

Potensi *Rhizopus* spp. dalam mengendalikan pertumbuhan *Aspergillus flavus* FNCC6109 pada pakan konsentrat ayam broiler

Potential *Rhizopus* spp. in control the growth of *Aspergillus flavus* FNCC6109 in broiler chicken concentrate feed

Lalu Muhammad Sakti Surya Jagat*, Ida Bagus Gede Darmayasa, I Made Sara Wijana

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jimbaran, Kuta Selatan, Badung, Bali 80361 – Indonesia

*Email: jagatzsurya@gmail.com

Diterima 7 April 2021

Disetujui 26 Agustus 2021

INTISARI

Kontaminasi *Aspergillus flavus* pada pakan ternak di Indonesia dapat mempengaruhi kesehatan dan produktivitas ternak. Beberapa faktor yang mendukung terjadinya kontaminasi pada pakan adalah suhu dan kelembapan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi kultur filtrat *Rhizopus* spp. dalam menghambat *A. flavus* FNCC6109 pada pakan konsentrat ayam broiler. Metode yang digunakan yaitu metode *dual culture* dan uji daya hambat kultur filtrat *Rhizopus* spp. yang diinkubasi selama 3, 4, dan 5 hari secara *in vitro*. Uji *in vivo* dilakukan pada model pakan konsentrat ayam broiler yang ditambahkan kultur filtrat *Rhizopus* spp. dengan konsentrasi 10% (v/v), 20% (v/v), 30% (v/v), 40% (v/v), dan 50% (v/v). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur filtrat *Rhizopus* spp. secara signifikan ($P \leq 0,05$) mampu menghambat pertumbuhan *A. flavus* FNCC6109 baik *in vitro* dan *in vivo*. Persentase daya hambat kultur filtrat *Rhizopus* spp. yang diinkubasi selama 5 hari yaitu sebesar $67,47 \pm 2,10\%$ relatif lebih baik dibandingkan 3 dan 4 hari, sehingga digunakan secara *in vivo*. Perlakuan kultur filtrat *Rhizopus* spp. sebesar 50% (v/v) pada pakan konsentrat ayam broiler berhasil secara signifikan menurunkan populasi *A. flavus* FNCC6109 sebesar 82% setelah diinkubasi selama 15 hari dibandingkan perlakuan kontrol negatif (pakan konsentrat tanpa penambahan kultur filtrat *Rhizopus* spp. dan *A. flavus* FNCC6109).

Kata kunci: *Rhizopus* spp., *Aspergillus flavus* FNCC6109, pakan konsentrat

ABSTRACT

Aspergillus flavus contamination of agriculture in Indonesia can cause problems to animal health and productivity. Some factors can support the appearance of contamination in feed, especially temperature and humidity. The main objective of this research was to investigate potency of *Rhizopus* spp. on inhibit *A. flavus* FNCC6109 in broiler chicken concentrate feed. The experiments were conducted dual culture method and the inhibition test of the *Rhizopus* spp. filtrate culture was incubated for 3, 4 and 5 days on *in vitro*. The *in vivo* test was directly applied in broiler chicken concentrate feed which added *Rhizopus* spp. filtrate culture concentration at 10% (v/v), 20% (v/v), 30% (v/v), 40% (v/v), dan 50% (v/v). The results showed that the *Rhizopus* spp. filtrate culture significantly ($P \leq 0,05$) to inhibit the growth of *A. flavus* FNCC6109 both *in vitro* and *in vivo*. The percentage inhibition of *Rhizopus* spp. filtrate culture incubated for 5 days showed $67,47 \pm 2,10\%$ relatively better results than 3 and 4 days, and therefore was used in the *in vivo*. Application of 50% (v/v) *Rhizopus* spp. filtrate culture to the broiler chicken concentrate feed

significantly reduced 82% population of *A. flavus* FNCC6109 after 15 days incubated relative to that of negative control (concentrate feed without addition *Rhizopus* spp. filtrate culture and *A. flavus* FNCC6109).

Keywords: *Rhizopus* spp., *Aspergillus flavus* FNCC6109, concentrate feed

PENDAHULUAN

Industri peternakan di Indonesia memiliki peranan penting sebagai sumber penghasil protein hewani yang dibutuhkan oleh masyarakat (Sekretariat Ditjen PKH, 2017). Produktivitas hewan ternak sangat dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitas pakan yang diberikan (Nurwahidah et al., 2016). Kualitas pakan yang baik mempunyai kandungan gizi yang diperlukan ternak, viabilitas tinggi, mudah dicerna, dan tidak mengandung cemaran mikroba patogen (Akhadiarto, 2010).

Penyediaan pakan secara berkelanjutan menjadi salah satu kendala bagi para peternak, karena selama proses penyimpanan pakan atau bahan pakan terjadi penurunan kualitas sehingga produktivitas ternak menjadi menurun (Yulien, 2012). Hal ini disebabkan karena Indonesia memiliki curah hujan yang tinggi sehingga kelembapan pakan meningkat (Fadilah & Polana, 2011). Kadar air yang tinggi pada pakan dapat mendukung pertumbuhan jamur genus *Aspergillus* (Bidura, 2017).

Menurut Hasanah (2017), *Aspergillus flavus* berkembang biak dengan pembentukan hifa dan menghasilkan konidiofor untuk pembentuk spora. Spora *A. flavus* dapat ditemukan pada udara terbuka dan air. Jamur ini memiliki ciri-ciri morfologi kuning kehijauan dan dapat tumbuh pada suhu 12–48°C dengan a_w minimal 0,8 (Vujanovic et al., 2001). *Aspergillus flavus* merupakan salah satu jamur penghasil toksin yang berbahaya. Toksin yang dihasilkan jamur pencemar ini dikenal dengan aflatoksin yang umumnya ditemukan pada pakan ternak (Didwania & Joshi, 2013).

