

POLA PERTUMBUHAN *ASPERGILLUS OCHRACEUS* BIO 220 DAN PRODUKSI OKRATOKSIN A PADA JAGUNG DAN KEDELAI INVITRO

Sinta Simatupang¹, Winiati P. Rahayu^{2,3}, Hanifah N. Lioe², Dian Herawati^{2,3}, Wisnu Broto⁴,
Santi Ambarwati⁵

¹Program Studi Ilmu Pangan-Institut Pertanian Bogor;

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian- Institut Pertanian Bogor;

³SEAFast Center- Institut Pertanian Bogor;

⁴Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor;

⁵SEAMEO BIOTROP, Bogor

Email : wini_a@hotmail.com

Kapang toksigenik *Aspergillus ochraceus* penghasil mikotoksin dapat menimbulkan masalah kesehatan bila mengkontaminasi bahan pangan seperti jagung dan kedelai. Pertumbuhan kapang *A. ochraceus* dipengaruhi oleh perubahan iklim, seperti perubahan suhu dan kelembaban. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh perubahan suhu dan kelembaban terhadap pertumbuhan *A. ochraceus* dan jumlah okratoksin A yang diproduksinya. *Aspergillus ochraceus* BIO 220 diinokulasikan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA), jagung dan kedelai, kemudian diinkubasi selama 20 hari pada tiga kondisi suhu (20, 30, 40°C) dan tiga tingkat kelembaban (70, 80 dan 90%). Pertumbuhan miselium dan spora diamati setiap dua hari dan konsentrasi okratoksin A yang terbentuk dianalisis dengan RP-HPLC yang dilengkapi dengan *fluorescence detector* setelah 40 hari. Pertumbuhan kapang toksigenik *A. ochraceus* BIO 220 pada media laboratorium PDA, jagung dan kedelai optimal pada suhu 30°C dan kelembaban 90%. Pembentukan okratoksin A optimum pada jagung dan kedelai yang dikontaminasi dengan *A. ochraceus* BIO 220 pada suhu 20°C dan RH 80% masing-masing sebanyak 93 dan 45 ppb. Kapang *A. ochraceus* BIO 220 tidak dapat tumbuh pada jagung dan kedelai bila kondisinya ekstrim yaitu pada suhu 40°C dengan kelembaban 70, 80 dan 90 %.

Kata kunci : *Aspergillus ochraceus*, kelembaban, okratoksin, suhu

ABSTRACT. Sinta Simatupang, Winiati P. Rahayu, Hanifah N Lioe, Dian Herawati, Wisnu Broto, Santi Ambarwati. 2013. **Growth Pattern of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin A Production on Maize and Soybeans invitro.** Toxigenic fungi, *Aspergillus ochraceus* producing ochratoxin A can cause serious health problem if the fungi contaminated food product such as maize and soybean. *A. ochraceus* growth is affected by climate change including the change of temperature and relative humidity. This study was performed to evaluate the effect of temperature and relative humidity on *A. ochraceus* BIO 220 growth and its ochratoxin A production. *Aspergillus ochraceus* BIO 220 was inoculated in Potatoes Dextrose Agar (PDA) media, maize and soybean, then incubated at 3 different temperatures (20, 30, 40 °C) dan 3 different relative humidities (70, 80 dan 90%) for 20 days. Mycelium and spores were in observed every two days and the level of ochratoxin A was analyzed using RP-HPLC equipped by fluorescence detector after 40 days. Optimum growth for *A. ochraceus* BIO 220 in laboratory media, maize and soybean was at temperature 30 °C and relative humidity 90%, while the highest ochratoxin A level was reached in maize (93 ppb) and soybean (45 ppb) at temperature of 20 °C and 80 % relative humidities. *Aspergillus ochraceus* BIO 220 could not grow in maize and soybean media at extreme condition (temperature 40 °C and relative humidity 70, 80 dan 90 %).

Keywords : *Aspergillus ochraceus*, ochratoxin, relative humidity, temperature

PENDAHULUAN

Aspergillus ochraceus merupakan salah satu kapang toksigenik penghasil okratoksin A (OTA) yang dapat tumbuh pada berbagai produk hasil pertanian, seperti jagung, kacang-kacangan, kedelai, sorgum, kopi, kakao^{1,2,3}. Okratoksin A merupakan metabolit sekunder dari *A. ochraceus*, yang secara kimia merupakan turunan dari klorinat isokumarin yang berikatan melalui ikatan amida dengan kelompok amino dari L- β fenilalanina⁴. Saat ini diketahui ada 3 macam okratoksin yaitu okratoksin A, okratoksin B dan okratoksin C⁵. Selain *A. ochraceus*, kapang penghasil OTA adalah *A. Alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. meleus*, *A. niger* dan *Penicillium mordicum* serta *P. verrucosum*⁶. Keberadaan kapang tersebut berpotensi mengakibatkan terjadinya kontaminasi OTA pada produk pertanian. Pada tahun 2009, dilaporkan bahwa 25 % biji-bijian dari produksi global sebesar 2.200 juta ton terinfeksi oleh kapang toksigenik⁷. Kapang penghasil OTA yang paling sering dijumpai pada sereal adalah *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* dan *P. verrucosum*^{8,9}. Perubahan suhu dan kelembaban sebagai akibat dari perubahan iklim dapat mempengaruhi pertumbuhan kapang toksigenik dan interaksinya dengan media pertumbuhannya. Secara umum kapang toksigenik memiliki kisaran suhu optimum untuk pertumbuhannya dan peningkatan suhu dapat menyebabkan kapang toksigenik tumbuh lebih baik sehingga mampu berkompetisi dengan mikroba lainnya¹⁰. Kapang toksigenik penghasil OTA dapat tumbuh pada kisaran suhu 15-35 °C, Aw 0,95-0,99 dalam waktu 5-30 hari⁸, sedangkan suhu optimum untuk pertumbuhan dan produksi OTA oleh *A. ochraceus* adalah 25-30 °C¹¹.

