

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR PENGHASIL MIKOTOKSIN PADA BIJI KAKAO KERING YANG DIHASILKAN DI FLORES

Emilia Simplisiu Ake Wangge, Dewa Ngurah Suprpta, dan Gusti Ngurah Alit
Susanta Wirya*)

Program Studi Bioteknologi Pertanian Program Pascasarjana Universitas Udayana

*) corresponding author at: Jl. PB. Sudirman Denpasar 80362 Bali

E-mail address: alitsusanta@yahoo.com

Abstract

A study entitled “Isolation and Identification of Mycotoxin-producing Fungi on Cocoa Beans Produced in Flores” was done in order to know the population and species of fungi and to know the concentration of mycotoxin in the dried cocoa beans. The dry cocoa beans used in this study were collected from several locations in Flores. Isolation of the fungi was done using Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), while the determination of mycotoxin concentration was done based on Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Results of this study showed that, there were several fungi were found in the dried cocoa beans produced in Flores, namely *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus* and *Mucor* sp. All tested dried cocoa beans contained aflatoxin B1, where the highest aflatoxin B1 concentration was found in the fermented beans from West Manggarai with the concentration at 3.65 ppb, while the lowest concentration was 2.21ppb, which was found in the cocoa beans from Nagekeo. The highest concentration of ochratoxin A was 0.38 ppb, which was found in the cocoa beans from West Manggarai, while no ochratoxin A was detected in the cocoa beans from Ende.

Key world : jamur, mikotoksin, kakao kering

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas ekspor yang dapat memberikan kontribusi untuk peningkatan devisa. Indonesia merupakan negara pengekspor kakao terbesar ketiga di dunia dengan kontribusi sebesar 13 % setelah Pantai Gading (38%) dan Ghana (19%)(Wahyudi *et al.*,2008).Kondisi ini merupakan suatu peluang yang baik karena Indonesia berpotensi untuk menjadi produsen utama kakao dunia.

Kualitas biji kakao yang diekspor oleh Indonesia dikenal rendah. Di Amerika Serikat, biji kakao Indonesia selalu mendapatkan penahanan (*automatic detention*)

karena sering ditemukan jamur, kotoran, serangga dan benda asing lainnya (Rahmadi, 2008). Banyak faktor yang mempengaruhi mutu biji kakao kering, diantaranya 75 % oleh teknik pengolahan dan 25 % oleh jenis kakao, situasi dan kondisi daerah produksi (Badrun, 1991).

Biji kakao dapat ditumbuhi jamur dan jamur yang sering ditemui pada biji kakao yang proses penanganan dan pengolahan yang tidak tepat adalah jamur dari genera *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicilium*, dan *Rhizopus* (Aroyeun dan Adegoke, 2006). *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus* dan *A. niger* merupakan jamur yang dapat menghasilkan mikotoksin pada biji kakao kering (Rahmadi dan Fleet, 2007). Konsumsi produk pangan yang terkontaminasi mikotoksin dapat menyebabkan mikotoksikosis (Rahayu, 2006).

Flores merupakan salah satu dari puluhan pulau di Propinsi NTT yang memiliki produksi biji kakao kering yang cukup baik. Berdasarkan produksi kakao di Flores dan bahaya kontaminasi jamur penghasil mikotoksin pada biji kakao kering maka penulis melakukan suatu penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi jamur yang terdapat pada biji kakao kering yang berasal dari berbagai daerah di Flores, serta meneliti tentang jamur apa yang dapat menghasilkan mikotoksin pada biji kakao kering.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis jamur, populasi jamur, dan kadar aflatoxin B1 dan Ochratoxin A yang terdapat pada biji kakao kering yang dihasilkan di Flores.

