

SELEKSI GALUR *LACTOBACILLUS PLANTARUM* UNTUK INOKULUM PADA PEMBUATAN SILASE

Screening of Lactobacillus plantarum Strains for Ensiling

Muhammad Nur Cahyanto¹, Shannora Yuliasari¹, Budi Prasetyo Widyobroto², Tyas Utami¹

ABSTRAK

Sebelas galur *Lactobacillus plantarum* telah dievaluasi laju pertumbuhan dan kemampuannya dalam menurunkan pH selama fermentasi pada pembuatan silase jagung. Fermentasi dilakukan pada skala kecil menggunakan kantong plastik selama 14 hari dan diamati konsumsi karbohidrat terlarut, produksi asam organik, dan penurunan pH-nya selama fermentasi. Masing-masing galur juga dilihat laju pertumbuhan selnya dalam medium cair. Meskipun kesebelas galur yang diuji mampu memperbaiki proses pembuatan silase, akan tetapi galur T-16, T-25 dan S-98 tumbuh paling cepat dalam medium cair dan mampu menurunkan pH silase paling cepat dibanding galur lain. Setelah difermentasi selama 2 hari pH silase yang diinokulasi dengan galur T-16, T-25 dan S-98 turun dari sekitar 5,60 menjadi berturut-turut 4,23, 4,45 dan 4,40 dan pH silase setelah 14 hari mencapai berturut-turut 3,98, 4,05 dan 4,03. Kadar asam asetat pada silase yang diinokulasi dengan ketiga galur tersebut juga tergolong rendah. Galur T-16 dan T-25 berpotensi sebagai inokulum untuk pembuatan silase dan kemampuannya setara dengan galur yang diisolasi dari inokulum silase komersial.

Kata kunci: Silase, *Lactobacillus plantarum*, seleksi galur, fermentasi, inokulum, jagung

ABSTRACT

Eleven strains of *Lactobacillus plantarum* have been evaluated for their growth rate and ability to reduce pH during corn ensiling. Ensiling was carried out in small scale using plastic bag for 14 days. Soluble carbohydrate consumption, organic acids production and pH reduction were measured during fermentation. The growth rate of each strain was also determined in liquid medium. All of the 11 strains of *L. plantarum* tested were able to improve the ensiling process. However, strains T-16, T-25 and S-98 grew in liquid medium faster than the others, and were able to reduce pH of silage quicker than the other strains. The pH of silage inoculated with strain T-16, T-25 and S-98 decreased from about 5.60 to 4.23, 4.45 and 4.40, respectively, in two days, and to 3.98, 4.05 and 4.03, respectively, after 14 days fermentation. The acetic acid content of silages inoculated with those strains was low. Strains T-16 and T-25 were suitable as potential silage inoculants and their characteristics were comparable to the one isolated from a commercial silage inoculant.

Keywords: Silage, *Lactobacillus plantarum*, screening, ensiling, inoculant, corn

PENDAHULUAN

Silase adalah salah satu bentuk awetan hijauan pakan ternak yang dihasilkan dengan cara memfermentasikannya menggunakan bakteri asam laktat. Selama proses pembuatan silase terbentuk asam laktat, sehingga pH turun yang kemudian akan mengawetkan hijauan pakan selama kondisi anaerobik

dalam silase dapat dipertahankan. Silase banyak digunakan sebagai pakan ternak di daerah subtropik, terutama di musim dingin. Di Indonesia, silase cocok untuk dikembangkan di daerah yang mengalami kekeringan di musim kemarau karena tidak adanya sistem irigasi di daerah itu. Silase dapat

¹ Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

² Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Agro, Yogyakarta 55281

dibuat di daerah tersebut pada saat hijauan pakan masih dapat diproduksi dengan baik, dan digunakan sebagai pakan ternak pada saat musim kemarau.

Preservasi nutrisi dalam hijauan pakan selama proses pembuatan silase tergantung pada laju penurunan pH dan pH akhir yang dicapai (Weinburg dan Muck, 1996). pH silase sebaiknya turun sampai di bawah 4,2 (Cai dkk., 1999; Ohmomo dkk., 1995). Penurunan pH ini terjadi karena adanya fermentasi gula oleh mikroflora yang secara alami terdapat pada hijauan pakan. Pada awal proses fermentasi bakteri asam laktat berkompetisi dengan enterobakteria dalam menggunakan karbohidrat terlarut. Meskipun aktivitas enterobakteria bisa berakibat buruk bagi kualitas silase yang dihasilkan, akan tetapi aktivitas bakteri ini akan terhambat oleh kondisi anaerobik dan asam yang tercipta segera setelah fermentasi dimulai. Fermentasi selanjutnya didominasi oleh bakteri asam laktat, baik galur yang heterolaktik maupun homolaktik (Weinburg dan Muck, 1996). Bakteri asam laktat heterolaktik mengkonversi 1 mol glukosa menjadi 1 mol asam laktat, 1 mol asam asetat dan 1 mol etanol, sementara bakteri asam laktat homolaktik mengkonversi 1 mol glukosa menjadi 2 mol asam laktat (Holzapfel dan Wood, 1995). Kandungan asam laktat pada silase yang baik adalah di atas 4 % (db) (Weinburg dan Muck, 1996). Fermentasi oleh bakteri asam laktat alami dapat menghasilkan sejumlah asam asetat dan etanol yang tidak dikehendaki dalam fermentasi silase, karena akan menghambat penurunan pH dan juga tidak menguntungkan bagi performan ternak. Selain itu jumlah bakteri asam laktat dalam hijauan pakan sangat bervariasi (Lin dkk., 1992). Kedua hal tersebut mendorong berkembangnya inokulum untuk pembuatan silase yang tujuan penggunaannya adalah untuk menjamin keberhasilan proses tersebut.

Sudah banyak dikembangkan inokulum untuk pembuatan silase, dan mikrobia yang banyak digunakan terutama adalah *Lactobacillus plantarum* (Done, 1986; Keady dkk., 1994; Weinburg dan Muck, 1996). Akan tetapi bakteri asam laktat lain seperti *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* dan *Lactobacillus rhamnosus* juga digunakan sebagai inokulan pada pembuatan silase, baik digunakan secara tunggal maupun dikombinasikan dengan *L. plantarum* (Cai, dkk., 1999; Fitzsimons dkk., 1992; Muck, 1989; Salimei dkk., 2007; Wienberg dkk., 1993). *L. plantarum* tergolong bakteri asam laktat yang mampu memfermentasi heksosa menjadi asam laktat sebagai produk tunggalnya. Disamping itu bakteri ini juga mampu memfermentasi pentosa dan glukonat (Hammes dan Vogel, 1995). Penelitian yang menunjukkan bahwa *L. plantarum* berperan besar dalam pengembangan inokulum silase memang banyak dilakukan di daerah subtropik (Weinburg dan Muck, 1996), namun demikian mikrobia ini ternyata juga berperan besar dalam fermentasi silase di daerah tropik. Dari 311 galur bakteri asam

laktat yang diisolasi dari berbagai silase yang dibuat dari tanaman sereal maupun rumput-rumputan di daerah tropik, *L. plantarum* merupakan mikrobia yang dominan (Tjandraatmadja dkk., 1990). Disamping itu hasil penelitian Ohmomo dkk. (1995) menunjukkan bahwa *Lactobacillus* mempunyai adaptabilitas yang tinggi dalam fermentasi silase di daerah tropik, disamping mikrobia tersebut juga lebih tahan terhadap kondisi asam.

Meskipun *L. plantarum* sudah diketahui banyak berperan dalam fermentasi silase dan banyak digunakan sebagai inokulum fermentasi silase, akan tetapi kemampuan masing-masing galur bisa berbeda. Hal ini berkaitan dengan kapasitas genetik masing-masing galur tersebut. Pada penelitian ini diseleksi beberapa galur *L. plantarum* yang diisolasi dari berbagai makanan fermentasi tradisional Indonesia guna keperluan inokulum fermentasi silase. Kriteria pemilihannya terutama adalah kecepatannya dalam menurunkan pH silase dan pH akhir yang dicapai.

METODE PENELITIAN

Mikroorganisme

Sepuluh galur *Lactobacillus plantarum* yang digunakan sebagai inokulum silase pada penelitian ini adalah hasil isolasi dari berbagai makanan fermentasi asal Indonesia, seperti growol (hasil fermentasi ubi kayu), moromi, dan gatot (hasil fermentasi ubi kayu). Galur-galur tersebut (kecuali galur S-98) merupakan koleksi Prof. Dr. Endang Sutriswati Rahayu dari Food and Nutrition Culture Collection, Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada. Sebagai pembanding digunakan galur yang diisolasi dari inokulum silase komersial. Galur-galur tersebut tercantum di Tabel 1.

Tabel 1. Galur *Lactobacillus plantarum* yang digunakan sebagai inokulum silase pada penelitian ini

Galur	Asal Isolat
T-3	Growol
T-11	Growol
T-16	Growol
T-23	Moromi
T-24	Moromi
T-25	Moromi
T-36	Moromi
T-32	Gatot
T-37	Gatot
T-82	Gatot
S-98	Inokulum silase komersial

Galur-galur tersebut disimpan dalam medium MRS agar miring pada suhu 4 °C dan dimudakan setiap 4 minggu.

Bahan Baku Silase

Bahan baku silase pada penelitian ini adalah tanaman jagung yang berumur 2 bulan. Tanaman jagung dipanen dengan memotongnya sekitar 10 cm dari permukaan tanah. Selanjutnya tanaman jagung dipotong-potong dengan ukuran 2 cm. Potongan tanaman jagung ini, yang selanjutnya disebut hijauan jagung, dipakai sebagai bahan baku pembuatan silase.

Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dalam Medium Cair

Laju pertumbuhan *L. plantarum* ditentukan dalam medium MRS cair pada suhu 30 °C. Satu ose masing-masing biakan murni diinokulasikan ke dalam 5 ml medium MRS cair dan diinkubasikan pada suhu 30 °C selama 24 jam, hingga konsentrasi sel mencapai 10⁷-10⁸ sel per milliliter. Sebanyak 2 ml dari masing-masing kultur tersebut diinokulasikan ke dalam 200 ml medium MRS cair dan diinkubasikan pada suhu 30 °C selama 24 jam. Perubahan pH dan pertumbuhan sel diamati selama waktu inkubasi tersebut dengan mengambil sampel setiap 1-3 jam selama 24 jam dan mengukur pH dan absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm. Laju pertumbuhan ditentukan dengan menghitung perubahan konsentrasi sel setiap satuan waktu (jam) pada fase pertumbuhan eksponensial.

Fermentasi Silase

Sebanyak 500 g hijauan jagung dimasukkan ke dalam kantong plastik (tebal 0,8 mm). Ke dalamnya dimasukkan biomasa sel *L. plantarum* yang berasal dari 10 ml kultur dalam medium MRS yang berumur 18 jam dan dipisahkan dari sisa mediumnya dengan sentrifugasi (3.500 rpm, 15 menit). Jumlah inokulum yang ditambahkan pada kisaran 10⁷ sel per gram. Hijauan jagung dan biomasa sel dicampur di dalam kantong plastik dan kantong plastiknya ditutup dalam kondisi vakum. Hijauan jagung yang sudah diinokulasi diinkubasikan pada suhu kamar selama 14 hari. Sebagai pembanding adalah fermentasi silase tanpa menggunakan inokulum dan fermentasi silase menggunakan galur yang diisolasi dari inokulum komersial (S-98). Masing-masing perlakuan dilakukan dengan dua kali ulangan. Pada masa inkubasi 0, 2, 4, 7, dan 14 hari diambil 2 kantong plastik untuk masing-masing perlakuan untuk dilakukan analisis yang meliputi pH, karbohidrat terlarut, asam laktat, asam asetat, asam propionat dan asam butirat.

Cara Analisis

pH. Analisis pH dilakukan dengan mensuspensikan 100 g silase hijauan dalam aquadest dengan volume akhir 1.000

ml. Suspensi disaring dan filtratnya diukur pH-nya dengan pH meter.

Karbohidrat terlarut. Karbohidrat terlarut dianalisis dengan metode Dubois (1956). Dua milliliter filtrat yang sama untuk pengukuran pH ditambah 1 ml fenol 5 % dan 5 ml asam sulfat pekat. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, absorbansinya ditera pada panjang gelombang 490 nm.

Asam laktat. Analisis asam laktat dilakukan dengan metode menurut Mattson (1965). Sebanyak 10 ml filtrat yang sama untuk pengukuran pH ditambah 5 ml larutan NaOH 0,5 N dan 5 ml larutan ZnSO₄ 10 %. Setelah digojok ditambah aquadest sampai volumenya 100 ml dan disaring. Sebanyak 1 ml filtrat ditambah 10 ml aquadest dan 1 ml FeCl₃ 1% dan langsung ditera absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm.