Jagung merupakan bahan pangan yang penting di dunia karena memiliki banyak manfaat baik sebagai bahan pangan maupun sebagai pakan ternak. Beberapa daerah di Indonesia memanfaatkan jagung sebagai bahan campuran beras. Jagung dapat diolah lebih lanjut menjadi minyak dan tepung. Kedelai sebagai salah satu sumber protein nabati, umumnya dikonsumsi dalam bentuk produk olahan, seperti tahu, tempe, kecap, taucu, susu kedelai dan berbagai bentuk makanan ringan. Hal ini menjadikan kedelai sebagai salah satu komoditas penting di Indonesia.

Jagung dan kedelai yang merupakan komoditas pertanian yang dapat berfungsi sebagai substrat bagi pertumbuhan berbagai kapang penghasil mikotoksin seperti *Aspergillus* spp. dan *Fusarium* spp. Keberadaan *A. ochraceus* pada kedelai pernah dilaporkan oleh Pacin *et al.*¹² bahwa sebanyak 60% sampel kedelai yang diperoleh dari petani di Ekuador terinfeksi *A. ochraceus*. Data terjadinya kontaminasi OTA pada bahan pangan di

Indonesia khususnya untuk jagung dan kedelai masih sangat sedikit. Keberadaan OTA pada jagung pernah dilaporkan oleh Widiastuti *et al.*¹³ sebesar 3 ng/g, sedangkan BB Veteriner pernah melaporkan keberadaan OTA sebesar 68,441 ng/g pada sampel jagung dari berbagai daerah¹⁴. Data kontaminasi OTA pada kedelai di Indonesia sampai saat ini belum ada. Bangladesh pernah melaporkan keberadaan OTA pada jagung yang dijual di pasaran berkisar 1.000 – 117.000 ng/g, sedangkan di Mesir ditemukan kandungan OTA sebesar 14.300 ng/g pada jagung¹⁵. Departemen Pertanian, Perikanan dan Pangan Inggris juga pernah melaporkan keberadaan OTA berkisar 50 – 500 ng/g pada kedelai dan tepung kedelai¹⁶. Batasan maksimum kandungan OTA dalam produk pangan khusus untuk biji-bijian dan produk olahannya adalah 5 ng/g¹⁷.

Kontaminasi OTA pada pangan tidak hanya dapat menurunkan kualitas pangan tetapi juga dapat memberi pengaruh buruk terhadap kesehatan manusia dan hewan yang mengkonsumsi produk pangan yang terkontaminasi OTA. Okratoksin A dapat menyebabkan *nephrototoxic*, *teratogenic*, *hepatotoxic*, *immunosuppressive* dan *carcinogenic*¹⁸. International Agency for Research on Cancer (IARC) menggolongkan OTA sebagai senyawa karsinogen dan masuk dalam golongan 2B¹⁹.

Penelitian yang berkaitan dengan pengaruh suhu dan kelembaban terhadap pertumbuhan dan produksi OTA oleh *A. ochraceus* telah banyak dilakukan di beberapa negara khususnya di negara-negara Eropa yang memiliki iklim yang sangat berbeda dengan Indonesia, akan tetapi hingga saat ini belum ditemukan penelitian yang melihat pengaruh suhu dan kelembaban terhadap pertumbuhan dan produksi OTA oleh *A. ochraceus* BIO 220 yang merupakan isolat lokal Indonesia. Keberadaan *A. ochraceus* BIO 220 tidak menutup kemungkinan dapat mengkontaminasi biji-bijian khususnya jagung dan kedelai yang ada di Indonesia.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh suhu dan kelembaban terhadap pola pertumbuhan dan produksi OTA oleh *A. ochraceus* BIO 220. Hasil dari penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam mencegah pertumbuhan dan produksi OTA yang disebabkan oleh *A. ochraceus* BIO 220 pada jagung dan kedelai selama penyimpanan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah kapang toksigenik *A. ochraceus* BIO 220 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi SEAMEO – BIOTROP Bogor. Jagung dan kedelai diperoleh dari Daerah Kediri Jawa Timur. *Potato*

Dextrose Agar (PDA) (Oxoid), Garam (NH_4Cl , BaCl_2 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NaNO_3) diperoleh dari toko bahan kimia di Bogor, standar okratoksin A (Sigma Co. USA), Kolom IAC Ochra TestTM WB (Vicom, USA), asetronitril HPLC grade (Merck), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Vicom), asam asetat glasial (Merck) dan *aqua bidest*. Alat yang digunakan adalah inkubator dengan suhu 20, 30 dan 40 °C, mini desikator, *autoclave* dan alat-alat gelas, HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Co., Jerman) dengan detektor fluoresen dan kolom Zorbax C18 4.6 mm x 150 mm dengan ukuran partikel 5 µm (Agilent Technologies Co. USA).