Aflatoksin merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat karsinogenik, mutagenik, dan teratogenik pada manusia dan hewan

(Ghiasian & Maghsood, 2011). Ada enam jenis senyawa aflatoksin yaitu B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ dan M₂ (Hackbart et al., 2014). Berdasarkan jenis senyawa aflatoksin tersebut, Aflatoksin B₁ (AFB₁) dan B₂ (AFB₂) dihasilkan oleh *A. flavus* (Yogendrarajah et al., 2015). AFB₁ merupakan jenis senyawa yang paling toksik diantara jenis lainnya (Safika et al., 2015). Frekuensi cemaran aflatoksin B₁ tertinggi terdapat pada berbagai hasil pertanian seperti kacang-kacangan, gandum, dan biji-bijian yang umumnya digunakan sebagai bahan baku pakan ternak (Utami et al., 2012).

Upaya pengendalian cemaran aflatoksin pada pakan ternak perlu dilakukan agar kandungan aflatoksin pada pakan tidak melebihi batas maksimum yang telah ditetapkan. Pengendalian secara fisik maupun kimia telah diusahakan, namun masih memiliki kelemahan disamping tidak efektif dan efisien tetapi juga menyisakan residu bahan kimia yang dapat membahayakan kesehatan. Selain itu, biaya yang dikeluarkan untuk membeli bahan-bahan kimia terbilang cukup mahal, sehingga perlu dilakukan teknik pengendalian lain yang tidak memerlukan biaya yang mahal serta lebih efektif dan efisien (Roosita, 2002). Pengendalian tersebut dapat dilakukan secara biologi dengan menggunakan mikroba antagonis yang berpotensi menghambat pertumbuhan *A. flavus*, salah satunya yaitu *Rhizopus* spp.. Beberapa penelitian terdahulu, seperti yang dilakukan oleh Kusumaningtyas dan Masrianti (2019) menunjukkan bahwa *Rhizopus oligosporus* mampu menghambat pertumbuhan *A. flavus*.

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk menggali potensi *Rhizopus* spp. dalam menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus* FNCC6109 yang diaplikasikan pada pakan konsentrat ayam broiler sebagai upaya meningkatkan produktivitas hasil ternak

MATERI DAN METODE

Isolasi *Rhizopus* spp. dari Bahan Pakan Konsentrat Ayam Broiler

Isolasi *Rhizopus* spp. dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran sampel (*Plating method*) yaitu, seri pengenceran 10^{-1} sampai pengenceran 10^{-3} (Ilyas et al., 2006). Sampel yang digunakan berasal dari bahan-bahan pakan konsentrat antara lain kedelai, jagung, dedak padi, dan bungkil kelapa. Suspensi pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-3} masing-masing diambil sebanyak 1 mL kemudian suspensi dimasukkan ke dalam cawan Petri steril dan ditambahkan 15 mL media *Potato Dextrosa Agar* (PDA) serta *kloramfenikol*, lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 3-4 hari. Koloni jamur yang tumbuh pada cawan Petri dicatat dan diamati secara makroskopis dengan berpedoman pada buku identifikasi Pitt and Hocking (1997).

Identifikasi kultur *Rhizopus* spp.

Identifikasi kultur *Rhizopus* spp. dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan menggunakan kaca pembesar (*loop*) yang meliputi bentuk koloni, warna permukaan koloni, dan warna sebalik koloni. Sedangkan pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang meliputi rhizoid, sporangiofor, sporangium, spora, stolon, hifa, dan ada tidaknya sekat pada hifa (Pitt & Hocking, 1997).

Reisolasi *Aspergillus flavus* FNCC6109

Kultur *A. flavus* FNCC6109 diperoleh dari stok kultur Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Udayana. Langkah pertama yang dilakukan yaitu stok kultur *A. flavus* diambil 1 ose kemudian diinokulasikan tepat di tengah cawan Petri yang berisi media *Potato Dextrose Agar* (PDA), lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 4 hari. Koloni *A. flavus* FNCC6109 yang tumbuh pada media PDA dilakukan reidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan menggunakan

kaca pembesar (*loop*) yang meliputi tekstur koloni, warna permukaan koloni, dan warna sebalik koloni. Sedangkan pengamatan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop yang meliputi *foot sel*, konidiofor, konidia, *sterigma*, miselia, hifa, dan ada tidaknya sekat pada hifa.

Uji Daya Hambat *Rhizopus* spp. terhadap *Aspergillus flavus* FNCC6109

Uji daya hambat *Rhizopus* spp. terhadap *A. flavus* FNCC6109 dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode *dual culture* dengan ulangan sebanyak 4 kali.

