

Isolasi Jamur Potensial Penghasil Mikotoksin Pada Produk

Fermentasi Biji Kakao Kering asal Indonesia

Isolation of potential mycotoxigenic moulds in fermented and dried cocoa beans from Indonesia

Anton Rahmadi^{1*}, Graham, H. Fleet²

¹ PS Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman, Samarinda, INDONESIA; Email: arahmadi@unmul.ac.id

² Dept. Food Science dan Technology, the University of New South Wales, Sydney, AUSTRALIA

Abstract

*The presence of mycotoxins in cocoa beans dan chocolate products is emerging as an important public health issue dan has created a need for more information about the occurrence of mycotoxigenic fungi in cocoa beans. This project has surveyed the presence of filamentous fungi on dried cocoa beans from five plantations in Indonesia. Fungi were isolated by placing chlorine and non-chlorine disinfected beans onto the surface of plates of DG-18 agar, and also their populations were determined by spread plating onto DG-18 and DRBC agar. Fungal population in cocoa beans varied between $10^4 - 10^6$ CFU.g⁻¹. There was a high incidence of potentially mycotoxigenic filamentous fungi on all bean samples. The main species were *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus clavatus*, *Penicillium citrinum*, and *Penicillium spinolosum*. Chlorine treatment of the beans decreased the incidence and diversity of fungal species detected.*

1 Pendahuluan

Produksi biji kakao kering secara global mengalami peningkatan tahunan 6-10% sejak kurun 2001/2002 hingga 2005/2006 (ICCO, 2007). Saat ini, pasar kakao dunia berada pada kisaran 3,6 juta metrik ton dengan kontribusi Indonesia sebesar 13% dari total produksi (ICCO, 2007; UNCTAD, 2007a). Persentase tersebut menempatkan Indonesia sebagai produsen terbesar ketiga di dunia. Dalam perdagangan kakao, kualitas biji cokelat ditentukan salah satunya dengan kandungan jamur, dimana 3% adalah batas maksimal yang diperkenankan untuk grade I, dan maksimal 4% untuk grade II (Minifie, 1980). Standar perdagangan ini tidak berubah selama 25 tahun (Minifie, 1999; UNCTAD, 2007b). Lebih lanjut, CODEX Alimentarius (2001a, b, c) merilis tiga revisi standar perdagangan kakao, tetapi tidak menyentuh aspek kontaminasi jamur penghasil toksin ataupun metabolitnya.

Dalam berbagai penelitian (Galvez *et al*, 2006; Jespersen *et al*, 2005; Schwan dan Wheals, 2004; Ardhana dan Fleet, 2003; Schwan, 1998; Schwan *et al*, 1997) proses yang kompleks terjadi selama fermentasi biji cokelat, sehingga dimungkinkan tumbuhnya mikroorganisme yang tidak diinginkan seperti jamur penghasil toksin (Minifie, 1999). Kakao merupakan biji buah dari pohon cokelat, *Theobroma cacao* L, yang tumbuh baik di daerah tropis seperti Indonesia, Amerika Latin dan Afrika (Ardhana dan Fleet, 2003; Schwan dan Wheals, 2004; Nielsen *et al*, 2007). Biji dan pulp yang menutupinya dikeluarkan dari buah dan dijemur di atas plastik terpal, boks, ataupun papan. Fermentasi umumnya terjadi secara spontan dan dipengaruhi oleh mikroorganisme awal yang terdapat pada biji cokelat.

Umumnya mikroflora awal yang terdapat pada biji kakao adalah kamir dan bakteri asam laktat (Schwan dan Wheals, 2004; Jespersen *et al.*, 2005; Camu *et al.*, 2007a). Akan tetapi pada biji cokelat asal Indonesia, kapang juga berperan aktif dalam tahap awal proses fermentasinya (Ardhana dan Fleet, 2003). Proses fermentasi dibagi ke dalam dua kelompok besar, tahap awal (0-48 jam) dan tahap lanjut (48-120 jam). Pada tahap awal, beberapa jamur ditemukan tumbuh yaitu *Aspergillus versicolor*, *A. Wentii*, *Penicillium citrinum*, *P. purpogenum*, dan *P. ochrochloron* (Ardhana dan Fleet, 2003). Kapang-kapang ini bertahan pada konsentrasi antara 10^2 - 10^3 CFU.g⁻¹ yang kemudian menurun hingga tidak terdeteksi (< 100 CFU.g⁻¹) setelah 36 jam. Jamur-jamur ini dilaporkan juga memproduksi enzim-enzim untuk mendegradasi pektin (Ardhana dan Fleet, 2003).

Pada tahap lanjut (setelah 48 jam), tidak dilaporkan adanya pertumbuhan jamur hingga proses fermentasi selesai, melainkan didominasi oleh bakteri asam asetat. Selama proses pengeringan, aktifitas mikroorganisme masih terus berlangsung hingga membentuk karakter aroma, tekstur, dan warna yang spesifik (Ardhana dan Fleet, 2003; Nielsen *et al.*, 2007).