Metode

Penelitian dilakukan dalam 3 tahap, yang meliputi (1) tahap pemeliharaan dan penyiapan kultur kapang, jagung dan kedelai sebagai media pertumbuhan kapang, serta larutan garam, (2) pengujian terhadap pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada media laboratorium, jagung dan kedelai, dan (3) pengujian produksi OTA pada jagung dan kedelai.

1. Tahap persiapan

Pada tahap ini dilakukan persiapan kapang *A. ochraceus* BIO 220. Kapang tersebut disegarkan dengan cara diinokulasi pada media PDA agar miring lalu diinkubasi pada suhu 28 °C selama 5 hari. Sampel jagung dan kedelai yang digunakan sebelumnya diradiasi di Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jakarta. Jagung dan kedelai masing-masing dikemas sebanyak 25 g dengan menggunakan plastik *polyethilen* (PE), iradiasi dilakukan dengan menggunakan sinar gamma Cobalt-60 dengan dosis 25 kGy 20.

Pengamatan pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 dan produksi OTA dilakukan pada kondisi suhu 20, 30, 40 °C dan kelembaban 70, 80, 90 %. Jenis garam

yang digunakan sesuai dengan penelitian Greenspan²¹, Wexler & Hasegawa²² dan Jalali *et al.*²³. Jumlah garam yang digunakan untuk mengatur kelembaban diperoleh dengan cara melarutkan garam dengan berat tertentu dan dilarutkan dalam 100 ml air. Larutan tersebut disimpan pada inkubator dengan suhu 20, 30, dan 40 °C, setiap 24 jam kelembaban dari larutan garam jenuh diukur dengan menggunakan higrometer. Apabila larutan garam jenuh belum mencapai kelembaban yang diinginkan (70, 80 dan 90 %) maka dilakukan penambahan garam secara bertahap sampai kelembaban yang diinginkan tercapai dan stabil. Jika larutan garam tersebut telah mencapai kelembaban yang diinginkan dan stabil pada kelembaban yang diinginkan, maka dilakukan sterilisasi larutan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Wadah yang digunakan sebagai desikator disterilkan dengan menggunakan alkohol 70 % sebelum diisi larutan garam jenuh steril. Jumlah garam dan jenis garam yang digunakan untuk mengatur kelembaban dapat dilihat pada Tabel 1.

Pengujian Pengaruh Suhu dan Kelembaban terhadap Pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada Media Laboratorium, Jagung dan Kedelai (Modifikasi Kokkonen *et al.*²⁴)

Modifikasi yang akan dilakukan dari Kokkonen *et al.*²⁴ adalah jenis media, suhu dan kelembaban yang akan diatur selama masa inkubasi *A. ochraceus*. Sebanyak satu ose kapang *A. ochraceus* BIO 220 diinokulasi pada permukaan media cawan agar PDA, kemudian media tersebut diinkubasi pada kombinasi suhu (20, 30, 40 °C) dan kelembaban (70, 80, 90%). Inkubasi dilakukan selama 20 hari. Pengamatan pertumbuhan kapang dilakukan dengan mengukur pertumbuhan miselium kapang setiap 2 hari. Selain dilakukan pada media laboratorium, pengujian tersebut juga dilakukan pada media jagung dan kedelai. Sampel jagung dan kedelai

Tabel 1. Jenis dan jumlah garam dalam 100 ml air untuk pengaturan kelembaban

Table 1. The type and total of salt in 100 mL water for arrangement of different relative humidity condition

Suhu / Temperature (°C)	Kelembaban / RH (%)	Jenis Garam / Kind of salt	Jumlah Garam / Salt addition (g)
20	70	Amonium klorida (NH_4Cl) - Teknis	120,00
	80	Barium klorida (BaCl_2) - Teknis	140,00
	90	Kalium sulfat (K_2SO_4) – PA *	100,00
30	70	Amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Teknis	92,60
	80	Kalium nitrat (KNO_3) - Teknis	110,00
	90	Kalium nitrat (KNO_3) – PA *	200,00
40	70	Natrium nitrat (NaNO_3) - Teknis	70,00
	80	Kalium nitrat (KNO_3) - Teknis	80,00
	90	Kalium sulfat (K_2SO_4) – PA *	60,00

* PA : Pro Analysis

masing-masing sebanyak 25 g dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian diinokulasi dengan suspensi spora kapang *A. ochraceus* BIO 220 (106 spora/ml) sebanyak 4 ml di beberapa titik. Sebagai kontrol dilakukan dengan menumbuhkan pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada suhu (28-30 °C) dan kelembaban (65-80%) ruang yang berfluktuasi. Pengamatan pertumbuhan kapang dilakukan dengan menghitung berat massa sel yang terbentuk selama 20 hari. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 2 (dua) kali ulangan.

Pengujian Pengaruh Suhu dan Kelembaban terhadap Produksi Okratoksin A

Pengujian pengaruh suhu dan kelembaban terhadap produksi okratoksin A dilakukan dengan cara yang sama seperti pada pengujian pengaruh suhu dan kelembaban terhadap pertumbuhan kapang *A. ochraceus* BIO 220 dalam media jagung dan kedelai, hanya saja waktu inkubasi dilakukan selama 40 hari. Pengukuran kadar OTA secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan HPLC.