Asam asetat, asam propionat dan asam butirat. Dari filtrat yang sama untuk pengukuran pH ditentukan kandungan asam asetat, asam propionat dan asam butirat dengan khromatografi gas menurut Raymond (1977).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dalam Medium Cair

Semua galur *L. plantarum* mampu tumbuh dengan baik dalam medium MRS cair, dengan laju pertumbuhan yang hampir sama kecuali galur T-37 yang mempunyai laju pertumbuhan lebih rendah (Tabel 2). pH akhir yang dicapai setelah tumbuh dalam medium MRS cair selama 24 jam juga hampir sama, kecuali galur T-37 yang pH akhirnya lebih tinggi.

Galur-galur T-16, T-23, T-25 dan T-36 mampu tumbuh dengan laju yang tidak lebih rendah dibandingkan dengan galur yang berasal dari inokulum komersial (S-98). Penurunan pH-nya pun juga setara dengan yang dicapai oleh galur yang berasal dari isolat komersial. Berdasarkan laju pertumbuhan dan pH akhir yang dicapai di medium cair, nampaknya galur T-16, T-23, T-25 dan T-36 potensial sebagai inokulum silase.

Tabel 2. Laju pertumbuhan *L. pantarum* dalam medium cair dan pH akhir yang dicapai setelah tumbuh selama 24 jam

Galur	Laju pertumbuhan (jam ⁻¹)	pH akhir
T-3	0,136	3,16
T-11	0,121	3,24
T-16	0,157	3,13
T-23	0,161	3,17
T-24	0,142	3,20
T-25	0,161	3,11
T-32	0,133	3,20
T-36	0,168	3,15
T-37	0,082	3,47
T-82	0,140	3,24
S-98	0,155	3,15

Fermentasi Selama Pembuatan Silase

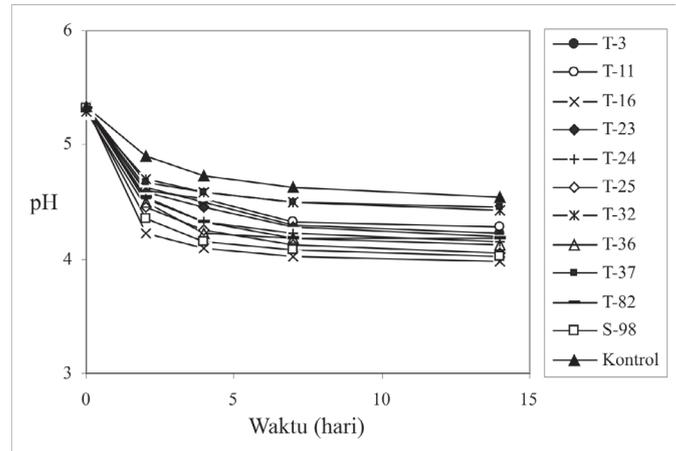
Pengamatan terhadap perubahan pH, karbohidrat terlarut, asam laktat, asam asetat, asam propionat dan asam butirat selama pembuatan silase dengan inokulum berbagai galur *L. plantarum* menunjukkan bahwa masing-masing galur mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menyebabkan perubahan-perubahan tersebut, meskipun perbedaannya tidak nyata pada beberapa galur.

Perubahan pH. Gambar 1 menunjukkan perubahan pH selama pembuatan silase yang diinokulasi dengan berbagai galur *L. plantarum*. Silase yang dihasilkan dari fermentasi hijauan jagung menggunakan inokulum *L. plantarum* menunjukkan laju penurunan pH di awal fermentasi lebih besar dari pada di waktu fermentasi selanjutnya, dengan pH akhir yang lebih rendah dari pada pH silase yang difermentasi tanpa menggunakan inokulum. Diantara galur-galur *L. plantarum* yang dipelajari, galur T-16, T-24, T-25, T-36, T-82 dan S-98 mampu menurunkan pH silase sampai di bawah 4,2 setelah 14 hari, yang menurut Cai dkk. (1999) dan Ohmomo dkk. (1995) berarti berpotensi untuk mengawetkan silase yang dihasilkan. Meskipun demikian galur T-16 dan T-25 menyebabkan laju penurunan pH silase yang paling besar dan pH akhir yang paling rendah dibandingkan dengan galur lain, dan setara dengan efek yang dihasilkan oleh galur yang berasal dari inokulum komersial (S-98). Silase yang dibuat dengan menggunakan inokulum *L. plantarum* T-16, T-25 dan S-98 mempunyai pH berturut-turut 3,98, 4,05 dan 4,03. Laju penurunan pH di awal fermentasi yang besar dan pH akhir yang rendah sudah diketahui menyebabkan pertumbuhan bakteri lain yang bersifat merusak menjadi terhambat bahkan berhenti yang selanjutnya membuat silase menjadi awet (Whittenbury, 1968).

