. fumigatus* secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan karakter morfologi *Aspergillus* sp. secara makroskopik yaitu, warna koloni hitam dan bersporulasi, sebalik koloni tidak berwarna, koloni bertekstur granular (*granulose*), terdapat zonasi dan *growing zone*, serta tidak terdapat *radial furrow* dan *exudate drops*. Pengamatan morfologi *Aspergillus* sp. secara mikroskopik memperlihatkan konidia berupa sel tunggal dan berbentuk bulat berdiameter (8--12 µm). Kepala konidia berbentuk semibulat hingga bulat, berukuran (96--168) x (100--180) µm. Hifa bersepta dengan lebar berkisar (16--32) µm. Hasil yang diperoleh sesuai dengan deskripsi kapang *Aspergillus* sp. oleh Samson dkk. (1984: 52) dalam *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Menurut Samson dkk. (1984: 52), koloni dapat berwarna kuning, cokelat, atau hitam. Kepala konidia dapat berbentuk *radiate* atau *kolumnar*. Hasil pengamatan morfologi *Aspergillus* sp. secara makroskopik dan mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 4.2.(1) serta Gambar 4.2.(3) dan Gambar 4.2.(4).

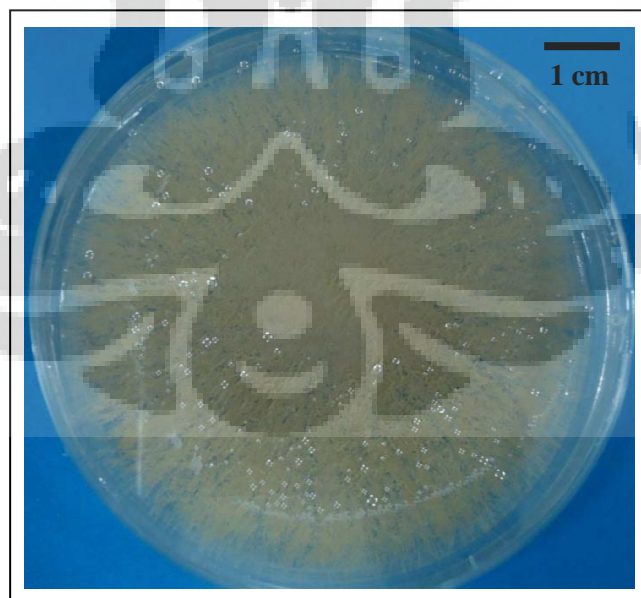


Gambar 4.2.(3). Hasil pengamatan morfologi *Aspergillus* sp. secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

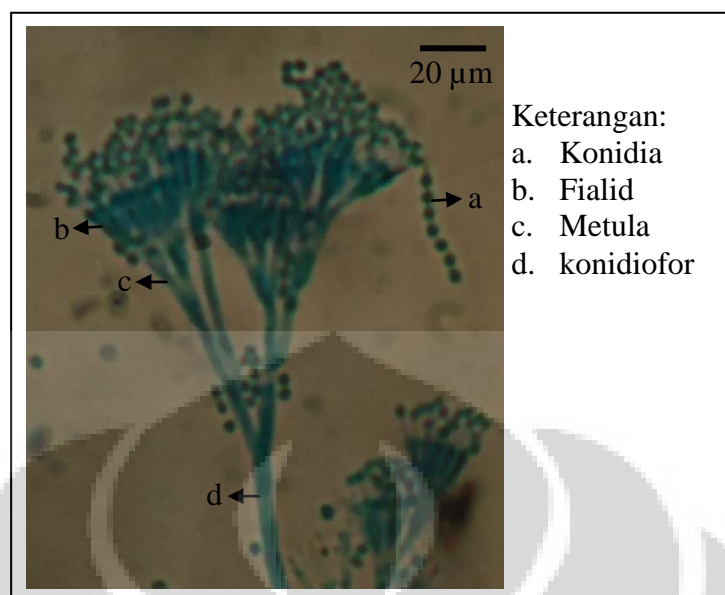


Gambar 4.2.(4). Hasil pengamatan morfologi *Aspergillus* sp. secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan karakter morfologi *Penicillium* sp.(1) secara makroskopik yaitu, warna koloni adalah cokelat jangat dan telah bersporulasi, sebalik koloni tidak berwarna, koloni bertekstur granular (*granulose*), terdapat *growing zone*, serta tidak terdapat zonasi, *radial furrow*, dan *exudate drops*. Pengamatan morfologi *Penicillium* sp.(1) secara mikroskopik memperlihatkan konidia berbentuk bulat dengan ukuran diameter berkisar (2--6) μm yang duduk langsung pada fialid. Panjang fialid berkisar (22--26) μm . Sebanyak 3--5 fialid duduk langsung pada metula. Sebanyak 3--5 metula duduk pada konidiofor sehingga membentuk percabangan. Tipe percabangan yaitu *terverticillate* (*two-stage branched*). Hifa bersepta dengan lebar berkisar (8--18) μm . Hasil yang diperoleh sesuai dengan deskripsi kapang *Penicillium* sp. oleh Samson dkk. (1984: 98) dalam *Introduction to Food-Borne Fungi*. Menurut Samson dkk. (1984: 98), *Penicillium* sp. memiliki konidia berbentuk bulat, lonjong, atau silindris, dan memiliki tipe percabangan *monoverticillate*, *biverticillate* (*one-stage branched*), *terverticillate* (*two-stage branched*), dan *quarterverticillate* (*more-stage branched*). Hasil pengamatan morfologi *Penicillium* sp.(1) secara makroskopik dan mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 4.2.(1) serta Gambar 4.2.(5) dan Gambar 4.2.(6).

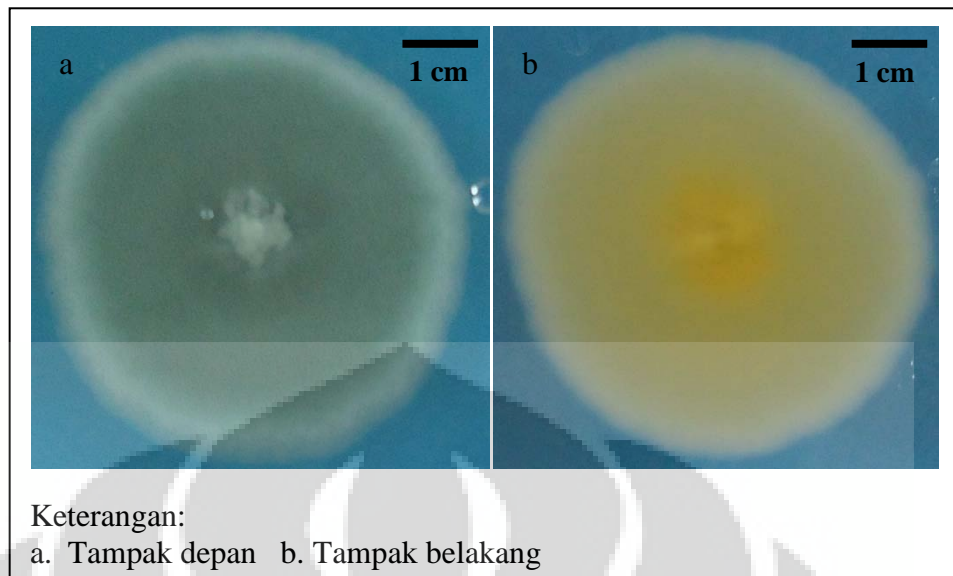


Gambar 4.2.(5). Hasil pengamatan morfologi *Penicillium* sp.(1) secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

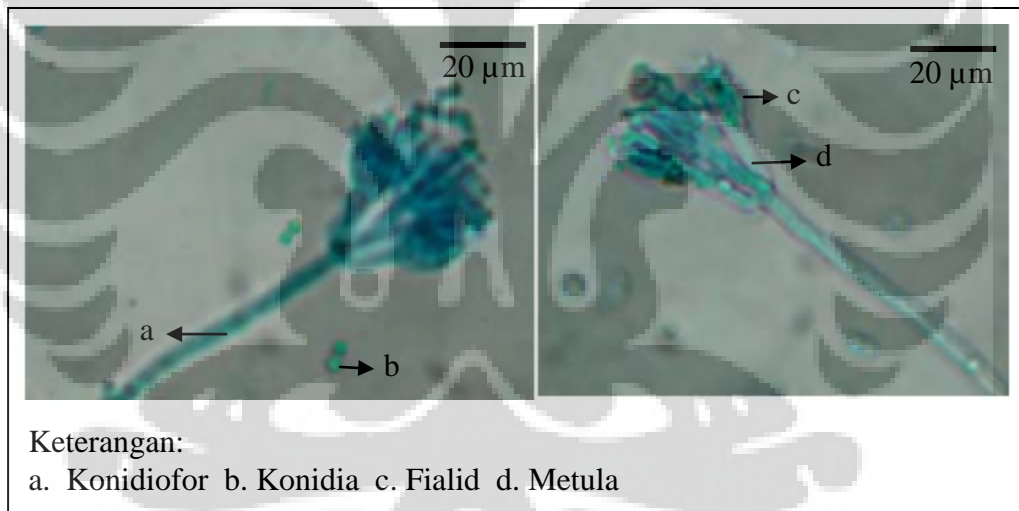


Gambar 4.2.(6). Hasil pengamatan morfologi *Penicillium* sp.(1) secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan karakter morfologi *Penicillium* sp.(2) secara makroskopik yaitu, warna koloni hijau cemara dan bersporulasi, sebalik koloni berwarna kuning langsung, koloni bertekstur beludru (*velvety*), terdapat zonasi, *exudate drops*, *growing zone*, dan tidak terdapat *radial furrow*. Pengamatan morfologi *Penicillium* sp.(2) secara mikroskopik memperlihatkan konidia berbentuk bulat dengan ukuran diameter berkisar (8--12) μm . Fialid memiliki panjang (20--28) μm dan melekat langsung pada metula. Sebanyak 3--5 fialid duduk langsung pada metula. Sebanyak 3 metula duduk pada konidiofor sehingga membentuk percabangan. Konidiofor memiliki diameter berkisar (4--10) μm dengan *biverticillate (one-stage branched)*. Hasil yang diperoleh sesuai dengan deskripsi kapang *Penicillium* sp. oleh Samson dkk. (1984: 98) dalam *Introduction to Food-Borne Fungi*. Menurut Samson dkk. (1984: 98), koloni *Penicillium* sp. berwarna hijau, konidia berbentuk bulat, lonjong, atau silindris, dan memiliki tipe percabangan *monoverticillate*, *biverticillate (one-stage branched)*, *terverticillate (two-stage branched)*, dan *quarverticillate (more-stage branched)*. Hasil pengamatan morfologi *Penicillium* sp.(2) secara makroskopik dan mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 4.2.(1) serta Gambar 4.2.(7) dan Gambar 4.2.(8).