2. Bahan dan Metode

2.1 Bahan penelitian

Penelitian ini dilakukan bulan Juni sampai bulan Agustus 2011. Isolasi dan identifikasi jamur dan pengujian kadar aflatoxin B1 dan Ochratoxin A dilaksanakan di Laboratorium Balai Besar Veteriner Denpasar. Biji kakao kering yang digunakan dalam penelitian adalah biji kakao kering terfermentasi dan tidak terfermentasi yang dihasilkan di Flores yaitu Kabupaten Manggarai Timur,

Kabupaten Manggarai Barat, Kabupaten Ngada, Kabupaten Nagekeo, Kabupaten Ende, Kabupaten Sikka, Kabupaten Flores Timur dan Kabupaten Lembata.

2.2 Isolasi dan identifikasi jamur

Isolasi jamur dilakukan dengan menggunakan media SDA (*Sabouraud Dextrosa Agar*). Proses identifikasi jamur berdasarkan ciri-ciri dan karakter morfologis secara makroskopis (visual) dan mikroskopis dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 x. Identifikasi jamur dilakukan berdasarkan panduan Pitt dan Hocking (1997), Samson *et al.* (1995), dan Olds (1975).

2.3 Analisa mikotoksin

a. Penentuan konsentrasi aflatoksin B1 dan Okratoksin A

Pengujian kadar toksin dilakukan berdasarkan uji ELISA (*Enzym Linked Immunosorbant Assay*) plate (Ridascreen Fast Aflatoksin) dengan menggunakan DOA Aflatoksin B1 ELISA Test Kit buatan Thailand tahun 2009 (Chinaphuti *et al.*, 2009). Sedangkan pengujian kadar okratoksin A dilakukan berdasarkan uji ELISA (*Enzym Linked Immunosorbant Assay*) plate (Ridascreen Fast Okratoksin A) dengan menggunakan Okratoksin A ELISA Test Kit buatan Amerika tahun 2011.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Jenis jamur pada biji kakao kering di flores

Berdasarkan hasil isolasi jamur pada media Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), terdapat beberapa jenis jamur pada biji kakao kering yang dihasilkan di Flores yaitu *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus fumigatus* dan *Mucor* sp.

Berdasarkan hasil pengamatan, secara makroskopis spesies *A. niger* menampakkan koloni kompak berwarna putih, dan kuning pada permukaan bawah koloni yang akan berubah menjadi coklat gelap sampai hitam setelah terbentuk konidiospora. Secara mikroskopis bentuk badan buah *A. niger* dicirikan dengan vesikula berbentuk bulat hingga semi bulat. Konidia bulat hingga semi bulat, dan berwarna coklat. Spesies *A. flavus*, secara makroskopis memiliki ciri koloninya

pada saat mudaberwarna putih, dan akan berubah menjadi berwarna hijau kekuningan setelah membentuk konidia. Secara mikroskopis ciri dari badan buah *A. flavus* adalah vesikula berbentuk bulat hingga semi bulat dan konidia berbentuk bulat hingga semi bulat. Species *A. parasiticus*, memiliki ciri-ciri sebagai berikut : koloni hijau gelap, konidiofor dengan satu set sterigmata, bentuk visikelnya bulat. Species *A. fumigatus*, memiliki ciri-ciri koloni saat muda berwarna putih dan dengan cepat berubah menjadi hijau dengan terbentuknya konidia. Konidiofor pendek, dan berwarna hijau (khusus pada bagian atas). Vesikula berbentuk gada. Konidia bulat hingga semi bulat, berinding kasar.

Mucor sp., memiliki koloni berwarna putih dan akhirnya berwarna kelabu, berwarna kuning dan halus, hifa tidak berseptat kadang-kadang membentuk cabang, sporangiospora tumbuh pada seluruh bagian miselium, kolumela berbentuk bulat, dan tidak membentuk stolon (Fardiaz, 1989).

