

PENURUNAN KADAR AFLATOKSIN B₁ PADA SARI KEDELAI OLEH SEL HIDUP DAN SEL MATI *Lactobacillus acidophilus* SNP-2

[Reduction of Aflatoxin B₁ in Soymilk by Viable and Heat-killed *Lactobacillus acidophilus* SNP-2]

Tyas Utami^{1)*}, FX. Hartanta Adi Nugroho¹⁾, Sri Usmiati³⁾, Sri Marwati²⁾, dan Endang S. Rahayu¹⁾

¹⁾Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²⁾Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor

Diterima 14 Desember 2010 / Disetujui 11 April 2012

ABSTRACT

Aflatoxins are carcinogenic mycotoxins that commonly contaminate foods and feed. There are many different forms of aflatoxin and its metabolites. Of these, aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most prevalent and toxic. *Lactobacillus acidophilus* SNP-2 has previously been shown to remove AFB₁ from liquid solution of phosphate saline buffer. However, the ability of lactic acid bacteria to reduce AFB₁ content in soymilk has not been studied yet. The objective of this study was to investigate the ability of viable and heat-killed cells of *L. acidophilus* SNP-2 to reduce AFB₁ in soymilk and fermented soymilk. Soymilk contaminated with *Aspergillus flavus* was inoculated with culture of *L. acidophilus* SNP-2, and incubated at 37 °C for 12 hours. Fermented soymilk, then, was heat sterilized and stored at cool room (4°C). Heat-killed cells were introduced to soy milk and then kept at cool room for 3 days. During soymilk fermentation, there was reduction of AFB₁ content in soymilk related to the growth of lactic acid bacteria and the reduction of pH. The initial concentration of AFB₁ in the soymilk was 4.9 ppb. *Lactobacillus acidophilus* SNP-2 reduced 67.58% of AFB₁ in the soymilk after 12 hours of fermentation. In cool environment, the binding of AFB₁ to heat-killed cell after soymilk fermentation was relatively more stable than that of soymilk without fermentation.

Key words: aflatoxin B₁, heat-killed cell, lactic acid bacteria, reduction, soymilk

PENDAHULUAN

Aflatoxin merupakan kelompok metabolit sekunder yang dapat memberikan efek yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan hewan karena bersifat karsinogenik, mutagenik, teratogenik dan immunosupresif. Metabolit sekunder ini dihasilkan oleh kapang *A. pergillus flavus* dan *A. parasiticus* dan *A. nomius* yang tumbuh pada berbagai biji-bijian dan kacang-kacangan pada suhu antara 24 sampai 35°C. Hasil penelitian di beberapa negara sedang berkembang di daerah tropis dan subtropis menunjukkan adanya cemaran aflatoxin pada berbagai komoditas dan hasil olahannya seperti kacang tanah, jagung, kedelai, hazelnut, dan sorghum (Williams *et al.*, 2004). Hasil survey juga menunjukkan sampel jagung, kacang tanah dan hasil olahannya di berbagai tempat di Indonesia juga terkontaminasi aflatoxin (Rahayu *et al.*, 2003; Dharmaputra *et al.*, 2005; Lilieanny *et al.*, 2005).

Aflatoxin B₁ (AFB₁) merupakan jenis aflatoxin yang paling sering dijumpai dan mempunyai toksisitas yang paling tinggi dibandingkan jenis aflatoxin lainnya. Banyak penelitian menunjukkan keterlibatan strain-strain *Lactobacillus* dalam menurunkan kadar aflatoxin. Pengikatan aflatoxin oleh sel bakteri merupakan salah satu mekanisme yang diduga menjelaskan aktivitas antimutagenik *Lactobacillus* (El-Nezami *et al.*, 1998, Peltonen *et al.*, 2001; Haskard *et al.*, 2001; Zinedine *et al.*, 2005). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG dan *L. rhamnosus* LC-705 menunjukkan kemampuan menghilangkan

AFB₁ secara efektif pada media cair yang dipengaruhi oleh suhu dan konsentrasi bakteri (El-Nezami *et al.*, 1988). Haskard *et al.* (2000) menduga bahwa AFB₁ berikatan dengan komponen karbohidrat dan protein sel hidup dari *L. rhamnosus* GG. Penelitian yang dilakukan oleh Lahtinen *et al.* (2004) menunjukkan bahwa peptidoglikan merupakan komponen karbohidrat yang paling mungkin terlibat dalam proses pengikatan AFB₁. Perlakuan panas dan asam secara nyata meningkatkan kemampuan pengikatan terhadap AFB₁ dan stabilitas kompleks bakteri AFB₁ (Haskard *et al.*, 2001). Perlakuan panas dapat menyebabkan denaturasi protein, gangguan terhadap struktur dinding sel dan fungsinya. Perlakuan dengan asam dapat merusak ikatan glikosidik pada polisakarida dan mengubah struktur peptidoglikan.