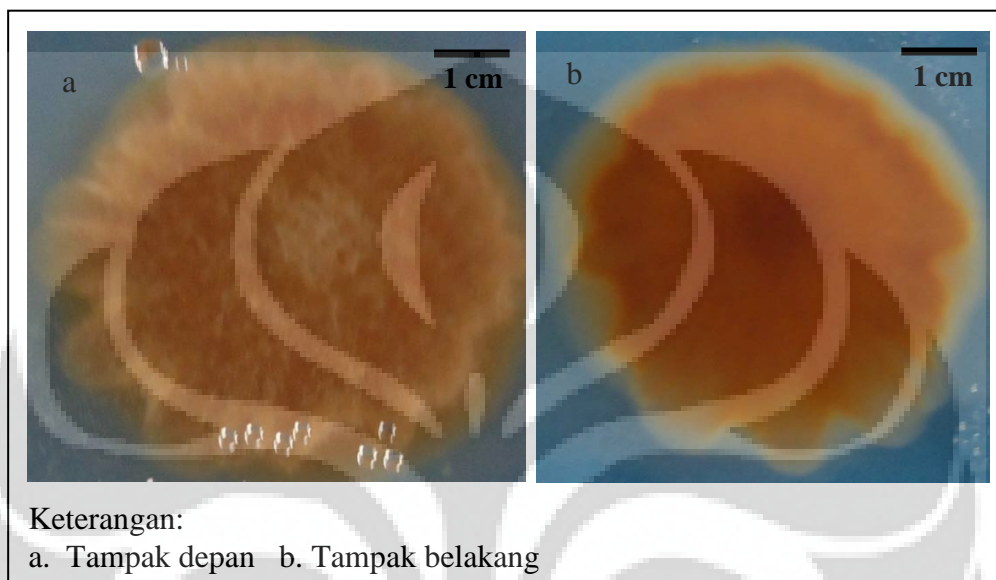
Gambar 4.2.(7). Hasil pengamatan morfologi *Penicillium* sp.(2) secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]



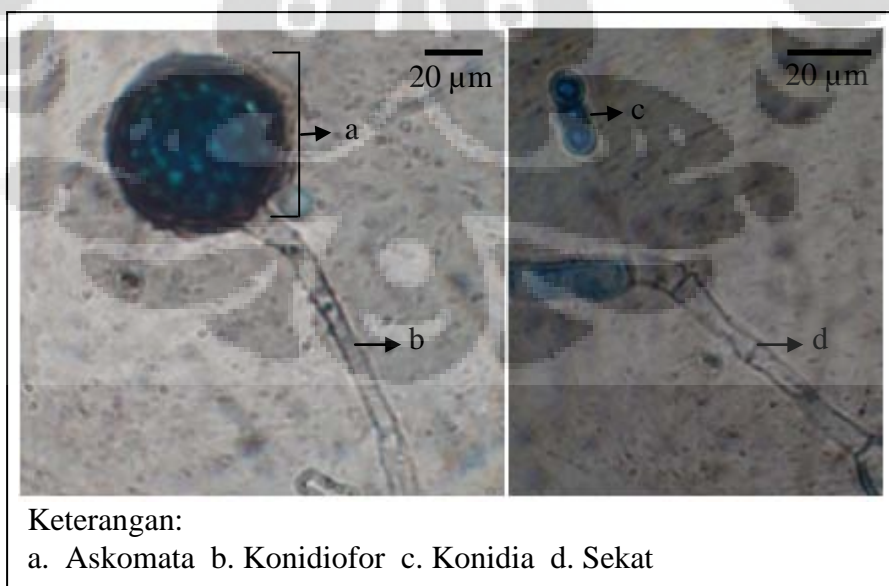
Gambar 4.2.(8). Hasil pengamatan morfologi *Penicillium* sp.(2) secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan karakter morfologi jamur merah secara makroskopik yaitu, warna koloni hortal emas dan bersporulasi, sebalik koloni berwarna hortal renting, koloni bertekstur kapas (*wooly*), terdapat *exudate drops* dan *growing zone*, namun tidak terdapat zonasi dan *radial furrow*. Pengamatan morfologi jamur merah secara mikroskopik memperlihatkan *ascomata* berbentuk semibulat

hingga bulat berukuran (72--128) x (80--136) μm . Konidia berbentuk bulat dengan ukuran diameter berkisar (8--20) μm . Hifa bersepta dengan lebar berkisar (12--18) μm . Hasil pengamatan morfologi jamur merah secara makroskopik dan mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 4.2.(1) serta Gambar 4.2.(9) dan Gambar 4.2.(10).



Gambar 4.2.(9). Hasil pengamatan morfologi jamur merah secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

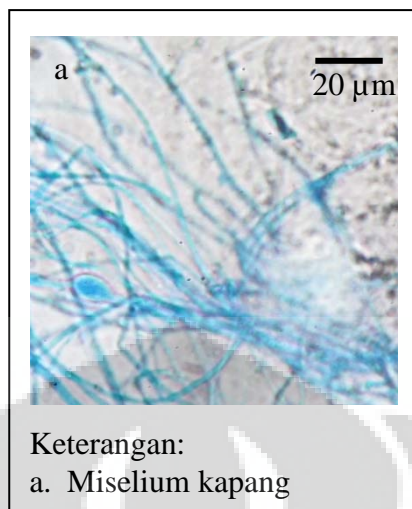


Gambar 4.2.(10). Hasil pengamatan morfologi jamur merah secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan karakter morfologi jamur putih secara makroskopik yaitu, warna koloni adalah putih dan tidak ada sporulasi. Sebalik koloni tidak berwarna. Koloni bertekstur kapas (*wooly*), terdapat *growing zone* dan tidak terdapat *radial furrow*, zonasi, dan *exudate drops*. Pengamatan morfologi jamur putih secara mikroskopik menunjukkan tidak ditemukan bentuk reproduksi seksual dan aseksual. Jamur putih hanya terdiri atas miselium berwarna putih. Hifa tidak bersepta dengan diameter (2--12) μm . Hasil pengamatan morfologi jamur putih secara makroskopik dan mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 4.2.(1) serta Gambar 4.2.(11) dan Gambar 4.2.(12).



Gambar 4.2.(11). Hasil pengamatan morfologi jamur putih secara makroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.2.(12). Hasil pengamatan morfologi jamur putih secara mikroskopik pada medium PDA, inkubasi 7 hari, 30° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.3. Total Plate Count (TPC) *L. plantarum* dan Kapang

Total Plate Count sel *L. plantarum* bertujuan untuk mengetahui jumlah sel yang hidup pada pengujian kemampuan antifungi dengan metode *double layer agar diffusion*. Jumlah sel *L. plantarum* yang diinokulasikan memengaruhi keberhasilan dalam menghasilkan senyawa antifungi. Hasil perhitungan sel *L. plantarum* dengan metode TPC memiliki jumlah $(0,8--20,0) \times 10^{11}$ CFU/ml (Tabel 4.3.(1)). Jumlah sel *L. plantarum* tersebut diduga telah mampu menghasilkan senyawa antifungi. Lavermicocca dkk. (2000: 4085) menggunakan 10^9 CFU/ml pada fermentasi *L. plantarum* untuk menghasilkan senyawa antifungi.

Hasil perhitungan spora kapang dengan metode TPC memiliki jumlah $(8 \times 10^5)--(17,0 \times 10^6)$ CFU/ml (Tabel 4.3.(1)). Jumlah inokulum tersebut diperkirakan cukup untuk digunakan dalam pengujian antifungi. Menurut Benson (2001: 145), salah satu faktor yang memengaruhi efektivitas senyawa antifungi adalah konsentrasi organisme uji yang diinokulasikan ke dalam medium. Menurut Magnusson dan Schnürer (2001: 2), jumlah minimal spora kapang yang digunakan dalam pengujian antagonistik sebesar 10^4 CFU/ml.

Tabel 4.3.(1). Perbandingan jumlah sel bakteri dan spora kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC)

Bakteri	Jumlah Koloni (CFU/ml)	Kapang	Jumlah Koloni (CFU/ml)
<i>L. plantarum</i> DSK3	$(10,0--14,0) \times 10^{11}$	<i>A. fumigatus</i>	$(11,9--15) \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> 1A2	$(0,2--20,0) \times 10^{11}$	<i>Aspergillus</i> sp.	$(3,0--4,5) \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> DR162	$(3,0--11,0) \times 10^{11}$	<i>Penicillium</i> sp.(1)	$(2,5--8,7) \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> DP142	$(8,0--8,3) \times 10^{11}$	<i>Penicillium</i> sp.(2)	$(10,5--17,0) \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> TSD10	$(3,0--6,2) \times 10^{11}$	Jamur merah	$(8,3--16,2) \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> 1BL2	$(0,8--2,7) \times 10^{11}$	Jamur putih	$(8--9,5) \times 10^5$

4.4. Pengujian Kemampuan Antifungi *L. plantarum* terhadap Kapang Uji

Hasil pengujian dengan metode *double layer agar well diffusion* menunjukkan bahwa semua strain *L. plantarum* memiliki kemampuan antifungi terhadap kapang *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1), dan *Penicillium* sp.(2), namun tidak memiliki kemampuan antifungi terhadap jamur merah dan jamur putih (Tabel 4.4.(1) dan Gambar 4.4.(1), 4.4.(2), 4.4.(3), 4.4.(4), 4.4.(5), 4.4.(6)). Kemampuan antifungi ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar sumur yang berisi suspensi sel *L. plantarum*. Zona hambat yang terbentuk mengindikasikan bahwa *L. plantarum* menghasilkan senyawa bioaktif yang berdifusi ke dalam medium agar dan menghambat pertumbuhan kapang uji yang terkandung di dalamnya. Zona hambat ditunjukkan dengan adanya daerah yang tidak ditumbuhi oleh kapang.

Zona hambat yang dihasilkan oleh *L. plantarum* terhadap *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., dan *Penicillium* sp.(2) adalah zona hambat total (Gambar 4.4.(2), 4.4.(2), dan 4.4.(4)), sedangkan zona hambat yang dihasilkan terhadap *Penicillium* sp.(1) adalah zona hambat parsial (Gambar 4.4.(3)). Berdasarkan Poeloengan (2009: 65--66), zona hambat total merupakan daerah jernih di sekitar sumur yang menunjukkan bahwa terdapat senyawa bioaktif yang mampu membunuh

mikroorganisme uji. Zona hambat parsial merupakan daerah yang menunjukkan masih terdapat pertumbuhan mikroorganisme uji di sekitar sumur yang mengandung senyawa bioaktif, namun dalam jumlah lebih sedikit dibandingkan dengan daerah yang tidak berada di sekitar sumur. Hal tersebut disebabkan karena senyawa bioaktif yang terdapat di dalam sumur, hanya menghambat mikroorganisme uji, namun tidak membunuhnya.

Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian kemampuan antifungi adalah nistatin dengan konsentrasi 1000 ppm (b/v). Diameter zona hambat rata-rata tertinggi yang mampu menghambat *A. fumigatus* yaitu *L. plantarum* strain 1BL2 yang memiliki diameter rata-rata sebesar $29,1 \pm 0,14$ mm. Kemampuan antifungi *L. plantarum* strain 1BL2 setara dengan kemampuan antifungi nistatin dengan konsentrasi 1243,4 ppm (Tabel 4.4.(2)). Diameter zona hambat rata-rata tertinggi yang mampu menghambat *Aspergillus* sp. yaitu *L. plantarum* strain DSK3 yang memiliki diameter rata-rata sebesar $28,1 \pm 0,14$ mm. Kemampuan antifungi *L. plantarum* DSK3 setara dengan kemampuan antifungi nistatin dengan konsentrasi 1197,1 ppm. Diameter zona hambat rata-rata tertinggi yang mampu menghambat *Penicillium* sp.(1) yaitu *L. plantarum* strain 1BL2 yang memiliki diameter rata-rata sebesar $25,6 \pm 1,27$ mm. Kemampuan antifungi *L. plantarum* 1BL2 setara dengan kemampuan antifungi nistatin dengan konsentrasi 1142,8 ppm. Diameter zona hambat rata-rata tertinggi yang mampu menghambat *Penicillium* sp.(2) yaitu *L. plantarum* strain DSK3 yang memiliki diameter rata-rata sebesar $31,5 \pm 0,28$ mm. Kemampuan antifungi *L. plantarum* DSK3 setara dengan kemampuan antifungi nistatin dengan konsentrasi 2072,7 ppm.

Berdasarkan data diatas beberapa strain *L. plantarum* memiliki diameter zona hambat rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan lainnya. Hal tersebut diduga bahwa strain yang berbeda dapat menghasilkan senyawa antifungi berbeda pula. Niku-Paavola pada tahun 1999 mengidentifikasi senyawa antifungi berupa *cyclo (Gly-Leu)* dari *L. plantarum* strain VTT E-78076 sedangkan Lavermicocca dkk. pada tahun 2000 mengidentifikasi senyawa antifungi berupa *4-hydroxy-phenyllactic acid* dan *3-phenyllactic acid* dari *L. plantarum* strain 21B (lihat Störm 2005:10).

Lactobacillus plantarum strain DSK3, DR162, dan DP142 diisolasi dari dadih dengan lokasi yang berbeda. Diameter zona hambat rata-rata ketiga strain *L. plantarum* tersebut berbeda terhadap *A. fumigatus*, yaitu *L. plantarum* strain DSK3 ($24,2 \pm 0,28$ mm), strain DP142 ($24,2 \pm 0,84$ mm), dan strain DR162 ($21,8 \pm 0,28$ mm). Hal tersebut diduga bahwa perbedaan habitat menjadi faktor yang menyebabkan ketiga strain tersebut memiliki kemampuan kemampuan antifungi berbeda. Magnusson dkk. (2003: 132) melaporkan bahwa *L. plantarum* strain MiLAB 014 memiliki zona hambat lebih besar terhadap *A. fumigatus* dibandingkan dengan MiLAB 006. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 014 dan MiLAB 006 diisolasi dari *lilac flowers* di Swedia, namun dengan lokasi berbeda.