Menurut Singh & Vijay (2011), persentase hambatan *Rhizopus* spp. terhadap *A. flavus* FNCC6109 dapat dihitung melalui PIRG (*Percentage Inhibition of Radial Growth*) dengan rumus:

$$\text{PIRG (\%)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

- PIRG : *Percentage Inhibition of Radial Growth*
 R1 : Diameter koloni *A. flavus* FNCC6109 tanpa antagonis (kontrol)
 R2 : Diameter koloni *A. flavus* FNCC6109 dengan antagonis (*dual culture*)

Uji Daya Hambat kultur filtrat *Rhizopus* spp. terhadap *Aspergillus flavus* FNCC6109

Biakan *Rhizopus* spp. yang memiliki potensi paling besar dalam menghambat pertumbuhan *A. flavus* pada uji daya hambat secara *in vitro* selanjutnya diinokulasikan ke dalam botol yang berisi 100 mL media PDB (*Potato Dextrosa Broth*) lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 3, 4, dan 5 hari. Kultur filtrat *Rhizopus* spp. yang telah dibuat dilakukan uji daya hambat secara *in vitro* sesuai dengan masa inkubasi yang telah ditentukan dengan pengulangan 4 kali. Hasil uji daya hambat kultur filtrat *Rhizopus* spp. terhadap *A. flavus* FNCC6109 dapat dihitung menggunakan rumus yang telah ditetapkan menurut Singh & Vijay (2011).

Pembuatan Model Pakan Konsentrat Ayam Ras Pedaging

Bahan baku pakan yang telah diformulasi dibuat dalam bentuk *pellet* sesuai dengan kebutuhan ransum ternak. Menurut Darmayasa (2015), komposisi bahan baku untuk pembuatan model pakan konsentrat antara lain, tepung jagung, tepung kedelai, dedak padi, bungkil kelapa, tepung ikan, tepung daun turi, garam dapur, dan mineral B12 (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi Model Pakan Konsentrat Ayam Ras Pedaging

No	Jenis Bahan	Berat (g)
1	Tepung Jagung	400
2	Dedak Padi	210
3	Tepung Kedelai	130
4	Bungkil Kelapa	90
5	Tepung Ikan	100
6	Tepung Daun Turi	55
7	Garam Dapur	7
8	Mineral B12	8

Sumber: Darmayasa (2015)

Pembuatan Suspensi Spora *Aspergillus flavus* FNCC6109

Pembuatan suspensi spora *A. flavus* FNCC6109 dilakukan dengan menginokulasikan koloni *A. flavus* FNCC6109 tepat di tengah media PDA padat dengan diameter 5 mm lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 4 hari. Koloni yang tumbuh pada media PDA ditetesi air steril sebanyak 5 mL pada permukaan koloni lalu diusapkan dengan spatula. Diambil cairan yang telah berisi spora menggunakan pipet Pasteur lalu dipindahkan ke tabung reaksi.

Uji kultur filtrat *Rhizopus* spp. terhadap Jumlah Koloni *Aspergillus flavus* FNCC6109 pada Pakan Konsentrat Ayam Ras Broiler

Uji ini dilakukan menggunakan 7 botol plastik yang masing-masing diisi dengan 10 g pakan konsentrat. Botol plastik pertama hanya diisi dengan 10 g pakan konsentrat yang digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya botol plastik kedua diisi dengan 10 g pakan konsentrat

ditambahkan 5 mL spora *A. flavus* FNCC6109 sebagai kontrol positif. Botol plastik ketiga sampai ketujuh, ditambahkan pakan ternak dan 5 mL spora *A. flavus* FNCC6109, kemudian ditambahkan kultur filtrat *Rhizopus* spp. dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Semua perlakuan dan kontrol diinkubasi selama 15 hari pada suhu 28°C dan dilakukan perhitungan jumlah koloni *A. flavus* FNCC6109 menggunakan *plating method*.

HASIL

Isolasi dan Identifikasi *Rhizopus* spp. Secara Makroskopis dan Mikroskopis

Hasil isolasi *Rhizopus* spp. yang dilakukan pada bahan-bahan pakan konsentrat diperoleh satu isolat *Rhizopus* spp yang berhasil diisolasi dari kedelai. Hasil pengamatan isolat *Rhizopus* spp. secara makroskopis yang diinkubasi selama 4 hari rata-rata diameter koloninya 9 cm. Ciri-ciri koloni tersebut memiliki warna putih keabuan dengan tekstur koloni menyerupai kapas, growing zone, tidak terdapat zonasi, dan tidak memiliki garis radial (Gambar 1. A). Hasil pengamatan secara mikroskopis dengan perbesaran 400x menunjukkan bahwa *Rhizopus* spp. memiliki sporangium berbentuk oval, hifa tidak bersekat, memiliki rhizoid dan stolon (Gambar 1. B). Karakteristik isolat *Rhizopus* spp. yang diinkubasi selama 4 hari pada media PDA ditampilkan pada Tabel 2.



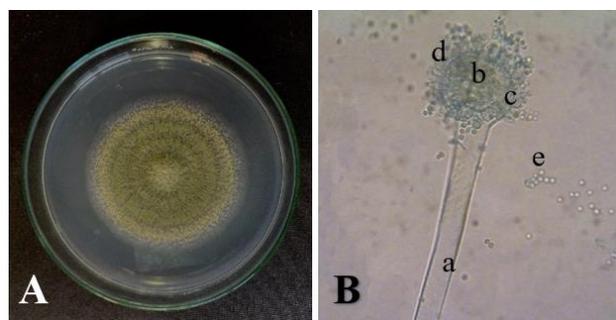
Gambar 1. Morfologi *Rhizopus* spp. (A) Koloni *Rhizopus* spp. pada media PDA; dan (B) Struktur *Rhizopus* spp. secara mikroskopis dengan perbesaran 400x, Keterangan a: rhizoid; b: stolon; c: sporangiofor; d: sporangium

Tabel 2. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis isolat *Rhizopus* spp. masa inkubasi 4 hari

