

Isolasi dan karakterisasi bakteri yang berpotensi mengikat aflatoksin di rumen sapi

Isolation and characterization of the aflatoxin binding bacteria in the rumen of cattle

Dwi Sisriyenni¹, Suryahadi², Komang G Wiryawan², Dwierra Evvyernie², Dadik Pantaya^{3*}

¹Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Riau. Jl. Kaharuddin Nasution KM. 10 No. 341 Pekanbaru. Riau. Indonesia. 28284

²Departemen Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Jl. Agatis, Kampus Darmaga. Bogor. 166680

³Program Studi Manajemen Bisnis Unggas. Jurusan Peternakan. Politeknik Negeri Jember. Jl. Mastrip Kotak Pos 164. Jember. Jawa Timur. 68124

*Email Koresponden: dadik_pantaya@polije.ac.id

ARTICLE INFO

Received:
18 February 2021

Accepted:
18 March 2021

Published:
31 March 2021

Kata kunci:
Aflatoksin
Bakteri rumen
Isolasi bakteri

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh aflatoksin terhadap fermentasi rumen secara in vitro dan untuk mendapatkan isolat bakteri rumen yang mampu mengikat aflatoksin. Percobaan terdiri dari tiga tahap, tahap pertama adalah penurunan aflatoksin didalam rumen yang dilakukan secara in vitro. Tahap kedua adalah isolasi dan karakterisasi bakteri rumen yang bisa mengikat aflatoksin, dan tahap ketiga adalah uji daya ikat aflatoksin oleh bakteri rumen. Penelitian ini menggunakan rumen sapi yang didapatkan dari rumah potong hewan (RPH) Bubulak Bogor. Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) faktorial 2x3 dan 2 ulangan. Faktor pertama adalah kandungan aflatoksin (tanpa dan penambahan aflatoksin), faktor kedua adalah jenis pakan (ransum dan glukosa), dan faktor ketiga adalah waktu inkubasi (0 dan 4 jam). Hasil penelitian menunjukkan kandungan aflatoksin tidak mempengaruhi kondisi rumen (pH, *Volatile Fatty Acid* (VFA), dan konsentrasi asam laktat rumen), dari hasil isolasi didapatkan 6 isolat dan bakteri rumen yang dapat mengikat aflatoksin hingga 50%.

ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the influence of aflatoxins on rumen fermentation in vitro and obtained rumen bacterial isolates capable of binding aflatoxin. This trial consisted of three stages. The first trial was a reduction of aflatoxin in the rumen in vitro. The second experiment was the isolation and characterization of rumen bacteria that could bind aflatoxin. The third stage was to test the holding capacity of aflatoxin by rumen bacteria. This study used cow rumens. The Research design used a randomized complete block design (RCBD) factorial 2x3 and 2 replications. The first factor was the presence of aflatoxin (with and without the addition of aflatoxin), the second factor was the type of feed (diet and glucose), and the third factor was the time of incubation (0 and 4 hours). The results showed the presence of aflatoxin did not affect rumen conditions (pH, volatile fatty acid (VFA), and rumen lactic acid concentration), and the results obtained 6 isolates and isolation of rumen bacteria to bind aflatoxin up to 50%.

Key words:
Aflatoxin
Rumen bacteria
Bacterial isolation

PENDAHULUAN

Aflatoksin adalah produk senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh

spesies *Aspergillus* yaitu *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* (Yao, Gao, Ding, Zhang, and Li, 2021). Aflatoksin dapat tumbuh pada bahan pakan pada masa pertumbuhan hingga

panen, pada proses penyimpanan dan juga pada saat transportasi. Secara kimiawi, aflatoxin adalah kelompok turunan difuranocoumarin yang menunjukkan fluoresensi di bawah sinar ultraviolet. Berdasarkan warna fluoresensi aflatoxin dikelompokkan menjadi aflatoxin B1 dan B2 (AFB1, AFB2) berwarna biru, serta G1 dan G2 (AFG1, AFG2) berwarna hijau, angka 1 dan 2 menunjukkan perbedaan antar senyawa utama dan tambahan (Firmin, Morgavi, Yiannikouris, & Boudra, 2011). Aflatoxin B2 merupakan derivat dari B1 dan G2 merupakan derivat dari G1. Aflatoxin B1 (AFB1) diketahui yang paling berbahaya di antara keempat jenis aflatoxin lainnya, sehingga pengembangan penelitian banyak difokuskan pada aflatoxin B1.