Seperti yang dikemukakan Minifie (1980), jamur tumbuh di produk biji kakao dan menurut Pitt dan Hocking (1997) hampir semua fungi memproduksi toksin, yang disebut mikotoksin. ICMSF (2005) melaporkan kemungkinan adanya aflatoksin dan okratoksin A di produk kakao, kacang-kacangan, dan sereal. Studi lanjut yang mengkonfirmasi pernyataan ini dilakukan oleh Tafuri *et al* (2004) dan Mounjouenpou *et al* (2007), sementara Batista *et al* (2003) melaporkan hal yang sama untuk produk kopi.

Proses kontaminasi jamur dari produk kering kakao dimungkinkan karena pengeringan tidak sempurna, dalam hal ini Minifie (1980) memberikan titik kritis kadar air pada level 8% dan rekomendasi 6-7%.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari mikroflora jamur potensial memproduksi mikotoksin pada produk biji coklat, sehingga diharapkan dapat meminimalkan perkembangannya untuk menghasilkan kakao dengan kualitas yang lebih baik.

2 Material dan Metode

2.1 Sampel biji coklat

Biji coklat dari Kalimantan Timur diambil dari tiga perkebunan berlokasi di Samarinda pada tanggal 12 Juli 2007, Malinau, 12 Juli 2007, dan Penajam, 14 Juli 2007. Pengumpulan sampel ini bekerjasama dengan Unit Penelitian Pengembangan Perkebunan Propinsi Kalimantan Timur. Biji kakao asal Sulawesi dan Irian Jaya merupakan sampel komersial yang disediakan oleh Cadbury-Sweppes, Australia, bulan Juli 2005.

2.2 Media

Media yang digunakan untuk menumbuhkan jamur adalah Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar, DRBC (Oxoid, Basingstoke) dan Dichloran 18% Glycerol Agar, DG-18 (Oxoid, Basingstoke). Malt Extract Agar, MEA (Oxoid, Melbourne) digunakan untuk menumbuhkan jamur dalam kapasitas pengamatan morfologi koloninya. *Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar, AFPA (Oxoid, Basingstoke) digunakan untuk mengkonfirmasi spesies *Aspergillus flavus* dan *A. Parasiticus*. Chloramphenicol (Oxoid,

Basingstoke) ditambahkan (100 mg/L) ke dalam masing-masing media, digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang mungkin mengganggu.

Semua media disiapkan menurut rekomendasi yang diberikan dan disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

2.3 Isolasi jamur dari biji cokelat

2.3.1 Inokulasi langsung

2.3.1.1 Inokulasi langsung dengan disinfeksi permukaan

Untuk mengisolasi jamur, sampel biji cokelat diletakkan langsung di atas media agar DG-18. Larutan 0,4% klorin disiapkan dengan melarutkan klorin komersial (Sara Lee, South Australia) yang mengandung 42 g.L⁻¹ natrium hipoklorida (setara 4% klorin aktif) dalam air destilasi steril (1:9, v/v). Lima belas (15) biji direndam dalam 30-40 mL 0,4% klorin selama 2 menit. Setelah direndam, larutan dibuang dan biji-biji kakao dibilas dengan air destilasi steril selama 2 menit. Air rendaman dibuang dan biji cokelat diletakkan langsung di tengah cawan petri yang berisi agar DG-18. Selanjutnya, cawan-cawan tersebut diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 - 7 hari (Batista et al., 2003).

Pertumbuhan jamur yang berasal dari biji cokelat diobservasi harian sampai dengan 7 hari. Satu loop biomassa dari tiap koloni jamur yang berbeda dipindahkan ke media DG-18 dan DRBC baru untuk mendapatkan isolat murni. Cawan-cawan diinkubasikan selama 4 hari pada 25°C. Isolat murni disimpan pada suhu 5°C sebelum identifikasi.

2.3.1.2 Inokulasi langsung tanpa disinfeksi permukaan

Lima belas (15) biji cokelat direndam dalam air destilasi steril selama 2 menit. Air rendaman dipisahkan dari biji kakao, dan tiap-tiap biji cokelat diletakkan di atas cawan

agar DG-18 seperti yang telah disebutkan sebelumnya. Cawan-cawan diinkubasikan pada 25°C selama 3-7 hari (Batista *et al.*, 2003) dan diobservasi pertumbuhan koloninya hingga 7 hari. Koloni jamur dipindahkan dari media isolasi primer ke cawan agar DG-18 dan DRBC yang lain, sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya.