Mekanisme penghambatan yang dilakukan oleh senyawa antifungi yang dihasilkan belum dapat diketahui, namun dapat diperkirakan mekanisme penghambatan yang terjadi hampir serupa dengan mekanisme penghambatan oleh agen antifungi yang dilaporkan mampu menghambat kapang. Menurut Lavermicocca dkk. (2000: 4088) dan Magnusson dan Schnürer (2001: 4), agen antifungi yang umum terdapat pada *L. plantarum* yaitu *3-phenyllactic acid* yang memiliki aktivitas spektrum luas melawan bakteri dan fungi bersifat patogen. Senyawa antifungi tersebut bekerja menghambat sintesis dinding sel, yaitu menghambat pembentukan kitin dan β -glukan. Menurut Störm (2005: 13), kitin dan β -glukan merupakan komponen dinding sel dari fungi, sehingga apabila sintesis kitin dan β -glukan terhambat maka fungsi dinding sel akan terganggu, dan pertumbuhan sel menjadi terhambat. Menurut Hawser dan Islam (1999: 413), penghambatan pada sintesis dinding sel disebabkan oleh senyawa antifungi yang bersifat fungisida, atau memiliki kemampuan membunuh pada kapang uji.

Tabel 4.4.(1). Hasil pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* dengan *double layer agar well diffusion method* terhadap kapang uji, inkubasi 48 jam, suhu 30° C

Kapang	n-	<i>Lactobacillus plantarum</i> (strain)							
		Diameter zona hambat (mm)							
		Nistatin	Akuades steril	DSK3	1A2	DR162	DP142	TSD10	1BL2
<i>A. fumigatus</i>	1	23,7	-	24,4	30,0	22,0	24,8	27,0	29,0
	2	23,2	-	24,0	27,6	21,6	23,6	27,5	29,2
	Rata-rata ± SD	23,4 ± 0,35	-	24,2 ± 0,28	28,8 ± 1,69	21,8 ± 0,28	24,2 ± 0,84	27,3 ± 0,35	29,1 ± 0,14
<i>Aspergillus</i> sp.	1	24,0	-	28,2	23,7	23,3	24,9	24,4	26,8
	2	23,0	-	28,0	24,8	24,9	22,0	25,7	25,8
	Rata-rata ± SD	23,5 ± 0,70	-	28,1 ± 0,14	24,2 ± 0,78	24,1 ± 1,13	23,4 ± 2,05	25,1 ± 0,91	26,3 ± 0,70
<i>Penicillium</i> sp.(1)	1	21,8	-	24,6*	22,0*	22,7*	24,0*	23,4*	24,7*
	2	23,0	-	23,9*	21,8*	23,0*	24,5*	22,9*	26,5*
	Rata-rata ± SD	22,4 ± 0,84	-	24,25 ± 0,50	21,9 ± 0,14	22,8 ± 0,21	24,3 ± 0,35	23,2 ± 0,35	25,6 ± 1,27
<i>Penicillium</i> sp.(2)	1	14,5	-	31,3	31,3	25,5	31,9	28,0	28,9
	2	15,8	-	30,0	31,7	25,4	30,0	27,4	28,6
	Rata-rata ± SD	15,2 ± 0,91	-	30,65 ± 0,91	31,5 ± 0,28	25,4 ± 0,70	30,9 ± 1,34	27,7 ± 0,42	28,8 ± 0,21
Jamur merah	1	27,0	-	-	-	-	-	-	-
	2	26,8	-	-	-	-	-	-	-
	Rata-rata ± SD	26,9 ± 0,14	-	-	-	-	-	-	-
Jamur putih	1	28,0	-	-	-	-	-	-	-
	2	28,2	-	-	-	-	-	-	-
	Rata-rata ± SD	28,1 ± 0,14	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : Diameter sedotan steril 6 mm

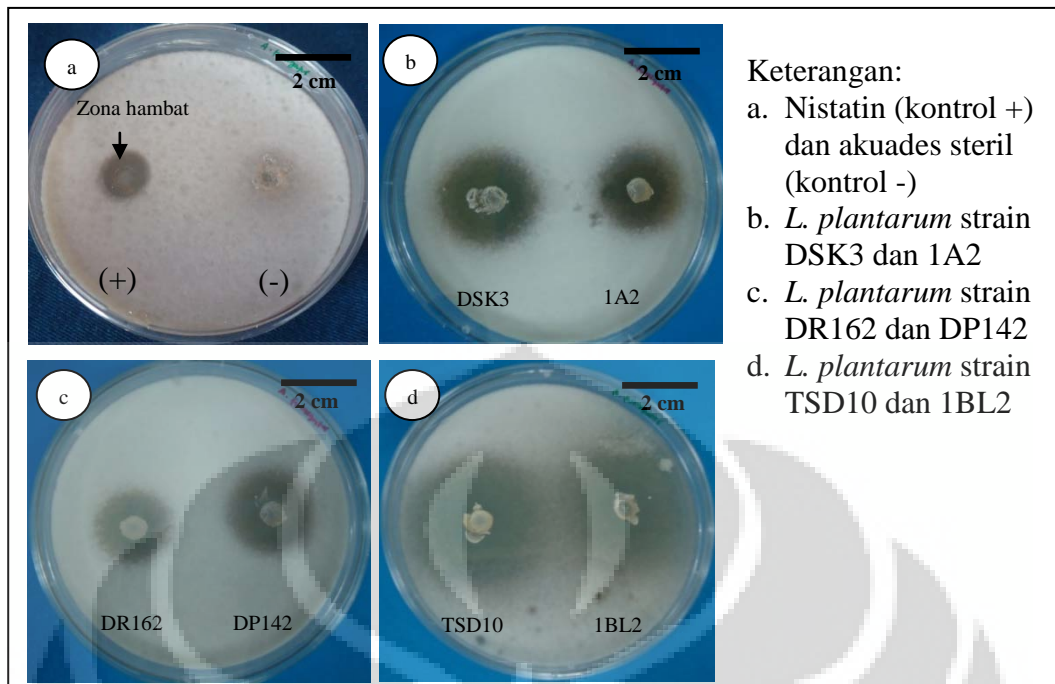
n- = Pengulangan ke-

* Zona hambat yang terbentuk adalah zona hambat parsial

Tabel 4.4.(2). Konsentrasi *L. plantarum* yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nistatin berdasarkan perbandingan zona hambat

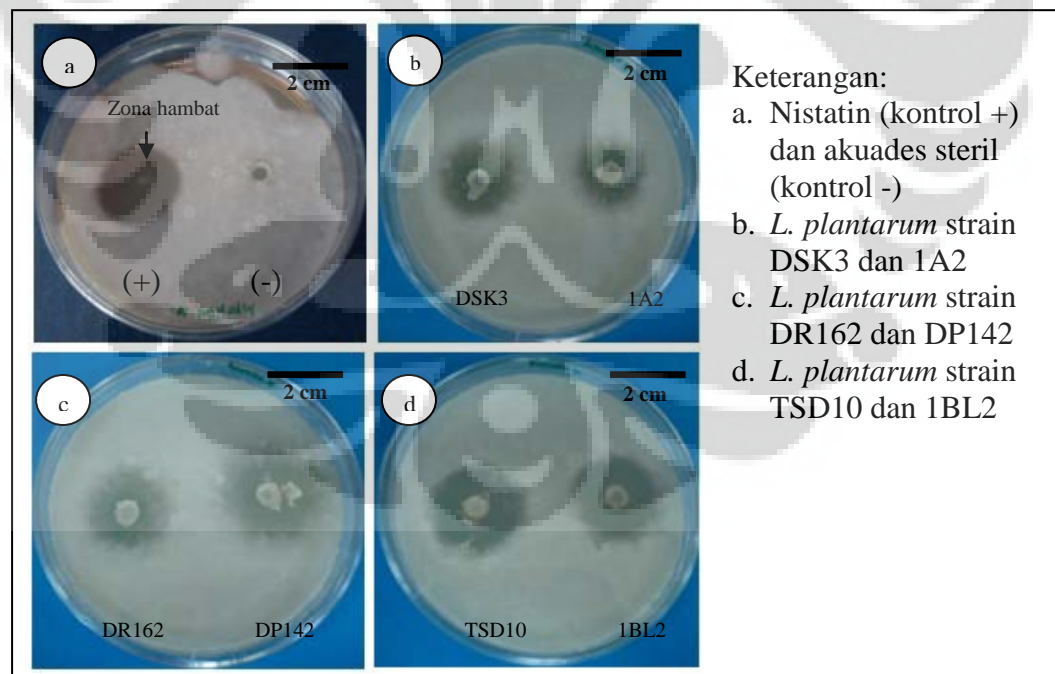
Kapang	Zona hambat <i>Lactobacillus plantarum</i> (strain)						
	Rata-rata ± SD						
	Nistatin	DSK3	1A2	DR162	DP142	TSD10	1BL2
<i>A. fumigatus</i>	23,4 ± 0,35	24,2 ± 0,28	28,8 ± 1,69	21,8 ± 0,28	24,2 ± 0,84	27,3 ± 0,35	29,1 ± 0,14
Konsentrasi	1000 ppm	1034,1 ppm	1230,7 ppm	931,6 ppm	1034,0 ppm	1166,5 ppm	1243,4 ppm
<i>Aspergillus</i> sp.	23,5 ± 0,70	28,1 ± 0,14	24,2 ± 0,78	24,1 ± 1,13	23,4 ± 2,05	25,1 ± 0,91	26,3 ± 0,70
Konsentrasi	1000 ppm	1197,1 ppm	1030,9 ppm	1026,7 ppm	996,8 ppm	1096,3 ppm	1120,4 ppm
<i>Penicillium</i> sp.(1)	22,4 ± 0,84	24,3 ± 0,50 *	21,9 ± 0,14*	22,8 ± 0,21*	24,3 ± 0,35*	23,2 ± 0,35*	25,6 ± 1,27*
Konsentrasi	1000 ppm	1084,7 ppm	977,6 ppm	1017,8 ppm	1084,8 ppm	1035,6 ppm	1142,8 ppm
<i>Penicillium</i> sp.(2)	15,2 ± 0,91	30,7 ± 0,91	31,5 ± 0,28	25,4 ± 0,70	30,9 ± 1,34	27,7 ± 0,42	28,8 ± 0,21
Konsentrasi	1000 ppm	2019,7 ppm	2072,7 ppm	1671,3 ppm	2033,2 ppm	1822,7 ppm	1895,0 ppm
Jamur merah	26,9 ± 0,14	-	-	-	-	-	-
Konsentrasi	1000 ppm	-	-	-	-	-	-
Jamur putih	28,1 ± 0,14	-	-	-	-	-	-
Konsentrasi	1000 ppm	-	-	-	-	-	-

Keterangan : * Zona hambat yang terbentuk adalah zona hambat parsial



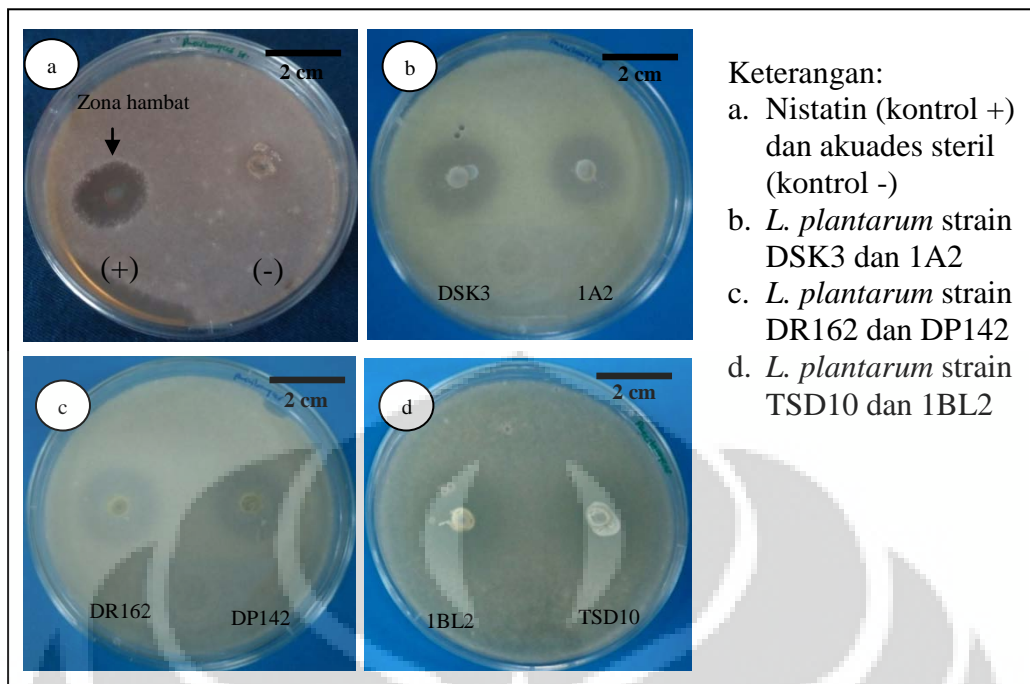
Gambar 4.4.(1). Hasil pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* dengan *double layer agar well diffusion method* terhadap *A. fumigatus* pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