Prosedur analisis OTA sesuai dengan manual VICAM²⁵ yang terdiri dari 3 tahap, yaitu (1) pembuatan larutan standar, (2) ekstraksi dan *clean up*, dan (3) analisis dengan HPLC. Larutan standar OTA (200 ng/ml) dipipet sebanyak 500 µl dan dimasukkan ke dalam vial kemudian ditambahkan dengan larutan pengencer yang merupakan campuran dari asetonitril : air : asam asetat (49,5 : 49,5 : 1, v/v/v) sebanyak 500 µl, sehingga konsentrasinya menjadi 100 ng/ml. Serial larutan standar dibuat dari larutan stok primer (100 ng/ml) dengan cara pengenceran, sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar sebagai berikut : 1, 2, 5, 7,5, 25, dan 50 ng/ml dengan fase gerak HPLC di atas. Setiap larutan standar disuntikkan sebanyak 20 µl ke HPLC dan didapatkan sejumlah *area peak*. Kurva standar dibuat dengan memplot luas *area peak* terhadap konsentrasi OTA (ng/ml).

Ekstraksi dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 25 g sampel dan dimasukkan ke dalam *blender*, kemudian ditambahkan dengan NaCl sebanyak 5 g dan ditambahkan larutan ekstraksi sebanyak 50 ml (80% metanol dan 20% air). Campuran tersebut diblender selama 1 menit dan disaring dengan kertas saring Whatman No.4. Hasil ekstraksi dipipet sebanyak 5 ml dan dimasukkan dalam erlemeyer 250 ml, kemudian ditambahkan 20 ml PBS dan dihomogenkan selama 1 menit lalu disaring dengan menggunakan *microfibre filter*. Larutan tersebut dipipet sebanyak 5 ml dan dilewatkan pada kolom IAC, kemudian 10 ml PBS dilewatkan pada kolom IAC dan diikuti dengan 10 ml air, eluen dari larutan PBS dan air dibuang. Vial dengan ukuran 1.5 ml diletakkan pada bagian bawah kolom IAC,

kemudian dilewatkan pada kolom IAC 1,5 ml metanol dan 1,5 ml air, lalu larutan sampel dalam metanol dan air dalam vial tersebut divortex dan diinjeksi ke HPLC dengan volume injeksi 20 µl.

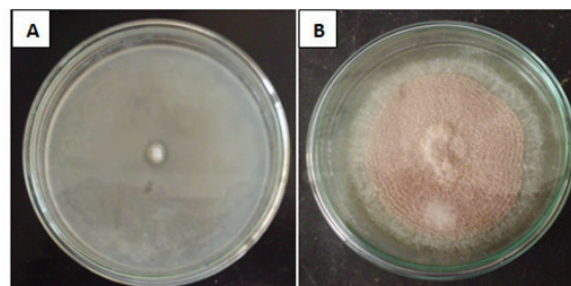
Analisis dengan HPLC dilakukan dengan menggunakan fase diam yang merupakan kolom C-18 *reversed-phase* (4,6 mm x 150 mm, 5 µl), dan fase gerak yang digunakan merupakan campuran asetonitril : air : asam asetat (49,5 : 49,5 : 1, v/v/v) yang dialirkan secara isokratik dengan kecepatan 0,8 ml/menit, sedangkan detektor fluoresens diatur pada panjang gelombang emisi dan eksitasi masing-masing 477 dan 333 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Suhu dan Kelembaban terhadap Pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada Media PDA

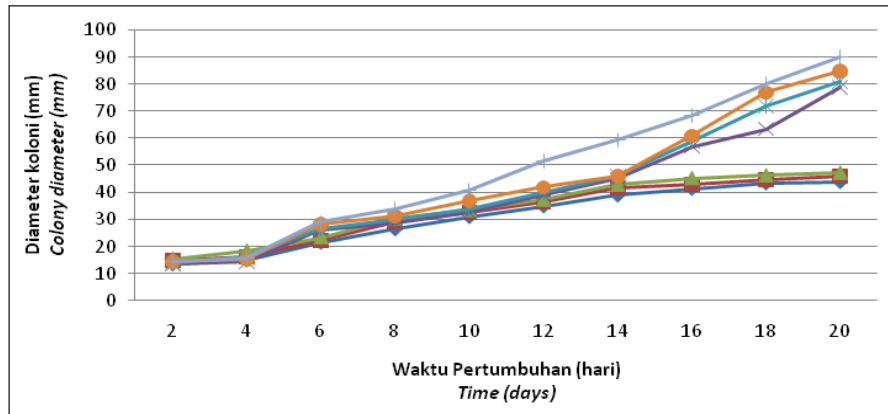
Pertumbuhan kapang *A. ochraceus* BIO 220 pada media PDA cenderung lambat, pertumbuhan koloni tampak terlihat pada hari ke 2 - 3 setelah inokulasi yang diawali dengan terbentuknya koloni kapang yang berwarna putih dan berukuran ± 15 mm (Gambar 1A). Pada hari ke 5 - 6 setelah inokulasi mulai tampak miselium yang berwarna putih kecoklatan, sedangkan setelah lebih dari 9 hari masa inkubasi koloni kapang *A. ochraceus* BIO 220 akan berubah warna menjadi kecoklatan (Gambar 1B). Pengamatan terhadap warna koloni kapang *A. ochraceus* BIO 220 tersebut sesuai dengan deskripsi Perrone dan Reddy yang melaporkan bahwa koloni kapang *A. ochraceus* berwarna kuning kecoklatan^{26,27}.