3.2 Populasi jamur pada biji kakao kering terfermentasi yang dihasilkan di Flores.

Hasil penelitian menunjukkan populasi jamur pada sampel MB1 lebih tinggi dari sampel lain yang diteliti, hal ini disebabkan proses fermentasi yang dilakukan oleh petani asal Manggarai Barat kurang tepat yaitu menggunakan alat yang kurang higienes seperti wadah yang digunakan untuk proses fermentasi oleh para petani adalah karung-karung bekas mengisi pupuk atau hasil pertanian lainnya yang memungkinkan adanya kontaminasi mikroba yang tidak diinginkan. Rahmadi (2008) menyatakan titik kritis fermentasi adalah pada flora awal dimana terjadi cemaran bakteri pathogen dan jamur penghasil toksin. Selain itu, selama proses fermentasi, tidak dilakukan pembalikan/pengadukan. Hal ini menyebabkan bakteri penghasil spora dan jamur berfilamen muncul dan beberapa diantaranya dapat memproduksi toksin. Minifie (1999) menyatakan selama fermentasi terjadi proses yang kompleks sehingga memungkinkan biji kakao tersebut terserang jamur penghasil mikotoksin.

Tabel 1. Populasi Jamur yang Diisolasi dari berbagai Sampel Biji Kakao Kering Terfermentasi yang dihasilkan di Flores

No	Kode Sampel	Jamur ($\times 10^2$ cfu/g)					Total Jamur
		<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>Mucor</i> sp.	
1	MB1	240	40	0	20	20	320
2	MB2	100	40	0	40	40	220
3	MT1	0	60	70	60	40	230
4	MT2	0	50	80	40	20	190
5	ND1	90	0	80	40	30	240
6	ND2	110	0	70	40	20	240
7	NK1	60	0	60	0	20	140
8	NK2	40	0	100	0	20	160
9	ED1	200	40	70	0	0	310
10	ED2	110	50	0	0	0	160
11	SK1	60	60	80	30	0	230
12	SK2	80	20	30	30	0	160
13	FT1	80	40	50	0	0	170
14	FT2	100	50	60	0	0	210
15	LB1	100	30	0	80	0	210
16	LB2	70	40	0	70	0	180

3.3 Populasi jamur pada biji kakao kering yang tidak terfermentasi

Hasil penelitian menunjukkan total populasi jamur yang tinggi pada biji kakao pada sampel MT3 disebabkan karena proses pengeringan yang dilakukan petani kurang tepat. Dari hasil pengamatan, wadah yang digunakan oleh para petani untuk menjemur biji kakao adalah terpal, karung atau tikar bekas dan pengeringan tidak optimal. Karena pengeringan yang kurang baik, maka kadar air pada biji kakao menjadi tinggi yaitu lebih dari 7,5 %. Hal ini menyebabkan biji kakao mudah terserang jamur. Pitt dan Hocking (1997) menyatakan kadar air bahan mempengaruhi daya tahan bahan terhadap serangan mikroba. Pengeringan harus berlangsung dibawah suhu 60°C cukup cepat untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri penghasil spora (Rahmadi, 2008).

Tabel 2. Populasi Jamur yang Diisolasi dari berbagai Sampel Biji Kakao Kering yang tidak Terfermentasi yang dihasilkan di Flores

No	Kode Sampel	Jamur (x 10 ² cfu/g)					Total Jamur
		<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>Mucor</i> sp.	
1	MB3	40	10	0	20	20	90
2	MB4	40	10	0	10	10	70
3	MT3	10	20	80	0	20	130
4	MT4	0	20	60	0	10	90
5	ND3	30	20	50	0	20	120
6	ND4	20	30	40	0	20	110
7	NK3	0	0	40	20	20	80
8	NK4	0	0	40	10	20	70
9	ED3	20	10	0	20	0	50
10	ED4	10	10	0	40	0	60
11	SK3	30	20	60	0	0	110
12	SK4	20	20	60	0	0	100
13	FT3	10	10	30	0	20	70
14	FT4	20	20	40	0	10	90
15	LB3	60	0	10	0	0	70
16	LB4	40	0	20	0	0	60

3.4 Konsentrasi aflatoksin B1 pada biji kakao kering di flores

Konsentrasi aflatoksin B1 tertinggi terdapat pada sampel yang berasal dari Manggarai Barat (MB1), hal ini disebabkan karena fermentasi yang dilakukan kurang tepat seperti menggunakan wadah yang tidak tepat. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin adalah (1) pengaruh aerasi, dimana proses fermentasi yang dilakukan pada wadah yang tidak memiliki aerasi yang bagus (2) pengaruh atmosfer (gas udara) seperti CO₂, dan O₂; (3) suhu, dimana suhu optimum untuk memproduksi toksin yaitu 25⁰C ; (4) pengaruh kelembaban, dimana RH pada proses fermentasi lebih dari 80 % (Syarif et al.,2003).