2.3.2 Frekuensi isolasi jamur

2.3.2.1 *Frekuensi isolasi jamur pada biji cokelat yang didisinfeksi*

Sepuluh (10) biji cokelat direndam dalam 30-40 mL of 0,4% klorin selama 2 menit. Setelah direndam, larutan dipisahkan dan biji-biji cokelat dibilas dengan air destilasi steril selama 2 menit. Air rendaman dibuang dan biji-biji kakao digunakan untuk analisa. Tiap-tiap biji kakao diletakkan di tengah cawan agar DG-18, yang kemudian diinkubasikan pada suhu 25°C selama 3-7 hari (Batista *et al.*, 2003).

2.3.2.2 *Frekuensi isolasi jamur pada biji cokelat yang didisinfeksi*

Satu set lain yang terdiri dari 10 biji cokelat dibasahkan dengan cara direndam dalam air destilasi steril. Air rendaman tersebut kemudian dipisahkan. Biji-biji kakao diletakkan secara individual di atas media agar DG-18 sebagaimana telah dijelaskan pada metode inokulasi langsung. Cawan-cawan diinkubasikan pada suhu 25°C selama 3-7 hari (Batista *et al.*, 2003) dan diobservasi pertumbuhan jamurnya hingga 7 hari.

2.3.2.3 *Identifikasi*

Spesies jamur diisolasi untuk diidentifikasi. Masing-masing koloni yang berbeda diobservasi dengan mikroskop fase kontras pada perbesaran 400 kali untuk menentukan nama spesiesnya. Proses identifikasi berbasarkan karakteristik koloni dan sel yang dijelaskan oleh Pitt dan Hocking (1997)

2.3.3 Populasi jamur

Sampel (10 g) biji kakao ditimbang secara aseptis. Biji-biji ini direndam dalam 90 mL 0,1% pepton cair steril (Oxoid, Melbourne) di dalam sebuah *Stomacher bag*. Setelah direndam selama 30 menit pada suhu 25°C hingga biji coklat menjadi lunak, campuran ini dihaluskan dalam *Stomacher 400* selama 3 menit, diikuti dengan penggoncangan dan pemijatan selama 3 menit untuk menghasilkan *homogenate* yang seragam. Pengenceran berseri dari *homogenate* dilakukan dalam 0,1% pepton cair steril. Larutan diaduk menggunakan sebuah *vortex mixer* sebelum ditransfer ke medium agar. *Aliquots* (0,1 mL) dari pengenceran yang dilakukan diinokulasikan dan diratakan dengan gelas hoki di atas permukaan agar DG-18 dan DRBC (Ardhana dan Fleet, 2003; Batista *et al.*, 2003).

Cawan-cawan diinkubasikan secara aerobik pada suhu 25°C selama 3-7 hari. Koloni jamur yang didapatkan dari cawan-cawan disub-kulturkan ke atas media DG-18 dan DRBC yang kemudian diinkubasikan selama 7 hari pada 25°C. Isolat murni disimpan pada suhu 5°C sebelum proses identifikasi dilakukan.

2.3.4 Identifikasi

Karakterisasi dan identifikasi dari tiap-tiap isolat dilakukan di University of New South Wales, Sydney. Identifikasi dilakukan berdasarkan observasi koloni dan morfologi sel menurut Pitt dan Hocking (1997) dan dibantu dengan pengamatan yang dilakukan oleh Dr. Ailsa D. Hocking dan Mr Nick Charley, Food Science Australia, CSIRO, North Ride, NSW.

2.3.4.1 *Morfologi sel*

Satu loop kultur diambil dari biomass yang tumbuh di atas agar DG-18 or DRBC dan diletakkan di atas sebuah gelas obyek. Biomassa tersebut dibasahi dengan larutan asam laktat dan etil alkohol (2:8) dan ditutup dengan *cover glass*. Identifikasi morfologi dilakukan di bawah mikroskop fase kontras (Nikon, Japan) pada perbesaran 400 dan 1000 kali. Karakteristik dari tiap-tiap kapang diidentifikasi menurut Ingold dan Hudson (1993) serta Pitt dan Hocking (1997).

2.3.4.2 *Konfirmasi Aspergillus flavus dan Aspergillus parasiticus*

Satu loop dari isolat koloni yang identik *A. flavus* atau *A. parasiticus* diinokulasikan di atas medium AFPA. Cawan tersebut diinkubasikan selama 1-2 hari pada 30°C (Pitt dan Hocking, 1997). Konfirmasi positif diperoleh apabila warna kuning cerah hingga jingga tampak mengelilingi koloni yang tumbuh (Pitt dan Hocking, 1997).

3 Hasil

3.1 *Inokulasi langsung tanpa disinfeksi permukaan*

Sembilan (9) genera kapang diisolasi dari sampel yang tidak didisinfeksi (Tabel 1). Jamur-jamur ini meliputi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Chaetomium*, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Epicoccum*, dan *Mucor*. *Aspergillus* dan *Penicillium* merupakan genera yang mendominasi produk biji kakao kering asal Indonesia.