Simanjuntak (2005) mempelajari kemampuan beberapa strain bakteri asam laktat lokal dalam menurunkan kadar AFB₁ dan salah satu yang berpotensi adalah bakteri asam laktat probiotik *Lactobacillus acidophilus* SNP-2. Bakteri ini mampu mengikat lebih dari 50% AFB₁ dalam media *phosphate saline buffer* (PBS). Selanjutnya Amanah (2007) mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi pengikatan AFB₁ oleh *L. acidophilus* SNP-2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin rendah pH semakin banyak aflatoxin yang dapat dihilangkan dari media. Semakin tinggi konsentrasi AFB₁ dalam media bufer, kecepatan pengikatan AFB₁ semakin tinggi. Hasil penelitian Utami (2007) menunjukkan bahwa sel mati *L. acidophilus* SNP-2 karena perlakuan pemanasan dan asam mempunyai kemampuan pengikatan AFB₁ dua kali lebih besar dibandingkan dengan sel hidup. Selain itu perlakuan pemanasan dan asam meningkatkan secara nyata stabilitas kompleks yang terbentuk

*Korespondensi Penulis :
Email : tys_utami@yahoo.com.sg

antara bakteri dengan AFB₁. Namun demikian belum diketahui kemampuan *L. acidophilus* SNP-2 dalam mengikat AFB₁ pada sistem pangan. Oleh karenanya tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari kemampuan *L. Acidophilus* SNP-2 dalam mengikat AFB₁ dalam media sari kedelai, baik dalam bentuk sel hidup ataupun sel mati oleh panas (*heat-killed*).

METODOLOGI

Bahan dan alat

Lactobacillus acidophilus SNP-2 dan *A. flavus* FNCC 6109 merupakan koleksi dari Food and Nutrition Culture Collection (FNCC), Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada. Kedelai lokal diperoleh dari Pasar Beringharjo, Yogyakarta. Media PDA digunakan untuk pembentukan spora *A. flavus*. Media MRS (Oxoid) digunakan untuk penyiapan stok kultur bakteri asam laktat, sedang untuk enumerasinya menggunakan MRS agar yang ditambah dengan CaCO₃. Untuk produksi biomasa bakteri asam laktat digunakan media air kelapa yang ditambah dengan 5% ekstrak khamir (Oxoid).

Bahan-bahan untuk uji AFB₁ dengan metoda ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) adalah *stip antibody-coated wells*, *plate frame*, *microwell plate*, aflatoxin-enzim konjugat (*horseradish* peroksidase), larutan substrat, khromogen, asam sulfat 1,25 M (*stopping solution*), dan metanol 60% untuk ekstraksi sampel. ELISA kit untuk analisa AFB₁ ini dikembangkan dan diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner (Balivet), Bogor.

Penyiapan biji kedelai yang terkontaminasi aflatoxin

Aspergillus flavus FNCC 6109 ditumbuhkan dalam medium PDA miring selama 4-6 hari untuk mendapatkan spora. Selanjutnya spora diinokulasikan pada biji kedelai dan disimpan dalam kotak plastik selama 1,5-2 bulan pada suhu ruangan ($\pm 29^\circ\text{C}$). Kedelai yang telah terkontaminasi aflatoxin digunakan untuk membuat sari kedelai.

Penyiapan sari kedelai

Kedelai sebanyak 100 g direndam selama 12 jam pada suhu ruang, selanjutnya diikuti dengan penghilangan kulit ari, pencucian, penghancuran menggunakan blender dengan rasio kedelai dan air 1:10, dan penyaringan menggunakan kain saring untuk memisahkan ampas dari sari kedelai. Sari kedelai yang diperoleh dipanaskan dan ditambah sukrosa 10% (v/v). Selanjutnya sari kedelai dipasteurisasi pada suhu 100°C selama 5 menit. Selama proses pembuatan sari kedelai dilakukan uji kadar AFB₁ menggunakan ELISA pada kedelai, bekas air rendaman, kulit ari, sari kedelai dan ampasnya.