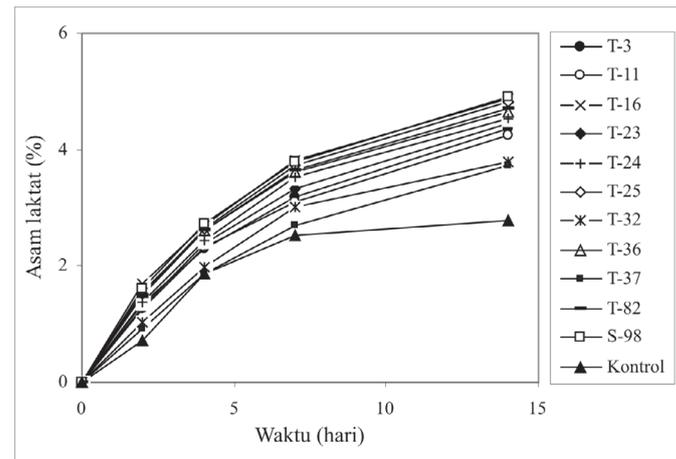
Produksi asam organik. Bakteri asam laktat yang berperan dalam pembuatan silase menghasilkan asam laktat dan asam asetat, sedangkan bakteri lain seperti *Clostridium* yang juga terlibat dalam pembuatan silase menghasilkan asam propionat dan asam butirat (Whittenury, 1968). Meskipun demikian produksi asam laktat lah yang paling besar diantara produksi asam organik selama pembuatan silase.

Produksi asam laktat pada silase yang diinokulasi dengan *L. plantarum* lebih besar dibandingkan dengan silase yang tidak diinokulasi dengan bakteri asam laktat (Gambar 2). Akan tetapi produksi asam laktat bervariasi tergantung pada galur *L. plantarum* yang digunakan sebagai inokulum. Pada penelitian ini *L. plantarum* T-16, T-25 dan T-82 termasuk inokulum yang memberikan laju produksi asam laktat dan kadar asam laktat pada hari ke 14 yang tertinggi. Produksi asam laktat pada silase yang diinokulasi dengan galur T-16, T-25 dan T-82 setara dengan yang diinokulasi dengan isolat *L. plantarum* dari inokulum komersial (S-98). Kadar asam laktat

yang tinggi dalam silase tersebut sesuai dengan nilai pH-nya yang rendah, karena asam laktat merupakan asam organik utama dalam silase. Kadar asam laktat dalam silase yang pada pembuatannya diinokulasi dengan galur T-16, T-25, T-82 dan S-98 mencapai berturut-turut 4,87, 4,83, 4,70 dan 4,90 g/l pada hari ke 14.



Gambar 1. Perubahan pH selama fermentasi silase menggunakan inokulum *L. plantarum*



Gambar 2. Perubahan kadar asam laktat selama fermentasi silase menggunakan inokulum *L. plantarum*

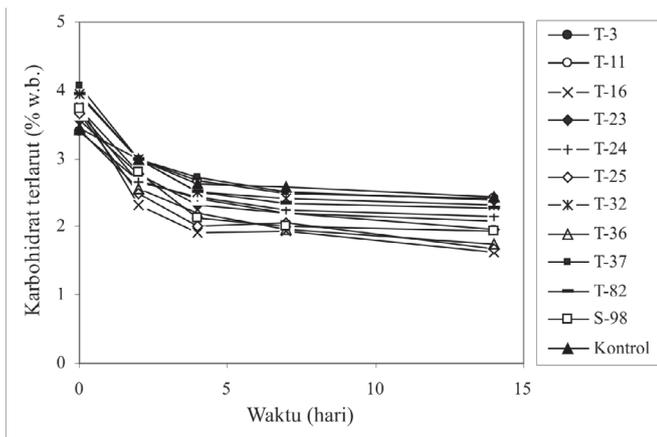
Kandungan asam asetat, asam propionat dan asam butirat dalam silase relatif kecil dibandingkan dengan asam laktat. Asam-asam organik tersebut juga berperan dalam menghambat pertumbuhan mikrobial (Baird-Parker, 1980). Kandungan asam asetat, asam propionat dan asam butirat setelah fermentasi selama 14 hari dapat dilihat pada Tabel 3. Produksi asam asetat dan asam propionat pada pembuatan silase relatif rendah, sementara kandungan asam butirat dalam silase setelah fermentasi selama 14 hari tidak terdeteksi meskipun analisisnya menggunakan metode yang cukup sensitif.