Spesies jamur yang paling sering ditemukan adalah *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. clavatus* dan *Penicillium citrinum* (Tabel 1). Dalam genus *Aspergillus*, terdapat *A. flavus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, serta dalam kategori yang kurang penting, *A.*

wentii, merupakan jamur-jamur potensial penghasil mikotoksin. Spesies lain juga terdapat secara sporadis, yaitu *Stemphylium sp.*, *Chaetomium globosum*, dan *Fusarium spp.* Dalam jumlah yang relatif lebih sedikit dibanding spesies-spesies yang telah disebutkan sebelumnya. Sampel yang berasal dari Penajam, secara khusus, menunjukkan diversitas jamur yang paling tinggi dengan 10 spesies yang berbeda dalam lima genera. Akan tetapi, hanya enam spesies kapang dalam empat genera jamur yang berhasil diisolasi dari sampel yang berasal dari Sulawesi. Kamir tidak ditemukan pada semua sampel, kecuali pada biji kakao yang berasal dari Irian Jaya.

3.2 Inokulasi langsung dengan disinfeksi permukaan

Tabel 2 menunjukkan diversitas spesies jamur yang diisolasi dari biji-biji coklat yang telah didisinfeksi dengan klorin. Dalam kasus ini, jumlah spesies yang berhasil diisolasi lebih sedikit bila dibandingkan dengan perlakuan sebelumnya. *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. wentii*, dan *A. clavatus* masih merupakan spesies utama yang berhasil diisolasi dari biji coklat. Sampel yang berasal dari Samarinda (Indonesia) memiliki spesies kapang terbanyak yang terdiri dari enam genera. *Eupenicillium cinnamopurpureum* dan *Epicocum nigrum* muncul setelah perlakuan disinfeksi, namun tidak muncul dalam sampel dari lokasi yang sama tetapi tidak didisinfeksi. Sebaliknya, *Stemphylium sp.* dan *Chaetomium globosum* tidak ditemukan pada sampel-sampel yang didisinfeksi (Tabel 2).

3.3 Frekuensi isolasi kapang

Aspergillus flavus merupakan spesies dengan frekuensi paling sering diisolasi dari biji coklat, diikuti oleh *A. niger*, *A. clavatus*, dan *A. wentii* (Tabel 3). Kemunculan *A. flavus* pada sampel yang berasal dari Penajam dan Malinau memiliki frekuensi 100%.

Aspergillus niger dominan pada sampel yang berasal dari Penajam dengan tingkat kemunculan 100% dari 10 biji kakao. Spesies *Aspergillus* yang lain, *A. clavatus*, ditemukan pada 10- biji coklat dari Malinau, sementara *A. wentii* juga ditemukan pada semua sampel yang berasal dari Penajam (Tabel 3). Terdapat sembilan spesies *Aspergillus* dan teleomorf-nya diobservasi dari biji-biji coklat (Tabel 3). Secara keseluruhan, spesies *Aspergillus* ditemukan dengan insiden terbanyak dari biji asal Penajam dengan 33 isolat. Sampel yang berasal dari Sulawesi dan Irian Jaya menunjukkan insiden terendah isolasi spesies *Aspergillus* (Tabel 3).

Penicillium species juga merupakan kapang dominan pada biji-biji coklat. *Penicillium citrinum* merupakan isolat yang paling sering ditemukan, diikuti oleh *P. spinulosum*. Sampel yang berasal dari Malinau dan Irian Jaya merupakan sumber insiden tertinggi spesies *Penicillium*, dengan empat isolat berhasil ditemukan dari setiap lokasi tersebut (Tabel 3).

Stemphylium sp. ditemukan dalam jumlah yang sedikit dari sampel yang berasal dari Malinau. *Epicoccum nigrum* juga berhasil dideteksi dari sampel yang berasal dari Sulawesi.

Disinfeksi pada permukaan biji coklat menggunakan klorin merubah mikroflora jamur yang diisolasi (Tabel 3), dimana penurunan jenis dan frekuensi jamur pada sampel-sampel juga terjadi. Sebagai contoh, pada 10 sampel biji kakao dari Malinau, semuanya menunjukkan pertumbuhan *A. flavus* (Tabel 3). *A. flavus* tidak terdeteksi pada sampel yang didisinfeksi (Tabel 4). Total isolat *Aspergillus* dari semua sampel turun dari 90 ke

31 isolat (65,6% reduksi), sementara jumlah isolat *Penicillium* juga menurun sebanyak empat (4) isolat (36,4%).

Pada biji kakao dengan perlakuan disinfeksi *flavus* (Tabel 4), *Aspergillus flavus* tetap mendominasi mikroflora biji kakao dibandingkan spesies *Aspergillus* lainnya. Spesies *Aspergillus* yang penting lainnya adalah *A niger* bersama dengan *A. wentii* dan *A. clavatus* (Tabel 4).