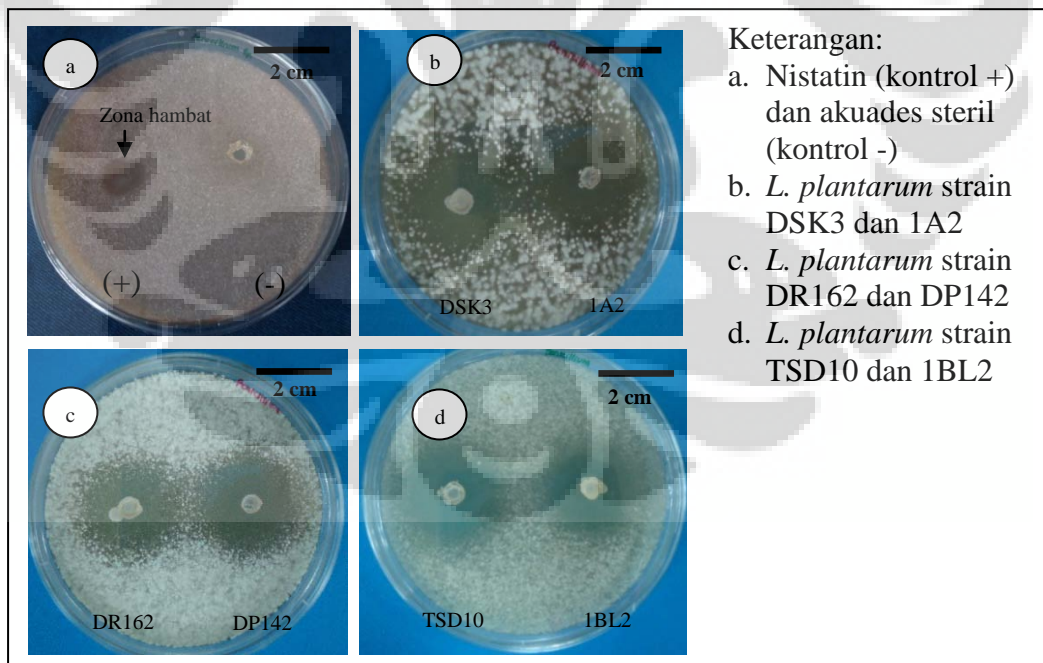
Gambar 4.4.(2). Hasil pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* dengan *double layer agar well diffusion method* terhadap *Aspergillus* sp. pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.4.(3). Hasil pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* dengan *double layer agar well diffusion method* terhadap *Penicillium* sp.(1) pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C

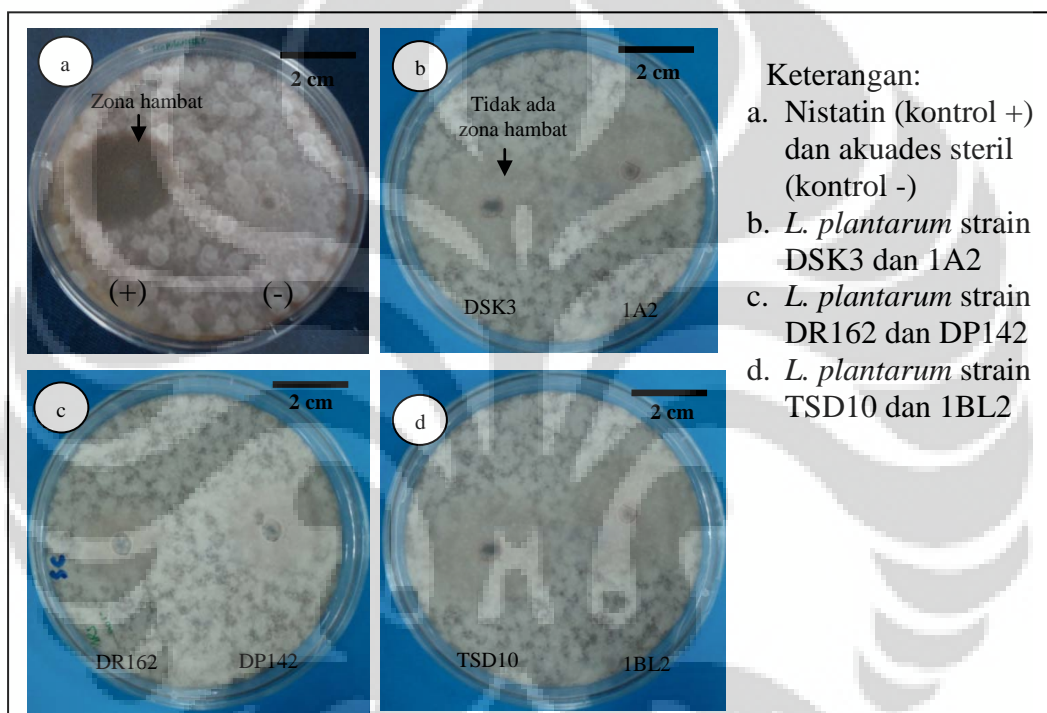
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.4.(4). Hasil pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* dengan *double layer agar well diffusion method* terhadap *Penicillium* sp.(2) pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C

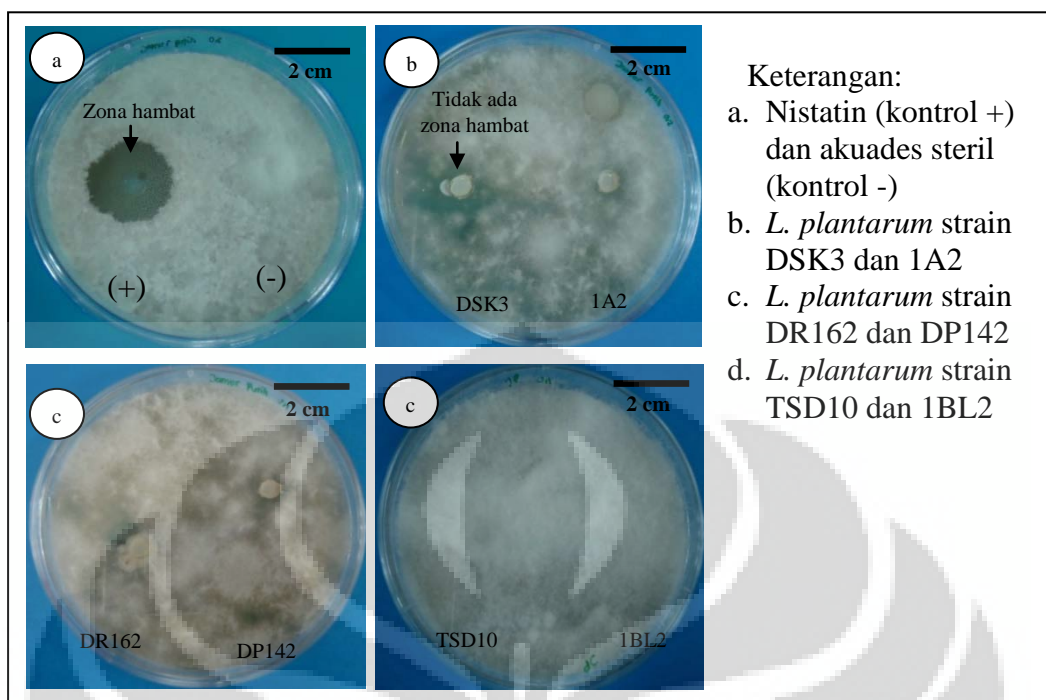
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* terhadap jamur merah dan jamur putih tidak memperlihatkan adanya zona hambat (Tabel 4.4.(1) dan Gambar 4.4.(5), 4.4.(6)). Kecepatan pertumbuhan kapang tersebut tidak dapat dihambat oleh semua strain *L. plantarum*. Hal tersebut diduga karena kapang memenangkan kompetisi dalam pengambilan nutrisi sehingga pertumbuhan kapang menutupi permukaan medium. Dugaan lainnya yaitu senyawa bioaktif tidak dihasilkan oleh semua strain *L. plantarum* yang diujikan terhadap jamur merah dan jamur putih.



Gambar 4.4.(5). Hasil pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* dengan *double layer agar well diffusion method* terhadap jamur merah pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.4.(6). Hasil pengujian kemampuan antifungi *L. plantarum* dengan *double layer agar well diffusion method* terhadap Jamur putih pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.5. Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Supernatan *L. plantarum*

Pengendapan supernatan dilakukan terhadap semua strain *L. plantarum* yang menunjukkan kemampuan antifungi dengan metode *double layer agar well diffusion*, yaitu *L. plantarum* DSK3, 1A2, DR162, DP142, TSD10 dan 1BL2. Supernatan diproduksi dari *L. plantarum* setelah inkubasi 18 jam karena diduga *L. plantarum* telah menghasilkan senyawa antifungi. Menurut Magnusson dan Schnürer (2001: 4), produksi supernatan *L. coryniformis* untuk mendapatkan substansi antifungi dimulai selama fase eksponensial dan mencapai maksimum pada awal fase stasioner, waktu tersebut berkisar antara 18--24 jam. Menurut Gandjar dkk. (2006: 39), pada awal fase stasioner senyawa metabolit sekunder banyak dihasilkan.

Pengendapan supernatan dengan amonium sulfat 60% dilakukan karena terdapat beberapa penelitian melaporkan bahwa senyawa antifungi dihasilkan oleh

BAL adalah protein, dengan kejenuhan 60%. Berdasarkan penelitian Vamanu dkk. (2010: 502), tingkat kejenuhan 60% ditentukan karena antifungi berupa protein diduga telah diendapkan oleh amonium sulfat pada tingkat kejenuhan tersebut.

Hasil pengendapan supernatan dengan amonium sulfat berupa endapan berwarna coklat. Hasil pengendapan dapat dilihat pada Gambar 4.5.(1). Menurut Rosenberg (1996: 125), amonium sulfat merupakan garam yang sering digunakan untuk meningkatkan efektifitas pemisahan dan presipitasi protein. Menurut SAFC Bioscience (2006: 1), umumnya pada tingkat kejenuhan yang rendah, protein dan air akan diikat oleh amonium sulfat, sedangkan pada tingkat kejenuhan yang lebih tinggi amonium sulfat akan mengikat lebih banyak air dan beragregasi sehingga protein akan terlepas dan mengendap. Hal tersebut disebabkan karena sifat amonium sulfat yang dapat mengikat molekul air sebagai bagian dari struktur kristalnya. Störm dkk. (2002: 4326) melaporkan bahwa *L. plantarum* MiLAB 393 memproduksi antifungi berupa protein yaitu *cyclic dipeptides cyclo*.



Keterangan:

- a. Nistatin 1000 ppm (+)
- b. Amonium sulfat dalam bufer fosfat kejenuhan 60% (-)
- c. Ekstrak supernatan *L. plantarum* strain 1A2
- d. Ekstrak supernatan *L. plantarum* strain DSK3
- e. Ekstrak supernatan *L. plantarum* strain DP142
- f. Ekstrak supernatan *L. plantarum* strain DR162
- g. Ekstrak supernatan *L. plantarum* strain TSD10
- h. Ekstrak supernatan *L. plantarum* strain 1BL2

Gambar 4.5.(1). Ekstrak supernatan hasil pengendapan dengan amonium sulfat yang telah dilarutkan dalam bufer fosfat 50 mM, pH 7

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.6. Pengujian Kemampuan antifungi Ekstrak Supernatan *L. plantarum* terhadap Kapang

Pengujian kemampuan antifungi ekstrak supernatan *L. plantarum* dilakukan dengan *paper disc assay* terhadap *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1) dan *Penicillium* sp.(2). Hasil pengujian ekstrak supernatan *L. plantarum* terhadap kapang uji menunjukkan bahwa *L. plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, 1BL2, dan TSD10 menghambat *A. fumigatus* dan tidak terjadi penghambatan terhadap *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1), *Penicillium* sp.(2) pada semua strain *L. plantarum* (Tabel 4.6.(1) dan Gambar 4.6.(1)).