Karakter Morfologi		Keterangan
Makroskopik		
a	Warna koloni	Putih keabuan
b	Warna sebalik koloni	Putih
c	Tekstur koloni	<i>Cattony</i>
d	<i>Growing zone</i>	Ada
e	Zonasi	Tidak ada
Mikroskopik		
a	Jenis hifa	Tidak bersepta
b	Sporangium	Oval
c	Stolon	Ada
d	Rhizoid	Ada
e	Sporangiofor	Tunggal

Reidentifikasi *Aspergillus flavus* FNCC6109 Secara Makroskopis dan Mikroskopis

Hasil reidentifikasi *A. flavus* FNCC6109 yang diperoleh dari stok kultur Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Biologi Universitas Udayana. Hasil pengamatan *A. flavus* FNCC6109 secara makroskopis yang diinkubasi selama 4 hari rata-rata diameternya 6,5 cm. Ciri-ciri koloni tersebut memiliki warna hijau kekuningan dengan tepi koloni berwarna putih, terdapat *growing zone*, koloni bertekstur granural, terdapat zonasi, dan tidak memiliki garis radial (Gambar 2. A). Hasil pengamatan secara mikroskopis dengan perbesaran 400x menunjukkan bahwa *A. flavus* FNCC6109 memiliki konidia yang berbentuk bulat, konidiofor berwarna bening, vesikel berbentuk bulat, dan sterigma yang menempel pada bagian vesikel (Gambar 2. B).



Gambar 2. Morfologi *Aspergillus flavus* FNCC6109 (A) Koloni *A. flavus* FNCC6109 pada media PDA; dan (B) Struktur *A. flavus* FNCC6109 secara mikroskopis dengan perbesaran 400x, Keterangan a: konidiofor; b: vesikel; c: sterigma; d: konidia; e: konidium.

Tabel 3. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis isolat *A. flavus* FNCC6109 masa inkubasi 4 hari

Karakter Morfologi		Keterangan
Makroskopik		
a	Warna koloni	Hijau kekuningan
b	Warna sebalik koloni	Kuning
c	Tekstur koloni	<i>Granular</i>
d	<i>Growing zone</i>	Ada
e	Zonasi	Ada
Mikroskopik		
a	Jenis hifa	Bersepta
b	Bentuk Vesikel	Bulat
c	Konidiofor	Ada
d	Konidia	Ada
e	Sterigma	Ganda

Uji Daya Hambat *Rhizopus* spp. terhadap *Aspergillus flavus* FNCC6109 secara *In Vitro*

Uji daya hambat *Rhizopus* spp. terhadap *A. flavus* FNCC6109 secara *in vitro* dengan menggunakan metode *dual culture* diperoleh hasil rata-rata persentase daya hambat sebesar 61,40±0,54% dengan masa inkubasi selama 4 hari. Rata-rata diameter koloni *A. flavus* FNCC6109 tanpa *Rhizopus* spp. dengan masa inkubasi 4 hari sebesar 6,37±0,22 cm. Sedangkan rata-rata diameter koloni *A. flavus* FNCC6109 dengan perlakuan yang diinkubasi selama 4 hari sebesar 2,46±0,09 cm (Tabel 4 dan Gambar 3).

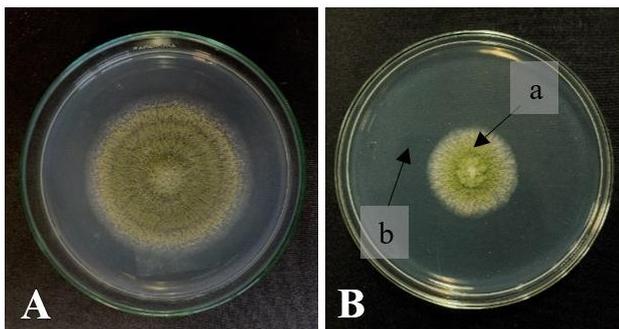
Tabel 4. Hasil uji daya hambat *Rhizopus* spp. terhadap *A. flavus* FNCC6109

Perlakuan	Diameter koloni <i>A. flavus</i> FNCC6109 setelah inkubasi (cm)				Jumlah	Rata-rata
	U1	U2	U3	U4		
Kontrol	6,5	6,1	6,3	6,6	25,5	6,37±0,22
<i>Rhizopus</i> spp.	2,55	2,37	2,40	2,52	9,84	2,46±0,09
Hambatan (%)	60,76	61,14	61,90	61,81	245,61	61,40±0,54

Keterangan: Nilai-nilai pada tabel 8 merupakan nilai dengan empat kali ulangan dan rata-rata ± standar deviasi; U = Ulangan

Uji Daya Hambat Kultur Filtrat *Rhizopus* spp. terhadap *Aspergillus flavus* FNCC6109 Secara *In Vitro*

Hasil persentase daya hambat kultur filtrat *Rhizopus* spp. yang diinkubasi selama 3, 4, dan 5 hari masing-masing sebesar 59,23±2,50%; 62,64±1,28%; dan 67,47±2,10%. Rata-rata diameter koloni *A. flavus* FNCC6109 tanpa perlakuan kultur filtrat *Rhizopus* spp. adalah sebesar 6,35±0,26 cm dengan masa inkubasi 4 hari. Sedangkan rata-rata diameter koloni *A. flavus* FNCC6109 yang diberikan perlakuan kultur filtrat *Rhizopus* spp. sebesar 2,33 cm dengan masa inkubasi 4 hari (Gambar 4).



Gambar 4. Uji daya hambat kultur filtrat *Rhizopus* spp. terhadap *A. flavus* FNCC6109 pada media PDA; (A) Kontrol: *A. flavus* FNCC6109; (B) Perlakuan: a. *A. flavus* FNCC6109; b. Kultur filtrat *Rhizopus* spp.