Spesies *Penicillium* juga dipengaruhi perlakuan dengan klorin. Hanya dua isolat, *P. spinulosum* dan *P. citrinum* yang ditemukan. *Mucor pyriformis* dapat dihambat pertumbuhannya, seperti yang tampak pada Tabel 4. Sebaliknya, perlakuan disinfeksi memberikan keuntungan untuk spesies yang kurang kompetitif seperti *Eupenicillium cinnamopurpureum* untuk dapat berkembang.

3.4 Populasi jamur pada media agar DRBC dan DG-18

Jamur dengan populasi tertinggi diperoleh pada sampel yang berasal dari Penajam dengan jumlah $2,1 \times 10^6$ dan $7,2 \times 10^6$ CFU.g⁻¹ on DRBC dan DG-18, secara berurutan. Sampel yang berasal dari Samarinda memberikan populasi tertinggi kedua dengan $2,0 \times 10^5$ CFU.g⁻¹ pada kedua media agar. Populasi terendah didapatkan dari sampel yang berasal dari Irian Jaya dengan angka 100 CFU.g⁻¹, sementara sampel yang berasal dari Sulawesi memiliki populasi kapang sedikit lebih banyak dibandingkan pada sampel yang asalnya dari Irian Jaya (Tabel 5).

4 Pembahasan

Jamur berfilamen yang diisolasi dari biji-biji cokelat terfermentasi dan telah dikeringkan adalah *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. wentii*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. versicolor*, *Eurotium chevaleri*, *Penicillium citrinum*, *P. spinulosum*, *P. corylophilum*, *Eupenicillium cinnamopurpureum*, *Mucor pyriformis*, *Stemphylium sp.*, *Chaetomium globosum*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sp.*, dan *Geotrichum candidum*. Beberapa spesies penting, utamanya dalam genera *Aspergillus* dan *Penicillium*, juga dilaporkan dalam riset-riset sebelumnya (Hansen dan Welty, 1970; Ogundero, 1983; Ardhana dan Fleet, 2003; Schwan dan Wheals, 2004; Camu *et al.*, 2007a). Akan tetapi, *Eupenicillium cinnamopurpureum*, *Stemphylium sp.*, dan *Chaetomium globosum*, yang ditemukan secara sporadis pada biji kakao yang didisinfeksi, belum pernah diasosiasikan sebagai kontaminan pada produk kakao sebelumnya. Spesies ini dikenal sebagai jamur tanah dan udara (Williams *et al.*, 2006).

Pada penyimpanan dalam waktu yang lama, produk pertanian kering dapat terinfeksi oleh *Aspergillus niger* dan *Eurotium sp.* (ICMSF, 2005; Pitt, 2006). Hasil-hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* merupakan spesies dengan frekuensi paling sering kedua yang berhasil diisolasi dari biji kakao yang tidak didisinfeksi (Tabel 1). *Eurotium chevaleri* dapat ditemukan pada sampel biji cokelat asal Penajam (Tabel 1).

Kapang diisolasi dari 15 biji kakao untuk tiap-tiap lokasi (Tabel 1 dan Tabel 2). Biji cokelat tersebut telah diperlakukan atau tidak diperlakukan dengan klorin sebelumnya sebagai bagian dari metode disinfeksi permukaan sebelum disimpan di atas cawan yang berisi agar DRBC atau DG-18 (Batista *et al.*, 2003). Penggunaan klorin ditujukan untuk

menghilangkan kontaminasi pada permukaan produk-produk pertanian, yang berguna untuk mendapatkan gambaran infeksi jamur dalam produk-produk tersebut. (Hocking *et al.*, 1997; Pitt dan Hocking, 1997). Akan tetapi, larutan antiseptik juga dapat meresap ke dalam daging biji (*cotyledon*), sehingga spora jamur yang mungkin terdapat di dalamnya turut tidak aktif dan percobaan menghasilkan kesalahan *false negative* (Pitt dan Hocking, 1997).

Hasil-hasil pada inokulasi langsung menunjukkan bahwa perlakuan disinfeksi dengan klorin menurunkan diversitas spesies jamur yang diisolasi dari produk kakao. Batista *et al* (2003) melaporkan reduksi sebanyak 52% terhadap diversitas kapang pada produk kopi yang didisinfeksi dan yang tidak didisinfeksi. Hasil yang serupa dilaporkan pada penelitian ini, dimana pada Tabel 4, frekuensi kemunculan spesies *Aspergillus* dan *Penicillium* species di biji kakao mampu bertahan, secara berurutan, pada 34,4% dan 63,6% untuk biji cokelat yang didisinfeksi (Tabel 4) dibandingkan dengan biji cokelat yang tidak didisinfeksi (Tabel 3).

Hasil ini memberikan saran bahwa kontaminasi permukaan merupakan sumber utama populasi jamur dalam biji kakao kering terfermentasi. Walaupun demikian, beberapa spesies *Aspergillus*, seperti *A. flavus*, *A. niger*, dan *A. wentii*, mampu menginvasi inti (*kernel*) dari biji-bijian saat masih dalam tahap pematangan buah (Lie, 2007; ICMSF, 2005).