Kemampuan antifungi dari pengujian ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar *paper disc* yang mengandung ekstrak supernatan *L. plantarum*. Zona hambat yang terbentuk adalah zona hambat parsial. Zona hambat tersebut menunjukkan bahwa ekstrak supernatan *L. plantarum* mengandung antifungi yang berdifusi ke dalam medium agar dan menghambat tumbuhnya mikroorganisme uji. Zona hambat parsial menunjukkan masih terdapat pertumbuhan kapang namun dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan daerah yang tidak berada di sekitar *paper disc*. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa antifungi yang dihasilkan bersifat fungistatik, atau tidak memiliki kemampuan membunuh, namun hanya menghambat pertumbuhan kapang. Okker dkk. pada tahun 1999 melaporkan bahwa *Lactobacillus pentosus* mampu menghasilkan senyawa antifungi berupa pentocin TV35b yang bersifat fungistatik melawan *Candida albicans* (lihat Störm dkk. 2002: 4322). Menurut Hawser dan Islam (1999: 413), mekanisme penghambatan yang dilakukan oleh agen fungistatika yaitu dengan menghambat *cytochrome P450 demethylase* pada membran sel fungi.

Tabel 4.6.(1). Hasil pengujian kemampuan antifungi ekstrak supernatan *L. plantarum* dengan metode *paper disc assay* terhadap kapang uji, inkubasi 48 jam, suhu 30° C

Kapang	n	Kontrol		<i>Lactobacillus plantarum</i> (strain)					
		Positif	Negatif	Diameter zona hambat (mm)					
		Nistatin	Amonium sulfat	DSK3	1A2	DR162	DP142	TSD10	1BL2
<i>A. fumigatus</i>	1	9,7	-	8,9*	8,0*	7,5*	-	8,0*	7,2*
	2	10,9	-	8,5*	8,2*	7,7*	-	7,3*	7,6*
Rata-rata ± SD		10,3 ± 0,84	-	8,7 ± 0,28	8,1 ± 0,14	7,6 ± 0,14	-	7,6 ± 0,49	7,4 ± 0,28
<i>Aspergillus</i> sp.	1	15,5	-	-	-	-	-	-	-
	2	14,2	-	-	-	-	-	-	-
Rata-rata ± SD		12,3 ± 0,91	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.(1)	1	14,2	-	-	-	-	-	-	-
	2	13,8	-	-	-	-	-	-	-
Rata-rata ± SD		14,8 ± 0,28	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.(2)	1	8,4	-	-	-	-	-	-	-
	2	7,2	-	-	-	-	-	-	-
Rata-rata ± SD		7,8 ± 0,84	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : Diameter *paper disc* 5 mm

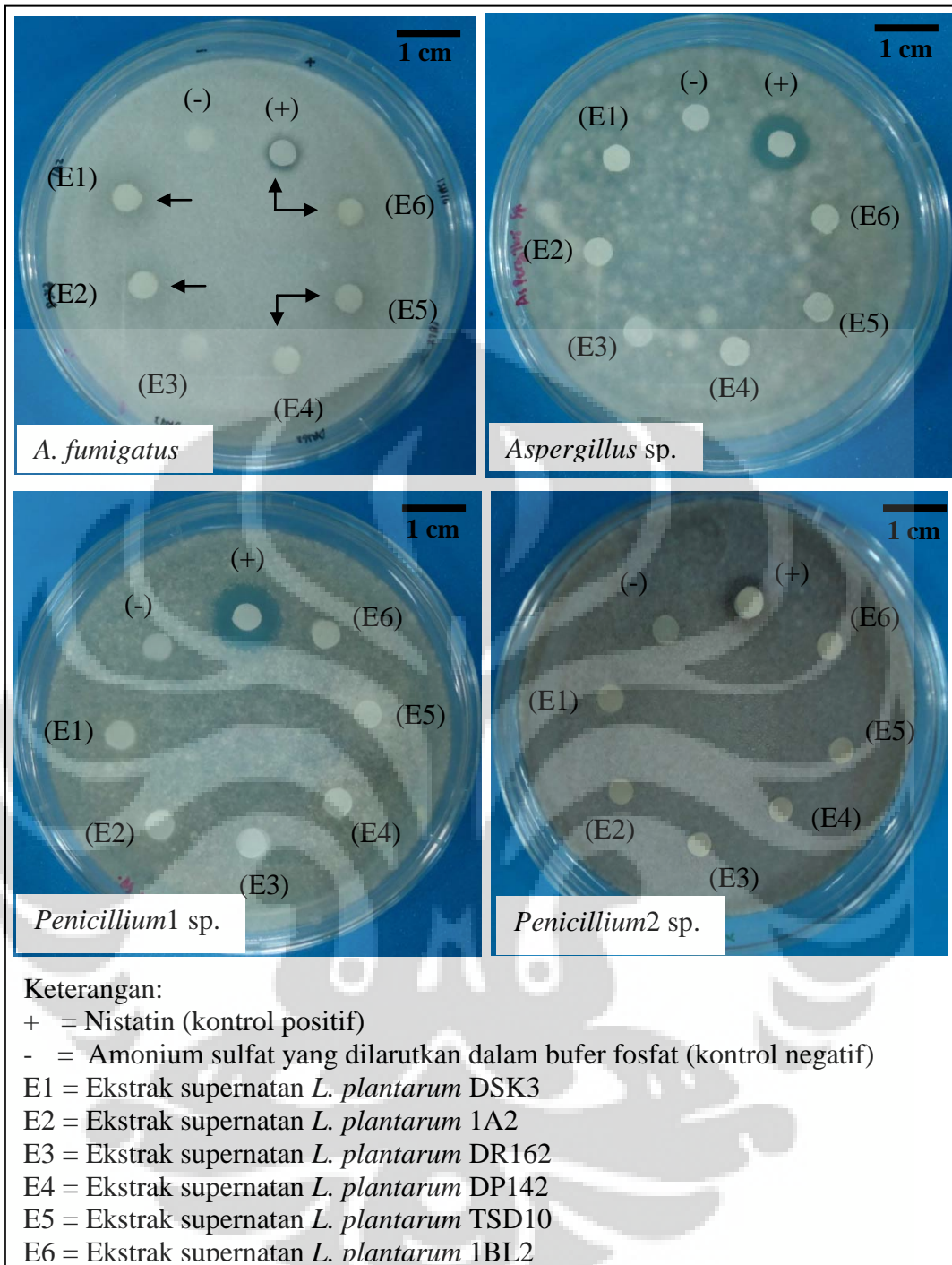
n- = Pengulangan ke-

* Zona hambat yang terbentuk adalah zona hambat parsial

Tabel 4.6.(2). Konsentrasi ekstrak supernatan *L. plantarum* yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nistatin berdasarkan perbandingan zona hambat

Kapang	Kontrol	Zona hambat <i>Lactobacillus plantarum</i> (strain)					
		Rata-rata ± SD					
		Nistatin	DSK3	1A2	DR162	DP142	TSD10
<i>A. fumigatus</i>	10,3 ± 0,84	8,7 ± 0,28*	8,1 ± 0,14*	7,6 ± 0,14*	-	7,6 ± 0,49*	7,4 ± 0,28*
Konsentrasi	1000 ppm	844,6 ppm	786,4 ppm	737,8 ppm	-	737,8 ppm	718,4 ppm
<i>Aspergillus</i> sp.	12,3 ± 0,91	-	-	-	-	-	-
Konsentrasi	1000 ppm	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.(1)	14,8 ± 0,28	-	-	-	-	-	-
Konsentrasi	1000 ppm	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.(2)	7,8 ± 0,84	-	-	-	-	-	-
Konsentrasi	1000 ppm	-	-	-	-	-	-

Keterangan : * Zona hambat yang terbentuk adalah zona hambat parsial



Gambar 4.6.(1). Hasil pengujian kemampuan antifungi ekstrak supernatan *L. plantarum* dengan *paper disc assay* terhadap kapang uji pada medium MRS agar, inkubasi 48 jam, 30° C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian kemampuan antifungi ekstrak supernatan *L. plantarum* adalah nistatin dengan konsentrasi 1000 ppm (b/v). Diameter zona hambat rata-rata nistatin terhadap pertumbuhan kapang lebih besar jika dibandingkan dengan ekstrak supernatan *L. plantarum* (Tabel 4.6.(2)). Menurut Semis dkk. (2009: 334), nistatin mempunyai aktivitas fungisida atau fungistatik terhadap berbagai jenis fungi.

Hasil pengujian kontrol negatif dengan menggunakan ammonium sulfat yang dilarutkan dalam bufer fosfat dengan tingkat kejenuhan 60% tidak menunjukkan kemampuan antifungi (Tabel 4.6.(1) dan Gambar 4.6.(1)). Hal tersebut terlihat dari tidak terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram dan menunjukkan bahwa amonium sulfat tidak memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan kapang.

Diameter zona hambat rata-rata tertinggi yaitu pada *L. plantarum* DSK3 yang menghambat *A. fumigatus* yaitu $8,7 \pm 0,28$ mm. Kemampuan antifungi dari ekstrak supernatan *L. plantarum* DSK3 dalam amonium sulfat setara dengan kemampuan antifungi dari nistatin dengan konsentrasi 844,6 ppm.

Hasil pengujian ekstrak supernatan *L. plantarum* strain DP142 tidak menunjukkan kemampuan antifungi terhadap *A. fumigatus* dan *L. plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, DP142, TSD10, dan 1BL2 tidak menunjukkan kemampuan antifungi terhadap *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.(1), dan *Penicillium* sp.(2). Hal tersebut terlihat dari tidak terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram dan menunjukkan strain-strain tersebut tidak memiliki kemampuan dalam menghambat kapang uji.

Pengujian ekstrak supernatan dari beberapa strain *L. plantarum* dengan metode *paper disc assay* menunjukkan kemampuan antifungi berupa zona hambat parsial terhadap *A. fumigatus*. Hal tersebut diduga bahwa protein yang diperoleh dari pemekatan supernatan *L. plantarum* dengan amonium sulfat belum terendapkan pada konsentrasi kejenuhan 60% sehingga konsentrasi senyawa antifungi berupa protein dari ekstrak supernatan *L. plantarum* yang berhasil diendapkan sangat rendah. Magnusson dan Schnürer (2001:4) melaporkan bahwa *Lactobacillus coryniformis* mampu menghasilkan senyawa antifungi berupa

protein dari supernatan yang diendapkan dengan amonium sulfat dengan kejenuhan 80 dan 100%.



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Suspensi sel *L. plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, DP142, TSD10, dan 1BL2 menunjukkan kemampuan antifungi terhadap *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*(1), *Penicillium sp.*(2) namun tidak menunjukkan kemampuan antifungi terhadap jamur merah dan jamur putih menggunakan *double layer diffusion assay*.
2. Ekstrak supernatan *L. plantarum* strain DSK3, 1A2, DR162, TSD10, dan 1BL2 menunjukkan kemampuan antifungi terhadap *A. fumigatus*, namun tidak menunjukkan kemampuan antifungi terhadap *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*(1) dan *Penicillium sp.*(2) dengan *paper disc assay*.

5.2. Saran

Perlu dilakukan identifikasi antifungi yang dihasilkan *L. plantarum* dari suspensi sel.

DAFTAR REFERENSI

- Aarnikunnas, J. 2006. Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Disertation S3 Departement of Basic Veterinary Science, Helsinki: 57 hlm.
- Adams, N. 2007. Do you know what's in your silage. 19 Agustus: 2 hlm.
www.progressivehay.com, 28 Maret 2011, pk. 21.00.
- Ammor, S., G. Tauveron, E. Dufour & I. Chevallier. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and patogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-screening and characterization of antibacterial compounds. *Food Control* **17**: 454--461.
- Anonim. 2005. Bacteria. 13 hlm.
http://water.me.vccs.edu/courses/ENV195Micro/Lesson4_print.htm. 15 Desember 2011, pk. 19.30.
- Atta, H. M., B. M. Refaat & A. A. El-Waisef. 2009. Application of biotechnology for production, purification, and characterization of peptides antibiotic produced by probiotic *Lactobacillus plantarum*, NRRL B-227. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* **4**(2): 115--125.
- Auerbach, H., E. Oldenburg & F. Weissbach. 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *Journal of The Science of Food and Agriculture* **74**(4): 565--572.
- Bauer, J., A. Gareis, A. Gott, & B. Gedek. 1989. Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **27**(1): 45--50.
- Beasley, S. 2004. Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Disertation S3 Departement of Applied and Microbiology University of Helsinki, Helsinki: 57 hlm.
- Benson, H. J. 2001. *Microbiological application: Laboratory manual in general microbiology*. 8th ed. The McGraw-Hills Company, Inc., New york: xi + 478 hlm.
- Betsy, T & J. Keogh. 2005. *Microbiology demystified*. McGraw Hill Publishing. New York: xix + 269 hlm.