Pola pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada media PDA dengan kombinasi suhu 20, 30°C dan kelembaban 70, 80, 90 % dapat dilihat pada Gambar 2. Pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada berbagai suhu



Gambar 1. Pertumbuhan kapang *A. ochraceus* BIO 220 pada media PDA (A) 2-3 hari inkubasi, (B) lebih dari 9 hari inkubasi

Figure 1. Growth of *A. ochraceus* BIO 220 in PDA (A) 2 - 3 days incubation, (B) more than 9 day incubation



Keterangan/ Remarks :

- Suhu 20°C, kelembaban 70%/ Temperature 20°C, relative humidity 70%
- Suhu 20°C, kelembaban 80%/ Temperature 20°C, relative humidity 80%
- ▲— Suhu 20°C, kelembaban 90%/ Temperature 20°C, relative humidity 90%
- ◆— Suhu 30°C, kelembaban 70%/ Temperature 30°C, relative humidity 70%
- ×— Suhu 30°C, kelembaban 80%/ Temperature 30°C, relative humidity 80%
- ⬡— Suhu 30°C, kelembaban 90%/ Temperature 30°C, relative humidity 90%
- +— Kontrol/ Control

Gambar 2. Pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 di media PDA pada suhu 20, 30 °C dan kelembaban 70, 80 dan 90%
Figure 2. Growth of *A. ochraceus* BIO 220 in PDA at 20, 30 °C and RH 70, 80, 90%

dan kelembaban menunjukkan bahwa pada suhu 30°C dan kelembaban 90% kapang dapat tumbuh lebih cepat dibanding pada kondisi suhu 20 °C dan kelembaban 70, 80 dan 90%, serta pada kondisi suhu 30 °C dan kelembaban 70 dan 80 %.

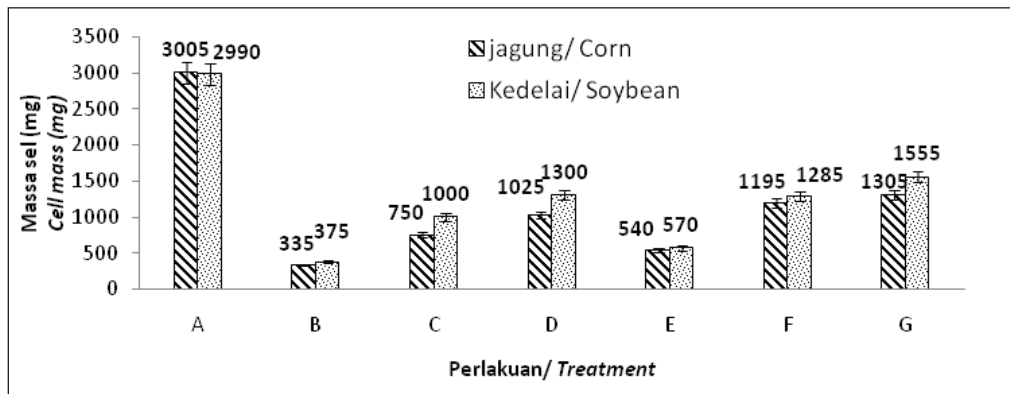
Pada kondisi suhu 30 °C dan kelembaban 70, 80 dan 90% pertumbuhan miselium mencapai maksimum masing-masing sebesar 79, 81 dan 85 mm setelah 20 hari inkubasi. Pertumbuhan miselium menjadi sangat lambat pada suhu 20 °C baik pada kelembaban 70, 80 dan 90 %, yaitu masing-masing hanya mencapai 44, 46 dan 48 mm. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pardo *et al.*²⁸ yang juga menunjukkan bahwa pertumbuhan *A. ochraceus* menjadi lebih lambat jika ditumbuhkan pada suhu 20 °C dan kelembaban 80 dan 90 % dibanding dengan pertumbuhan *A. ochraceus* pada suhu 30 °C dan kelembaban 80 dan 90 %. Apabila suhunya dinaikkan menjadi 40 °C *A. ochraceus* BIO 220 tidak dapat hidup pada semua tingkat kelembaban. Hal ini sesuai dengan penelitian pertumbuhan *A. ochraceus* yang lain yang menunjukkan bahwa pertumbuhan kapang yang ditumbuhkan pada kondisi suhu 35°C dan pada suhu 41°C kapang tidak dapat tumbuh pada berbagai media 1.

Pengaruh Suhu dan Kelembaban terhadap Pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada Jagung dan Kedelai

Pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada jagung dan kedelai mulai tampak terlihat pada hari ke 4 - 5 inkubasi. Waktu yang dibutuhkan kapang untuk dapat

tumbuh pada jagung dan kedelai lebih lama dibandingkan dengan pertumbuhan kapang pada media PDA. Hal ini disebabkan oleh adanya kulit luar dari biji-bijian yang bersifat keras untuk ditembus miselium sehingga kapang membutuhkan waktu yang lebih lama untuk bisa mendapatkan nutrisi dari dalam biji jagung dan kedelai. Hasil pengujian pengaruh suhu dan kelembaban terhadap pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada media jagung dan kedelai dapat dilihat pada Gambar 3.