Secara umum, dari semua sampel yang diujikan, spesies *Aspergillus* ditemukan dalam populasi yang lebih banyak bila dibandingkan dengan spesies *Penicillium*. Untuk dapat berkembang, *Aspergillus* memerlukan temperatur yang lebih tinggi, tetapi mampu

beradaptasi pada a_w (*water activity*) yang lebih rendah bila dibandingkan dengan *Penicillium*, dan spesies *Aspergillus* juga berkembang lebih cepat (Hocking, 2006). Genus ini, sekalipun memerlukan waktu yang lebih lama dan intensitas cahaya yang lebih untuk membentuk spora, tetapi juga memproduksi spora yang lebih banyak sekaligus lebih tahan terhadap bahan-bahan kimia (Hocking, 2006; Pitt, 2006).

Populasi kapang terbanyak yang didapatkan pada sampel yang berasal dari Penajam, dengan total populasi berkisar $2,1 \times 10^6$ dan $7,2 \times 10^6$ CFU.g⁻¹, secara berurutan pada medium DRBC dan DG-18. (Tabel 5). Semua sampel yang diperoleh di bulan Juli 2007 memiliki populasi fungi berkisar pada $2,3 \times 10^4$ hingga $7,2 \times 10^6$ CFU.g⁻¹.

Sampel dari Penajam dan Samarinda memberikan populasi kapang terbanyak baik yang diamati pada media DRBC maupun DG-18. Total jamur yang diperoleh dari kedua media berbeda sedikit namun tidak signifikan (Tabel 5). Fakta ini memberikan ide bahwa jamur-jamur yang tumbuh pada biji kakao toleran pada kondisi a_w yang rendah serta telah beradaptasi dengan kondisi kering pada biji coklat. Menurut ICMSF (2005), kandungan kadar air minimal untuk pertumbuhan jamur serofilik adalah 13.5%. Kadar air dapat meningkat saat transportasi produk dari daerah tropis ke negara-negara beriklim lebih dingin (Sharp, 1979).

5 Kesimpulan

Aspergillus dan *Penicillium* merupakan genera utama jamur yang diisolasi pada produk kakao. Spesies utama yang diisolasi adalah *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. clavatus*, *A. wentii*, *Penicillium citrinum* dan *P. spinolosum*. Frekuensi kemunculan dari *Aspergillus*

flavus dan *Aspergillus niger* dapat mencapai 100% pada beberapa sampel. Populasi jamur pada produk kakao segar asal Indonesia berkisar $2,3 \times 10^4 - 7,2 \times 10^6$ CFU.g⁻¹.

Perlakuan klorin mempengaruhi diversitas jamur yang diisolasi, juga frekuensi isolasinya pada produk kakao. Kemunculan spesies *Aspergillus* dan *Penicillium* dari jamur pada biji coklat dengan disinfeksi permukaan adalah 65,6% dan 36,4% lebih sedikit dibandingkan pada produk kakao tanpa disinfeksi.

Penelitian ini mendemonstrasikan adanya jamur potensial penghasil mikotoksin pada produk biji coklat kering asal Indonesia yang berkorelasi terhadap ditemukannya mikotoksin pada produk kakao, terutama Ochratoxin A. Riset lebih lanjut dibutuhkan untuk mempelajari pertumbuhan spesies-spesies jamur ini pada biji coklat, dan kondisi-kondisi yang menunjang produksi mikotoksin oleh kapang-kapang tersebut.

6 Ucapan terima kasih

Terima kasih disampaikan kepada Pemerintah Indonesia c.q. Dirjen Dikti dan Pemerintah Australia melalui AusAID.

7 Pustaka

- Ardhana, M.M. dan Fleet, G.H.. 2003. *The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia*. International J. Food Microbiology, 86: 87-99.
- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Prado, G. , Schwan, R.F., dan Wheals, A.E.. 2003. *Toxigenic fungi with processed (green) coffee beans (Coffee arabica L.)*. International J. Food Microbiology 85(3): 293-300.

