DAYA HAMBAT AFLATOKSIN TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Bacillus megaterium* DAN *Staphylococcus epidermidis*[1]

THE INHIBITORY EFFECT OF AFLATOXIN ON THE GROWTH OF *Bacillus megaterium* AND *Staphylococcus epidermidis*

Eko Sugeng Pribadi[2], Unang Patriana[3] dan Titiek Sunartatie[2]

[2]Laboratorium Mikologi, Bagian Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151, INDONESIA
[3]Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BPMSOH) Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian Republik Indonesia, Gunungsindur Serpong, INDONESIA

ABSTRAK

Media Veteriner. 1998. 5(1): 11-14

Bakteri *Bacillus megaterium* dan *Staphylococcus epidermidis* digunakan dalam penelitian ini untuk melihat efek penghambatan pertumbuhan yang diakibatkan oleh aflatoksin. Aflatoksin yang digunakan untuk maksud penelitian ini adalah aflatoksin murni dan aflatoksin yang dibuat dari tepung beras yang dicemari oleh *Aspergillus flavus*. Berdasarkan hasil pengamatan, efek penghambatan lebih terlihat pada percobaan yang menggunakan bakteri *B. megaterium*. Efek penghambatan terlihat pada konsentrasi aflatoksin murni sebesar 20 µg/ml dan terus berlangsung hingga konsentrasi aflatoksin murni mencapai 25 µg/ml, walaupun penghambatan ini tidak nyata ($P<0,05$). Efek penghambatan aflatoksin yang ada di dalam tepung beras tidak teramati karena konsentrasi aflatoksin sangat kecil.

Kata-kata Kunci : aflatoksin, daya hambat, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus epidermidis*

ABSTRACT

Media Veteriner. 1998. 5(1): 11-14

B. megaterium and *S. epidermidis* were used to study the inhibitory effect of pure aflatoxin and aflatoxin-contaminated rice. Results showed that the inhibitory effect was more pronounced in *B. megaterium* growth. The inhibitory effect of pure aflatoxin started at the concentration of 20 µg/ml and persisted to the concentration of 25 µg/ml ($P<0.05$). The inhibitory effect of aflatoxin-contaminated rice was not detected because of its low concentration.

Key words : aflatoxin, inhibitory effect, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus epidermidis*

PENDAHULUAN

Aflatoksin merupakan salah satu mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang gudang *Apergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* dan sering mengkontaminasi pakan ayam. Kontaminasi pakan ternak oleh aflatoksin telah menjadi perhatian para peneliti. Purwoko, Hold dan Wolstrup (1991) telah melakukan survei terhadap bahan mentah penyusun pakan ternak. Sembilan puluh satu persen jagung yang diperiksa mengandung aflatoksin dengan kadar toksin berkisar dari 22 sampai 6.171 µg/kg dan 100 % dedak yang diperiksa mengandung aflatoksin dengan kadar toksin berkisar dari 36 sampai 71 µg/kg.

Mahalnya biaya yang diperlukan untuk memeriksa aflatoksin menjadikan kendala utama bagi peternak untuk mendeteksi dini keberadaan aflatoksin di lingkungan peternakannya sebelum mengalami aflatoksikosis. Saat ini masih belum ditemukan cara yang murah, cepat dan memiliki ketepatan tinggi untuk mendeteksi aflatoksin di dalam usaha peternakan unggas. Metode pemeriksaan yang digunakan sekarang adalah metode pemeriksaan secara kimiawi, yaitu dengan menggunakan Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (HPLC) baik di pakan ternak maupun di

[1] Telah diseminarkan pada Seminar Hasil-Hasil Penelitian Dana Bantuan OPF-IPB 1996/1997, Lembaga Penelitian Institut Pertanian Bogor, 17-18 Desember 1997, Bogor

beberapa bahan makanan asal hewan. Namun pemeriksaan dengan teknik ini memerlukan biaya yang cukup mahal bagi peternak, sehingga hanya peternak-peternak besar saja yang mampu melakukannya. Teknik lain yang diperkirakan memiliki kepekaan yang cukup tinggi adalah teknik yang menggunakan reaksi antigen-antibodi, diantaranya adalah teknik ELISA (Adachi *et al.*, 1991) dan penggunaan kolom afinitas yang dikombinasikan dengan kromatografi kinerja tinggi (Trucksess *et al.*, 1991). Pribadi dan Patriana (1993, tidak dipublikasikan) pernah melakukan survei serologik terhadap aflatoksin dengan menggunakan teknik kolom afinitas yang memberikan hasil yang cukup baik. Namun teknik-teknik tersebut membutuhkan biaya yang cukup mahal sehingga dipastikan akan memberatkan bagi peternak untuk melakukan pemantauan dini terhadap keberadaan aflatoksin.