Tabel 5. Hasil uji daya hambat kultur filtrat *Rhizopus* spp. terhadap *A. flavus* FNCC6109

Perlakuan	Diameter koloni <i>A. flavus</i> FNCC6109 (cm)				Rata-rata (cm)	Daya hambat (%)
	U1	U2	U3	U4		
Kontrol	6,3	6,5	6,0	6,6	6,35±0,26 ^a	0±0,0
<i>Rhizopus</i> spp. inkubasi 3 hari	2,5	2,49	2,65	2,7	2,58±0,10 ^b	59,23±2,50
<i>Rhizopus</i> spp. inkubasi 4 hari	2,44	2,35	2,29	2,4	2,37±0,06 ^b	62,64±1,28
<i>Rhizopus</i> spp. inkubasi 5 hari	2,2	1,95	2,0	2,1	2,06±0,11 ^b	67,47±2,10

Keterangan: Nilai-nilai pada tabel yang diikuti notasi huruf yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($P \leq 0,05$) berdasarkan uji Duncan setelah dilakukan analisis sidik ragam (ANOVA).

Uji Kultur Filtrat *Rhizopus* spp. terhadap Jumlah Koloni *Aspergillus flavus* FNCC6109 Secara *In Vivo*

Hasil pengujian kultur filtrat *Rhizopus* spp. dalam menghambat pertumbuhan *A. flavus* FNCC6109 pada model pakan konsentrat ayam

ras broiler yang disimpan selama 15 hari menunjukkan hasil positif bahwa kultur filtrat yang diinkubasi selama 5 hari memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *A. flavus* FNCC6109 pada pakan konsentrat (Tabel 6).

Tabel 6. Jumlah koloni *A. flavus* FNCC6109 pada model pakan konsentrat ayam ras broiler yang ditambahkan kultur filtrat *Rhizopus* spp.

Perlakuan	Jumlah koloni <i>A. flavus</i> FNCC6109 (CFU/g)		Penurunan <i>A. flavus</i> FNCC6109 (%)
	Koloni sebelum inkubasi (T ₀)	Koloni sesudah inkubasi (T ₁₅)	
A	(0,00)	(0,00)±0,00 ^e	0
B	27,5x10 ⁴	51x10 ⁴ ±0,355 ^a	0
C	27,5x10 ⁴	25,5x10 ⁴ ±0,316 ^b	8
D	27,5x10 ⁴	22,7x10 ⁴ ±0,330 ^{bc}	18
E	27,5x10 ⁴	19,7x10 ⁴ ±0,298 ^{cd}	28
F	27,5x10 ⁴	8x10 ⁴ ±0,182 ^e	71
G	27,5x10 ⁴	5x10 ⁴ ±0,182 ^f	82

Keterangan: Nilai rata-rata empat kali ulangan pada T₁₅ dengan notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai rata-rata yang berbeda nyata ($P \leq 0,05$) berdasarkan uji Duncan setelah dilakukan analisis sidik ragam (ANOVA). (A): Konsentrat tanpa *A. flavus* FNCC6109 dan tanpa kultur filtrat *Rhizopus* spp.; (B): Konsentrat + *A. flavus* FNCC6109; (C): Konsentrat + *A. flavus* FNCC6109 + 10% *Rhizopus* spp.; (D): Konsentrat + *A. flavus* FNCC6109 + 20% *Rhizopus* spp.; (E): Konsentrat + *A. flavus* FNCC6109 + 30% *Rhizopus* spp.; (F): Konsentrat + *A. flavus* FNCC6109 + 40% *Rhizopus* spp.; (G): Konsentrat + *A. flavus* FNCC6109 + 50% *Rhizopus* spp.

PEMBAHASAN

Isolat *Rhizopus* spp. berhasil diisolasi dari kedelai sebagai salah satu bahan pakan konsentrat setelah ditumbuhkan dan dimurnikan pada media PDA yang diinkubasi selama 4 hari. *Rhizopus* spp. merupakan jamur kosmopolitan yang sering ditemukan di tanah, berbagai substrat organik seperti buah dan sayuran serta produk hasil fermentasi (Endrawati & Kusumaningtyas, 2017). Kemudian Park et al. (2016) menyatakan faktor yang menyebabkan jamur ini dapat mudah ditemukan keberadaannya adalah karena dalam pertumbuhannya tidak memerlukan nutrisi yang spesifik, namun di penelitian ini *Rhizopus* spp.

hanya ditemukan pada kedelai dari beberapa bahan pakan konsentrat yang telah diisolasi. Hal ini diduga disebabkan oleh tidak adanya kontaminasi pada bahan pakan yang lain dan atau faktor kelembapan pada bahan pakan konsentrat tersebut. Jamur tingkat rendah seperti *Rhizopus* spp. umumnya memerlukan lingkungan dengan tingkat kelembapan relatif yang tinggi yaitu (Rh) $\geq 90\%$ untuk dapat tumbuh. Bahan pakan konsentrat yang disimpan pada lingkungan dengan tingkat kelembapan relatif di bawah 90% tidak dapat dicemari oleh jamur tingkat rendah, tetapi jamur tingkat tinggi seperti *Aspergillus* spp. dan *Penicillium* spp. dapat tumbuh dengan tingkat kelembapan relatif $\geq 80\%$ (Gandjar et al., 1999).