- CODEX. 2001a. *Standard for Cocoa Butter*. Codex Alimentarius. [online at] http://www.codexalimentarius.net/download/standards/66/CXS_086e.pdf [1 Oktober 2007].
- CODEX. 2001b. *Standard for Cocoa powders (cocoas) dan dry mixtures of cocoa and sugars*. Codex Alimentarius. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/68/CXS_105e.pdf [1 Oktober 2007].
- CODEX. 2001c. *Standard for Cocoa (cacao) Mass (cocoa/chocolate liquor) and cocoa cake*. Codex Alimentarius. [online at] http://www.codexalimentarius.net/download/standards/69/CXS_141e.pdf [1 Oktober 2007].
- Camu, N., Winter, T. D. , Verbrugghe, K., Cleenwerck, I. , Vandamme, P. , Takrama, J. S., Vacanneyt, M., dan Vuyst. L. D. 2007a. *Dynamics dan biodiversity of populations of lactic acid bacteria dan acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana*. Applied and Environmental Microbiology 73: 1809-1824.
- Camu, N. A., Gonzalez, A., De-Winter, T. Van-Schoor, A. , De-Bruyne, K. , Vandamme, P. , Takrama, J. S. , Addo, S. K. , dan De-Vuyst, L. 2007b. *Influence of turning dan environmental contamination on the dynamics of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria populations involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana*. Applied and Environmental Microbiology in press.
- Galvez, S.L., Loiseau, G. , Paredes, J.L. , Barel, M. , dan Guiraud, J.P. 2007. *Study on microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic*. International J. Food Microbiology, 114: 124-130.
- Hansen, A. P. and Welty, R. E. 1970. *Microflora of raw cocoa beans*. Mycopathologia Mycologia Applicata **44**: 309-316.
- Hocking, A.D., *Aspergillus and Related Teleomorphs*. Di dalam C.W. Blackburn, Editor. 2006. *Food Spoilage Microorganisms*. CRC Press, Woodhead, UK. p. 451-477.
- Hocking, A.D., Arnold, G. , Jenson, I. , Newton, K. , dan Sutherland, P. 1997. *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. 5th ed. AIFST (NSW Branch) Food Microbiology Group., Australia.
- ICCO. 2007. Annual Report. 2005/2006 ed. *The International Cocoa Organization*, London, UK.
- ICMSF. 2005. *Microbial Ecology of Food Commodities*. 2nd ed. *Microorganisms in Food*, ed. 6. Chapman & Hall, UK.
- Ingold, C. T. dan Hudson, H. J. 1993. *The biology of fungi*. Ed: 6th. Chapman & Hall, UK.
- Jespersen, L., Nielsen, D. S. , Henholt, S. dan Jakobsen, M.. 2005. *Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans*. FEMS Yeast Research 5: 441-453.

- Lie, L. V. 2007. *Biocontrol of mycotoxigenic fungi in cocoa bean production by yeast*. Honours thesis (unpublished). Chemical Sciences and Engineering the University of New South Wales, Sydney.
- Mounjouenpou, P., Gueule, D. , Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P. R., dan Guiraud, J. P. 2007. *Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Camerron*. International J. Food Microbiology in press.
- Minifie, B.W. 1980. *Chocolate, cocoa, and confectionery*, ed. 2nd. AVI Publishing, Connecticut
- Minifie, B.W. 1999. *Chocolate, cocoa, and confectionery*, ed. 3rd. AVI Publishing, Connecticut
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D. , Ban-Koffi, L., Owusu, M. , Andersson, T. S., dan Holzapfel, W. H.. 2007. *The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analyzed using culture-dependent and culture-independent methods*. International J. Food Microbiology **114**: 168-186.
- Ogundero, V. 1983. *Thermophilic fungi and fermenting cocoa beans in Nigeria*. Mycopathologia **82**: 159-165.
- Pitt, J. I. 2006. *Penicillium and related genera*. Di dalam: C. W. Blackburn. *Food Spoilage Microorganisms*: 437-450. CRC Press, Woodhead, UK.
- Pitt, J.I. dan Hocking, A.D.. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. Blackie Academic & International, Australia
- Rahmadi, A. 2008. *The occurrence of mycotoxigenic moulds in cocoa beans from Indonesia, Solomon Islands, dan Queensland, Australia*. Master thesis (unpublished). Chemical Sciences and Engineering. the University of New South Wales, Sydney.
- Schwan, R. F. 1998. *Cocoa fermentations conducted with a define coctail inoculum*. Applied and Environmental Microbiology **64**: 1477-1483.
- Schwan, R F., Wheals, A.F. 2004. *The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality*. Critical Review in Food Science and Nutrition, 44, p. 205-221.
- Schwan, R.F., Cooper, R.M., dan Wheals, A.E. 1997. *Endopolygalacturonase secretion by Kluyveromyces marxianus and other cocoa pulp-degrading yeasts*. Enzyme and Microbiol Technology, 21, p. 234-244.
- Tafari, A., Ferracane, R., dan Ritieni, A. 2004. *Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products*. Food Chemistry, 88: 487-494.
- UNCTAD. 2007a. *Production, Cocoa Market*. United Nations Conference on Trade dan Development. <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/cocoa/market.htm> [6 Oktober 2007].
- UNCTAD. 2007b. *Cocoa Quality*. United Nations Conference on Trade and Development. <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/cocoa/quality.htm> [4 Oktober 2007].

Williams, A. P., Williams and Neaves. 2006. *Other type of spoilage moulds*. Di dalam:
C. W. Blackburn. Food Spoilage Microorganisms: 488-503. CRC Press,
Woodhead, UK.

LAMPIRAN

Tabel 1 Diversitas spesies jamur diisolasi dengan inokulasi langsung biji cokelat di atas media DG-18 tanpa disinfeksi permukaan.