Aflatoxin pada hewan dapat menyebabkan kerusakan hati, gangguan saluran pencernaan, produktivitas, efisiensi pemanfaatan pakan, penurunan kinerja reproduksi, mengurangi produksi susu atau telur, kematian embrio, teratogenisitas (cacat lahir), tumor dan menekan fungsi sistem kekebalan tubuh (Park, Park, Song, & Lim, 2019). Gejala penyakit yang ditimbulkan tergantung pada hewan, dosis, lama paparan, spesies dan diet atau status gizi.

Detoksifikasi bahan pakan yang terkontaminasi aflatoxin baik secara fisik dan kimia dalam pelaksanaannya kurang praktis, tidak efisien dan membutuhkan biaya yang besar. Selain itu, juga memiliki keterbatasan sehubungan dengan pertimbangan keamanan karena dapat membuat produk tercemar bahan kimia yang akan dapat merusak nilai nutrisi produk. Liu, Wang, Deng, Gu, & Wang (2018) melaporkan bahwa detoksifikasi secara kimia menggunakan arang aktif dan sodium terhidrasi aluminium silikat dengan persentase rendah tidak efektif untuk mengatasi jamur pada bahan pakan, karena adsorben dapat mengikat nutrisi penting sehingga dapat menyebabkan efek negatif.

Bakteri rumen khususnya bakteri asam laktat (BAL) bersama *yeast* sebagai adsorben biologis dapat mencegah perpindahan aflatoxin ke dalam saluran usus hewan. Mikroba rumen dapat mengubah mikotoksin menjadi metabolik non toksik pada saluran pencernaan hewan sebelum diserap dalam saluran pencernaan. Aflatoxin B1 oleh mikroba dirubah menjadi B2, B2a, dan M1. Carulla, Kreuzer, Machmüller, and Hess (2005) melaporkan biotransformasi, pembelahan dan detoksifikasi molekul mikotoksin oleh mikroba

atau pun enzim adalah metode yang efektif dan lebih aman dalam mengontrol mikotoksin. Gallo et al. (2020) melaporkan terjadi degradasi sebanyak 42 % aflatoxin saat diinkubasi secara *in vitro* menggunakan cairan rumen. Pendapat berbeda disampaikan oleh Pantaya et al. (2016) yang melaporkan bahwa mikroorganisme rumen mampu mendegradasi seluruh mikotoksin yang diuji kecuali AFB1.

Asam laktat merupakan hasil fermentasi karbohidrat dari hijauan di dalam rumen. Semakin tinggi asam laktat di dalam rumen akan mengakibatkan pH turun sehingga mikroba-mikroba rumen yang tidak tahan kondisi asam akan mati dan dapat mengganggu proses fermentasi di dalam rumen. Bakteri asam laktat dapat digunakan untuk menghambat produksi aflatoxin (Jiang et al., 2020). Pengikatan aflatoxin oleh BAL berlangsung secara cepat tidak lebih dari 60 menit tergantung pada konsentrasi aflatoxin (Gonçalves et al., 2020).

Penelitian tentang pengaruh aflatoxin terhadap kondisi fermentasi rumen dan kemampuan bakteri rumen dalam mengikat aflatoxin belum pernah dilaporkan di Indonesia. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh aflatoxin terhadap fermentasi rumen secara *in vitro* dan mendapatkan isolat bakteri rumen yang mampu mengikat aflatoxin.

MATERI DAN METODE

Penurunan Aflatoxin di dalam Rumen secara *In vitro*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penurunan aflatoxin oleh bakteri rumen secara *in vitro* pada berbagai kondisi jenis pakan, lama inkubasi dan faktor konsentrasi aflatoxin. Sumber bakteri yang digunakan berasal dari rumah potong hewan (RPH) Bubulak Bogor. Cairan rumen sebanyak 500 ml disaring menggunakan saringan polyester ukuran 250- μ m. Teknik isolasi dan inkubasi dengan metode Goering, H.K. and Van Soest, (1970) menggunakan 25 mL larutan buffer sitrat phosphate dan 15 mL cairan rumen untuk analisis pengikatan aflatoxin. Adapun analisis VFA menggunakan 0,8 ml cairan rumen yang dicampur dengan 0,5 mL dari 0,4 mg/mL asam crotonic dan 20 mg/ml asam metaphosphoric dalam 0,5 N HCl dan disimpan dalam suhu -20°C sampai dilakukan dianalisis (Pantaya et al., 2016). Larutan asam

laktat sebanyak 2 mL diletakkan dalam tube, disimpan sampai dilakukan analisis Pakan yang digunakan dalam percobaan ini menggunakan formulasi rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) 8%, konsentrat 14%, dan mineral 1%. Konsentrat yang digunakan mempunyai kandungan *Neutral Detergent Acid* (NDF) 54,2% BK, *acid detergent fiber* (ADF) 31,8%, dan protein kasar (PK) 8,4%.

Rancangan percobaan yang dilakukan adalah rancangan acak kelompok faktorial (RAK faktorial) 2x3 diulang 2 kali. Faktor A adalah aflatoxin yaitu A1 = tanpa aflatoxin dan A2 = penambahan aflatoxin 20 ppb. Faktor B adalah pakan, B1 = ransum (15% hijauan dan 85% konsentrat) dan B2 = glukosa. Faktor C adalah waktu inkubasi yaitu C1 = inkubasi 0 jam dan C2 = inkubasi selama 4 jam. Peubah yang diukur sebelum dan setelah fermentasi rumen adalah pH, konsentrasi *volatile fatty acid* (VFA) yang diukur dengan teknik destilasi uap (Mansfield et al., 1995), kadar asam laktat dianalisis kandungan aflatoxinnya menggunakan *Thin Layer Chromatography* (TLC) (Pantaya et al., 2016).

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Rumen Pendegradasi Aflatoxin

Sebagai tindak lanjut percobaan tahap kedua dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri rumen yang mampu menurunkan kadar aflatoxin. Prosedur isolasi bakteri, pembuatan media tumbuh dan media pengencer dilakukan berdasarkan prosedur persiapan media (Ogimoto, 1981). Sumber bakteri yang digunakan adalah dari kultur bakteri yang menghasilkan persentase penurunan aflatoxin tertinggi.

Setelah didapatkan kultur murni. maka dilanjutkan dengan karakterisasi yaitu 1) Pewarnaan gram (Cappucino, 2011), 2) Pewarnaan endospore (Lay, 1994), 3) uji katalase (Lay, 1994) dan 4) uji motilitas (Barrow, G. I. and Feltham, 1993). Data yang diperoleh dikemukakan secara deskriptif.

Pengikatan Aflatoxin oleh Bakteri Rumen

Setelah didapatkan kultur murni bakteri rumen yang mampu menurunkan kadar aflatoxin didalam rumen, selanjutnya dilakukan pengujian lebih lanjut tentang kemampuannya dalam mengikat aflatoxin pada dinding sel bakteri. Tahapan ini mengkaji kerja bakteri rumen dalam mengikat aflatoxin. Prosedur pengujian

daya ikat mengacu pada (El-Nezami, Mykkänen, Kankaanpää, Salminen, & Ahokas, 2000). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah dua kultur murni bakteri rumen hasil dari isolasi bakteri pada percobaan dua, larutan standar aflatoxin (Sigma Aldrich).

Prosedur pelaksanaan pada tahap ini yaitu larutan kultur bakteri disentrifugasi pada putaran 3500 xg selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan pelet dikultur *in vitro* dalam suatu media broth pada kondisi *anaerob* suhu 37°C selama 60 menit. selanjutnya media tersebut ditambahkan aflatoxin dengan konsentrasi akhir 100 ppb. Setelah diinkubasikan suspensi bakteri dan AFB1, dilakukan sentrifugasi selama 3500 rpm selama 10 menit. Endapan dibuang dan supernatan dikoleksi untuk ditetapkan kadar AFB1 dengan *Liquid Chromatography Mass Spectrophotometer* (LCMS-MS). Sebagai kontrol dilakukan prosedur yang sama tetapi medium tidak diinokulasikan dengan bakteri. Peubah yang diukur adalah kadar aflatoxin setelah inkubasi selama 60 menit.

Daya ikat aflatoxin oleh bakteri rumen didefinisikan sebagai berikut: [(Kadar aflatoxin kontrol - Kadar aflatoxin sampel)/Kadar aflatoxin kontrol] x 100% (Kankaanpää, Tuomola, El-Nezami, Ahokas, & Salminen, 2000).

Peubah yang diukur adalah pengikatan aflatoxin oleh bakteri menggunakan *Liquid Chromatography Mass Spectrophotometer* (LCMS-MS) mengacu pada modifikasi Silva, Pena, Lino, Fernández, and Mañes (2010). Data yang diperoleh dikemukakan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penurunan Aflatoxin dalam Rumen secara *In vitro*

Untuk menentukan kemampuan bakteri rumen dalam mendegradasi aflatoxin, di dalam sistem fermentasi rumen harus dilakukan dengan penambahan aflatoxin dalam rumen. Degradasi dapat disebabkan oleh bakteri itu sendiri, mikroba rumen lainnya atau bisa juga disebabkan oleh perubahan kimia aflatoxin di dalam rumen. Kondisi rumen harus ideal untuk pertumbuhan bakteri rumen, oleh karena itu bakteri rumen yang mampu mendegradasi aflatoxin dari rumen yang memiliki kondisi fisikokimia yang ideal. Pengukuran terhadap nilai pH, VFA, asam laktat dan kadar aflatoxin untuk melihat ideal atau

Tabel 1. Nilai pH rumen

Faktor Perlakuan		Aflatoksin	Waktu Inkubasi (jam)		Rataan
			0	4	
Pakan	Ransum	-	6,82 ± 0,056	6,30 ± 0,056	6,56 ± 0,303
		+	6,96 ± 0,113	6,40 ± 0,092	6,68 ± 0,336
	rataan		6,89 ± 0,098	6,35 ± 0,070	6,62 ± 0,381
	Glukosa	-	6,73 ± 0,077	6,28 ± 0,091	6,51 ± 0,268
		+	6,89 ± 0,084	6,15 ± 0,148	6,52 ± 0,435
		rataan		6,81 ± 0,116	6,22 ± 0,122
Aflatoksin	Rataan	-	6,78 ± 0,078	6,29 ± 0,063	6,53 ± 0,268
		+	6,93 ± 0,091	6,28 ± 0,171	6,60 ± 0,369
Waktu fermentasi		rataan	6,85 ^a ± 0,113	6,28 ^b ± 0,119	6,56 ± 0,403

^{a, b}Superskrip yang berbeda pada baris yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

tidaknya kondisi rumen dengan penambahan aflatoksin. Berikut ini ditampilkan data nilai pH, konsentrasi VFA, kadar asam laktat dan kadar aflatoksin perlakuan.

Nilai pH rumen

Nilai pH rumen ditampilkan pada Tabel 1. Derajat keasaman (pH) cairan rumen merupakan salah satu indikator yang menunjukkan berlangsungnya kegiatan bioproses di dalam rumen. Nilai pH rumen berkisar 6,15 – 6,96. Konsentrasi pH dipengaruhi oleh faktor waktu, terjadi penurunan pH sebanyak 8,32% setelah inkubasi selama 4 jam (P>0,05). Penurunan pH setelah 4 jam inkubasi terjadi karena asam yang dihasilkan. Nilai ini menunjukkan bahwa pada waktu itu sudah dihasilkan produk fermentasi berupa VFA yang optimal. Hal ini terlihat pada konsentrasi VFA cairan rumen yang cukup tinggi dengan kisaran 122,27 – 151,58 mM. Konsentrasi VFA yang cukup tinggi ini akan mempengaruhi pH rumen karena produk fermentasi dalam bentuk VFA terakumulasi di dalam tabung fermentor.

Walaupun terjadi penurunan pH, namun pH rumen masih berada pada kisaran normal. Kisaran pH rumen yang normal adalah 6 – 7 (Usman, 2013). Nilai ini menunjukkan bahwa fermentasi dalam rumen berlangsung secara optimal. Nilai pH rumen berkisar antara 6 – 7 dan kondisi yang paling optimal untuk aktivitas bakteri rumen adalah 6,9.

Pemberian pakan dengan rasio konsentrat yang lebih tinggi dibandingkan hijauan, dan pakan glukosa yang fermentabel di rumen juga tidak mengertak terjadinya kondisi asidosis, karena

pH rumen masih berada pada kisaran normal. Begitu juga dengan penambahan aflatoksin tidak mempengaruhi kondisi pH rumen, dengan demikian penambahan aflatoksin tidak mengurangi pH rumen, proses fermentasi secara keseluruhan tidak berubah. Nilai pH rumen masih berada dalam kondisi normal.

Konsentrasi VFA rumen

Konsentrasi VFA rumen ditampilkan pada Tabel 2. VFA merupakan produk fermentasi karbohidrat dalam rumen, semakin tinggi jumlah VFA, menunjukkan ketersediaan energi semakin besar. Faktor pakan, aflatoksin dan waktu fermentasi tidak berpengaruh (P>0,05) terhadap konsentrasi VFA rumen setelah proses fermentasi selama 4 jam. Hal ini mengindikasikan bahwa aflatoksin, jenis pakan dan waktu inkubasi tidak mengganggu proses fermentasi bahan pakan di dalam rumen.

Konsentrasi VFA merupakan salah satu produk fermentasi karbohidrat oleh mikroba rumen disamping produk lainnya yaitu CO₂ dan CH₄. *Volatile Fatty Acid* merupakan sumber energi utama bagi ternak ruminansia, konsentrasi VFA hasil penelitian ini berkisar 110,24 – 165,37 mM, konsentrasi ini hampir sama dengan konsentrasi VFA yang dilaporkan oleh Gallo et al. (2020) yaitu sekitar 138,57 mM pada sapi laktasi dan 124,56 mM pada sapi kering kandang. Konsentrasi VFA masih berada pada kisaran normal, berarti penambahan aflatoksin tidak mempengaruhi proses fermentasi di dalam rumen hal ini ditunjukkan dengan nilai pH yang normal. Selanjutnya Rahayu, Subrata, and Achmadi (2018)

Tabel 2. Konsentrasi VFA (mM) rumen

Faktor Perlakuan		Aflatoksin	Waktu Inkubasi (jam)		Rataan
			0	4	
Pakan	Ransum	-	140,31 ± 42,518	135,29 ± 21,267	137,80 ± 27,598
		+	140,31 ± 42,518	120,27 ± 42,518	130,29 ± 36,593
	Rataan	140,31 ± 34,716	127,78 ± 28,785	134,05 ± 30,273	
	Gluoksa	-	160,35 ± 14,170	125,28 ± 21,267	142,82 ± 20,863
		+	165,37 ± 21,267	110,24 ± 14,170	137,81 ± 35,079
	Rataan	162,86 ± 15,033	117,76 ± 17,116	140,31 ± 25,127	
Aflatoksin	Rataan	-	150,33 ± 28,345	130,29 ± 18,299	140,31 ± 24,548
		+	152,84 ± 31,026	115,26 ± 17,116	134,05 ± 33,427
Waktu fermentasi	Rataan		151,59 ± 27,544	122,77 ± 22,569	137,18 ± 28,515

menyatakan menunjang pertumbuhan mikroba yang optimum, konsentrasi VFA cairan rumen berkisar antara 80-160 mM. Adapun Mc Donald, A., JFD., and CA. (2002) menyatakan konsentrasi VFA dalam rumen bervariasi antara 0,2-1,5 g per 100 mL atau 10-70 mmol L⁻¹.

Konsentrasi asam laktat rumen

Kadar asam laktat ditampilkan pada Tabel 3. Faktor waktu dan faktor jenis pakan tidak berpengaruh terhadap kadar asam laktat di dalam rumen, namun faktor aflatoksin berpengaruh nyata (P<0,05) meningkatkan kadar asam laktat rumen. Kadar asam laktat berada pada kisaran 0,34 - 0,72 mg/ml. Terjadi peningkatan kadar asam laktat rumen 67,42% dengan penambahan aflatoksin. Asam laktat dapat menurunkan pH rumen, mengakibatkan kerusakan pada dinding sel bakteri yang terdiri dari polisakarida dan peptidoglikan.

Penambahan aflatoksin yang merupakan senyawa pepton dapat diserap oleh bakteri rumen untuk memperbaiki struktur dinding sel bakteri sehingga bakteri pembentuk asam laktat bertahan hidup dan menghasilkan asam laktat yang dapat menekan pertumbuhan bakteri lain. Asam laktat dijumpai didalam rumen ruminansia karena didalam rumen terdapat bakteri pembentuk laktat (Lettat et al., 2010). Menurut Wulandari, Agus, Cahyanto, & Utomo (2014) asam laktat dapat menghasilkan pH yang rendah pada substrat sehingga dapat menimbulkan suasana asam.

Kadar aflatoksin rumen

Rataan kadar aflatoksin dalam rumen diperlihatkan pada Tabel 4. Penambahan aflatoksin dan jenis pakan tidak berpengaruh terhadap kadar aflatoksin dalam rumen. Penambahan waktu inkubasi dari 0 menjadi 4

Tabel 3. Konsentrasi asam laktat (mg/ml) rumen

Faktor Perlakuan		Aflatoksin	Waktu Inkubasi (jam)		Rataan
			0	4	
Pakan	Ransum	-	0,34 ± 0,310	0,72 ± 0,016	0,53 ± 0,282
		+	0,68 ± 0,095	0,70 ± 0,403	0,69 ± 0,275
	Rataan	0,51 ± 0,253	0,71 ± 0,026	0,61 ± 0,258	
	Gluoksa	-	0,34 ± 0,079	0,37 ± 0,365	0,36 ± 0,216
		+	0,67 ± 0,079	0,56 ± 0,024	0,62 ± 0,08
	Rataan	0,51 ± 0,205	0,47 ± 0,237	0,49 ± 0,206	
Aflatoksin	Rataan	-	0,34 ± 0,185	0,55 ± 0,291	0,44 ^b ± 0,223
		+	0,68 ± 0,072	0,63 ± 0,088	0,65 ^a ± 0,796
Waktu fermentasi	Rataan		0,51 ± 0,223	0,59 ± 0,204	0,55 ± 0,210

^{a, b}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Tabel 4. Kadar aflatoksin total G1 dan G2 (ppb) rumen

Faktor Perlakuan		Aflatoksin		Waktu Inkubasi (jam)		Rataan
				0	4	
Pakan	Ransum	-		8,08 ± 4,023	4,67 ± 2,771	6,38 ± 2,822
		+		7,89 ± 5,741	4,08 ± 1,202	5,99 ± 3,537
		rataan		7,99 ± 4,131	4,38 ± 1,746	6,18 ± 2,982
	Glukosa	-		9,51 ± 2,184	3,84 ± 0,233	6,68 ± 1,139
		+		7,74 ± 1,018	3,90 ± 0,021	5,82 ± 0,588
		rataan		8,63 ± 1,317	3,87 ± 0,170	6,25 ± 0,881
Aflatoksin	rataan			8,80 ± 3,228	4,26 ± 2,725	6,53 ± 2,773
				7,82 ± 4,695	3,99 ± 2,325	5,90 ± 3,461
Waktu fermentasi	rataan			8,31 ^a ± 3,734	4,12 ^b ± 2,347	6,21 ± 3,030

a, b Superskrip yang berbeda pada baris yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

jam dapat menurunkan kadar aflatoksin cairan rumen (P<0,05), dimana terjadi penurunan kadar aflatoksin sebesar 50,36% setelah fermentasi dilakukan selama 4 jam.

Penurunan aflatoksin sejalan dengan penurunan pH, adanya penurunan pH dapat mengakibatkan AFB1 berubah menjadi turunan aflatoksin seperti AFB2, AFB2a dan AFM1 oleh mikroba rumen, sehingga AFB1 tidak terdeteksi. Sutardjid (1989) melaporkan pada pH rendah, AFB1 dirubah menjadi AFB2a, sedangkan Kiessling, Pettersson, Sandholm, & Olsen (1984) menyatakan cairan rumen sapi atau domba dapat mengkonversi AFB1 menjadi AFM1. Aflatoksin yang terdeteksi adalah aflatoksin G1 dan G2 yang berasal dari pakan yang terbawa oleh cairan rumen. El-Nezami et al. (2000) melaporkan bahwa aflatoksin B2, G1 dan G2 kurang sensitif terhadap proses pengikatan, sehingga aflatoksin jenis ini dapat terdeteksi.

Penurunan aflatoksin terjadi setelah diinkubasi selama 4 jam. Penurunan ini diduga lebih disebabkan konversi AFB1 menjadi senyawa turunannya misalnya AFM1. Penurunan pH rumen diduga disebabkan oleh peningkatan asam laktat. Apabila pH rumen turun maka bakteri yang tahan asam (BAL) akan dapat hidup dengan baik. Kankaanpää, Tuomola, El-Nezami, Ahokas, and Salminen (2000) melaporkan penurunan kadar aflatoksin dalam cairan rumen juga sejalan dengan penurunan nilai pH karena suasana asam dapat merusak dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan AFB1 dengan mudah diikat oleh konstituen membran sitoplasma. Mekanisme pengikatan AFB1 oleh bakteri dilakukan oleh

polisakarida dinding sel dan peptidoglikan. Perubahan pH dapat menyebabkan peningkatan ukuran pori-pori, penurunan ketebalan dinding sel sehingga bakteri dapat mengikat aflatoksin. Pantaya et al. (2016) menyatakan bahwa kecepatan bakteri dalam mengikat toksin dipengaruhi oleh nilai pH.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Rumen

Identifikasi dan karakteristik bakteri rumen ditampilkan pada Tabel 5. Hasil isolasi didapatkan 6 jenis bakteri. Pengujian dengan pewarnaan gram didapatkan isolat no 1 menunjukkan gram negatif dan lainnya gram positif. Uji katalase didapatkan 2 isolat (3 dan 6) memiliki katalase positif. Uji endospora semua isolat tidak menghasilkan endospora dan uji motilitas semua isolat bersifat motil ditandai dengan pergerakan flagella.

Uji Pengikatan Aflatoksin oleh Isolat Bakteri Rumen

Hasil analisis pengikatan AFB1 oleh bakteri rumen menggunakan LCMS-MS disajikan pada Tabel 6. Pengikatan AFB1 oleh bakteri rumen setelah masa inkubasi selama 60 menit masing-masing 53,59% dan 51,68%. Kedua isolat memiliki kemampuan yang hampir sama dalam mengikat AFB1 hanya selisih 1,91%. Perbedaan populasi bakteri yang digunakan tidak berpengaruh terhadap daya ikat bakteri. Persentase pengikatan aflatoksin dipengaruhi oleh pH, suhu inkubasi dan konsentrasi AFB1. Pada percobaan ini konsentrasi aflatoksin di dalam media 100 ppb dan suhu inkubasi 37°C, sehingga pengikatan terhadap AFB1 nilainya

Tabel 5. Karakteristik bakteri rumen yang tumbuh pada media aflatoksin

No	Bentuk	Pewarnaan gram	Uji Katalase	Endospora	Motilitas	Uji konfirmasi pengikatan aflatoksin
1	<i>Coccus in cluster</i>	-	-	-	+	belum diuji
2	<i>Coccus</i>	+	-	-	+	+
3	<i>Curved Rod</i>	-	-	-	+	belum diuji
4	<i>Cocci in chains</i>	+	-	-	+	+
5	<i>Rod with square end</i>	+	-	-	+	belum diuji
6	<i>Diplococcus</i>	+	+	-	+	belum diuji

Tabel 6. Hasil pengikatan AFB1 oleh isolat bakteri rumen

No	Isolat Populasi (CFU/ml)	Pengikatan AFB1 (%/jam)
1	Isolat no 2 7,1 x 10 ⁸	53,59
2	Isolat no 4 2,5 x 10 ⁸	51,68

hampir sama. El-Nezami et al. (2000) menyatakan bahwa jumlah aflatoksin B1 yang terikat oleh bakteri meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi aflatoksin B1. Sejalan dengan hasil laporan Lee et al. (2003) yang menyatakan bahwa rata-rata kecepatan pengikatan AFB1 oleh bakteri tergantung pada konsentrasi aflatoksin. Semakin tinggi aflatoksin yang tersedia di sekitar sel bakteri, maka semakin tinggi pula kesempatan aflatoksin dan sel bakteri berinteraksi sehingga proses pengikatan berlangsung dengan cepat.

Haskard, El-Nezami, Kankaanpää, Salminen, and Ahokas (2001) melaporkan dalam keadaan hidup bakteri memiliki pertahanan diri sehingga tidak semua aflatoksin B1 akan terikat pada komponen sel dari bakteri, namun demikian, ketika racun pada media tinggi maka bakteri akan mengikat lebih banyak.

KESIMPULAN

Penambahan aflatoksin sampai 20 ppb di dalam rumen tidak mempengaruhi karakteristik kimiawi rumen, seperti pH, VFA, asam laktat dan aktivitas mikroba rumen. Bakteri rumen mampu mengurangi kadar aflatoksin dalam rumen melalui pengikatan ke dalam dinding sel bakteri rumen dengan waktu inkubasi selama 4 jam. Beberapa bakteri rumen yang memiliki kemampuan tersebut dapat diisolasi dan memiliki

kemampuan untuk menurunkan kadar aflatoksin hingga 50%.

DAFTAR PUSTAKA

Barrow, G. I.; Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.

Cappucino, J. G. . S. N. (2011). *Microbiology: a Laboratory Manual* (9th ed.). Adviso Wesley Pub. Comp. Inc. USA.

Carulla, J. E., Kreuzer, M., Machmüller, A., & Hess, H. D. (2005). Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(9), 961-970. doi:https://doi.org/10.1071/AR05022

El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., & Ahokas, J. (2000). Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B, from the chicken duodenum. *J Food Prot*, 63(4), 549-552. doi:10.4315/0362-028x-63.4.549

Firmin, S., Morgavi, D.P., Yiannikouris, A., & Boudra, H. (2011). Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5611-5619. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2011-4446

Gallo, A., Minuti, A., Bani, P., Bertuzzi, T., Cappelli, F. P., Doupovec, B., . . . Trevisi, E. (2020). A mycotoxin-deactivating feed additive counteracts the adverse effects of regular levels of *Fusarium* mycotoxins in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 11314-11331. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2020-18197

Goering, H.K. and Van Soest, P. J. (1970). *Forage Fiber Analysis (Apparatus Reagents, Procedures and Some Applications)*. *Agriculture Handbook*. Washington DC: United States Department of Agriculture.