Tabel 3. Kandungan asam organik yang berupa asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat dalam silase setelah fermentasi selama 14 hari

Galur	Asam laktat (%)	Asam asetat (%)	Asam propionat (%)	Asam butirat (%)
T-3	4,36	0,43	0,56	ND
T-11	4,25	0,66	0,36	ND
T-16	4,87	0,33	0,39	ND
T-23	4,46	0,43	0,30	ND
T-24	4,53	0,34	0,58	ND
T-25	4,83	0,35	0,44	ND
T-32	3,78	0,55	0,58	ND
T-36	4,66	0,30	0,43	ND
T-37	3,72	0,56	0,28	ND
T-82	4,70	0,34	0,46	ND
S-98	4,90	0,36	0,34	ND
Kontrol	2,79	0,65	0,45	ND

ND = Tidak terdeteksi

Penggunaan karbohidrat terlarut. Selama pembuatan silase akan terjadi penggunaan karbohidrat terlarut oleh mikrobia yang berperan pada proses itu. Karbohidrat terlarut dalam limbah jagung terutama adalah glukosa dan fruktosa yang jumlahnya dapat mencapai 30 – 46 % dari berat kering ekstrak, disamping terdapat juga sejumlah kecil sukrosa, xilosa, arabinosa, galaktosa dan mannosa (Chen dkk., 2007). Mikrobia yang berperan dalam pembuatan silase, termasuk *L. plantarum*, dapat memetabolisme gula-gula tersebut. Penggunaan karbohidrat oleh mikrobia digunakan untuk pertumbuhan dan produksi metabolit seperti asam laktat, asam asetat dan lain-lain. Penggunaan karbohidrat terlarut bervariasi diantara silase dengan inokulan yang berbeda. Penggunaan karbohidrat terlarut paling besar terjadi pada silase yang diinokulasi dengan galur T-16, T-25 dan S-98, sedangkan yang paling rendah pada silase yang dibuat tanpa inokulum.



Gambar 3. Perubahan kadar karbohidrat terlarut selama pembuatan silase menggunakan inokulum *L. plantarum*

Penggunaan karbohidrat selama pembuatan silase digunakan oleh mikrobia untuk tumbuh dan memproduksi asam laktat dan asam organik lainnya. Penggunaan karbohidrat yang lebih tinggi menyebabkan produksi asam laktat yang lebih tinggi, dan hal itu berakibat pada penurunan pH yang lebih besar pula. Pembuatan silase dengan inokulum *L. plantarum* T-16, T-25 dan S-98 menunjukkan penggunaan karbohidrat terlarut, produksi asam laktat dan penurunan pH yang paling tinggi, sementara pembuatan silase tanpa inokulum keadaannya sebaliknya, yaitu penggunaan karbohidrat terlarut, produksi asam laktat dan penurunan pH yang paling rendah. Karakteristik ini nampaknya juga tidak berhubungan dengan asal isolat; galur T-16 berasal dari growol sedangkan galur T-25 berasal dari moromi. Karbohidrat terlarut memang merupakan sumber energi bagi ternak, akan tetapi penggunaan karbohidrat terlarut oleh mikrobia yang berperan dalam pembuatan silase tidak berarti kehilangan sumber energi pada pakan. Hal itu dikarenakan asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat selama fermentasi silase juga bisa dipakai sebagai sumber energi oleh hewan ternak seperti sapi.

KESIMPULAN

Pembuatan silase yang diinokulasi dengan galur *L. plantarum* mempunyai karakteristik lebih baik dibandingkan dengan yang tanpa diinokulasi. Pembuatan silase yang diinokulasi dengan *L. plantarum* memperlihatkan laju penurunan pH di awal fermentasi lebih tinggi dan pH akhir silasnya lebih rendah. Galur T-16 dan T-25 memberikan karakteristik fermentasi yang lebih baik dari pada galur *L. plantarum* yang lain apabila digunakan sebagai inokulum dalam pembuatan silase, dan setara dengan galur yang diisolasi dari inokulum komersial.