Asal sampel	Spesies jamur
Penajam, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Eurotium chevaleri</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Penicillium spinolosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Mucor pyriformis</i>
Malinau, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Stemphylium sp.</i> , <i>Fusarium sp</i> (1 species)
Samarinda, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Fusarium sp</i> (1 spesies), <i>Geotrichum candidum</i>
Sulawesi (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. wentii</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Stemphylium sp.</i> , <i>Epicoccum nigrum</i>
Irian Jaya (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>P. spinolosum</i> , <i>Stemphylium sp.</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> , yeasts

Tabel 2 Diversitas spesies jamur diisolasi dengan inokulasi langsung biji cokelat di atas media DG-18 dengan disinfeksi permukaan.

Asal Sampel	Spesies jamur
Penajam, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A. ochraceus</i>
Malinau, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. niger</i> , <i>A. clavatus</i>
Samarinda, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Penicillium spinolosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Eupenicillium cinnamopurpureum</i> , <i>Mucor pyriformis</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Fusarium sp.</i>
Sulawesi (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. clavatus</i> , <i>E. cinnamopurpureum</i>
Irian Jaya (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>E. cinnamopurpureum</i>

Tabel 3 Frekuensi kemunculan spesies kapang di biji coklat tanpa perlakuan disinfeksi

Spesies	Frekuensi isolasi dari 10 biji coklat					Total Isolat
	Penajam	Malinau	Samarinda	Sulawesi	Irian Jaya	
<i>Aspergillus & teleomorf</i>						
<i>A. flavus</i>	10	10	5	1	2	28
<i>A. parasiticus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger</i>	10	1	3	1	1	16
<i>A. carbonarius</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. clavatus</i>	0	10	3	0	7	20
<i>A. wentii</i>	10	2	4	6	0	22
<i>A. ochraceus</i>	1	0	1	0	0	2
<i>A. versicolor</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Eurotium chevalieri</i>	1	0	0	0	0	1
Total <i>Aspergillus & teleomorf</i>	33	23	16	8	10	90
<i>Penicillium</i>						
<i>P. spinulosum</i>	2	0	0	0	2	4
<i>P. citrinum</i>	2	1	1	1	1	6
<i>P. corylophilum</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Eupenicillium cinnamopurpureum</i>	0	0	0	0	0	0
Total <i>Penicillium</i>	4	1	1	1	4	11
Lainnya						
<i>Mucor pyriformis</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Stemphylium</i>	0	2	0	0	0	2
<i>Chaetomium globosum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum nigrum</i>	0	0	0	1	0	1
Total lainnya	1	2	0	1	0	4

Tabel 4 Frekuensi kemunculan spesies kapang di biji coklat dengan perlakuan disinfeksi

Spesies	Frekuensi isolasi dari 10 biji coklat					Total Isolat
	Penajam	Malinau	Samarinda	Sulawesi	Irian Jaya	
<i>Aspergillus & teleomorphs</i>						
<i>A. flavus</i>	5	0	6	0	0	11
<i>A. parasiticus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger</i>	2	1	3	0	0	6
<i>A. carbonarius</i>	1	0	0	0	0	1
<i>A. clavatus</i>	2	3	0	1	0	6
<i>A. wentii</i>	4	0	2	0	0	6
<i>A. ochraceus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>A. versicolor</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Eurotium chevalieri</i>	0	0	0	0	0	0
Total <i>Aspergillus & teleomorf</i>	15	4	11	1	0	31
<i>Penicillium</i>						
<i>P. spinulosum</i>	0	0	2	0	0	2
<i>P. citrinum</i>	0	0	2	0	0	2
<i>P. corylophilum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Eupenicillium cinnamopurporeum</i>	0	0	1	1	1	3
Total <i>Penicillium</i>	0	0	5	1	1	7
Lainnya						
<i>Mucor pyriformis</i>	0	0	3	0	0	3
<i>Stemphylium</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetomium globosum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum nigrum</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Fusarium spp.</i>	0	0	1	0	0	1
Total lainnya	0	0	5	0	0	5

Tabel 5 Populasi jamur pada biji coklat di atas media agar DRBC dan DG-18.

Asal sampel	DRBC (CFU.g ⁻¹)	DG-18 (CFU.g ⁻¹)	Spesies jamur diisolasi
Penajam, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	2.100.000	7.200.000	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , yeasts
Malinau, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	38.000	23.000	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A.</i> <i>carbonarius</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium</i> <i>citrinum</i>
Samarinda, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	200.000	200.000	<i>Aspergillus wentii</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Geotricum candidum</i> , yeasts
Sulawesi (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	< 100	220	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Mucor</i> <i>pyriformis</i> , <i>Stemphylium sp.</i> , <i>Penicillium citrinum</i>
Irian Jaya (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	< 100	< 100	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. spinulosum</i>