Penyiapan biomasa sel mati *Lactobacillus acidophilus* SNP-2

Sebanyak 10 ml kultur *L. acidophilus* SNP-2 dalam media MRS yang berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam 100 ml media air kelapa yang ditambah dengan 5% (b/v) ekstrak khamir dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya kultur diinokulasikan pada 1000 ml media yang sama dan diinkubasi pada suhu dan waktu yang sama. Setelah

inkubasi, dilakukan sentrifugasi pada 1800 g selama 20 menit pada suhu 10°C. Pelet yang diperoleh dicuci dua kali menggunakan *peptone water* 0,1%, dan dilakukan enumerasi jumlah sel menggunakan metoda *dilution* dan *plating* (*pour plate*) pada media MRS agar yang ditambah CaCO₃. Pelet diresuspensi dengan aquades sterill hingga mencapai jumlah sel 10¹⁰-10¹¹ cfu/ml. Setelah dilakukan penghitungan jumlah sel, suspensi sel disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Sel mati oleh panas tersebut (selanjutnya ditulis sel mati) disimpan pada ruang pendingin (4°C) sampai digunakan.

Reduksi AFB₁ pada sari kedelai selama fermentasi oleh *Lactobacillus acidophilus* SNP-2

Sari kedelai yang terkontaminasi AFB₁ diinokulasi dengan sel hidup *L. acidophilus* SNP-2 (10% v/v) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam. Kultur starter disiapkan dengan cara menginokulasikan kultur *L. acidophilus* SNP-2 ke dalam media cair MRS dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selama fermentasi dilakukan penghitungan jumlah sel dengan metoda *dilution and plating*, serta pengukuran pH dan kadar AFB₁ pada sari kedelai.

Stabilitas pengikatan AFB₁ oleh sel mati *Lactobacillus acidophilus* SNP-2 pada sari kedelai terfermentasi selama penyimpanan

Sari kedelai difermentasi oleh *L. acidophilus* SNP-2 pada suhu 37°C selama 12 jam. Selanjutnya sari kedelai terfermentasi tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit untuk mematikan sel bakteri *L. acidophilus* SNP-2, dan disimpan pada ruang dingin (4°C) selama 3 hari. Selama penyimpanan dingin dilakukan uji kadar AFB₁ dan pH setiap 24 jam.

Reduksi AFB₁ pada sari kedelai oleh sel mati *Lactobacillus acidophilus* SNP-2

Sari kedelai yang telah terkontaminasi dengan AFB₁ ditambah dengan biomasa sel mati *L. acidophilus* SNP-2 dengan konsentrasi sel 10⁹ dan 10¹⁰ cfu/ml. Penghitungan jumlah sel dilakukan pada suspensi pelet sebelum sel dipanaskan. Volume suspensi sel mati *L. acidophilus* SNP-2 yang ditambahkan ke dalam sari kedelai yang terkontaminasi berdasarkan jumlah sel hidup pada suspensi pelet sehingga konsentrasinya menjadi 10⁹ dan 10¹⁰ cfu/ml. Selanjutnya disimpan pada suhu 4°C selama 3 hari. Setiap 24 jam dilakukan pengujian kadar AFB₁ pada sari kedelai.

Analisis kadar AFB₁

Pengujian kadar AFB₁ menggunakan metoda ELISA yang merupakan format ELISA kompetitif langsung yang dikembangkan oleh Balai Penelitian Veteriner, Bogor. Sampel diekstraksi dengan metanol 60%. Masing-masing larutan standar AFB₁ dan ekstrak sampel dicampur dengan enzim konjugat (AFB₁ *Horseradish* peroksidase). Campuran dimasukkan ke dalam plat mikro yang sudah dilapisi antibodi. Selanjutnya terjadi kompetisi antara AFB₁ standar atau AFB₁ dalam sampel dengan enzim konjugat untuk berikatan dengan

antibodi dalam plat mikro. Enzim konjugat yang tidak berikatan dengan antibodi dicuci dengan air. Enzim yang berikatan dengan antibodi dengan penambahan substrat akan memberikan warna. Semakin tinggi kadar AFB₁ pada standar atau sampel, warna yang terbentuk makin pudar. Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan penghenti reaksi. Intensitas warna yang terbentuk pada masing-masing sumur (blanko, standar dan sampel) diukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm dan dihitung persen inhibisi standar dan sampel. Kadar AFB₁ pada sampel dihitung menggunakan kurva standar AFB₁ vs persen inhibisi. Kurva standar hubungan antara kadar AFB₁ dengan persen inhibisi menghasilkan persamaan $y = a \ln x + b$, dimana y dan x adalah persen inhibisi dan kadar AFB₁, sedang a dan b masing-masing merupakan slope dan *intercept* dari persamaan tersebut. Kadar AFB₁ (ppb) = $2,718 \times [(\% \text{ inhibisi sampel} - b)/a] \times \text{faktor pengenceran}$. Kemampuan mereduksi AFB₁ merupakan selisih dari kadar AFB₁ pada sari kedelai sebelum dengan setelah perlakuan dikalikan 100%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar AFB₁ selama proses pembuatan sari kedelai

Selama proses pengolahan sari kedelai, terjadi berbagai perlakuan yang kemungkinan dapat mempengaruhi kadar AFB₁ dalam bahan. Pengolahan sari kedelai melalui tahapan perendaman, pengupasan kulit, ekstraksi dan penyaringan, serta pemanasan. Hasil penelitian menunjukkan bahan baku kedelai yang telah terkontaminasi spora *A. flavus* mengandung 107,1 ppb AFB₁ atau 10,71 µg per 100 g kedelai, dan setelah mengalami proses pengolahan menjadi sari kedelai kadar AFB₁ turun menjadi 4,9 ppb, masih di bawah ambang batas yang diijinkan yaitu 20 ppb (Tabel 1). Air bekas rendaman mengandung 20,3 ppb AFB₁ ataudalam air rendaman terdapat 3,76 µg AFB₁. Pada proses perendaman kedelai dalam air selama 12 jam terjadi reduksi AFB₁ pada kedelai sebanyak 28,62%.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Rubak (2007) menunjukkan bahwa perendaman kacang tanah selama 30 menit dapat menurunkan kadar AFB₁ sebanyak 5,14%. Kelarutan AFB₁ dalam air diperkirakan berkisar antara 11-33 µg/ml (Grant dan Philips, 1998). Penelitian yang dilakukan oleh Nugroho (2005) menunjukkan bahwa sebagian besar AFB₁ terbawa dalam air pada tahap perendaman jagung. Selama proses pengolahan sari kedelai, sebagian AFB₁ berada pada kulit dan ampas, sehingga setelah pemanasan pada suhu 80°C selama 15 menit, kadar AFB₁ pada sari kedelai tinggal 4,9 ppb. Penurunan kadar AFB₁ dalam sari kedelai setelah pemanasan ini, selain disebabkan oleh terikutnya AFB₁ dalam kulit dan ampas kemungkinan juga karena adanya pemanasan. Hasil penelitian Marwati (2007) menunjukkan bahwa perebusan kacang tanah dengan air selama 20 menit dapat menurunkan cemaran AFB₁ pada kacang tanah sebesar 36,1%. Diduga keberadaan air akan membantu dalam pembukaan cincin lactone pada AFB₁. Aflatoksin bersifat stabil pada suhu tinggi, tetapi masih dapat dirusak oleh air mendidih (Christensen *et al.*, 1977). Berdasarkan hasil penelitian ini, terlihat bahwa proses pengolahan kedelai menjadi sari kedelai memberikan kontribusi

yang cukup besar terhadap penurunan kadar AFB₁ pada sari kedelai yaitu dari 107,1 ppb pada kedelai menjadi 4,9 ppb pada sari kedelai.

Tabel 1. Kadar AFB₁ pada kedelai selama proses pembuatan sari kedelai

Bahan	AFB ₁	
	ppb	µg (dari 100 g kedelai)
Kedelai	107,1	10,71
Air Rendaman	20,3	3,76
Kulit	9,2	0,23
Ampas	8,7	0,71
Sari Kedelai	4,9	5,25

Reduksi AFB₁ pada sari kedelai selama fermentasi oleh *Lactobacillus acidophilus* SNP-2

Kemampuan *L. acidophilus* SNP-2 dalam menurunkan kadar AFB₁ pada sari kedelai selama fermentasi dilakukan dengan menginokulasikannya ke dalam sari kedelai dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam. Setelah penambahan inokulum *L. acidophilus* SNP-2 (10% v/v) terjadi penurunan pH menjadi 4,68 karena selama penyiapan inokulum telah terjadi produksi asam dan pHnya menjadi turun. Selama fermentasi terjadi peningkatan jumlah sel dan penurunan pH karena aktivitas metabolisme menghasilkan asam laktat (Tabel 2).