- Diambil dari https://books.google.co.id/s?id=yn8wAAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=id&source=gbs_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Gonçalves, B. L., Muaz, K., Coppa, C. F. S. C., Rosim, R. E., Kamimura, E. S., Oliveira, C. A. F., & Corassin, C. H. (2020). Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in Frescal cheese. *Food Research International*, 136, 109604. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109604>
- Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpää, P. E., Salminen, S., & Ahokas, J. T. (2001). Surface binding of aflatoxin B(1) by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 67(7), 3086-3091. doi:10.1128/AEM.67.7.3086-3091.2001
- Jiang, Y., Ogunade, I. M., Pech-Cervantes, A. A., Fan, P. X., Li, X., Kim, D. H., . . . Adesogan, A. T. (2020). Effect of sequestering agents based on a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product and clay on the ruminal bacterial community of lactating dairy cows challenged with dietary aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1431-1447. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16851>
- Kankaanpää, P., Tuomola, E., El-Nezami, H., Ahokas, J., & Salminen, S. J. (2000). Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model. *Journal of Food Protection*, 63(3), 412-414. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.3.412>
- Kiessling, K. H., Pettersson, H., Sandholm, K., & Olsen, M. (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 47(5), 1070-1073. doi:10.1128/aem.47.5.1070-1073.1984
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikrobiologi di Laboratorium*. Jakarta: Raja Graffindo Persada.
- Lee, Y. K., El-Nezami, H., Haskard, C. A., Gratz, S., Puong, K. Y., Salminen, S., & Mykkänen, H. (2003). Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and nonviable bacteria. *Journal of Food Protection*, 66(3), 426-430. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.3.426>.
- Lettat, A., Nozière, P., Silberberg, M., Morgavi, D. P., Berger, C., & Martin, C. (2010). Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *J Anim Sci*, 88(9), 3041-3046. doi:10.2527/jas.2010-2926
- Liu, N., Wang, J., Deng, Q., Gu, K., & Wang, J. (2018). Detoxification of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and hydrated sodium calcium aluminosilicate in broiler chickens. *Live-stock Science*, 208, 28-32. doi:<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.12.005>
- Mansfield, H. R., Endres, M. I., & Stern, M. D. (1995). Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*, 55(1), 47-66. doi:[https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)98202-8](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)98202-8)
- Mc Donald, P., A., E., JFD., G., & CA., M. (2002). *Animal Nutrition, 7th Ed.* Edition. Longman Scientific and Technical Co. Published in The United States with John Wiley and Sons Inc. New York. United States with John Wiley and Sons Inc. New York.
- Ogimoto, K. a. S. I. (1981). *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan: Japan Scientific Societies Press, Tokyo
- Pantaya, D., Morgavi, D. P., Silberberg, M., Martin, C., Suryahadi, Wiryawan, K. G., & Boudra, H. (2016). Bioavailability of aflatoxin B 1 and ochratoxin A , but not fumonisin B 1 or deoxynivalenol , is increased in starch-induced low ruminal pH in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9759-9767. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11421>.
- Park, W., Park, M. Y., Song, G., & Lim, W. (2019). Exposure to aflatoxin B1 attenuates cell viability and induces endoplasmic reticulum-mediated cell death in a bovine mammary epithelial cell line (MAC-T). *Toxicology in Vitro*, 61, 104591. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104591>.
- Rahayu, R. I., Subrata, A., & Achmadi, J. (2018). Fermentabilitas Ruminal In Vitro pada Pakan Berbasis Jerami Padi Amoniasi dengan Suplementasi Tepung Bonggol Pisang dan Molases. 2018, 20(3), 9. doi:10.25077/jpi.20.3.166-174.2018.
- Silva, L. J., Pena, A., Lino, C. M., Fernández, M. F., & Mañes, J. (2010). Fumonisin determination in urine by LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem*, 396(2), 809-816. doi:10.1007/s00216-009-3231-9
- Upadhaya, S. D., Park, M. A., & Ha, J. K. (2010). Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 23(9), 1250-1260. doi:10.5713/ajas.2010.r.06
- Usman, Y. (2013). Pemberian Pakan Serat Sisa Tanaman Pertanian (Jerami Kacang Tanah, Jerami Jagung, Pucuk Tebu) Terhadap Evolusi pH, N-NH3 dan VFA Di dalam Rumen Sapi. *Jurnal Agripet*, 13(2), 53-58. <https://doi.org/10.17969/agripet.v13i2.821>

- Wulandari, S., Agus, A., Cahyanto, M. N., & Utomo, R. (2014). Effect of fermented cacao pod supplementation on sheep rumen microbial fermentation. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 39(3), 167–174. <https://doi.org/10.14710/jitaa.39.3.167-174>.
- Yao, Y., Gao, S., Ding, X., Zhang, Q., & Li, P. (2021). Topography effect on *Aspergillus flavus* occurrence and aflatoxin B1 contamination associated with peanut. *Current Research in Microbial Sciences*, 100021. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100021>