

# ***Aspergillus* PROTEOLITIK INDIGENOUS DARI KOJI DAN KEMAMPUANNYA MENDEGRADASI AFLATOKSIN B1**

INDIGENOUS PROTEOLYTIC *Aspergillus* ISOLATED FROM KOJI AND ITS ABILITY TO DEGRADE AFLATOXIN B1

Sardjono, Endang S. Rahayu, Sri Raharjo and Kapti Rahayu Kuswanto

## **ABSTRACT**

*Legume and cereals are always exposed to the danger of fungal contamination. Among such fungi, some species of the genus Aspergillus are potential of aflatoxins producer. Aflatoxin B1 (AFB1) which is the most carcinogenic mycotoxins, known very stable under cooking condition and other processing factors. The removal of AFB1 by degradation or detoxification is critical to reduce risk to human health. Microbiological degradation is a promising method for AFB1 degradation compared to others. The aim of this research was to isolate the proteolytic Aspergillus strain from "koji" and to determine its ability to degrade AFB1. Out of 18 strains of Aspergillus, 16 strains were found proteolytic and only 5 strains had no aflatoxigenic properties, but all of them were able to degrade AFB1. There were no specific pattern of the rate of AFB1 degradation. Strain of KKB4 was identified as Aspergillus oryzae, that possess the highest ability to degrade AFB1. Two kind of substances were formed after degradation which were more polar than AFB1. The rate of AFB1 uptake by Aspergillus oryzae KKB4 was similar with that of mycelial growth. Aflatoxin B1 inhibits mycelium growth, vesicle and conidial head formation.*

**Keywords :** *Proteolytic Aspergillus, Aspergillus oryzae, koji, degradation, aflatoxin.*

## **PENDAHULUAN**

Produk-produk pertanian, terutama bijian dan kacang selalu berpeluang besar terkontaminasi jamur berbahaya sejak di lapangan, panen, pengangkutan dan penyimpanan. Kondisi iklim yang lembab dan hangat di Indonesia sangat cocok untuk pertumbuhan jamur, sehingga peluang tercemarnya produk pertanian dengan mikotoksin cukup besar. Di antara jamur toksigenik, beberapa spesies dari genera *Aspergillus* dan *Fusarium* telah diketahui sebagai produsen aflatoksin dan fusarium toksin yang memiliki frekuensi yang besar sebagai pencemar produk pertanian di Indonesia (Piit, dkk., 1998; Sardjono, dkk., 1992; Goto, dkk., 1999; Nurhayati dkk., 1998; Yamashita, dkk., 1995).

Aflatoksin B1 (AFB1) diketahui sebagai mikotoksin paling berbahaya yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*, dan merupakan kontaminan tertinggi bagi komoditi pertanian di Indonesia (Piit, dkk., 1998; Sardjono, dkk., 1992; Goto, dkk., 1999; Nurhayati dkk., 1998; Yamashita, dkk., 1995). AFB1 dikenal sebagai mikotoksin yang tahan terhadap faktor pengolahan dan stabil pada kondisi pemasakan di rumah tangga. Berdasarkan pada sifatnya yang tahan terhadap faktor pengolahan, jika bahan yang tercemar AFB1 digunakan sebagai bahan mentah suatu proses pengolahan, maka peluang terdapatnya cemaran AFB1 pada

produk akhir cukup besar (Kamimura, 1999; Chinaphuti, 1999; Noviandi, 2001).