Sampel ED3 merupakan sampel dengan konsentrasi aflatoksin terendah, hal ini disebabkan karena proses pengeringan dan penyimpanan cukup baik. Adapun proses pengeringan yang dilakukan adalah biji kakao yang telah dikupas dari kulit buahnya langsung dijemur di atas lantai semen dan terpal yang bersih dan

mendapat sinar matahari yang cukup. Wahyudi *et al*, (2008) menyatakan biji kakao yang setelah dikupas dari kulit buahnya, langsung dijemur akan mempercepat proses pengeringan sehingga biji kakao tersebut terhindar dari serangan jamur penghasil aflatoksin.

Tabel 3. Konsentrasi Aflatoksin B1 pada berbagai Sampel Biji Kakao Kering yang Terfermentasi yang dihasilkan di Flores

No	Kode Sampel	Konsentrasi Aflatoksin B1 (ppb)	No	Kode Sampel	Konsentrasi Aflatoksin B1 (ppb)
1	MB1	3.65	17	ED3	2.21
2	MB2	3.45	18	ED4	2.38
3	MB3	3.4	19	ED1	3.61
4	MB4	3.4	20	ED2	3.41
5	MT1	3.62	21	SK1	3.61
6	MT2	3.38	22	SK2	2.61
7	MT3	3.58	23	SK3	3.2
8	MT4	3.4	24	SK4	3.4
9	ND1	3.61	25	FT1	3.35
10	ND2	3.62	26	FT2	3.45
11	ND3	3.4	27	FT3	2.59
12	ND4	3.2	28	FT4	2.85
13	NK1	3	29	LB1	3.46
14	NK2	3.12	30	LB2	3.36
15	NK3	3.2	31	LB3	2.54
16	NK4	3	32	LB4	2.41

3.5 Konsentrasi okratoksin A pada biji kakao kering

Kontaminasi jamur penghasil mikotoksin pada berbagai produk pangan dipengaruhi oleh beberapa faktor dan sangat kompleks. Faktor biologi, fisik dan kimia saling berinteraksi dalam proses terjadinya proses metabolisme sekunder jamur, yaitu dimana mikotoksin tersebut diproduksi. Produksi okratoksin dipengaruhi oleh adanya interaksi dari beberapa faktor seperti suhu, substrat dan kadar air bahan. Pengeringan biji kakao yang tidak maksimal akan mengakibatkan tumbuhnya jamur penghasil okratoksin seperti spesies *A. niger*. Rahmadi dan Fleet (2008) menyatakan *A. niger* diketahui berpotensi memproduksi Okratoksin

A, hal ini juga dikatakan oleh Bisbal *et al.*, (2009) bahwa spesies *A. niger* merupakan sumber kontaminasi okratoksin A pada produk kakao.

Faktor yang mempengaruhi tingginya kandungan okratoksinA pada biji kakao kering adalah tempat pengeringan, pengemasan dan tempat penyimpanan dan lama penyimpanan yang kurang baik. Okratoksin A terbentuk pada awal penjemuran biji kakao kering (Aroyeun dan Adegoke, 2006). Pengeringan biji kakao yang tidak mencapai 7,5 % memberi peluang untuk pertumbuhan jamur penghasil okratoksin (Bucheli *et al.*, 1998).