- Biro, D., M. Juracek, M. Kacaniova, M. Simko, B. Galik, J. Michalkova & E. Gyongyova. 2009. Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **16**: 227--232.
- Broberg, A., K. Jacobsson, K. Storm & J. Schnürer. 2007. Metabolites profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(17): 5547--5552.
- Caplice, E & G. F. Fitzgerald. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **50** 131--149.
- Carlile, M. J., S. C. Watkinson, & G. W. Gooday. 2001. *The fungi*. 2nd ed. Academic Press, London: xvii + 588 hlm.
- Cole, R. J., J. W. Kirksey, J. W. Dorner, D. M. Wilson, JC. Jr. Johnson, A. N. Johnson, D. M. Bedell, J. P. Springer, K. K. Chexal, J. Clardy & R. H. Cox. 1997. Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from moldy silage. *Journal Agriculture Food Chemistry* **25**(4): 826--830.
- Coolborn, A. F. 2009. Antibacterial quantification from lactic acid bacteria isolated from food sources and soil. *Journal of Food Technology* **3**(24): 568--571.
- Deacon, J. W. 2006. *Fungal Biology*. Blackwell publishing, Cornwall: iv + 371 hlm.
- El-Shanawany, A. A., M. E. Mostafa & A. Barakat. 2005. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut ang Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergillus* toxins. *Mycophatologia* **159**(2): 281--289.
- Englard, S. & S. Seifther. 1990. Precipitation Techniques. *Methods in Enzymology* **182**: 285--300.
- Fellis, G. E. & F. Dellaglio. 2008. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **8**: 44--61.
- Filya, I., R. E. Muck & F. E. Contreras-Govea. 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. *American Dairy Science Association* **90**(11): 5108--5114.

- Gandjar, I., I. R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. FMIPA UI, Depok: iii + 87 hlm.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K. Van den Twel Vermeulen, A. Oetari & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor, Jakarta: xiii + 136 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal & A. Oetari. 2006. *Mikologi: Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xii + 234 hlm.
- Ghiasian, S. A. & A. H. Maghsood. 2011. Occurrence of aflatoxigenic fungi in cow feeds during the summer and winter season in Hamadan, Iran. *African Journal of Microbiology Research* **5**(5): 516--521.
- Gollop, N., V. Zakin & Z. G. Weinberg. 2004. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 662--666.
- Guyot, H., C. Sandersen, H. Aliaoui, M. Brihoum, S. Vandeputte & F. Rollin. 2002. Case report: a suspicion of cortico-cerebral necrosis in Belgian Blue herd after ingestion of moulded silage. http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/76037/1/CasereportNCC_POSTER11.pdf, ? : 1 hlm. 7 Maret 2011, pk. 16.30.
- Hawser, S. & K. Islam. 1999. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**: 411--413.
- Hedammar, M., A. E. Karlström & S. Hober. 2005. Chromatographic method for protein purification. ? : 32 hlm. http://www.biotech.kth.se/courses/gru/courselist/BB2040_ENG/ChromMethods.pdf. 13 November 2011, pk. 11.20.
- Jansson, S. 2005. Lactic acid bacteria in silage-growth, antibacterial activity and antibiotic resistance. Thesis S2 Departement of Microbiology Swedish University of Agricultural Science, Uppsala: 33 hlm.
- Jay, J. M., M. J. Loessner, & D.A. Golden. 2005. *7th ed. Modern food microbiology*. Springer Science, California: 751 hlm.

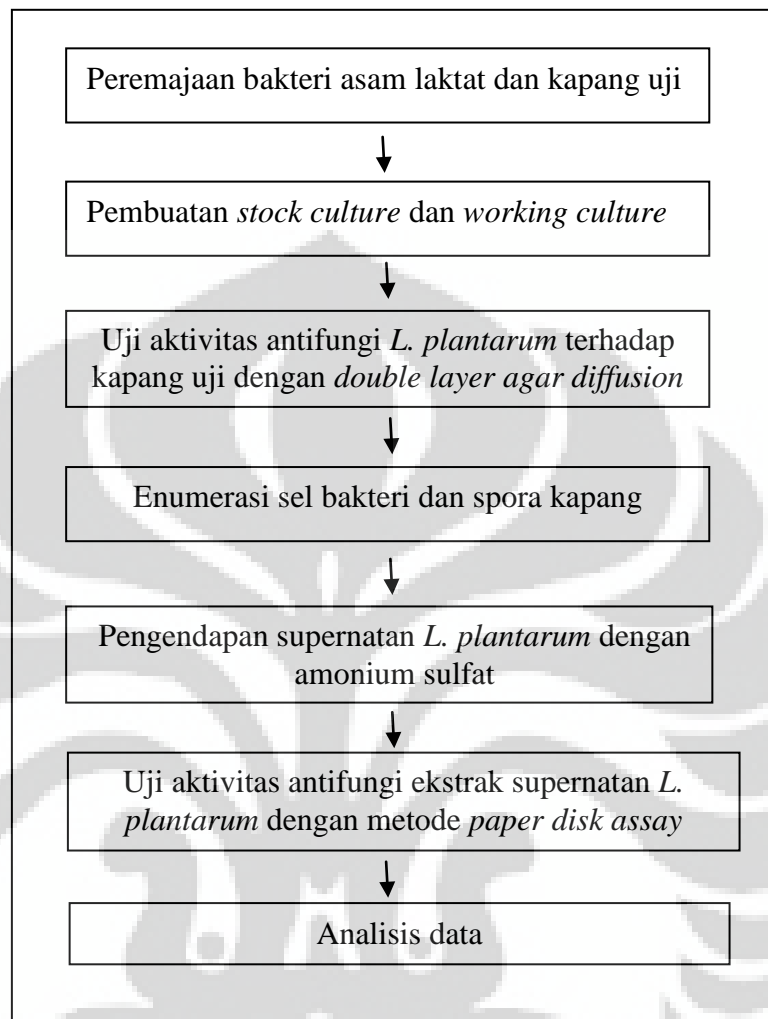
- Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti & M. Gobbetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(9): 4084--4090.
- Lewis, R. E. 2010. Antifungal pharmacology. ? : 5 hlm.
http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm. 29 September 2011, pk. 21.00.
- Madigan, M. T., J.M. Martinko & J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganism*. 10th ed. Prentice Hall International Inc., London: xix + 452 hlm.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. A. Stahl, & D. P. Clark. 2012. *Biology of microorganism*. 13th ed. Pearson Education Inc., San Fransisco: ii + 1044 hlm.
- Magnusson, J., K. Strom, S. Roos, J. Sjögren & J. Schnürer. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **219**: 129--135.
- Magnusson, J. & J. Schnürer. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(1): 1--5.
- McDonald, P., A. R. Henderson & S. J. E. Heron. 1991. *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow: 340 hlm.
- McDonell, E. E. & L. Kung. 2006. An update on covering bunker silos. 6 Mei: 12 hlm.
<http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/documents/CoveringBunkerSilos.pdf>, 19 Maret 2011, pk. 19.00.
- Mozzi, F., R. R. Raya & G. M. Vignolo. 2010. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. Blackwell Publishing, Iowa: xiii+ 383 hlm.
- Mu, W., F. Liu, J. Jia, C. Chen, T. Zhang & B. Jiang. 2009. 3-Phenyllactic acid production by substrate feeding and pH-control in fed-batch fermentation of *Lactobacillus* sp. SK007. *Bioresource Technology* **100**(21): 5226--5229.

- Muynck, C. D., A. I. J. Leroy, S. D. Maeseneire, F. Arnaut, W. Soetaert & E. J. Vandamme. 2004. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research* **159**: 339--346.
- O'Brien, M., P. O'Kiely, P. D. Forristal & H. T. Fuller. 2010. Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **247**: 131--135.
- Ohmomo, S., O. Tanaka, H. K. Kitamoto & Y. Cai. 2002. Silage and microbial performance, old story but new problems. *Japan Agricultural Research Quarterly* **36**(2): 59--71.
- Poeloengan, M. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun miana (*Coleus seutellarioides* (L.) Benth) terhadap bakteri *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biotika* **7**(2): 61--68.
- Queiroz, A. M. D., P. N. Filho, L. A. B. D. Silva, S. Assed, R. A. B. D. Silva & I. Y. Ito. 2009. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, calen paste thickened with zinc oxide, sealapex and endorez. *Brazilian Dental Journal* **20**(4): 290--296.
- Rai, M & A. Varma. 2010. *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New Jersey: xviii + 405 hlm.
- Ratnakomala, S., R. Ridwan, G. Kartina & Y. Widyastuti. 2006. Pengaruh inokulum *Lactobacillus plantarum* 1A-2 dan 1BL-2 terhadap kualitas silase rumput gajah (*Pennisetum purpureum*). *Biodeversitas* **7**(2): 131--134.
- Ridwan, R. S. Ratnakomala, G. Kartina, & Y, Widyastuti. 2005. Pengaruh penambahan dedak padi dan *Lactobacillus plantarum* 1BL-2 dalam pembuatan silase rumput gajah (*Pennisetum purpureum*). *Media Peternakan*. **28**(3): 117--123.
- Rosenberg, I. M. 1996. *Protein analysis and purification: banchtop techniques*. Birkhäuser, Boston: xxi + 427 hlm.
- SAFC Bioscience. 2006. Protein purification technic. 1 April: 2 hlm.
<http://www.safcglobal.com/etc/medialib/docs/SAFC/Bulletin/t040.Par.0001.File.tmp/t040.pdf>, 19 Maret 2012, pk. 15.00.

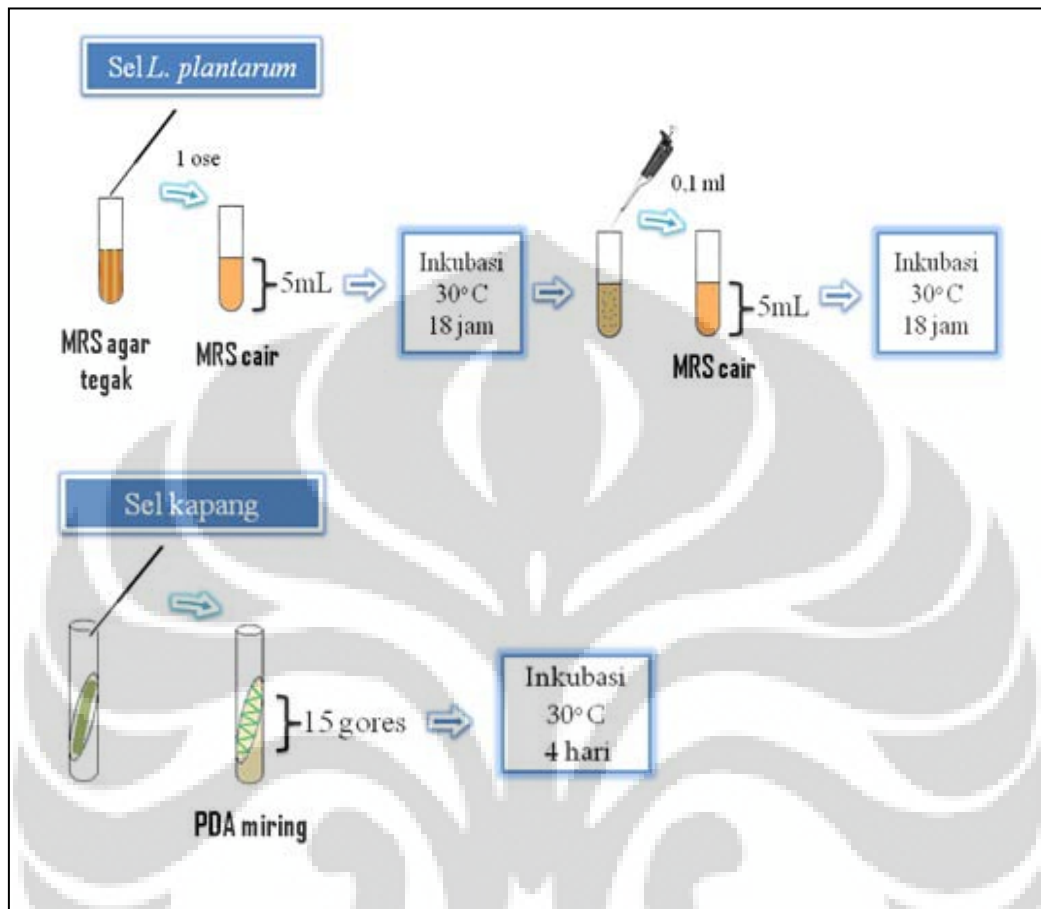
- Samson, R. A., E. S. Hoekstra, & C. A. N. V. Oorschot. 1984. *Introduction to food and airborne fungi*. 2nd ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht: 248 hlm.
- Samson, R. A., S. B. Hong, & J. C. Frisvad. 2006. Old and new concept of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* **44**: S133--S148.
- Schillinger, U. & J. V. Villarreal. 2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* **21**: 107--111.
- Schneweis, I., K. Meyer, S. Hormansdorfer & J. Bauer. 2000. Mycophenolic acid in silage. *Application Environmental Microbiology* **66**(8): 3639--3641.
- Semis, R., I. Polacheck & E. Segal. 2009. Nystatin-intralipid preparation: characterization and in vitro activity against yeast and molds. *Mycopathologia* **169**: 333-341.
- Singh, U. S. & K. Kapoor. 2010. *Introductory microbiology*. Oxford Book Company, Jaipur: v + 316 hlm.
- Sjögren, J., J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnürer & L. Kenne. 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acid from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and environmental Microbiology* **69**(12): 7554--7557.
- Stefanie, J.W., H. O. Elferink, F. Driehuis, J. C. Gottschal & S. F. Spoelstra. 2001. Silage fermentation processes and their manipulation. ? : 28 hlm. <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm>, 29 Maret 2011, pk. 13.10.
- Störm, K., J. Sjögren, A. Broberg & J. Schnürer. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the anti fungal *cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-pro)*, *cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro)*, dan *3-pheyllactic acid*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(9): 4322--4327.
- Störm, K. 2005. Fungal inhibitory lactic acid bacteria: characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. Dissertation S3 Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala: 39 hlm.
- Sutedjo, M.M., A.G. Kartasapoetra & R.S. Sastroadmojo. 1991. *Mikrobiologi tanah*. Rineka Cipta. Jakarta: xxi + 447 hlm.