Telah diketahui banyak industri yang menggunakan bijian sebagai bahan mentah, di antaranya industri pengolahan kecap yang menggunakan kedelai sebagai bahan mentah. Dari data survei menunjukkan bahwa 37.5 % sampel kecap komersial ternyata tercemar AFB1 dengan kadar 6 – 10 µg/kg, dan sebanyak 9.31% sampel tercemar dengan kadar lebih dari 11 µg/kg (Sardjono, dkk., 1995). Penelitian lanjutan menunjukkan bahwa dari 10 pabrik kecap yang diteliti, enam diantaranya diketahui terdapat cemaran AFB1 pada koji, dan empat pabrik lainnya tidak terdapat cemaran, walaupun diketahui bahan mentah yang dipakai kesepuluh pabrik telah tercemar AFB1. *Aspergillus flavus* ternyata juga terlibat pada fermentasi tradisional tersebut (Sardjono dkk., 1995). Ini diduga pada keempat pabrik yang produknya tidak tercemar tersebut terdapat sejumlah mikoflora yang mampu mendegradasi AFB1 ikut terlibat dalam proses fermentasi. Beberapa peneliti mengemukakan bahwa beberapa mikroorganisme baik bakteri maupun jamur ternyata dapat mendegradasi aflatoksin (Cole dan Dorner, 1999; Djen, 1974; Shanta, 2000; Nakazato dkk., 1990; Haskard dkk., 2000; Ciegler, 1966; Lillehoy dkk., 1967; Smiley dkk., 2000; El-Nezami dkk., 2000). Jamur yang dipakai pada fermentasi kecap adalah jamur *Aspergillus* proteolitik, sehingga jika dapat diisolasi strain *Aspergillus* proteolitik yang mampu mendegradasi aflatoksin, merupakan suatu langkah efisien untuk mengurangi cemaran aflatoksin pada produk akhir fermentasi. Strain tersebut dapat dikembangkan sebagai inokulum untuk fermentasi kecap atau fermentasi yang lain. Di samping itu, jika ternyata strain tersebut mampu menghasilkan enzim pemecah aflatoksin, hal ini merupakan suatu temuan yang sangat berharga ditinjau dari upaya untuk mendapatkan pangan bebas aflatoksin.

## **METODE PENELITIAN**

### **1. Sampel**

Sampel berupa koji, yakni produk antara yang dihasilkan dari proses fermentasi pertama pada proses fermentasi kecap, diambil dari pabrik kecap di wilayah Jawa Tengah, yakni dari daerah Purworejo dengan kode sampel KPW, Kebumen dengan kode sampel KKB, Magelang dengan kode sampel KMG. Sampel terdiri atas sampel koji yang sudah dikeringkan dan sampel koji yang baru selesai fermentasi (basah). Masing-masing sampel diambil secara acak sebanyak 0,5 kg, dikemas dengan kantong plastik. Sampel koji yang masih basah disimpan dalam almari es, dan dilakukan analisa pada keesokan harinya.

\*) Faculty of Agricultural Technology, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

## 2. Media

Media untuk isolasi digunakan media Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar, terdiri atas Glukosa 10 g, Pepton 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, agar 15 g, Rose bengal 25 mg, Dichloran 2 mg, Chloramphenicol 100 mg dan aquadest 1 L. Media untuk memisahkan strain “non aflatoksigenik”, digunakan medium *Aspergillus flavus-parasiticus* Agar (AFPA), dengan komposisi pepton 10 g, Yeast ekstrak 20 mg, Ferri Ammonium Sitrak 0,5 g, Chloramphenicol 100 mg, Agar 15 g, Dichloran 2 mg dan aquadest 1 L. Media untuk uji sifat proteolitik digunakan medium Skim Milk Agar, terdiri atas Skim milk 100 g, agar 28g dan aquadest 1 L. Media untuk identifikasi tingkat spesies digunakan Czapek Yeast Extract Agar (CYA), yang terdiri atas  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g, Czapek Concentrate 10 mL, Yeast extract 5 g, Sukrosa 10 g, Agar 15 g dan aquadest 1 L; Malt Extract Agar (MEA) yang terdiri atas Malt extract 20 g, Pepton 1 g, Glukosa 20 g, Agar 20 g dan aquadest 1 L, serta Czapek Yeast Extract Agar 20 % sukrosa (CY20S), dengan komposisi  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g, Czapek concentrate 10 g, Yeast ekstrak 5 g, Sukrosa 200 g, Agar 15 g, aquadest 1 L.

Media untuk uji kemampuan degradasi digunakan media Glucose Ammonium Nitrat (GAN) dengan komposisi setiap liter adalah glukosa 50 gram,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2,4 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 g.,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, aquadest 1000 mL, larutan A 1,3 mL dan larutan B 1,3 mL. Larutan A terdiri atas  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2,0 g,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 g dalam aquadest 1000 mL, sedangkan Larutan B adalah larutan  $\text{CaCl}_2$  5%.

## 3. Isolasi *Aspergillus* proteolitik

Teknik isolasi yang dipakai untuk isolasi *Aspergillus* proteolitik adalah dengan metode kultivasi langsung (“direct plating”) sampel koji (Samson, 1995). Koloni *Aspergillus* yang berbeda dipisahkan dan dipindahkan pada medium PDA agar miring, dilakukan pemurnian sehingga diperoleh isolat genera *Aspergillus* pada media agar miring sebagai kultur stok. Masing-masing isolat diuji dengan menggunakan medium Skim Milk Agar untuk mengetahui sifat proteolitik isolat yang diperoleh dengan melakukan pengamatan terhadap zona jernih yang dihasilkan.

## 4. Uji sifat aflatoksigenik isolat *Aspergillus* proteolitik yang telah diperoleh

Dari setiap isolat *Aspergillus* proteolitik yang telah diperoleh diuji pada medium AFPA untuk membedakan antara *Aspergillus* proteolitik yang berpotensi membentuk aflatoksin dan yang tidak berpotensi membentuk aflatoksin. Setelah inkubasi pada suhu 30°C selama 4 hari, diamati timbulnya warna kuning oranye sebagai tanda bahwa isolat yang diuji berpotensi membentuk aflatoksin.

## 5. Identifikasi isolat

Identifikasi tingkat spesies dilakukan menurut metoda Klich and Pitt (1988), berdasarkan karakteristik makroskopis yang meliputi diameter koloni pada CYA dan MEA, warna konidia, warna miselia, “exudate”, “soluble

pigment” dan “reverse color”. Pengamatan mikroskopis yang dilakukan meliputi bentuk pendukung konidia, ukuran stipa, bentuk dan ukuran vesikula, bentuk dan ukuran phialide dan metula, bentuk dan ukuran konidia serta permukaan konidia. Data diolah berdasarkan pada kunci yang telah dibakukan.

## 6. Uji potensi kemampuan degradasi aflatoksin

Disiapkan 100 mL medium GAN yang telah dicemari dengan AFB1, dalam erlenmeyer 250 mL, diinokulasi dengan suspensi spora strain yang diuji kemampuannya sebanyak 1 mL dengan konsentrasi spora  $10^6$  spora/mL. Inkubasi selama 10 hari pada suhu kamar. AFB1 diekstrak dari medium dengan menggunakan khloroform 100 mL, dipisahkan fase khloroformnya dengan corong pemisah. Ekstrak khloroform yang diperoleh dilakukan “clean up” dengan kolom silika. Elusi dilakukan berturut-turut dengan 100 mL hexan, 100 mL dietil eter dan terakhir dengan khloroform metanol (97:3), eluat ditampung, dan pelarutnya diuapkan. Ekstrak kering dilarutkan kembali dengan 100  $\mu\text{L}$  metanol untuk selanjutnya ditentukan kuantitasnya dengan CAMAG TLC Scanner 3.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### *Strain dan sifat aflatoksigeniknya*

Dari hasil kultivasi langsung dapat diisolasi berbagai genera jamur dari koji, sehingga dapat diketahui bahwa pada fermentasi spontan yang dilakukan di pabrik-pabrik tersebut telah terlibat berbagai genera jamur pada fermentasi koji. Berdasarkan pada pengamatan makroskopis dan mikroskopis, diketahui genera tersebut adalah *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium* dan *Eurotium* (data tidak ditampilkan). Secara tidak langsung dengan keterlibatan berbagai genera jamur selama fermentasi koji pada pabrik-pabrik tersebut, dimungkinkan terjadinya cemaran mikotoksin, khususnya aflatoksin. Ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, bahwa ternyata jamur-jamur aflatoksigenik, khususnya *Aspergillus flavus* ikut terlibat dalam proses fermentasi koji di beberapa pabrik kecap (Sardjono, dkk., 1995).

Pada penelitian ini jamur selain genera *Aspergillus* tidak diisolasi lebih lanjut, sehingga diperoleh 18 isolat *Aspergillus*. Dari 18 isolat tersebut sebanyak 16 isolat *Aspergillus* bersifat proteolitik, yakni 2 isolat dari Magelang, 7 isolat dari Kebumen dan 7 isolat dari Purworejo (Tabel 1). Secara kualitatif kemampuan proteolitik masing-masing isolat beragam, ditandai dengan perbedaan selisih diameter zona jernih dengan diameter koloni. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa dari 16 isolat yang memiliki sifat proteolitik, 11 diantaranya ternyata berpotensi membentuk aflatoksin. Lima isolat yang tidak berpotensi menghasilkan aflatoksin diuji lebih lanjut untuk mengetahui kemampuannya mendegradasi aflatoksin, yakni KKB2, KKB4, KKB6, KPW3 dan KPW4.

### **Kemampuan degradasi terhadap aflatoksin B1 (AFB1)**

Kelima isolat *Aspergillus* proteolitik yang tidak bersifat aflatoksigenik, diuji kemampuannya untuk mendegradasi aflatoksin B1, dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2. Dari Tabel 2 tersebut dapat ditunjukkan bahwa strain KKB4 memiliki kemampuan menurunkan konsentrasi AFB1 terbesar, disusul oleh KKB2, KPW3, KPW4 dan KKB6.

Kemampuan mendegradasi AFB1 oleh tiap isolat berbeda dan belum diketahui dengan pasti pola degradasinya, sehingga laju pengurangan AFB1 juga belum dapat diformulasikan. Selain ditentukan oleh sifat individu, hal tersebut juga disebabkan karena kegiatan fisiologik dan pertumbuhan jamur pada kultur rendam (sumerged culture) dipengaruhi banyak faktor, terutama transfer masa, distribusi oksigen terlarut, kenaikan viskositas yang disebabkan oleh metabolit yang dihasilkan serta karakteristik miselia yang beragam pada sistem tersebut (Smith, 1975).

Pada penelitian ini dapat diketahui degradasi AFB1 oleh jamur-jamur tersebut memunculkan spot yang berbeda-beda yang dapat dilihat pada lempeng khromatografi lapis tipis dengan penyinaran menggunakan sinar ultra violet. Spot yang dihasilkan berkisar antara 2 sampai 5 buah spot dengan nilai Rf yang berbeda seperti yang ditampilkan pada Tabel 3. Isolat KKB2, KKB4 dan KPW4 memunculkan 2 buah spot baru, sedangkan yang lainnya memunculkan 4 spot baru. Berdasarkan pada nilai Rf spot yang muncul serta pelarut yang digunakan untuk pengembangan adalah non polar, maka senyawa-senyawa baru hasil pemecahan AFB1 bersifat lebih polar bila dibandingkan dengan AFB1. Berdasarkan pada pola biodegradasi AFB1, perubahan molekul AFB1 mungkin terjadi karena hidrosilasi, reduksi ikatan siklopentanon, maupun pemecahan hidrolitik (Wyllie dan Morehouse, 1977). Kemungkinan ikatan rangkap pada senyawa siklis belum berubah, mengingat spot baru yang muncul masih memberikan flourisensi pada penyinaran dengan sinar ultraviolet. Mekanisme ini masih ditelusuri lebih lanjut, demikian pula uji toksisitas senyawa hasil degradasi AFB1 oleh jamur tersebut. Di samping itu penelitian tentang peran jamur dan perilakunya (*mode of action*) pada proses degradasi tersebut masih dilakukan, terutama pada isolat KKB4 yang memiliki kemampuan tertinggi untuk degradasi AFB1

### **Hasil identifikasi strain potensial**

Dari hasil identifikasi tingkat spesies, diketahui bahwa isolat KKB4, KKB6 dan KPW3 adalah *Aspergillus oryzae* (Tabel 4), sedangkan KKB2 adalah *Aspergillus flavus* dan KPW4 adalah *Aspergillus parasiticus* (Tabel 5). Walaupun KKB2 adalah *Aspergillus flavus* dan KPW4 adalah *Aspergillus parasiticus*, namun pada uji kemampuan produksi aflatoksin pada media AFPA tidak menunjukkan uji positif. Jadi kemungkinan potensi

kedua isolat ini dalam menghasilkan aflatoksin sangat rendah, sehingga tidak menunjukkan *reverse color* berwarna kuning oranye pada medium uji. Namun demikian kedua isolat ini mampu mendegradasi AFB1 pada medium pertumbuhannya. Ini sejalan dengan penelitian Djien (1974), yang menyatakan bahwa aflatoksin yang telah dihasilkan oleh *A. flavus* akan berkurang atau menurun konsentrasinya setelah pertumbuhan jamur tersebut masuk pada akhir fase stasioner. Untuk *A. parasiticus*, diketahui memiliki enzim peroksidase yang dapat menurunkan cemaran aflatoksin, dan kemampuannya dipengaruhi oleh jumlah miselia, suhu, pH dan konsentrasi aflatoksin (Sinha, 1998).

### **Pertumbuhan *Aspergillus oryzae* KKB4 pada media yang dicemari AFB1**

Pertumbuhan *A. oryzae* KKB4 pada media yang dicemari AFB1 ternyata lebih lambat bila dibandingkan dengan pertumbuhannya pada media tanpa AFB1 (Gambar 1), ditunjukkan oleh perbedaan berat kering miselia yang terbentuk pada waktu pertumbuhan yang sama. Mungkin hal ini disebabkan oleh sifat toksis AFB1 terhadap jamur tersebut. Ini juga ditunjukkan oleh perbedaan morfologi mikroskopis pada jamur yang ditumbuhkan pada medium yang dicemari AFB1 (Gambar 2). Selain penghambatan terhadap pembentukan miselia, AFB1 juga menghambat pembentukan vesikel dan pendukung konidia.

Jika dilihat pola penurunan kadar AFB1 pada media, nampaknya laju penurunan kadar AFB1 "sejalan" dengan laju pembentukan miselia. Untuk memastikan apakah AFB1 terikat pada miselia atau karena jamur tersebut menghasilkan metabolit yang bisa mendegradasi AFB1 masih diperlukan penelitian lebih lanjut.

### **KESIMPULAN**

Beberapa genera jamur berhasil diisolasi dari koji, yakni genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium* dan *Eurotium*. Dari 18 isolat *Aspergillus* yang berhasil diisolasi, sebanyak 16 isolat bersifat proteolitik, namun hanya 5 isolat yang tidak berpotensi membentuk aflatoksin. Kelima isolat tersebut mampu mendegradasi AFB1, dengan kemampuan yang berbeda-beda. Sebanyak 3 isolat diidentifikasi sebagai *Aspergillus oryzae*, yakni isolat KKB4, KKB6 dan KPW3. Dua isolat masing masing KKB2 adalah *Aspergillus flavus* dan KPW4 diidentifikasi sebagai *Aspergillus parasiticus*. Strain *Aspergillus oryzae* KKB4 memiliki kemampuan degradasi terhadap AFB1 yang paling besar yakni sebanyak 84% AFB1 bisa didegradasi. Degradasi AFB1 oleh strain KKB 4 menghasilkan 2 senyawa yang bersifat lebih polar.

Aflatoksin B1 menghambat pertumbuhan miselia, pembentukan vesikel dan pendukung konidia *A. oryzae* KKB4 serta menyebabkan perubahan morfologi miselia jamur tersebut. Pengurangan AFB1 nampaknya sejalan dengan pertumbuhan atau pembentukan miselia jamur.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ciegler, A., E.B. Lillehoj, R.E. Peterson dan H.H. Hall. 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl. Microbiol.* 14, 934-939.
- Cole, R.G. dan J. W. Dorner. 1999. Biological control of aflatoxin and cyclopiazonic acid contamination in peanut. *Proceed. of International Symposium of Mycotoxicology, Japan* : 70-73.
- Djien, K.S. 1974. Self protection of fermented foods againts aflatoxin. *Proceed. 4th Intl. Congress Food Sci. Technol.*, III, pp. 24-253.
- El-Nezami, H. Mykkanen, P. Kankaanpaa, S. Salminen. dan J .Ahokas. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from chicken doudenum. *J. Food Protect.* 63 , 549-552.
- Goto, T., E. Ginting, S.S. Antarlina, J.S. Utomo, Y. Ito dan S. Nikkuni., 1999. Aflatoxin contamination and fungi isolated from Indonesian agricultural commodities. *Proceed. of International Symposium of Mycotoxicology, Japan* : 211-215.
- Knol, W., J.Bol dan J.H.J Huis. 1997. Detoxification of AFB1 in feeds by *Rhizopus oryzae* in solid state. *TNO-CIVO Food Analysis Ist. Netherland*, pp. 2132-2136.
- Kamimura, H. 1999. Removal of mycotoxins during food processing. *Proceed. Intl. Symp. of Mycotoxicology. Japanese Association of Mycotoxicology, Tokyo, Japan*, pp. 88-94.
- Lillehoj, E.B., A. Ciegler dan H.H. Hall. 1967. Aflatoxin B1 uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effect. *J. Bacteriol.* 93, 464-471.
- Nakazato, M., S. Morozumi., K. Saito., K. Fujinuma, T. Nishima dan N. Kasai., 1990. *Appl. Environ Microbiol.*, 56(5):1465-1470.
- Norhayati, A., Sardjono, A. Yamashita dan T. Yoshizawa. 1998. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Additives and Contaminants* 5, 377-384.
- Noviandi, C.T., E. Razzazi., A. Agus., J. Bohm, H.W. Hulan, S. Wedastri., Y.B. Maryudhani, Nuryono, Sardjono dan J. Leibetseder, 2001. Natural occurrence of aflatoxin B1 in some Indonesian food and feed products in Yogyakarta in year 1998-1999. *Proceed. of the 23<sup>rd</sup> Mycotoxin-Workshop, Vienna, Austria*
- Pitt, J.I., A.D. Hocking, B.F. Miscamble, O.S. Darmaputra, K.R. Kuswanto., E.S. Rahayu dan Sardjono . 1998. The mycoflora of food commodities from Indonesia. *J. of Food Mycology* 1 (1) : 41-60
- Samson, R.A., E.S.Hoekstra, J.C. Frisvad dan O. Filtenborg. 1995. *Introduction to Food-Borne Fungi. Centraalbureau Voor Schimmel-cultures, Baarn, Delft. The Netherland.*
- Sardjono, E.S. Rahayu, E.S., A.D. Hocking dan J.I. Pitt. 1992 . Mycoflora of cereals and nut from Indonesia. *Development of Food Science and Technology in South East Asia. Proceed. of the 4<sup>th</sup> ASEAN Food Conference, Jakarta, Indonesia*, pp. 698-706.
- Sardjono, E.S. Rahayu dan S. Naruki. 1995. Mycoflora and aflatoxin in soybean and koji for kecap production. *J. Biosain* 1 , 11-15.
- Sardjono, 1998. Pencemaran pangan oleh jamur, potensi bahaya dan pencegahannya. *Agritech*, 18: 23-27.
- Sardjono, 2003. Occurence and detoxification of mycotoxins in foods. *Agritech* 23, 97-102.
- Shanta, T., 1999. Fungal degradation of aflatoxin B1. *Natural Toxins* 7(5): 175-78.
- Sinha, K.K. dan D. Bhtanagar., 1998. Detoxification of mycotoxins and food safety., dalam *Mycotoxin in Agriculture and Food safety . Marcel Dekker, Inc. New York, I* : 381-418.
- Smiley, R.D. dan F.A. Draughon. 2000. Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *J. Food Protect.* 63, 415-418..
- Smith, J.E.1975. *The Filamentous Fungi. Vol.1. Industrial Mycology, Edward Arnold, Ltd., London*
- Wyllie, T.D. dan L.G. Morehouse. 1977. *Mycotoxic fungi, Mycotoxins and Mycotoxi - cosis. An Encyclopedia Hand Book. Marcel Dekker Inc, New York.*
- Yamashita, A., T. Yoshizawa, Y. Aiura, P.C. Sanchez, E.I. Dizon, R.H. Arim dan Sardjono. 1995. *Fusarium* mycotoxins (Fumonisin, Nivalenol and Zearalenone ) and aflatoxins in corn from South East Asia. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 , 1804-1807.

Table 1. Characteristics of *Aspergillus* strains isolated from koji obtained from several kecap factories

FACTORY LOCATION	Strain - Number	COLONY DIAMETER, (4 days, mm)*	CLEAR ZONE DIAMETER (4 days, mm)*	AFLATOXIGENIC**
MAGELANG	KMG1	40.4	43.0	Positive
	KMG2	37.0	44.3	Positive
KEBUMEN	KKB1	39.4	42.1	Positive
	KKB2	35.8	44.0	Negative
	KKB3	38.5	46.8	Positive
	KKB4	29.0	43.3	Negative
	KKB5	39.0	41.7	Positive
	KKB6	28.6	41.7	Negative
	KKB7	28.8	37.5	Positive
PURWOREJO	KPW1	38.7	42.0	Positive
	KPW2	38.2	40.2	Positive
	KPW3	28.2	39.5	Negative
	KPW4	28.6	40.2	Negative
	KPW5	37.7	43.3	Positive
	KPW6	38.0	40.3	Positive
	KPW7	38.7	40.3	Positive

\* Growth on Skim Milk medium

\*\* Growth on AFPA medium

Table 2. The ability of non-aflatoxic strains to degrade AFB1 (GAN medium) \*

Aspergillus strain	% of AFB1 degraded
KKB2	68.87
KKB4	84.35
KKB6	47.60
KPW3	65.33
KPW4	67.34

\* data was obtained from 2 batches

Table 3. The Rf value of spots formed after degradation of AFB1 by using non-aflatoxic strains

Rf value of standard	Rf value of degradation product by strain				
	KKB2	KKB4	KKB6	KPW3	KPW4
AFB1: 0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
AFB2: 0.47	-	-	-	-	-
AFG1: 0.43	-	-	-	-	-
AFG2: 0.36	-	-	-	-	-
	0.24	-	0.24	-	-
	-	-	-	-	0.22
	0.21	0.21	0.21	-	-
	-	-	-	0.19	0.19
	-	-	-	0.17	-
	-	-	-	0.14	-
	-	-	-	-	-
	-	0.11	0.11	-	-
	-	-	0.09	0.09	-

Table 4. The characteristics of strain KKB4, KKB6 and KPW3

Characteristics	<i>A. oryzae</i>	KKB4	KKB6	KPW3
<b>Growth on CYA</b>				
1. colony diameter (mm)	55-70	62	62	64
2. conidial color				
3. mycelial color	yellow-green	yellow-green	olive-brown	olive
4. exudate	white	white	white	white
5. soluble pigment	-	-	-	-
6. reverse	-	-	-	-
	uncolor / dull yellow	dull yellow	dull yellow	dull yellow
<b>Growth on MEA</b>				
1. colony diameter (mm)	60-70	70	67	67
2. conidial color				
3. mycelial color	yellow-green	yellow-green	yellow-green	yellow-green
4. exudate	white	white	white	white
5. soluble pigment	-	-	-	-
6. reverse	-	-	-	-
	dull yellow	uncolored	uncolored	uncolored
<b>Growth on CYA (37°C) : mm</b>	<b>40-65</b>	<b>61</b>	<b>55</b>	<b>62</b>
<b>Microscopic</b>				
1. conidial head	radiate-columnar	radiate	radiate	radiate
2. stipes	(500-5000)	1700	1400	910
3. vesicle shape	clavate/subglobose	clavate	clavate	clavate
4. vesicle size (µm)	8-90	24	25	23
5. metulae size(µm)	2-15X4-5	9.5	10	8
6. phialide (bi/uni)	uni/biseriate	uni/biseriate	uni/biseriate	uni/biseriate
7. phialide size(µm)	8-15X3-5	10	7	10
8. conidial shape	globose/ellips	globose	globose	globose
9. conidial size(µm)	3.5-4X8-10	7.5	6	5
<b>Suspected species (according to the key)</b>		<b><i>A. oryzae</i></b>	<b><i>A. oryzae</i></b>	<b><i>A. oryzae</i></b>

Table 5. The characteristics of strain KKB2 and KPW4

characteristics	<i>A. flavus</i>	KKB2	<i>A. parasiticus</i>	KPW4
<b>Growth on CYA</b>				
1 colony diameter (mm)	65-70	70	50-70	64
2 conidial color	olive-green	olive	dark olive	olive
3 mycelial color	white	white	white	white
4 exudate	uncolored	uncolored	-	-
5 soluble pigment	-	-	-	-
6 reverse	uncolored	uncolored	uncolored	uncolored
<b>Growth on MEA</b>				
1 colony diameter (mm)	60-70	70	40-70	70
2 conidial color	olive-green	olive	dark green /olive	olive
3 mycelial color	white	white	white	white
4 exudate	-	-	-	-
5 soluble pigment	-	-	-	-
6 reverse	uncolored - yellow	uncolored	uncolored-dull yellow	dull yellow
<b>Growth on CYA (37°C) : mm</b>	<b>50-70</b>	<b>67</b>	<b>55-70</b>	<b>69</b>
<b>Microscopic</b>				
1 conidial head	Radiate-columnar	Radiate	Radiate	Radiate
2 stipes	250-2500	840	100-900	515
3 vesicle shape	spherical-elongated	spherical	spherical-ellips	spherical
4 vesicle size (µm)	12-20x45-85	22x40	10-40	28
5 metulae size(µm)	6-16x4-7	-	-	-
6 phialide (bi/uni)	bi/uniseriate	uniseriate	uniseriate	uniseriate
7 phialide size(µm)	7-12x3-4	7x3	8-11x5-7	10x5
8 conidial shape	globose-ellips	globose	globose	globose
9 conidial size(µm)	3-8	3	3-7	3.5-5
10 conidia wall	fine	fine	rough	rough
<b>Suspected species (according to the key)</b>		<b><i>A. flavus</i></b>		<b><i>A. parasiticus</i></b>

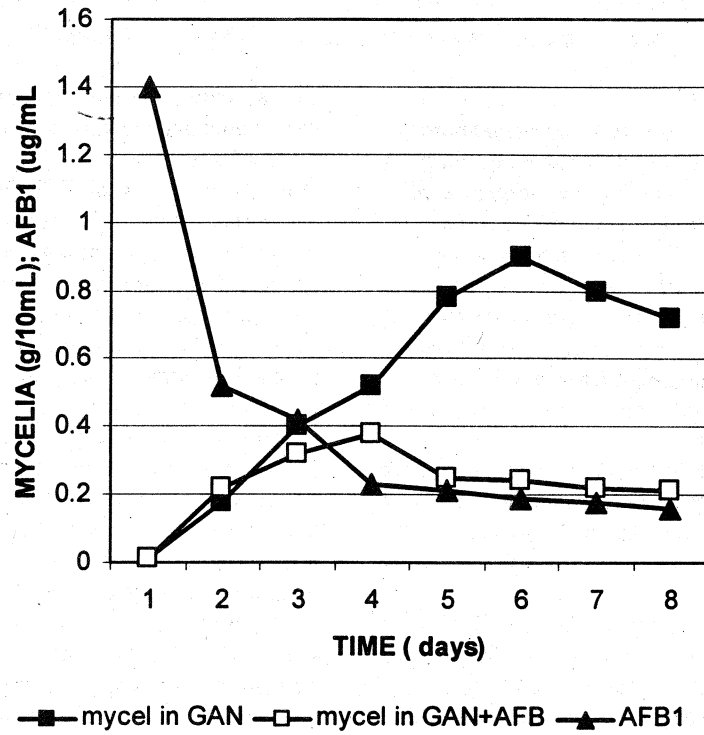


Figure 1. The growth of *A. oryzae* KKB4 in medium containing AFB1 and medium without AFB1

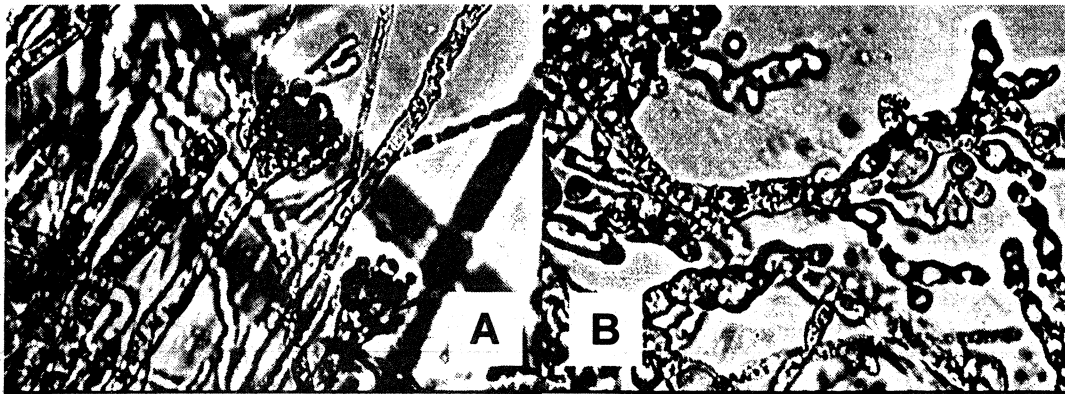


Figure 2. The morphological characteristics of *A. oryzae* KKB4  
A: in GAN medium B : in GAN + AFB1 medium