Berdasarkan hasil identifikasi yang dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis, isolat yang ditumbuhkan pada media PDA dengan masa inkubasi 4 hari menunjukkan karakteristik *Rhizopus* spp. (Tabel 2). Hasil pengamatan secara makroskopis *Rhizopus* spp. yang diinkubasi selama 4 hari pada media PDA dengan rata-rata diameter koloni 9 cm tergolong memiliki pertumbuhan yang sangat cepat. Morfologi *Rhizopus* spp. secara mikroskopis yang membedakannya dengan jamur lainnya adalah hifa yang tidak bersekat (*senositik*), memiliki rhizoid, serta sporangium yang berbentuk bulat, elip, dan silinder. Menurut Sine & Endang (2018), *Rhizopus* spp. memiliki rhizoid berwarna kecoklatan, bercabang, berlawanan arah dengan sporangiofor, memiliki stolon berdinding halus, serta sporangiofor dapat tumbuh tanpa adanya rhizoid.

Berdasarkan hasil reidentifikasi yang dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis, isolat yang ditumbuhkan pada media PDA dengan masa inkubasi 4 hari menunjukkan karakteristik *A. flavus* FNCC6109 (Tabel 3). Ciri-ciri koloni tersebut memiliki warna hijau kekuningan dengan tepi koloni berwarna putih (Gambar 2. A). Bertambahnya waktu inkubasi menyebabkan terjadinya penambahan diameter dan perubahan warna pada koloni *A. flavus* FNCC6109 dari hijau tua sampai kuning. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Samson et al.

(2011), bahwa secara makroskopis *A. flavus* yang ditumbuhkan pada media MEA selama 5-7 hari pada suhu 28°C memiliki koloni berwarna hijau kekuningan dengan misellium putih pada tepi koloni, memiliki zonasi, konidia bergranural, dan warna sebalik koloni kuning. Koloni yang berwarna putih kemudian akan berubah warna menjadi hijau kekuningan dengan membentuk struktur konidia pada hari ke-5 masa inkubasi (Safika et al., 2015). Pengamatan secara mikroskopis terlihat struktur *A. flavus* FNCC6109 yang terdiri dari konidium, konidia, vesikel, sterigma dan konidiofor (Gambar 2. B). Struktur mikroskopis pada hasil pengamatan tampak seperti struktur mikroskopis *A. flavus* secara umum yang memiliki konidiofor dengan panjang berkisar ± 1 mm, konidia berdiameter antara 3,5-4,5 μm , konidiofor tunggal, vesikel yang berdiameter 10-65 μm , hifa bersepta, dan terdapat fialid (Hedayati et al., 2007; Samson et al., 2011).

Uji daya hambat *Rhizopus* spp. terhadap *Aspergillus flavus* FNCC6109 secara *in vitro* dengan menggunakan metode *dual culture* yang diinkubasi selama 4 hari menunjukkan adanya aktifitas penghambatan yang dilakukan oleh *Rhizopus* spp. (Gambar 3. B). *Rhizopus* spp. sebagai antagonis mampu menghambat pertumbuhan *A. flavus* FNCC6109 dikarenakan pertumbuhan *Rhizopus* spp. lebih cepat dibandingkan dengan *A. flavus* FNCC6109. Menurut Widi et al. (2015), kecepatan pertumbuhan pada jamur antagonis merupakan salah satu indikator mekanisme kompetisi ruang dan nutrisi dengan jamur patogen, semakin cepat pertumbuhan jamur antagonis maka semakin efektif dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen. Kemampuan *Rhizopus* spp. dalam menghambat mikroorganisme lain pernah dilaporkan oleh Virgianti (2015) bahwa *Rhizopus* spp. yang diisolasi dari tempe mampu menghasilkan senyawa bioaktif antimikroba. Meskipun belum diketahui senyawa bioaktif yang dihasilkan tetapi telah mampu menghasilkan zona hambat dalam rentang *susceptible* terhadap bakteri patogen enterik *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, dan *Shigella flexneri* ATCC 12022. Perlu

dilakukan penelitian selanjutnya untuk mengetahui senyawa antibakteri maupun senyawa aktif lainnya yang dapat dihasilkan oleh *Rhizopus* spp.

Kultur filtrat *Rhizopus* spp. dengan masa inkubasi 3 hari, 4 hari, dan 5 hari menunjukkan daya hambat berbeda terhadap pertumbuhan *Aspergillus flavus* FNCC6109 secara *in vitro* (Tabel 5 dan Gambar 4). Kemampuan daya hambat yang dihasilkan kultur filtrat *Rhizopus* spp. diduga disebabkan karena pengaruh enzim dan metabolit-metabolit yang diekskresikan oleh *Rhizopus* spp. sehingga mampu menekan pertumbuhan *A. flavus* FNCC6109. Salah satu enzim yang dihasilkan oleh *Rhizopus* spp. adalah enzim β -glukanase (Celestino et al., 2006). Kemudian Celestino et al. (2006) menyatakan bahwa, enzim β -glukanase disintesis secara ekstraseluler oleh *Rhizopus* spp. untuk menghidrolisis karbohidrat golongan β -glukan. Menurut Hjeljord et al. (1998) enzim β -glukanase yang disintesis secara ekstraseluler bekerja dengan cara menghidrolisis struktur glukan yang terdapat pada dinding sel jamur patogen. Struktur glukan umumnya terdapat pada ujung hifa, sehingga enzim β -glukanase mampu mempengaruhi pertumbuhan hifa dan menyebabkan pembengkakan pada hifa serta nekrosis (Budiarti & Widyastuti, 2011). Menurut Deacon (1997) menyatakan bahwa, struktur glukan juga terdapat pada komponen utama penyusun dinding sel *A. flavus*. Komponen tersebut yaitu polisakarida yang terdiri dari protein dan lipid, dimana komponen fibrilnya berupa kitin dengan rantai panjang β -(1,4) N-acetylglucosamine dan β -(1,3)- β -(1,6) glukan. Jadi, enzim β -glukanase yang dihasilkan oleh *Rhizopus* spp. dapat menghidrolisis karbohidrat golongan glukan yang akan memperkaya nutrisi sehingga mempercepat pertumbuhan dan disisi lain enzim β -glukanase dapat menghidrolisis struktur glukan dinding sel hifa jamur patogen. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, belum diketahui secara pasti enzim spesifik dari kultur filtrat *Rhizopus* spp. yang mampu menghambat pertumbuhan *A. flavus* sehingga perlu diketahui lebih lanjut untuk