Pertumbuhan maksimal *A. ochraceus* BIO 220 terjadi pada kondisi suhu 30 °C dan kelembaban 90%, dengan jumlah massa sel sebesar 1.305 mg pada jagung dan 1.555 mg pada kedelai. Pada kondisi suhu 20 °C dan kelembaban 70 %, pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 terjadi sangat lambat, hal ini ditunjukkan dengan jumlah massa sel yang relatif sedikit yaitu sebesar 335 mg pada jagung dan 375 mg pada kedelai. Sedangkan pada suhu 40°C dan kelembaban 70, 80, 90 % *A. ochraceus* BIO 220 tidak dapat tumbuh. *A. ochraceus* BIO 220 pada kondisi ruang yang tidak diatur suhu dan kelembabannya (28 – 30 °C dan RH 65 – 80 %) mampu tumbuh baik dengan jumlah massa sel relatif lebih banyak yaitu 3.005 mg pada jagung dan 2.990 mg pada kedelai. Setiap mikroba khususnya kapang memiliki kisaran suhu dan kelembaban untuk pertumbuhan dan produksi mikotoksin. Pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 pada suhu ruang cenderung lebih baik dibandingkan dengan pertumbuhan pada kondisi suhu pengujian, diduga suhu optimum pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 memiliki kisaran antara 28 – 30 °C. Tentunya hal ini perlu diteliti



Keterangan/ remarks :

A : Kontrol/ Control

B : Suhu 20°C, kelembaban 70%/ Temperature 20°C, relative humidity 70%

C : Suhu 20°C, kelembaban 80%/ Temperature 20°C, relative humidity 80%

D : Suhu 20°C, kelembaban 90%/ Temperature 20°C, relative humidity 90%

E : Suhu 30°C, kelembaban 70%/ Temperature 30°C, relative humidity 70%

F : Suhu 30°C, kelembaban 80%/ Temperature 30°C, relative humidity 80%

G : Suhu 30°C, kelembaban 90%/ Temperature 30°C, relative humidity 90%

Gambar 3. Berat massa sel *A. ochraceus* BIO 220 yang ditumbuhkan pada media jagung dan kedelai pada suhu 20, 30 °C dan kelembaban 70, 80 dan 90%.

Figure 3. Growth of *A. ochraceus* BIO 220 in maize and soy bean at 20, 30 °C and RH 70, 80, 90%

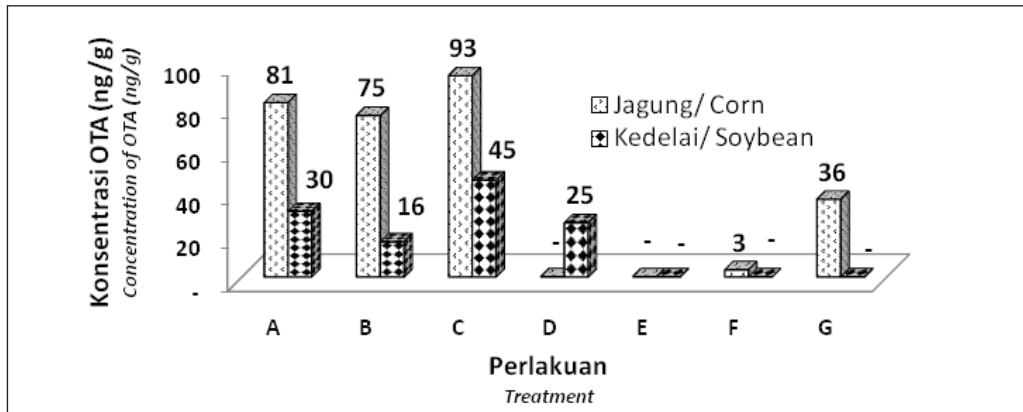
lebih lanjut untuk melihat pengaruh suhu 28 dan 29 °C terhadap pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220. Hasil pengujian statistik juga menunjukkan bahwa suhu dan kelembaban memberikan pengaruh nyata ($p < 0.05$) pada pertumbuhan kapang *A. ochraceus* BIO 220 di jagung dan kedelai. Fluktuasi suhu dan kelembaban yang terjadi pada waktu siang dan malam hari selama masa pertumbuhan kapang dapat mempercepat pertumbuhan dan berpengaruh terhadap kerusakan biji-bijian²⁹.

Pengaruh Suhu dan Kelembaban terhadap Produksi Okratoksin A

Analisis OTA dilakukan dengan menggunakan metode HPLC. HPLC yang digunakan dilengkapi dengan detektor *fluoresen*, detektor ini banyak dipakai untuk mendeteksi OTA pada berbagai jenis sampel^{30, 31, 32}. Limit deteksi pengujian OTA dari sampel jagung dan kedelai adalah 0,04 ng/ml setara dengan 0,3 ng/g, sedangkan limit kuantifikasi sebesar 0.39 ng/ml setara dengan 2,3 ng/g. OTA terdeteksi di instrumen HPLC fluoresens pada kisaran menit ke 7,0-7,9. Hasil analisis OTA pada sampel jagung dan kedelai dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil analisis menunjukkan bahwa produksi OTA optimum terjadi pada kondisi suhu 20 °C dan kelembaban 80 % yaitu sebesar 93 ng/g pada sampel jagung, sedangkan produksi OTA terendah terjadi pada

sampel jagung dengan kondisi penyimpanan pada suhu 30 °C dan kelembaban 80%. Pada sampel dengan kondisi penyimpanan suhu 40 °C dan kelembaban 70, 80 dan 90 % tidak terdeteksi adanya kandungan OTA, hal ini erat kaitannya dengan pengujian yang dilakukan pada tahap sebelumnya dimana hasil penelitian menunjukkan bahwa pada suhu 40 °C dan kelembaban 70, 80 dan 90 % *A. ochraceus* BIO 220 tidak dapat tumbuh. Hal ini berarti pada kondisi tersebut jagung dan kedelai terhindar dari keberadaan OTA, sehingga aman untuk dikonsumsi. Menurut Hadi dan Magan³³, suhu optimum produksi OTA oleh *A. ochraceus* adalah 20 °C, sedangkan menurut Pardo *et al.*²⁸ *A. ochraceus* dapat memproduksi OTA pada suhu 20 - 30°C dengan kelembaban berkisar 80 – 100%. Kondisi stres yang dialami oleh kapang toksigenik akibat suhu dan kelembaban yang tidak mendukung pertumbuhannya diduga berpengaruh terhadap pembentukan mikotoksin. Hal ini menunjukkan bahwa suhu dan kelembaban optimum pertumbuhan kapang toksigenik berbeda dengan suhu dan kelembaban optimum untuk produksi mikotoksin. Penelitian yang dilakukan oleh Calvo *et al.*³⁴, menemukan bahwa sebagian besar metabolit sekunder diproduksi setelah kapang melewati fase eksponensial yang ditandai dengan pembentukan spora. Saat nutrisi pada media pertumbuhan kapang mulai berkurang, kapang dapat mengalami stres karena tanpa sumber karbon kapang tidak memiliki energi yang dapat digunakan untuk pertumbuhannya, hal ini dapat



Keterangan/ remarks :

A : Kontrol/ Control

B : Suhu 20°C, kelembaban 70%/ Temperature 20°C, relative humidity 70%

C : Suhu 20°C, kelembaban 80%/ Temperature 20°C, relative humidity 80%

D : Suhu 20°C, kelembaban 90%/ Temperature 20°C, relative humidity 90%

E : Suhu 30°C, kelembaban 70%/ Temperature 30°C, relative humidity 70%

F : Suhu 30°C, kelembaban 80%/ Temperature 30°C, relative humidity 80%

G : Suhu 30°C, kelembaban 90%/ Temperature 30°C, relative humidity 90%

Gambar 4. Kandungan okratoksin A pada jagung dan kedelai yang diinokulasi dengan *A. ochraceus* BIO 22 dan diinkubasi pada berbagai suhu dan kelembaban

Figure 4. Ochratoxin A in corn and soybean by *A. ochraceus* BIO 220 at different temperature and relative humidity

memicu peningkatan produksi metabolit sekunder oleh kapang toksigenik³⁵. Selain faktor suhu dan kelembaban, kadar air dalam sampel juga berpengaruh terhadap produksi OTA, semakin tinggi kadar air sampel maka kandungan OTA semakin meningkat³⁶. Dawlatana *et al.*¹⁵, mengungkapkan bahwa jagung dengan kadar air berkisar 10,15 - 18,70 % dapat menghasilkan OTA hingga 103 ng/g.

Menurut Pardo *et al.*³⁷ produksi OTA oleh *A. ochraceus* pada berbagai substrat yang berbeda dapat menunjukkan perbedaan konsentrasi OTA yang dihasilkannya walaupun pada kondisi suhu dan kelembaban yang sama. Lebih lanjut menurut Khalesi dan Khatib³⁶, meskipun Aw dan suhu merupakan faktor utama yang mempengaruhi produksi OTA oleh *A. ochraceus*, komposisi substrat juga sangat dibutuhkan kapang untuk dapat memproduksi OTA jadi jika komposisi substratnya tidak sesuai dengan kebutuhan kapang, maka bahan pangan tersebut dapat terhindar dari kontaminasi OTA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa substrat jagung lebih mudah mengalami kontaminasi OTA dibandingkan dengan substrat kedelai, hal tersebut juga sesuai dengan hasil penelitian Blesa *et al.*¹⁶. Menurut Sardjono³⁸, kandungan asam fitat pada kedelai dapat menghambat produksi aflatoxin oleh kapang *A. flavus*, karena asam fitat dapat berikatan dengan zinc yang merupakan elemen penting untuk produksi aflatoxin,

diduga hal tersebut juga terjadi pada *A. ochraceus* BIO 220 yang diinokulasi di kedelai.