Tabel 4. Konsentrasi okratoksin A pada berbagai sampel biji kakao kering terfermentasi yang dihasilkan di flores

No	Kode Sampel	Konsentrasi Okratoksin A (ppb)	No	Kode Sampel	Konsentrasi Okratoksin A (ppb)
1	MB1	0.38	17	ED1	0.31
2	MB2	0.32	18	ED2	0.25
3	MB3	0.26	19	ED3	Tidak terdeteksi
4	MB4	0.23	20	ED4	0.18
5	MT1	0.34	21	SK1	0.34
6	MT2	0.37	22	SK2	0.36
7	MT3	0.32	23	SK3	0.28
8	MT4	0.26	24	SK4	0.27
9	ND1	0.36	25	FT1	0.29
10	ND2	0.35	26	FT2	0.32
11	ND3	0.3	27	FT3	0.16
12	ND4	0.28	28	FT4	0.26
13	NK1	0.24	29	LB1	0.31
14	NK2	0.26	30	LB2	0.26
15	NK3	0.18	31	LB3	0.21
16	NK4	0,19	32	LB4	0.16

4. Kesimpulan

1. Biji kakao kering di Flores baik yang terfermentasi maupun yang tidak terfermentasi terkontaminasi oleh lima jenis jamur yakni : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* dan *Mucor* sp.

2. Total Populasi jamur pada biji kakao kering di Flores yang tidak terfermentasi berkisar antara 50×10^2 cfu/g sampai 130×10^2 cfu/g, sedangkan total populasi jamur pada biji kakao kering terfermentasi di Flores berkisar antara 140×10^2 cfu/g sampai 320×10^2 cfu/g.
3. Konsentrasi aflatoksin B1 pada biji kakao tertinggi terdapat pada sampel MB1 (Manggarai Barat) yaitu 3,65 ppb sedangkan konsentrasi aflatoksin B1 terendah terdapat pada sampel ED3 (Ende) yaitu 2,21 ppb.
4. Konsentrasi okratoksin A pada biji kakao tertinggi terdapat pada sampel MB1 (Manggarai Barat) yaitu 0,38 ppb sedangkan konsentrasi okratoksin A pada sampel ED3 (Ende) tidak terdeteksi.
5. Kandungan aflatoksin B1 dan okratoksin A pada berbagai sampel yang diteliti, masih berada dibawah kadar maksimal yang ditentukan oleh Komisi Perdagangan Eropa yakni 4 ppb, sehingga aman untuk dikonsumsi.

Daftar Pustaka

- Anonim. 2007. Discussion paper on ochratoxin A in cocoa. Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, First session. Beijing, China (16-20 April 2007, CX/CF07/1/19).
- Aroyeun, S.O. dan G.O. Adegoke. 2006. Reduction of ochratoxin A (OTA) in spiked cocoa powder and beverage using aqueous extracts and essential oils of *Aframomum danielli*. *Afr. J. Biotechnol.* 6:612-616.
- Badrun, M. 1991. Program Pengembangan Kakao di Indonesia. Prosiding Konferensi Nasional Kakao III, Medan. Buku 2 : 1-9.
- Chinaphuti, A., Trikarunasawad C., S. Aukkasarakul. 2009. DOA-Aflatoxin EISA Test Kit. Post-harvest Technology Research and Development Group, Post-harvest and Processing Research and Development Office. Department of Agriculture.
- Pitt, J. I. dan A.D. Hocking. 1997. *Fungi and Spoilage*. Blackie Academic and Professional. London.
- Rahmadi, A. dan G.H. Fleet. 2008. The Occurrence of Mycotoxigenic Fungi in Cocoa Beans From Indonesia and Queensland, Australia. Proceeding of International Seminar on Food Science, University of Soegiyapranata, Semarang Indonesia (FMB-10).
- Saad, N. 2001. Aflatoxin Occurrence and Health Risk. An Undergraduate Student Cornell University for the AS625 Class. Animal Science at Cornell University. p 1-10.
- Samson, R.A., E.S. Hoekstra, dan Van Oorschot C.A. 1981. *Introduction To Food-Borne Fungi*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures.