

Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner

Ciawi - Bogor, 30 September - 1 Oktober 2002



**Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian
Bogor, 2002**

PENGIKATAN AFLATOKSIN OLEH BAKTERI ASAM LAKTAT SECARA *IN VITRO*

(Binding of Aflatoxin by Lactic Acid Bacteria *In Vitro*)

SUSAN M. NOOR, M. POELOENGAN, dan S. RACHMAWATI

Balai Penelitian Veteriner, P.O. Box 151, Bogor 16114

ABSTRACT

Aflatoxins are mycotoxins that cause health problems when they contaminate food and feed. Aflatoxin B1 (AFB1) is the most potent naturally occurring carcinogen known in certain animal models. In an effort to develop a practical method for aflatoxin detoxication, a preliminary study was carried out with lactic acid bacteria to investigate their ability to bind the AFB1. The lactic acid bacteria whether viable or heat-killed has been tested *in vitro*. The bacteria (1×10^{10} CFU) were suspended in 1.5 ml of PBS containing 1.5 μ l AFB1. The mixture was incubated at 37°C for 60 min after which the suspension was centrifuged 3000 rpm for 30 min and the supernatant was collected. The supernatant were then quantified utilizing high-pressure liquid chromatographic (HPLC) to measure the AFB1 binding affinities of the bacteria. In this study the viable *Lactobacillus rhamnosus* decreased AFB1 concentration by 69% in the liquid medium within 60 min. The viable *L. rhamnosus* was more efficient in binding AFB1 compared with heat-killed bacteria that removed 55% of AFB1 under similar conditions.

Key words: Aflatoxin, binding, *Lactobacillus rhamnosus*

PENDAHULUAN

Aflatoksin adalah metabolit kapang yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* (ELLIS *et al.*, 1991). Kapang banyak mencemari bahan pakan dan pakan ternak termasuk jagung dan kacang dimana dilaporkan hampir 80% dari sampel pakan yang telah diteliti di Indonesia tercemar aflatoksin (GINTING, 1984; BAHRI *et al.*, 1994).

Berbagai cara penanggulangan aflatoksin telah banyak dilakukan diantaranya adalah dengan mendegradasi aflatoksin pada bahan pakan secara ekstraksi dengan bentonite, sinar UV, bakteri, jamur dan ganggang (CEIGLER *et al.*, 1966 and RUSTOM, 1979). Beberapa mikroorganisme dilaporkan pula dapat mengurangi cemaran aflatoksin baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (PIERIDES *et al.*, 2000; KANKANKAA *et al.*, 2000), salah satunya adalah bakteri asam laktat (*Lactobacillus spp.*).

Lactobacillus adalah bakteri gram-positif, berbentuk batang dan memproduksi asam laktat. Strain *Lactobacillus* dapat dibedakan secara biokimia, fisiologi dan serologi dan kebutuhan akan vitamin. Media MRS dari de Man, Rogosa dan Sharpe dapat digunakan untuk menumbuhkan strain bakteri asam laktat. Beberapa strain bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* dilaporkan efektif untuk mengurangi cemaran AFM₁

pada media cair yang tercemar (EL-NEZAMI *et al.*, 1998). Bahkan dilaporkan bahwa *L. rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) dan *L. rhamnosus* strain LC-705 dapat mengurangi AFB1 sampai 80% (LINE and BECKETT, 1994).

Mengingat tingginya kejadian cemaran aflatoksin pada bahan pakan dan pakan ternak serta bahaya yang ditimbulkan aflatoksin tersebut maka perlu dilakukan upaya penanggulangan untuk mengurangi tingkat cemaran. Tujuan penelitian ini adalah melakukan isolasi strain bakteri asam laktat secara kultural dan di uji kemampuannya dalam mengurangi cemaran aflatoksin secara *in vitro*.

METODOLOGI

Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat (*Lactobacillus sp.*) diisolasi dari sampel susu secara kultural dengan mengacu metode dari Sharpe (GIBBS and SKINNER, 1966). Sampel susu ditumbuhkan pada media penyubur MRS broth (Difco) yang mengandung 5% laktosa (w/v) dengan pH 6,4 dan diinkubasi pada suhu 42°C dengan selama 24 jam. Bakteri disubkultur pada media MRS agar (Difco) sampai didapatkan koloni bakteri yang murni.

Identifikasi bakteri asam laktat dilakukan secara biokimia yaitu dengan cara menumbuhkan bakteri pada

media gula-gula yaitu arabinosa, celubiose, glukosa, salicin, raffinosa, rhamnosa, sukrosa, xylosa, maltosa, manitol, trehalosa (Difco) yang telah ditambah phenol red dengan pH 6,4.

Uji pengikatan aflatoksin dengan bakteri secara *in vitro*

Uji pengikatan aflatoksin dengan bakteri asam laktat dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan bakteri asam laktat yang diisolasi dari susu mengacu metode EL-NEZAMI *et al.* (1998). Pada uji ini digunakan bakteri asam laktat hidup (live) maupun mati (heat-killed). Pembuatan heat-killed bakteri dilakukan dengan cara menempatkan suspensi bakteri pada penangas air panas selama 1 jam dan kemudian dibiarkan dingin pada suhu kamar sebelum digunakan untuk uji pengikatan secara *in vitro*.

Strain bakteri yang digunakan (1×10^{10} CFU) disentrifugase pada putaran 3000-3500 x g selama 10-15 menit. Setelah disentrifugase, supernatan dibuang dan endapan (pelet bakteri) dicuci dengan larutan double distilled water (DDW). Pelet bakteri disuspensikan dalam 1,5 µg AFB₁ dalam 1,5 ml PBS dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 60 menit. Setelah diinkubasikan suspensi bakteri dan AFB₁ disentrifugasi kembali dengan cara seperti diatas. Supernatan dikoleksi dan dianalisis kandungan AFB₁ yang terikat pada bakteri. Pada uji *in vitro* ini dilakukan 3 kali ulangan (triplicate) dan disertakan pula kontrol positif (AFB₁ disuspensikan dalam PBS) dan kontrol negatif (PBS) juga bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai pembandingan.

Analisis kandungan aflatoksin

Analisis kandungan aflatoksin pada supernatan dilakukan dengan metoda *high-pressure liquid chromatographic* (HPLC) atau *thin layer chromatography* (TLC). Sebanyak 20 ml filtrat dari supernatan ditambah dengan 1 gram Pb asetat kemudian dikocok. Setelah tercampur rata disentrifuse, supernatan dikoleksi dan ditambahkan 25 ml hexan. Hexan dibuang dan endapan kemudian ditambah 20 ml chloroform dan dikocok. Filtrat di saring dengan kertas saring (Whatman no 41) yang sebelumnya telah diberi Na₂SO₄ kering, kemudian dimasukkan ke dalam tabung florentin. Tabung florentin dipanaskan dan kemudian dianalisis dengan HPLC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri asam laktat (*Lactobacillus spp.*) dapat diisolasi dari susu sapi, produk susu maupun saluran

pencernaan. Pada penelitian ini bakteri bakteri asam laktat diisolasi dari susu sapi. Isolasi *Lactobacillus rhamnosus* dilakukan dengan media selektif MRS de Man Rogosa dan Sharpe dan temperatur terbaik untuk pertumbuhan bakteri ini adalah 42° C. Bakteri *L. rhamnosus* bereaksi positif pada media rhamnose, selubiose, maltose, glukosa, manitol, salicin, trehalose, sorbitol, xylose dan sucrosa dan bereaksi negatif pada media arabinose dan raffinose (GIBBS *et al.*, 1966).

Uji pengikatan aflatoksin secara *in vitro* ini, digunakan *L. rhamnosa*, *L. acidophilus* dan *Staphylococcus aureus*. Residu aflatoksin AFB₁ yang terikat pada bakteri dilakukan dengan menganalisis supernatan dengan alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)/high performance liquid chromatography (HPLC). Hasil analisis residu aflatoksin (AFB₁) dalam supernatan tercantum pada Tabel 1.

Dari hasil analisis tersebut di atas, terlihat bahwa AFB₁ tidak terdeteksi pada kontrol negatif sedangkan pada kontrol positif konsentrasi AFB₁ pada supernatan bisa dikatakan hampir seluruhnya teranalisis yaitu mencapai 100%. Konsentrasi AFB₁ pada supernatan terendah terdapat pada penggunaan bakteri *L. rhamnose* baik hidup (live) maupun mati (killed) yaitu masing-masing mencapai 0,31 µg/ml dan 0,45µg/ml. Bakteri *L. acidophilus* ternyata tidak sebaik bakteri uji yang lainnya dalam mengikat aflatoksin, ini dapat dilihat bahwa konsentrasi residu AFB₁ dalam supernatan masih cukup tinggi, sebaliknya bakteri *Staph. aureus* lebih baik dari *L. acidophilus* untuk mengikat aflatoksin pada uji ini.

Berdasarkan hasil konsentrasi residu AFB₁ dalam supernatan yang diperoleh tersebut kemudian dihitung prosentase tingkat efektivitas bakteri uji dalam mengikat cemaran aflatoksin. Figure 1. menggambarkan perbandingan prosentasi AFB₁ yang terikat pada beberapa strain bakteri uji.

Prosentase pengikatan dihitung dengan cara sebagai berikut: (Konsentrasi AFB₁ positif kontrol - Konsentrasi AFB₁ bakteri uji / Konsentrasi AFB₁ positif kontrol X 100%) (KANKAAPAA *et al.*, 2000). Pada Figure 1. terlihat bahwa bakteri *L. rhamnosus* dapat mengikat AFB₁ dengan prosentase tertinggi yaitu mencapai 69% diikuti dengan bakteri *Staph aureus* dan *L. acidophilus*. Hasil penelitian EL-NAZAMI (1999) *L. rhamnosus* strain GG dan strain LC-705 secara *in vitro* dapat mengikat aflatoksin 80% dan 77% dalam waktu 60 menit. Bedanya prosentasi pengikatan ini terjadi karena pengikatan aflatoksin oleh bakteri tergantung pada strain dan jumlah bakteri yang digunakan (KANKAANPAA *et al.*, 2000).

Pengikatan aflatoksin oleh bakteri hidup pada penelitian ini hasilnya lebih baik daripada pengikatan oleh bakteri mati. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian dari KANKAANPAA *et al* (2000), dimana

penggunaan bakteri yang diberi perlakuan fisik dan kimia untuk mematikan bakteri akan meningkatkan aktifitas antiaflatoksinogenik dari bakteri sehingga lebih mudah untuk mengikat aflatoksin. Mekanisme pengikatan aflatoksin oleh bakteri belum diketahui

dengan pasti tetapi secara *in vitro* diperkirakan bahwa molekul aflatoksin akan terikat pada permukaan komponen dinding sel bakteri sehingga menurunkan kapabilitas perlekatan bakteri tersebut pada sel epitel usus (KANKAAPAA *et al.*, 2000).

Tabel 1. Konsentrasi residu AFB1 dalam supernatan dianalisis dengan HPLC

Jenis Bakteri ^a	Perlakuan	Konsentrasi AFB1 dalam supernatan ($\mu\text{g/ml}$) ^b
L. rhamnosus	Live	$0,31 \pm 0,0025$
<i>L. rhamnosus</i>	Killed	$0,45 \pm 0,0216$
<i>L. acidophilus</i>	Live	$0,63 \pm 0,0100$
<i>L. acidophilus</i>	killed	$0,90 \pm 0,0095$
Staph. Aureus	live	$0,55 \pm 0,0001$
<i>Staph. Aureus</i>	killed	$0,49 \pm 0,0095$
Positif kontrol ^c	live	$1,02 \pm 0,0043$
Negatif kontrol ^d		0

Keterangan: a. 10^9 CFU/ml bakteri diinkubasi dengan 1,5 μg AFB1 dalam 1,5 ml PBS, selama 60 menit
b. Konsentrasi AFB1 dalam supernatan diperoleh dari 3 kali ulangan $\pm$ SE
c. 1,5 μg AFB1 dalam 1,5 ml PBS
d. *L. rhamnose* dalam PBS

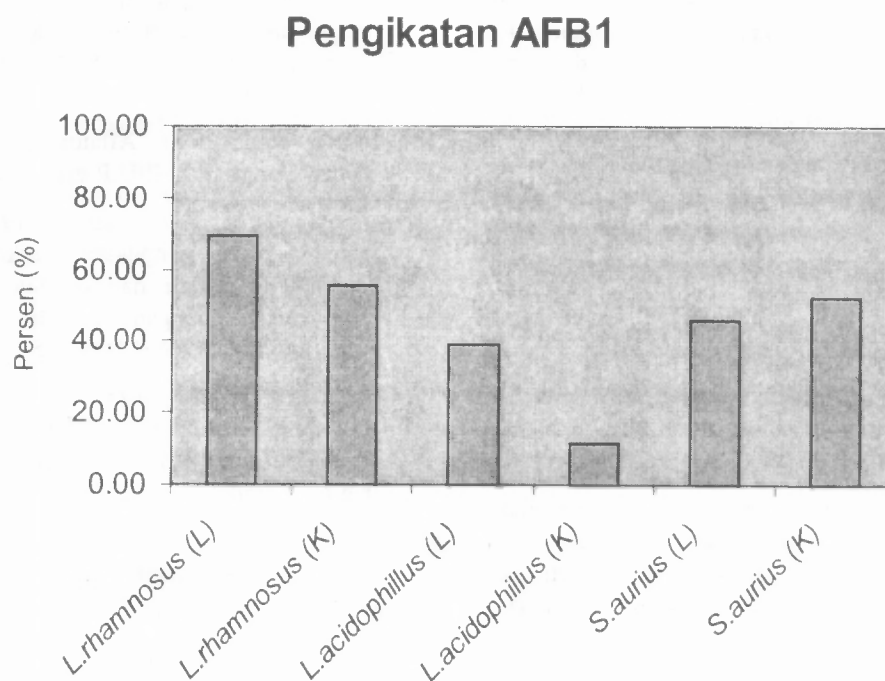


Figure 1. Prosentase AFB1 yang terikat pada beberapa strain bakteri uji dalam medium cair secara *in vitro*

KESIMPULAN

1. Bakteri *Lactobacillus rhamnosus* hidup (live) dan mati (killed) dapat mengikat aflatoksin B₁ (AFB₁) secara *in vitro*.
2. Prosentase pengikatan AFB₁ oleh *L. rhamnosus* hidup lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri *L. rhamnosus* mati.

DAFTAR PUSTAKA

- ANONIM, 1973. Pest control in groundnut. Pans Manual nr.2 FCOODA, London.
- BAHRI, S., P. ZAHARI, dan H. HAMID. 1990. Penggunaan arang aktif untuk mencegah aflatoksikosis pada itik. *Penyakit Hewan* 40:122127.
- BUCK, W.B. and G.D. OSWELLER, 1976. Clinical and diagnostic Veterinary Toxicology. G.A. van Gelder (Ed.) Kendall/Hut Publications. Dubuque.
- CEIGLER, A., B. LILLEHOJ, R.E. PETERSON, and H.H. HALL. 1996. Microbial detoxication of aflatoxin. *Appl. Microbiol.* 14:934-939.
- CHRISTENSENS C.M. and A. MALGREN. 1975. An inhibitory effect of vitamin A on the induction of tumor of forestomach and cervix in the syrian hamster by carcinogenic polycyclic hydrocarbon. *Cancer Res.* 25: 884-895.
- DHARSANA, R. 1987. A review: Aflatoxin and immunity. *Bul. FKH. UGM.* 7: 1-6.
- EDDS, G.T. 1973. A review: Acute aflatoxicosis. *JAVMA* 4: 304-309.
- ELLIS, W.O., J.P. SMITH, J.P. SIMPSON, and J.H. ODHAM. 1991. Aflatoxin in foods: occurrence, biosynthesis, effects on organism, detection, and methods of control. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30:403-439.
- EL-NEZAMI, H., P. KANKAANPAA, S. SALMINEN, and J. AHORAS. 1998. Physico-chemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Prot.* 61:466-468.
- GIBBS, B.M. and F.A. SKINNER. 1966. Identification methods for microbiologists. Academic Press. London. New York. P: 73-79.
- GINTING, 1984.
- HASTIONO. S. 1983. Peranan mikotoksin dalam industry makanan ternak. *Hamera Zoa* 71: 109-117.
- JONES, B.D. 1972. Methods of aflatoxin analysis. Tropical Product Institute. London.
- JONES, T.C. and R.D. HUNT. 1983. Mycotoxicosis (mouldy feeds). Veterinary Pathology. Lea and febiger. Philadelpia.
- KANKAANPAA, P., E. TUOMOLA, H. EL-NEZAMI, J. AHOKAS, and S.J. SALMINEN. 2000. Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a caco-2 model. *J. Food Prot.* 63 (3):412-414.
- LINE, J.E. and R.E. BRACKETT. 1995. Role of toxin concentration and second carbon source in microbial transformation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium aurantacium*. *J. Food Prot.* 58:1042-1044.
- MASSEY, T.E., R.K. STEWART, J.M. DANIELS, and L. LIU. 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208:213-227.
- NEWBERNE, P.M. 1970. Aflatoxins. In Disease of Swine. Dunne (Ed.) ISU Press, Ames.
- NOOR, S.M. dan A. PURWANTORO. 1992. Konfirmasi metode kasar pengukuran aflatoksin dengan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis dihubungkan dengan uji biologis. Laporan Penelitian No. 31/P4M/DPPM/SR/1991.
- PIERIDES, M., H. EL-NEZAMI, K. PELTONEN, S. SALMINEN, and J. AHOKAS. 2000. Ability of dairy strains of *Lactic acid* bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *J. Food Prot.* 63 (5):645-650.
- RUSTOM, I.Y.S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 59:57-67.