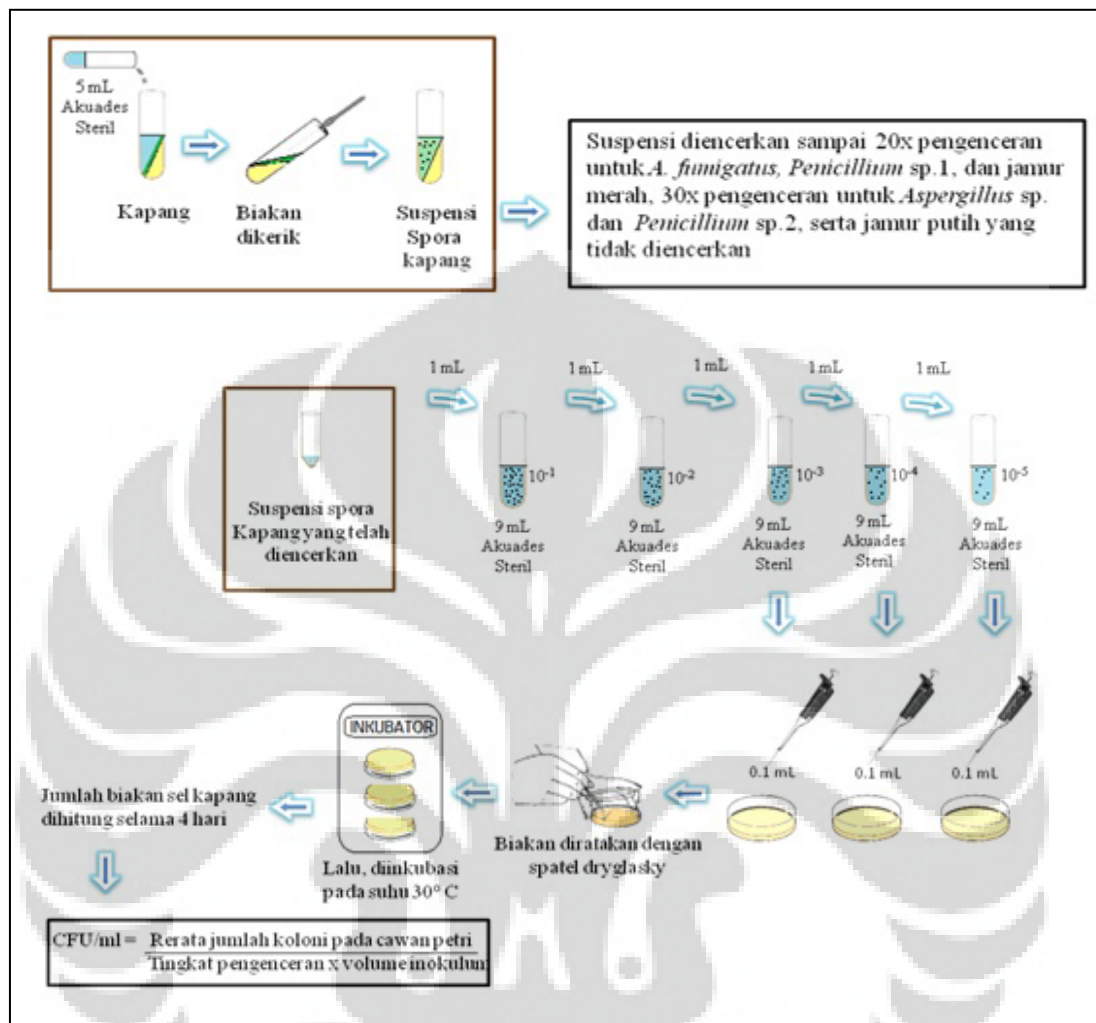
- Valentina, M. D. S., J. W. Dorner & F. Carreira. 2003. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia* **156**(2): 133--138.
- Vamanu, E., A. Vamanu & D. Pelinescu. 2010. Synthesis and partial biochemical characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* YR strain. *Revista Dechimi* **61**(5): 502--505.
- Vos, P. D., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, & W. B. Whitman. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Springer Science Business Media, New York: xxvii + 1422 hlm.
- Waluyo, L. 2007. *Mikrobiologi umum*. UMM Press, Malang: xxiii + 372 hlm.
- Webster, J. & W. S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, New York: xix + 841 hlm.
- Widyastuti, Y. 2008. Fermentasi silase dan manfaat probiotik silase bagi ruminansia. *Media Peternakan* **31**(3): 225--232.
- Wu, G. 1962. *Biological assay*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey: xvii + 423 hlm.

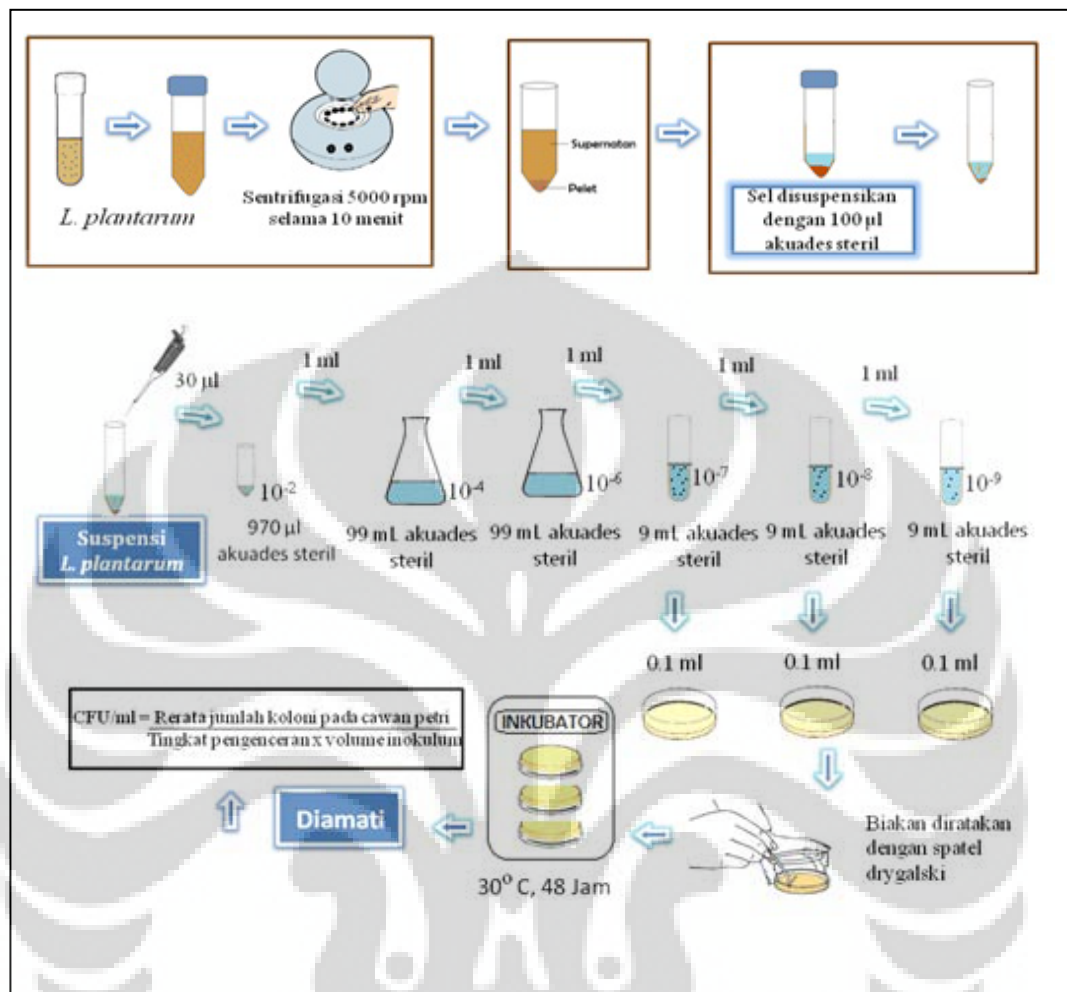
Lampiran 1. Skema kerja penelitian



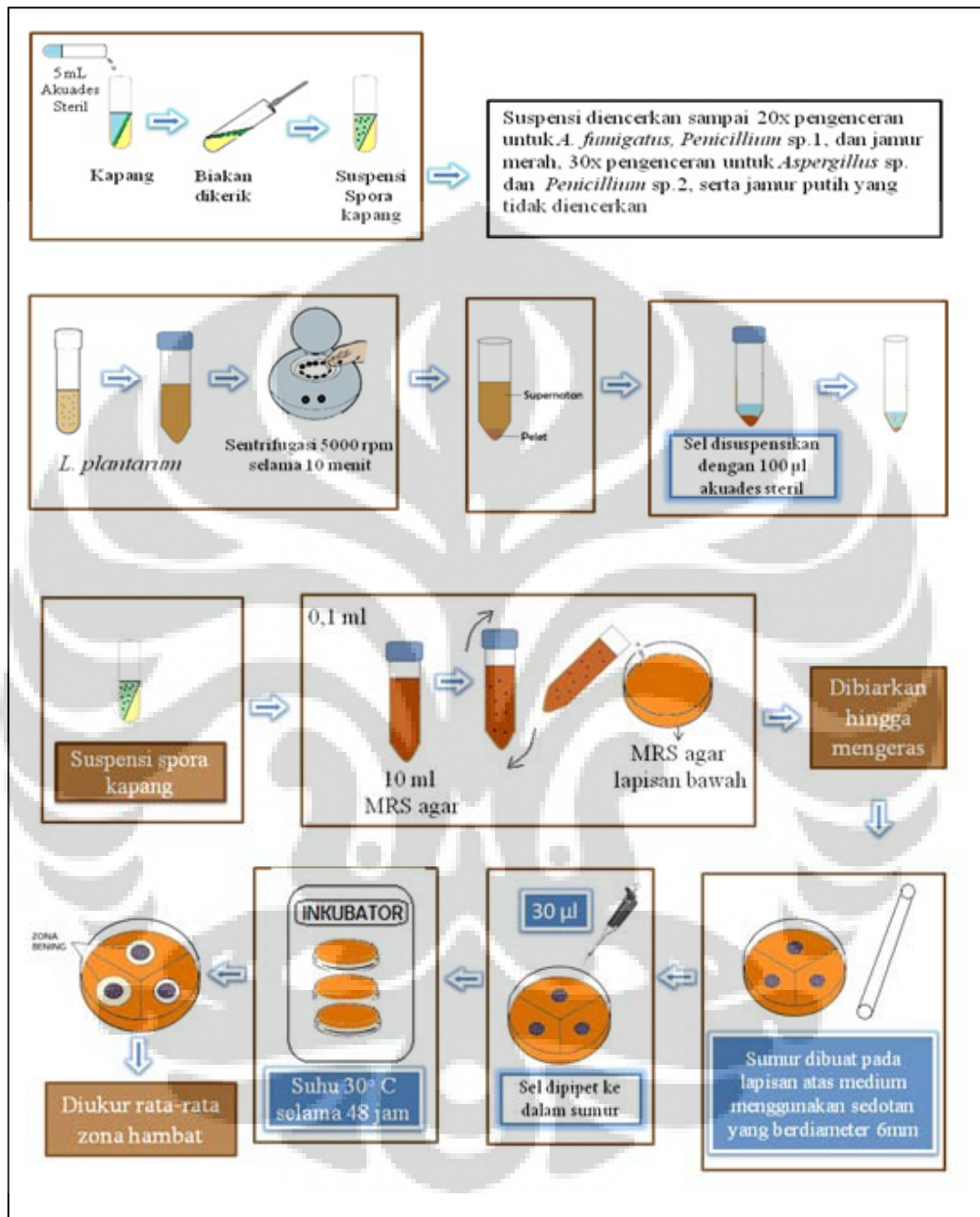
Lampiran 2. Pembuatan *stock culture* dan *working culture* *L. plantarum* dan kapang