mekanisme kerja dan enzim-enzim spesifik serta metabolit yang terkandung di dalam filtrat *Rhizopus* spp (Kobayasi, 1992).

Pemberian kultur filtrat *Rhizopus* spp. terhadap jumlah koloni *Aspergillus flavus* FNCC6109 pada pakan konsentrat ayam ras broiler yang diinkubasi selama 15 hari menunjukkan hasil positif bahwa kultur filtrat mampu menghambat pertumbuhan *A. flavus* FNCC6109 (Tabel 6). Jumlah koloni *A. flavus* FNCC6109 terendah ditemukan pada model pakan konsentrat dengan penambahan konsentrasi sebesar 50% kultur filtrat *Rhizopus* spp. yaitu sebesar $5 \times 10^4 \pm 0,182$ CFU/g sesudah penyimpanan selama 15 hari (T_{15}) dengan persentase penurunan sebesar 82%. Hasil yang ditunjukkan pada Tabel 6 memiliki signifikansi bahwa semakin tinggi konsentrasi kultur filtrat yang diberikan pada model pakan konsentrat, maka pertumbuhan jumlah koloni *A. flavus* FNCC6109 akan semakin rendah. Hasil tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Darmayasa (2015) yang menyatakan bahwa pemberian kultur filtrat *Trichoderma asperellum* TKD dengan konsentrasi 9/100g mampu menghambat pertumbuhan *A. flavus* FNCC6109 pada model pakan konsentrat sebesar 74,93% dengan masa penyimpanan selama 30 hari. Sedangkan penurunan hambatan koloni *A. flavus* FNCC6109 terendah yaitu pada konsentrasi 10%. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Rabinal & Bhat (2017) bahwa, aktivitas antijamur yang dihasilkan dari metabolit akan menurun bersamaan dengan penurunan konsentrasi dari metabolit tersebut.

SIMPULAN

Adapun simpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu *Rhizopus* spp. mampu menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus* FNCC6109 secara *in vitro* pada masa inkubasi 4 hari dengan persentase hambatan tertinggi yaitu 61,90% dan terendah sebesar 60,76%. Kultur filtrat *Rhizopus* spp. yang diinkubasi selama 3, 4, dan 5 hari mampu menghambat pertumbuhan *A. flavus* FNCC6109 masing-masing sebesar $59,23 \pm 2,50\%$; $62,64 \pm 1,28\%$; dan $67,47 \pm 2,10\%$.

Kultur filtrat *Rhizopus* spp. secara nyata mampu mempengaruhi jumlah koloni *A. flavus* FNCC6109 pada model pakan konsentrat ayam broiler. Kultur filtrat *Rhizopus* spp. dengan konsentrasi 50% mampu menurunkan jumlah koloni *A. flavus* FNCC6109 sebesar 82% setelah pakan konsentrat ayam broiler disimpan selama 15 hari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala laboratorium Mikrobiologi Prodi Biologi FMIPA Universitas Udayana atas semua fasilitas selama riset. Kepada Dr. Dra. Meitini Wahyuni Proborini, M.Sc., St., Dra. Inna Narayani, M.Sc., dan Drs. Deny Suhernawan Yusup, M.Sc. atas waktu saran, dan masukannya.