Satu teknik yang dapat dijadikan alternatif adalah teknik bioasai (*bioassay*). Teknik ini menggunakan pertumbuhan bakteri sebagai indikator adanya aflatoksin. Kuvaeva *et al.* (1989) dan El-Maghraby dan Abdel-Sater (1993) telah mencoba melakukan analisis aflatoksin secara bioasai dengan beberapa bakteri dan khamir. Refai *et al.* (1993) mengemukakan bahwa dari beberapa bakteri dan khamir yang digunakan ternyata bakteri *B. megaterium* dan *S. epidermidis* memiliki kepekaan yang paling tinggi terhadap keberadaan aflatoksin.

Tujuan penelitian ini adalah mengamati kepekaan *B. megaterium* dan *S. epidermidis* terhadap aflatoksin pada berbagai konsentrasi.

BAHAN DAN METODE

Aflatoksin Murni dan *Crude Aflatoxin*

Aflatoksin murni (Sigma) dipersiapkan dengan melarutkannya ke dalam larutan organik DMSO dan air suling sucihama. Konsentrasi aflatoksin sejak dilarutkan dengan pelarut organik dan air suling sucihama ini sudah diperhitungkan untuk tahap percobaan nantinya. Pelarut organik ini akan digunakan sebagai salah satu kontrol negatif.

Butir-butir beras yang telah dibersihkan dengan menggunakan larutan sodium hipoklorit dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer dan tabung ini dimasukkan ke dalam inkubator agar beras yang berada di dalamnya menjadi kering. Ke dalam biakan murni kapang *A. flavus* yang ada di dalam agar miring, ditambahkan air sucihama secukupnya dan dengan menggunakan ose/jarum spora kapang yang telah terendam air sucihama diaduk-aduk sampai terlepas. Dengan menggunakan pipet, suspensi spora diteteskan ke atas permukaan butiran-butiran beras. Beras yang telah dicemari dengan spora kapang *A. flavus* dieramkan pada suhu 37 ^{o}C selama 24 jam dan seterusnya disimpan selama lebih kurang lima sampai 14 hari pada suhu 25-27 ^{o}C.

Hari terakhir pengeraman, beras dihancurkan dengan menggunakan *blender* sehingga menjadi tepung beras dan diperiksa kandungan aflatoksinnya dengan menggunakan metode AOAC (1986) dan diperoleh *crude aflatoxin*.

Bakteri *B. megaterium* dan *S. epidermidis*

Bakteri yang digunakan dalam pecobaan ini adalah biakan bakteri umur 24 jam yang ditanam dalam media kaldu Tripticase Soy Broth (TSB). Suspensi bakteri yang digunakan untuk penelitian ini sebanding dengan kepekatan larutan Mc. Farland #1 dan #2.

Rancangan Percobaan

Kelompok perlakuan dalam percobaan ini dibagi ke dalam dua kelompok besar berdasarkan kepekatan bakteri. Kelompok pertama adalah kelompok percobaan dengan menggunakan baku Mc. Farland #1, sedangkan kelompok kedua menggunakan baku Mc. Farland #2 yang masing-masing diencerkan dengan pengenceran desimal sampai tingkat pengenceran tertinggi yang masih didapatkan pertumbuhan bakterinya. Sedangkan konsentrasi aflatoksin yang digunakan adalah keragaman beberapa konsentrasi yang terletak dalam selang konsentrasi terkecil dan tertinggi seperti yang diperoleh dalam penelitian El-Maghraby dan Abdel-Sater (1993), yaitu 5 dan 40 g/ml.

Sebagai kontrol negatif, suspensi bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diganti dengan larutan campuran pelarut organik dan air suling sucihama yang digunakan untuk melarutkan aflatoksin murni.

Analisis

Analisis dilakukan terhadap aflatoksin dan pertumbuhan bakteri. Analisis kandungan aflatoksin dalam tepung beras menggunakan metode Gerson dan Anhalt (1980) dengan kromatografi kinerja tinggi (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) yang telah dikembangkan oleh BPMSOH, Bogor-Indonesia.

Pertumbuhan bakteri diamati dengan dua cara, yaitu (i) melihat kejernihan media kaldu yang digunakan dan (ii) dengan menanamkan suspensi yang diberi perlakuan pada media agar padat Tripticase Soy Agar (TSA). Koloni yang tumbuh pada media padat dihitung dengan kepadatan bakteri antara 30 koloni hingga 300 koloni.