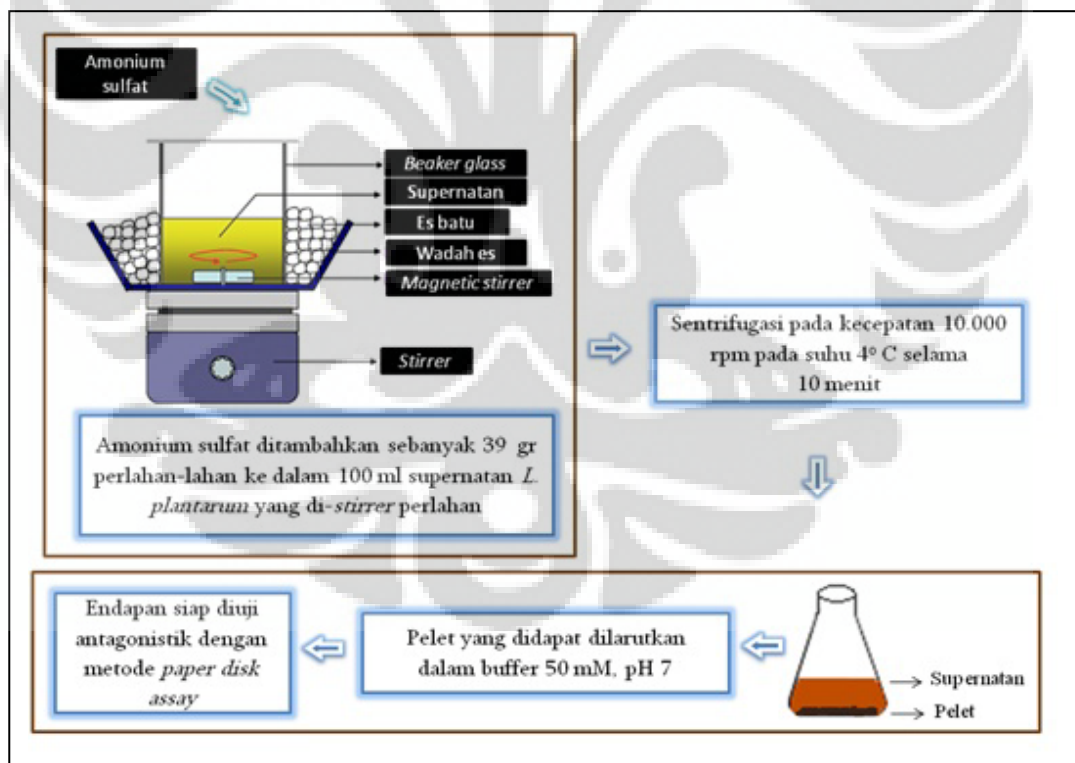


Lampiran 3. Skema cara kerja *Total Plate Count* (TPC) spora kapang

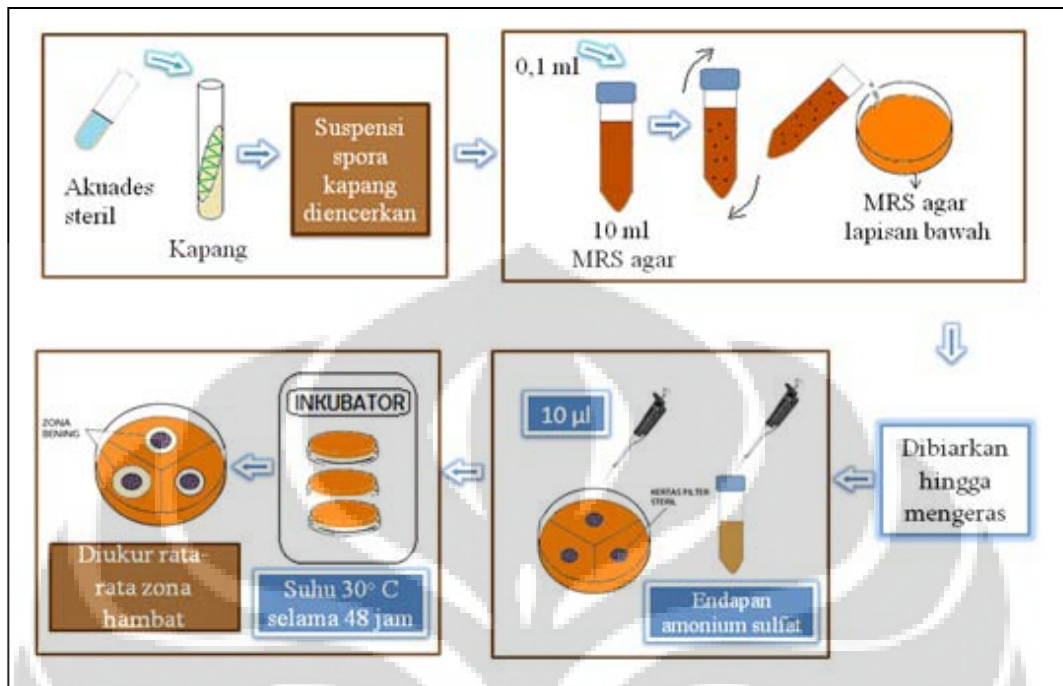
Lampiran 4. Skema cara kerja *Total Plate Count* (TPC) sel bakteri

Lampiran 5. Pengujian sifat antagonistik *L. plantarum* terhadap kapang uji dengan metode *double layer agar well diffusion*



Lampiran 6. Skema cara kerja produksi supernatan *L. plantarum*Lampiran 7. Skema cara kerja pengendapan ekstrak supernatan *L. plantarum* dengan amonium sulfat

Lampiran 8. Skema kerja uji antagonistik ekstrak supernatan dengan metode *paper disc assay*



Lampiran 9. Panduan warna Castell-Polychromos No.9216

PANDUAN WARNA CASTELL-POLYCHROMOS NO. 9216		
 101 Putih	 136 Ungu loh	 171 Hijau muda
 104 Kuning	 137 Ungu terung	 173 Hijau zaitun
 105 Kuning langsung	 139 Ungu muda	 174 Hijau cemara
 106 Kuning kunyit	 141 Biru Delft	 175 Sepia
 107 Kuning ilmau	 144 Biru kobalt muda	 176 Coklat
 108 Kuning kepodang	 146 Biru langit	 180 Coklat jagat
 109 Kuning jenar	 147 Biru muda	 182 Hartal coklat
 113 Jingga muda	 148 Biru jelah	 183 Hartal emas
 115 Jingga tua	 149 Biru Cina	 184 Hartal
 117 Merah merona	 150 Biru Berlin	 187 Hartal rentung
 118 Merah marak	 151 Biru Prusia	 189 Kayu manis
 121 Merah dadu	 153 Biru merak	 190 Merah Venetia
 124 Merah serah mawar	 155 Balu	 191 Merah Pompei
 126 Merah serah tua	 159 Hijau rumput	 192 Merah Indian
 127 Merah serah muda	 161 Hijau tembaga	 194 Lembayung
 128 Merah mengkudu mawar	 162 Hijau jelah	 195 Abu-abu muda
 129 Merah mengkudu jambon	 163 Hijau zamrud	 196 Abu-abu perak
 131 Merah daging medium	 167 Hijau getah	 197 Nilajada
 133 Merah anggur	 168 Hijau lumut	 198 Hitam sabak
 134 Merah lembayung	 170 Hijau apel	 199 hitam

Lampiran 10. Tabel jumlah sel *L. plantarum* pada menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC)

BAL	Tingkat pengenceran	Jumlah koloni		Jumlah sel (CFU/ml)	Kisaran (CFU/ml)
		I	II		
<i>L. plantarum</i> DSK3	10^{-7}	>300	292	-	$(10,0--14,0) \times 10^{11}$
	10^{-8}	53	31	14×10^{11}	
	10^{-9}	4	2	10×10^{11}	
<i>L. plantarum</i> 1A2	10^{-7}	252	292	$9,1 \times 10^{11}$	$(0,2--20) \times 10^{11}$
	10^{-8}	45	58	$0,2 \times 10^{11}$	
	10^{-9}	5	7	20×10^{11}	
<i>L. plantarum</i> DR162	10^{-7}	>300	>300	-	$(3,0--11,0) \times 10^{11}$
	10^{-8}	24	42	11×10^{11}	
	10^{-9}	0	2	3×10^{11}	
<i>L. plantarum</i> DP142	10^{-7}	248	231	8×10^{11}	$(8,0--8,3) \times 10^{11}$
	10^{-8}	25	24	$8,2 \times 10^{11}$	
	10^{-9}	4	1	$8,3 \times 10^{11}$	
<i>L. plantarum</i> TSD10	10^{-7}	186	192	$6,2 \times 10^{11}$	$(3,0--6,2) \times 10^{11}$
	10^{-8}	13	18	$5,2 \times 10^{11}$	
	10^{-9}	2	0	3×10^{11}	
<i>L. plantarum</i> 1BL2	10^{-7}	83	78	$2,7 \times 10^{11}$	$(0,8--2,7) \times 10^{11}$
	10^{-8}	5	0	$0,8 \times 10^{11}$	
	10^{-9}	0	0	0	

Lampiran 11. Tabel jumlah kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC)

Kapang	Tingkat pengenceran	Jumlah koloni		Jumlah sel (CFU/ml)	Kisaran (CFU/ml)
		I	II		
<i>A. fumigatus</i>	10^{-3}	215	261	$11,9 \times 10^6$	$(11,9--15) \times 10^6$
	10^{-4}	23	31	$13,5 \times 10^6$	
	10^{-5}	3	3	15×10^6	
<i>Aspergillus</i> sp.	10^{-3}	99	84	$3,1 \times 10^6$	$(3,0--4,5) \times 10^6$
	10^{-4}	16	11	$4,5 \times 10^6$	
	10^{-5}	2	0	$3,0 \times 10^6$	
<i>Penicillium</i> sp.(1)	10^{-3}	138	155	$7,3 \times 10^6$	$(2,5--8,7) \times 10^6$
	10^{-4}	18	17	$8,7 \times 10^6$	
	10^{-5}	1	0	$2,5 \times 10^6$	
<i>Penicillium</i> sp.(2)	10^{-3}	316	315	$10,5 \times 10^6$	$(10,5--17,0) \times 10^6$
	10^{-4}	47	43	$15,0 \times 10^6$	
	10^{-5}	3	7	$17,0 \times 10^6$	
Jamur merah	10^{-3}	147	185	$8,3 \times 10^6$	$(8,3--16,2) \times 10^6$
	10^{-4}	21	44	$16,2 \times 10^6$	
	10^{-5}	1	4	$12,5 \times 10^6$	
Jamur putih	10^{-3}	87	73	$8,0 \times 10^5$	$(8,0--9,5) \times 10^5$
	10^{-4}	12	7	$9,5 \times 10^5$	
	10^{-5}	0	0	0	