Kadar AFB₁ pada sari kedelai sebelum fermentasi 4,9 ppb, dan setelah fermentasi 6 jam pada suhu 37°C terjadi reduksi AFB₁ dalam sari kedelai sebesar 59,82% (Tabel 3). Pada akhir fermentasi kadar AFB₁ pada sari kedelai terfermentasi tinggal 1,60 ppb atau terjadi reduksi kadar AFB₁ sebesar 67,58%. Reduksi AFB₁ selama fermentasi 12 jam meningkat, seiring dengan kenaikan jumlah sel dan penurunan pH. Hasil penelitian Amanah (2007) menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi sel meningkatkan kemampuan pengikatan terhadap AFB₁ sampai konsentrasi 10⁹ cfu/ml pada media bufer fosfat. Selain konsentrasi sel, pengikatan AFB₁ dipengaruhi juga oleh pH media. Hasil penelitian Amanah (2007) menunjukkan bahwa pengikatan AFB₁ oleh *L. acidophilus* SNP-2 meningkat secara nyata pada pH ≤ 5,0 dibandingkan pada pH 6,0 dan 7,0. Diduga pada pH rendah dapat terjadi perubahan AFB₁ menjadi AFB_{2a} yang memiliki kemampuan toksisitas yang lebih rendah. Penelitian yang dilakukan oleh El-Nezami *et al.*, 1998 menunjukkan bahwa penambahan HCl pada standar AFB₁ menghasilkan konversi AFB₁ menjadi AFB_{2a}. Penelitian yang lain menyebutkan bahwa keberadaan asam organik dapat pula mengubah AFB₁ menjadi aflatoksikol yang toksisitasnya juga lebih rendah dari AFB₁ (Omaye, 2004). Haskard *et al.* (2001) menyebutkan bahwa perlakuan dengan asam kuat (HCl) dapat mempengaruhi komponen dinding sel seperti polisakarida dan peptidoglikan. Perlakuan dengan asam kuat tersebut dapat merusak dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan pengikatan AFB₁ oleh komponen membran sitoplasma menjadi lebih mudah. Namun pada penelitian ini tidak melibatkan asam kuat yang dapat merusak dinding sel bakteri, sehingga kemungkinan reduksi AFB₁ selama fermentasi disebabkan oleh pengikatan dengan sel bakteri dan pengaruh pH. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar AFB₁ yang sangat

nyata dari bahan baku kedelai (107,1 ppb) menjadi sari kedelai (4,9 ppb) dan setelah fermentasi oleh *L. acidophilus* SNP2 (1,6 ppb). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fermentasi oleh *L. acidophilus* SNP-2 berpotensi sebagai salah satu cara untuk detoksifikasi aflatoksin pada bahan pangan, dan oleh karenanya masih memerlukan kajian lebih lanjut.

Tabel 2. Pertumbuhan sel *L. acidophilus* SNP-2 dan penurunan pH sari kedelai selama fermentasi 12 jam pada suhu 37°C

Fermentasi (jam)	Jumlah Sel (cfu/ml)	pH
0	1,0 x 10 ⁸	4,68
4	5,3 x 10 ⁸	4,06
6	-	3,94
8	1,1 x 10 ⁹	3,73
10	-	3,67
12	7,0 x 10 ⁸	3,53

Tabel 3. Kadar AFB₁ pada sari kedelai selama fermentasi oleh *L. acidophilus* SNP-2 pada suhu 37°C

Sampel	Kadar AFB ₁ (ppb)	% Reduksi AFB ₁
Sari kedelai	4,90	0
Fermentasi 0 jam	4,50	7,98
Fermentasi 6 jam	1,93	59,82
Fermentasi 8 jam	1,87	61,97
Fermentasi 10 jam	2,20	54,74
Fermentasi 12 jam	1,60	67,58

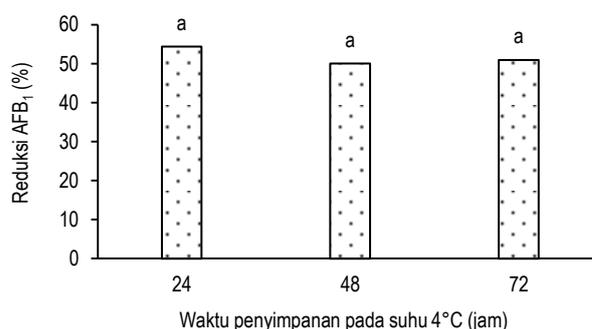
Reduksi AFB₁ pada sari kedelai terfermentasi oleh *L. acidophilus* SNP-2 setelah pemanasan