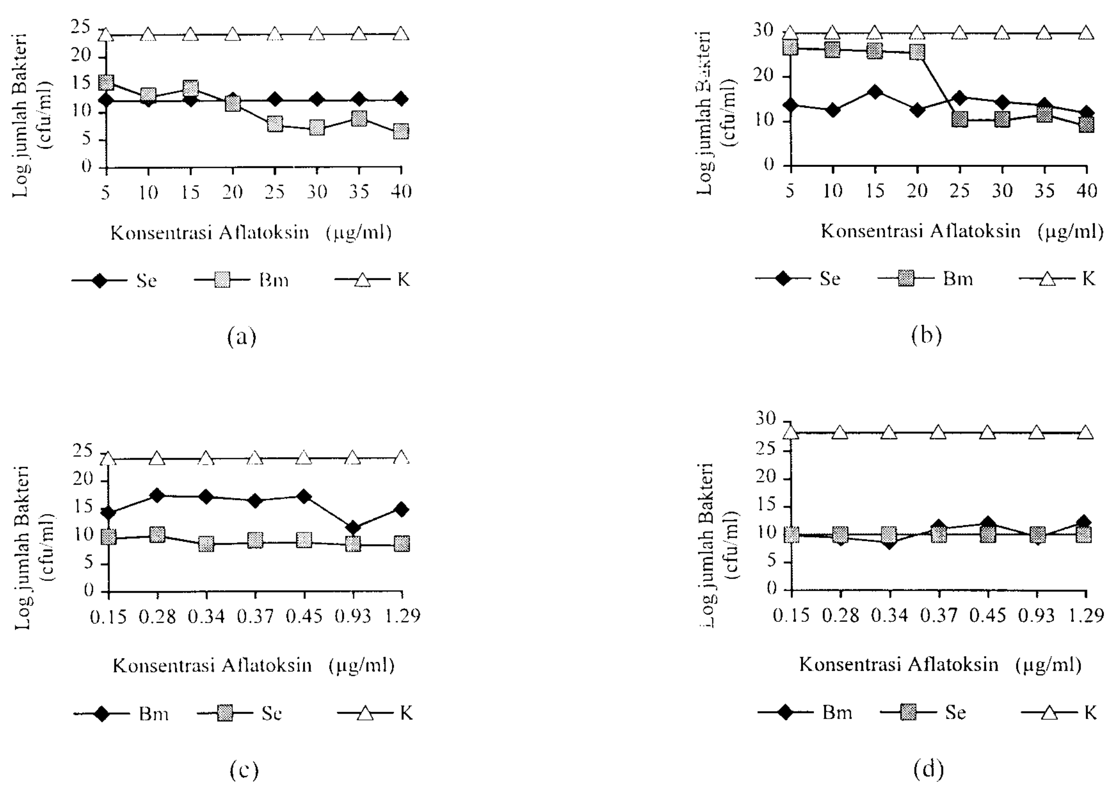
Perbedaan bakteri yang tumbuh pada tiap-tiap tingkat konsentrasi aflatoksin dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam dengan menggunakan Duncan Test pada $P<0{,}05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri *B. megaterium* dan *S. epidermidis* digunakan karena kedua bakteri ini memiliki kepekaan yang paling tinggi terhadap keberadaan aflatoksin (Refai *et al.*, 1993). Dalam penelitian ini pola pertumbuhan kedua bakteri terhadap konsentrasi aflatoksin murni terpapar pada Gambar 1 (a dan b) dan aflatoksin asal tepung beras terpapar dalam Gambar 1 (c dan d).

Dari Gambar 1 (a dan b) terlihat bahwa reaksi terhadap variasi konsentrasi aflatoksin lebih jelas diberikan oleh bakteri *B. megaterium*, baik dengan menggunakan suspensi bakteri McFarland#1 maupun McFarland#2. Dengan menggunakan suspensi McFarland#2 penurunan jumlah sel bakteri terlihat lebih jelas walaupun penurunan tersebut tidak nyata (P<0,05).

Pada konsentrasi aflatoksin murni kurang dari 20 µg/ml pertumbuhan sel-sel bakteri tidak mengalami gangguan berarti. Pada konsentrasi 20 - 25 µg/ml penurunan jumlah sel bakteri terlihat drastis walaupun tidak memberikan perbedaan yang nyata (P<0,05). Dengan demikian konsentrasi minimal aflatoksin yang dapat memberikan efek nyata penurunan sel bakteri *B. megaterium* adalah sebesar 20 µg/ml. Konsentrasi aflatoksin murni di atas 25 µg/ml tidak memberikan efek penurunan yang berarti. Belum diketahui apakah pada konsentrasi di atas 25 µg/ml bakteri-bakteri tersebut memberikan reaksi tahan terhadap aflatoksin atau diperlukan waktu kontak yang lebih lama lagi sehingga efek penurunan jumlah sel bakteri ini dapat terlihat terus. Dalam penelitian ini, waktu kontak antara larutan murni aflatoksin dan suspensi bakteri adalah 30 menit dan kemudian barulah ditumbuhkan di atas media agar padat.



Gambar 1. Pertumbuhan Bakteri dengan Kepekatan Bakteri McFarland #1 (a dan c) dan McFarland #2 (b dan d) dalam Berbagai Tingkatan Konsentrasi Aflatoksin Murni (a dan b) dan Aflatoksin di Dalam Tepung Beras (c dan d). Se = *S. epidermidis*, Bm = *B. megaterium*, K = suspensi campuran Se dan Bm

Dalam penelitian ini juga dicoba mengamati efek penghambatan oleh aflatoksin yang ada di dalam produk tepung beras seperti yang terpapar dalam Gambar 1 (c dan d). Dari gambar tersebut, tidak terlihat adanya efek penghambatan pertumbuhan sel bakteri yang berarti. Konsentrasi aflatoksin yang terlalu rendah di dalam tepung beras, diduga berpengaruh terhadap tiadanya efek penghambatan.

Fenomena penghambatan pertumbuhan sel-sel bakteri oleh afltoksin cukup menarik. Dari sisi diagnostik, hal ini memberikan alternatif pendeteksian aflatoksin dalam berbagai media dengan harga yang murah secara kualitatif melalui uji petik pemantauan kandungan aflatoksin pakan yang disimpan di gudang.

Untuk lebih memantapkan kembali hasil yang telah diperoleh pada tahap ini perlu dilakukan penelitian lebih mendalam mengenai efek penghambatan pada konsentrasi aflatoksin antara 20 - 25 μg/ml dengan cara memperbanyak ragam konsentrasi aflatoksin, pengaruh ragam waktu kontak larutan aflatoksin dengan suspensi bakteri terhadap efek penghambatan yang ditimbulkan dan karakteristik fisik-kimiawi dinding sel bakteri *B. megaterium*.

KESIMPULAN

Pertumbuhan bakteri *B. megaterium* lebih dihambat oleh aflatoksin murni dibandingkan bakteri *S. epidermidis*. Konsentrasi aflatoksin murni yang memberikan efek penghambatan yang nyata terhadap bakteri *B. megaterium* adalah sebesar 20 μg/ml dengan kisaran 20 - 25 μg/ml. Efek penghambatan aflatoksin yang berada di dalam tepung beras tidak terlihat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Proyek Operasi Dan Perawatan Fasilitas IPB (01.03.1.5960) yang telah membiayai penelitian ini. Terima kasih disampaikan juga kepada Ir. Etih Sudarnika atas bantuan uji statistika dan juga kepada Sdr. Budiawan, Sdr. Agus Somantri, Sdr. Raffi Ahmad dan Sdr. Elan Jaenudin yang telah terlibat dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Adachi, Y.; M. Hara; N.H. Kumazawa; K. Hirano; I. Ueno; K. Egawa. 1991. Detection of Aflatoxin B_1 in Imported Food Product into Japan by ELISA and HPLC. *J. Vet. Med. Sci.*, 53(1):49 - 52.

El-Maghraby, O.M.O. and M.A. Abdel-Sater. 1993. Microflora and Natural Occurrence of Mycotoxins in Tobacco from Cigarettes in Egypt. *CAB Abstract* 1993/1995.

Gerson, B. and J.P. Anhalt. 1980. Practice: Chromatography Condition. High Pressure Liquid Chromatography and Therapeutic Drug Monitoring. Educational Product Division. *American Society of Clinical Pathologist.*, -:17 - 77

Kuvaeva, I.B; E.V. Boltyanskaya and E.A. Kroyakova. 1989. Search For Microorganisms Sensitive to Deoxynivalenol, Zearalenone and Aflatoxin B1. *CAB Abstract* 1992.

Purwoko, H.M.; B. Hold; J. Wolstrup. 1991. Aflatoxin Content and Number of Fungi in Poultry Feedstuffs from Indonesia. *Letters in Applied Microbiol.*, 12: 212 - 215.

Refai, M.K.; M.E. Hatem; E. Sharaby and M.M. Saad. 1993. Detection and Estimation of Aflatoxins Using Both Chemical and Biological Techniques. *Mycotoxin Research.*, 9(1):47 - 52.

Trucksess, M.W., M.E. Stack, S. Neshem, S.W. Pagi and R.H. Albert. 1991. Immunoaffinity Column Coupled with Solution Fluorometry or Liquid Chromatography Postcolumn Derivatization for Determination of Aflatoxins in Corn, Peanuts, and Peanut Butter: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74(1):81 - 88.