DAFTAR PUSTAKA

Baird-Parker, A.C. (1980). Organic acids. Dalam Silliker, J.H., Elliott, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C. dan Roberts, T.A. (ed). *Microbial Ecology of Foods*, Vol. I. *Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. Academic Press, New York.

Cai, Y., Kumai, S., Ogawa, M., Benno., Y. dan Nakase, T. (1999). Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2901-2906.

Chen, S.F., Mowery, R.A., Scarlata, C.J. dan Chambliss, C.K. (2007). Compositional analysis of water-soluble materials in corn stover. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **55**: 5912 -5918.

- Done, D.L. (1986). Silage inoculants - A review of experimental work. *Research and Development in Agriculture* **3**: 83-87.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. dan Smith, F. (1956). Colorimetric determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-356.
- Fitzsimons, A., Duffner, F., Curtin, D., Brophy, G., O'Kiely, P. dan O'Connell, M. (1992). Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculan. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3047-3052.
- Hammes, W.P. dan Vogel, R.F. (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective. Dalam Wood, B.J.B dan Holzapfel, W.H. (ed). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, hal. 19-. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Holzapfel, W.H dan Wood, B.J.B. (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective. Dalam Wood, B.J.B dan Holzapfel, W.H. (ed). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, hal. 1-6. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Keady, T.W.J., Steen, R.W.J., Kilpatrick, D.J. dan Mayne, S.C. (1994). Effects of inoculant treatment on silage fermentation, digestibility and intake by growing cattle. *Grass and Forage Science* **49**: 284-294.
- Lin, C., Bolsen, K.K., Brent, B.E., Hart, R.A., Feyerherm, A.M. dan Aimutis, W.R. (1992). Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *Journal of Dairy Science* **75**: 2484-2493.
- Mattson, S. (1965). The determination of the configuration of lactic acid bacterial cultures. *Milk and Dairy Research Report* **71**: 5-15.
- Muck, R.E. (1989). Effect of inoculation level on alfalfa silage quality. *Transactions of the ASAE* **32**: 1153-1158.
- Ohmomo, S., Katayama, N., Potacharoen, W., Tanaka, O., Sirianuntapiboon, S. dan Atthasampunna, P. (1995). Screening of lactic acid bacteria suitable for silage-making in tropical regions. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* **29**: 251-256.
- Raymond, T.M. (1977). A gas chromatographic procedure for the determination of organic acids and reducing sugars in fermenting cucumber juice. *Journal of Food Science* **42**: 52-60.
- Salimei, E., Capilongo, V., Simoni, A., Peiretti, P.G., Maglieri, C., Romano, C.A., Mannina, L.M., Coppola, R. dan Sorrentino, E. (2007). *Lactobacillus rhamnosus* as additive for maize and sorghum ensiling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **55**: 9600-9607.
- Tjandraatmadja, M., Norton, B.W. dan MacRae, I.C. (1990). A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from tropical silages. *Journal of Applied Bacteriology* **68**: 543-553.
- Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y. dan Azrieli, A. (1993). The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silage. *Journal of Applied Bacteriology* **75**: 512-518.
- Weinberg, Z.G. dan Muck, R.E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews* **19**: 53-68.
- Whittenbury, R. (1968). Microbiology of grass silage. *Process Biochemistry* February: 27-31.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhardi. (1996). *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty-PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta
- Trout, G.R. dan Schmit, G.R. (1986). Effect of phosphates on the functional properties of restructured beef rolls: The role of pH, ionic strength, and phosphate type. *J. of Food Science* **51** (6):1416-1423.
- Van Wazer, J.R. (1971). Chemistry of phosphates and condensed phosphates. In: *Symposium: Phosphates in Food Processing* :1-48
- Watts, B.M., Ylimaki, G.L., Jeffery, L.E. dan Elias, L.G. 1989. *Basic Sensory Methods for Food Evaluation*. International Development Research Centre, Ottawa.
- Weilmeier, D.M. dan Regenstein, J.M. (2004). Antioxidant properties of phosphates and other additives during the storage of raw mackerel and lake trout. *J. of Food Science* **69** (2): FCT 102-108.
- Yuanita, L. dkk. (1997). *Pengaruh Penggunaan Alkali Fosfat Sebagai Pengganti Boraks Terhadap Kualitas Daging Olahan*. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian IKIP Surabaya.