Pada tahap selanjutnya, diamati stabilitas pengikatan AFB₁ oleh sel mati *L. acidophilus* SNP-2 setelah fermentasi sari kedelai. Setelah fermentasi sari kedelai selama 12 jam, dilakukan sterilisasi sehingga semua sel mati dan sari kedelai terfermentasi disimpan pada suhu 4°C selama 72 jam. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengukuran kadar AFB₁ pada sari kedelai terfermentasi setelah pemanasan, tetapi pengukuran AFB₁ dilakukan setelah sari kedelai terfermentasi tersebut disimpan selama 24 jam pada suhu 4°C. Kadar AFB₁ pada sari kedelai setelah fermentasi 12 jam adalah 1,60 ppb atau terjadi reduksi AFB₁ sebesar 67,58% dibandingkan kadar AFB₁ pada sari kedelai (Tabel 3). Setelah dilakukan pemanasan sari kedelai terfermentasi untuk mematikan sel *L. acidophilus* SNP-2 dan penyimpanan pada suhu 4°C selama 24 jam kadar AFB₁ menjadi 2,20 ppb, sehingga reduksi AFB₁ menurun menjadi 54,4% (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan terjadi pelepasan AFB₁ dari kompleks sel-AFB₁. Haskard *et al.* (2000) mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi pengikatan AFB₁ oleh *Lactobacillus rhamnosus* GG dan menduga bahwa AFB₁ berikatan dengan komponen karbohidrat dan protein dari sel hidup. Setelah dilakukan pencucian lima kali dengan air terjadi penurunan jumlah AFB₁ yang terikat pada sel hidup dari 78,9% menjadi 49,5%, sedang pengikatan AFB₁ oleh sel mati turun dari 84,1% menjadi 66,4% (Haskard *et al.*, 2001). Pelepasan kembali AFB₁ ke dalam larutan ini mengindikasikan bahwa pengikatan AFB₁ oleh sel bakteri melibatkan interaksi non kovalen.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa setelah penyimpanan 24 jam, selanjutnya stabilitas kompleks antara sel mati dengan

AFB₁ pada sari kedelai terfermentasi relatif stabil sampai dengan penyimpanan 72 jam. Selama penyimpanan pada suhu 4°C selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Kadar AFB₁ pada sari kedelai terfermentasi yang telah dipanaskan adalah berturut-turut 2,20 ppb, 2,40 ppb, dan 2,40 ppb. Selama penyimpanan dingin ini kemungkinan tidak terjadi pengikatan AFB₁ oleh sel mati, tetapi AFB₁ yang sudah terikat pada sel relatif stabil sehingga tidak terjadi pelepasan AFB₁ sampai 72 jam penyimpanan pada suhu 4°C.

Bila dibandingkan dengan pengikatan AFB₁ oleh sel mati pada sari kedelai tanpa fermentasi (Gambar 2), maka reduksi AFB₁ pada sari kedelai oleh sel mati setelah fermentasi ini relatif lebih tinggi dan lebih stabil dari pada reduksi AFB₁ oleh sel mati pada sari kedelai tanpa fermentasi.



Gambar 1. Reduksi AFB₁ pada sari kedelai terfermentasi oleh sel mati *L. acidophilus* SNP-2 selama penyimpanan dingin (4°C)

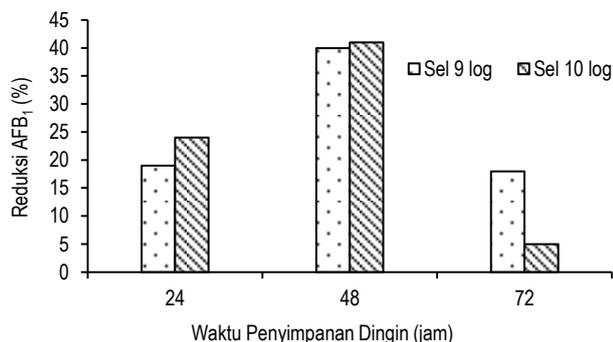
Hal ini kemungkinan terkait dengan pH media. Pada perlakuan tanpa fermentasi, pH sari kedelai yang telah ditambah sel mati *L. acidophilus* SNP-2 adalah 6,54, dan tidak terjadi perubahan pH selama penyimpanan. Sebaliknya selama fermentasi terjadi penurunan pH sari kedelai sampai 3,42. Penelitian yang dilakukan oleh Utami (2007) menunjukkan bahwa sel mati *L. acidophilus* SNP-2 baik dengan perlakuan panas maupun asam meningkatkan secara nyata kemampuan pengikatan AFB₁ dalam media bufer, dibandingkan dengan sel hidup. Disamping itu stabilitas kompleks antara sel mati dengan AFB₁, baik karena pemanasan maupun asam jauh lebih tinggi dari pada stabilitasnya dengan sel hidup. Kemungkinan kombinasi perlakuan pemanasan dalam kondisi asam lebih meningkatkan stabilitas kompleks antara sel mati *L. acidophilus* SNP-2 dengan AFB₁.

Reduksi AFB₁ pada sari kedelai oleh sel mati *L. acidophilus* SNP-2

Sari kedelai ditambah dengan biomasa sel mati *L. acidophilus* SNP-2, yang konsentrasinya sebelum mati adalah 10⁹ dan 10¹⁰cfu/ml. Selanjutnya dilakukan penyimpanan dalam cool room (4°C) selama 3 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 10⁹ cfu/ml sel *L. acidophilus* SNP-2 yang telah mati karena pemanasan dapat mereduksi kadar AFB₁ pada sari kedelai sebanyak 19,4%, dan peningkatan konsentrasi sel mati (10¹⁰cfu/ml) tidak secara nyata meningkatkan kemampuan mereduksi AFB₁ (Gambar2). Penelitian yang dilakukan oleh Amanah (2007) menunjukkan bahwa sel hidup *L. acidophilus* SNP-2 kurang efektif mereduksi AFB₁ pada media cair pada

konsentrasi 10^8 cfu/ml, namun pada konsentrasi 10^9 dan 10^{10} cfu/ml kemampuan mereduksi AFB₁ tidak jauh berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh El-Nezami *et al.* (1998), menunjukkan bahwa minimal diperlukan 2×10^9 cfu/ml untuk dapat mengikat lebih dari 50% AFB₁ pada media cair. Haskard *et al.* (2001) menyatakan bahwa AFB₁ terikat pada komponen dinding sel yaitu peptidoglikan. Hasil penelitian Utami (2007) menunjukkan bahwa kemampuan pengikatan AFB₁ oleh sel bakteri hidup setara dengan peptidoglikan murni. *Lactobacillus acidophilus* SNP-2 yang mati karena pemanasan masih berupa sel utuh.

Pada penelitian ini kadar AFB₁ pada sari kedelai adalah 9,60 ppb. Setelah ditambahkan 10^9 sel *L. acidophilus* SNP-2 yang telah dimatikan dan disimpan pada suhu dingin selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam maka kadar AFB₁ menjadi 7,70 ppb, 5,80 ppb, dan 7,80 ppb. Sedang sari kedelai yang ditambah dengan 10^{10} sel *L. acidophilus* SNP-2 yang telah dimatikan dan disimpan pada suhu dingin selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam, kadar AFB₁ menjadi 7,20 ppb, 5,60 ppb, dan 9,1 ppb. Sehingga dibandingkan dengan kadar AFB₁ pada sari kedelai awal, maka terjadi reduksi AFB₁ oleh sel mati pada sari kedelai selama penyimpanan dingin yang meningkat sampai dengan penyimpanan 48 jam, dan selanjutnya terjadi penurunan (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa masih terjadi proses pengikatan AFB₁ oleh sel mati selama penyimpanan dingin, dan ikatan antara AFB₁ dengan dinding sel *L. acidophilus* SNP-2 relatif tidak stabil, sehingga terjadi pelepasan kembali AFB₁ ke dalam sari kedelai. Penelitian yang dilakukan oleh Peltonen *et al.* (2001) menunjukkan bahwa pengikatan antara AFB₁ oleh beberapa galur bakteri asam laktat berbeda-beda, ada yang masih terjadi pengikatan AFB₁ setelah 72 jam, namun ada pula yang sudah terlepas lagi setelah 24 jam. Komponen peptidoglikan dinding sel bakteri asam laktat berpengaruh dalam pengikatan aflatoxin. Ikatan yang terjadi antara bakteri asam laktat dan aflatoxin adalah secara fisik dan bersifat reversibel atau ikatan non kovalen yang lemah. Stabilitasnya kompleks yang terbentuk tergantung dari strain, perlakuan dan kondisi lingkungan (Haskard *et al.*, 2001). Pencucian berulang-ulang dapat membebaskan kembali aflatoxin yang telah terikat (Peltonen *et al.*, 2001; Utami, 2007).



Gambar 2. Kemampuan sel *L. acidophilus* SNP-2 heat killed dalam mengikat AFB₁ pada sari kedelai selama penyimpanan dingin

KESIMPULAN

Selama proses pengolahan kedelai menjadi sari kedelai, terjadi penurunan kandungan AFB₁ dari 107,1 ppb pada kedelai menjadi 4,9 ppb pada sari kedelai, yang memenuhi batas maksimal (20 ppb) yang ditetapkan oleh BPOM. Selama fermentasi sari kedelai oleh *L. acidophilus* SNP-2 pada suhu 37°C selama 12 jam terjadi pengikatan AFB₁ sejalan dengan peningkatan jumlah sel dan penurunan pH sari kedelai.

Pada akhir fermentasi sari kedelai terjadi reduksi AFB₁ sebesar 67,58%. Pengikatan AFB₁ dalam sari kedelai terfermentasi oleh *Lactobacillus acidophilus* SNP-2 setelah proses pemanasan relatif lebih stabil selama penyimpanan dingin dibandingkan dengan pengikatan AFB₁ oleh sel mati pada sari kedelai. Sel mati *Lactobacillus acidophilus* SNP-2 dapat mereduksi AFB₁ pada sari kedelai sampai ± 40%, namun ikatannya tidak stabil dan terjadi pelepasan kembali AFB₁ ke dalam sari kedelai setelah 2 hari penyimpanan dingin.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Badan Litbang Pertanian Tahun Anggaran 2007-2008 melalui Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian Dengan Perguruan Tinggi (KKP3T). Untuk itu diucapkan terimakasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Amanah HZ. 2007. Studi faktor yang berpengaruh pada pengikatan aflatoxin B₁ oleh bakteri asam laktat strain *Lactobacillus acidophilus* SNP-2. [Tesis]. PS Ilmu dan Teknologi Pangan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Christensen CM, Mirocha CI, Meronuck RA. 1977. Mold, mycotoxin and mycotoxicosis. In: agricultural experiment station report. University of Minosita.
- Dharmaputra OS, Retnowati I, Ambarwati S, Maysra E. 2005. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in peanuts at various stages of delivery chains in Cianjur regency, West Java, Indonesia. Biotropia 24: 1-19.
- El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. Food and Chemical Toxicology 36: 321-326.
- Grant PG, Philips TD. 1998. Isothermal adsorption of aflatoxin B₁ on HSCAS clay. J Agric Food Chem 46: 599-605.
- Haskard C, Binnion C, Ahokas J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Chem Biol Interact 128: 39-49.
- Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpaa PE, Salminen S, Ahokas JT. 2001. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. Appl and Environmental Microbiol 67: 3-86-3091.
- Marwati. 2007. Reduksi aflatoxin B₁ dengan perebusan dalam larutan kapur pada pembuatan enting-enting. [Tesis]. PS Ilmu dan Teknologi Pangan. Universitas Gadjah Mada.

- Lahtinen SJ, Haskard CA, Ouwehand AC, Salminen SJ, Ahokas JT. 2004. Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants* 21: 158-164.
- Lilieanny O, Dharmaputra S, Putri ASR. 2005. Populasi kapang pascapanen dan kandungan aflatoksin pada produk olahan kacang tanah. *J Mikrobiologi Indonesia* 17-20.
- Nugroho DA. 2005. Penurunan cemaran aflatoksin B₁ pada pengolahan emping jagung. [Tesis]. PS Ilmu dan Teknologi Pangan. Universitas Gadjah Mada.
- Omaye ST. 2004. *Food and Nutritional Toxicology*. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C, Ahokas J, Salminen S. 2001. Aflatoxin B₁ binding by dairy strain lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J of Dairy Sci* 84: 2152-2156.
- Rahayu ES, Raharjo S, Rahmianna AA. 2003. Cemaran aflatoksin pada produksi jagung di daerah Jawa Timur. *Agritech* 23: 174.
- Rubak YT. 2007. Reduksi aflatoksin B₁ dengan proses fermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* MK-1 pada pembuatan bumbu pecel. [Tesis]. PS. Ilmu dan Teknologi Pangan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Simanjuntak R. 2005. Dekontaminasi aflatoksin B₁ melalui pengikatan oleh bakteri asam laktat. [Tesis]. PS. Ilmu dan Teknologi Pangan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Utami R. 2007. Pengikatan aflatoksin B₁ oleh bakteri Gram positif dan bakteri Gram negative. [Tesis]. PS ilmu dan Teknologi Pangan. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80: 1106-1022.
- Zinedine A, Faid M, Benlemlih M. 2005. In vitro reduction of aflatoxin B₁ by strain of lactic acid bacteria isolated from Morocco sourdough bread. *International J of Agric and Biol* 7: 67-70.