KEPUSTAKAAN

- Akhadiarto S. 2010. Pengaruh Pemanfaatan Limbah Kulit Singkong dalam Pembuatan Pellet Ransum Unggas. *J. Tek. Ling.* **11(1)**: 127-138.
- Bidura IGNG. 2017. *Buku Ajar Teknologi dalam Industri Pakan*. Denpasar: Udayana University Press.
- Budiarti SW, Widyastuti SM. 2011. Aktivitas Antifungal β -1,3-Glukanase *Trichoderma reesei* pada Fungi Akar *Ganoderma philipii*. *Jurnal Widyariset* **14(2)**:455-460.
- Celestino KRS, Cunha RB, Felix CR. 2006. Characterization of a β -glucanase Produced by *Rhizopus microspores* var. *microspores*, and its Potensial for Application in The Brewing Industry. *Journal BMC Biochemistry* **7(23)**:1-9.
- Darmayasa IBG. 2015. Potensi *Trichoderma asperellum* TKD Dalam Menghambat Pertumbuhan *Aspergillus flavus* FNCC6109 Sebagai Upaya Mengurangi Cemaran Afkatoksin B1 Pada Model Konsentrat. *Doctoral Disertasi*. Universitas Udayana.
- Deacon JW. 1997. *Modern Mycology*. 3rd ed. Oxford: Balckwell Science Ltd.
- Didwania N, Joshi M. 2013. Mycotoxins: A Critical Review on Occurrence and Significance. *Int J Pharm. Pharm Sci.* **5**: 1014-1019.
- Endrawati D, Kusumaningtyas E. 2017. Beberapa Fungsi *Rhizopus* sp. dalam Meningkatkan Nilai Nutrisi Bahan Pakan. *WARTAZOA* **27(2)**: 81-88
- Fadilah R, Polana A. 2011. *Mengatasi 71 Penyakit Pada Ayam*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Gandjar I, Samson RA, Vermeulen KVDT, Oetari A, Santoso I. 1999. *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Ghiasian SA, Maghsood AH. 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.
- Hackbart HCS, Machado AR, Christ-Ribeiro A, Prietto L, Badiale-Furlong E. 2014. Reduction of Aflatoxins by *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*. *Mycotoxin Res.* **30**: 141-149.
- Hasanah U. 2017. Mengenal Aspergillosis, Infeksi Jamur Genus *Aspergillus*. *Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera* **15(30)**: 76-86.
- Hedayati MT, Pasqualloto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Journal of Microbial* **153(1)**: 1677-1692.
- Hjeljord L, Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in Biological Control: an overview. In G.E. Harman and C.P. Kubicek (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2. London: Taylor and Francis.
- Ilyas M, Rahmansyah M, Kanti A. 2006. *Seri Panduan: Teknik Isolasi Fungi*. Jakarta: LIPI Press.
- Kobayasi. S. Y., N. Okazaki, dan T. Koseki. 1992. Purification and Characterization of an Antibiotic Substance Produced from *Rhizopus oligosporus* IFO 8631. *Journal Biosci. Biotech, Biochem.* **56(1)**:94-98.
- Kusumaningtyas E, Masrianti FF. 2019. *Rhizopus oligosporus* Activity in Crude Extract and Powder Form to Reduce *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Contamination in Corn. *JITV.* **24(4)**:173-181.
- Nurwahidah J, Tolleng AL, Hidayat MN. 2016. Pengaruh Pemberian Pakan Konsentrat Dan Urea Molases Blok (UMB) Terhadap

- Pertambahan Berat Badan Sapi Potong. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* **2(2)**: 111-115.
- Park JH, Yun HM, Kim IH. 2016. The effect of feeding *Rhizopus oligosporus* on growth performance, nutrient digestibility blood profile, fecal microbiota and fecal score in weanling pigs. *Turkish J Vet Anim Sci.* **40**:1-7.
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Second Edition. Cambridge: Printed in Great Britain at the University Press.
- Rabinal CA, Bhat S. 2017. Profiling of *Trichoderma koningii* IAB1252'S secondary metabolites by thin layer chromatography and their antifungal activity. *Bioscan.* **12**:163-168.
- Roosita LB. 2002. Biokontrol terhadap Racun Jamur. Dimuat pada Harian Pikiran Rakyat Edisi 2002. Diakses Tanggal 1 Oktober 2019 dari <http://www.aflatoksin.id.com>.
- Safika, Jamin F, Aisyah S. 2015. Deteksi Aflatoksin B1 pada Jenis Makanan Olahan Jagung Menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). *Jurnal Medika Veterinaria* **9(1)**: 23-25.
- Samson RA, Varga J, Frisvad JC. 2011. *Taxonomic studies on the genus Aspergillus*. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Sekretariat Ditjen PKH, 2017. Konsumsi Periode Tahun 2016. Newsletter Data Makro Edisi: 01/konsumsi/03/2017. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian. Diakses Tanggal 26 September 2019 dari <http://ditjenpkh.pertanian.go.id/pages/73/konsumsi.html>
- Sine Y, Endang SS. 2018. Isolasi dan Identifikasi Kapang *Rhizopus* pada tempe gude (*Cajanus cajan* L.) *Savana Cendana* **3(4)**:67-68.
- Singh PK, Vijay K. 2011. Biological Control of Fusarium Wilt of Chrysanthemum with *Trichoderma* and Botanicals. *J. Agric Tech.* **7(6)**: 1603-1613.
- Utami T, Hartanta FX, Nugroho A, Usmiati S, Marwati S, Rahayu ES. 2012. Penurunan Kadar Aflatoksin B1 pada Sari Kedelai oleh Sel Hidup dan Sel Mati *Lactobacillus Acidophilus* Snp-2. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* **23(1)**: 58-63.
- Virgianti DA. 2015. Uji Antagonis Jamur *Tempe (Rhizopus sp.)* terhadap Bakteri Patogen Enterik. *Jurnal Biosfera* **32(3)**:163-168.
- Vujanovic V, Smoragiewics W, Krzysztyniak K. 2001. Airborne Fungal Ecological Niche Determination as one of the Possibilities for Indirect Mycotoxin Risk Assessment in Indoor air. *Environ Toxicol.* **16**: 1-8.
- Widi A, Rita H, dan Samsudin. 2015. Evaluasi jamur antagonis dalam menghambat pertumbuhan *Rigidoporus microporus* penyebab penyakit jamur akar putih pada tanaman karet. *J. TIDP.* **2(1)**:51- 60.
- Yogendrarajah P, Devlieghere F, Ediage EN, Jacxsens L, De-Meulenaer B, De-Saeger S. 2015. Toxigenic Potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Strains Isolated from Black Pepper Assessed by an LCMS/MS Based Multi-mycotoxin Method. *Food Microbiology.* **52**: 185-196.
- Yulien TF. 2012. Analisis Pendapat dan Persepsi Peternak Unggas Plasma Terhadap Kontrak Perjanjian Pola Kemitraan Ayam Pedaging di Provinsi Lampung. *Jurnal Universitas Gadjah Mada.* **36 (1)**: 1-6.