KESIMPULAN

Suhu dan kelembaban sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi Ochratoxin A oleh kapang *A. ochraceus* BIO 220. Pertumbuhan *A. ochraceus* BIO 220 tertinggi terjadi pada suhu 30 °C dan kelembaban 90%, sedangkan produksi OTA tertinggi terjadi pada suhu 20 °C dan kelembaban 80%. Jagung cenderung lebih mudah terkontaminasi OTA dibandingkan kedelai. Untuk menghindari pertumbuhan dan produksi OTA oleh *A. ochraceus* BIO 220, jagung dan kedelai sebaiknya disimpan pada kondisi ruang dengan suhu 40 °C dan kelembaban 70 – 90 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Program Kerjasama Kemitraan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Nasional (KKP3N), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian sesuai dengan surat perjanjian pelaksanaan kegiatan Nomor : 692/LB.620/I.1/2/2013 tanggal : 25 Februari 2013 a.n. Prof. Dr. Winiati P. Rahayu.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cabrera HP, Taniwaki MH, Hashimoto JM, de Menezes HC. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Braz J Microbiol.* 2005; 36(1): 24-28.
2. Bayman P, Baker JL. Ochratoxins: a global perspective. *J Mycopathologia.* 2006; 162(3): 215-223.
3. El-Taher EM, Ghany TM, Alawlaqi MM, Ashour MS. Biosecurity for reducing ochratoxin A productivity and their impact on germination and ultrastructures of germinated wheat grains. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science.* 2012; 2(1):135-151.
4. O'Callaghan J, Caddick MX, Dobson AD. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *J Microbiology.* 2003; 149 : 3485-3491.
5. Ellis FJ. Ochratoxin a : Any cause for concern in Sub Sahara Africa? *Science J of Environmental Engineering Research.* 2012; 109: 1-5.
6. Maria Edite Bezera da Rocha, Francisco da Chagas Oliveira Freire, Fabio Erlan Feitosa Naia, Maria Izabel Florindo Guedes, David R. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control.* 2014; 36: 159-165.
7. Finnengan D. Mycotoxins in cereals : sources and risk [internet]. 2010 [Diunduh tanggal 20 April 2013]. Tersedia di : <http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/>
8. Amezcqueta S, Schorr-Galindo S, Muplo-Arbizu M, Gonzales-Penas E, Lopez de Cerain A, Guiraud JP. OTA – producing fungi in foodstuffs : A review. *Food control.* 2012; 26: 259-268.
9. Kumar V, Basu MS, Rajendran TP. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection.* 2008; 27 : 891-905.
10. Food and Agriculture Organization. *Climate Change : Implications for Food Safety.* Roma (IT): Communication Division-FAO; 2008.
11. Paterson RRM, Lima N. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International.* 2011; 44: 2555-2566
12. Pacin AM, Gonzalez HH, Etcheverry M, Resnik SL, Vivas L, Espin S. Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. *J Mycopathologia.* 2002; 156: 87-92.
13. Widiastuti R, Maryam R, Blaney BJ, Salfina, Stoltz DR. Corn as a source of mycotoxins in Indonesia poultry feeds and the effectiveness of visual examination methods for detecting contamination. *J Mycopathologia.* 1988; 102(1) : 45-49.
14. Haliza W, Munarso SJ, Miskiyah. Keragaan kontaminan mikotoksin pada jagung. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Inovatif Pascapanen untuk Pengembangan Industri Berbasis Pertanian. BB Pengembangan dan Penelitian Pascapanen Pertanian.* Bogor (ID). 2005. Hlm 1200-1214.
15. Dawlatana M, Shahida S, Rahim M, Hassan T. Investigation on the occurrence of ochratoxin A in maize in Bangladesh. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 2008; 43(4). 495-500.
16. Blesa J, Soriano JM, Molto JC, Manes J. Absence ochratoxin A in soy sauce. *Int J of Food Microbiol.* 2004; 97: 221-225.
17. SNI. 2009. Batas maksimum kandungan mikotoksin dalam pangan. SNI 7385: 2009. Badan Standarisasi Nasional.
18. Abrunhosa L, Santos L, Venancio A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology.* 2006; 20:231-242.
19. Yordanova P, Wilfried K, Tsoleva S, Dimitrov P. Ochratoxin A and β 2-microglobulin in BEN patients and controls. *Toxins.* 2010 ; 2(4): 780-792.
20. Aquino S. Gamma radiation against toxigenic fungi in food, medicinal and aromatic herbs. *Formatex.* 2011; 272-281.
21. Greenspan L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J Res Nat Bur Stand.* 1976; 81A (1) : 89-96.
22. Wexler A, Hasegawa S. Relative humidity-temperature relationships of some saturated salt solutions in the temperature range 0 to 50 °C. *J of Research of the National Bureau of Standards.* 1954; 50 (1) : 19-26.
23. Jalali R, Roberts SJ, Upreti P. Heat-treated flour. *US Provisional.* 2011; 61 (104) : 476.
24. Kokkonen M, Ojala L, Parikka P, Jestoi M. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *Int J food Microbiol.* 2010. 143: 17-25.
25. Vicam. *Instruction Manual Vicam Ochratest and Ochratest WB. (for fluorometric use);* 2004
26. Perrone G, Gallo A, Sasca A. *Molecular detection of foodborne pathogens.* CRC Press. New York. 531 hal. 2009.
27. Reddy KR, Farhana NI, Wardah AR, Salleh B. Morphological identification of foodborne pathogens colonizing rice grains in South Asia. *Pakistan J of Biological Science.* 2010; 13 : 794-801.
28. Pardo E, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiology.* 2005; 22: 383-389.
29. Rashid S, Kurt R, Carl B. Effects of Deterioration parameters on storage of Maize. *Journal of Natural Science Research.* 2013; 3(9): 147-165.

30. Pietri A, Rastelli S, Bertuzzi T. Ochratoxin A and aflatoxins in liquorice products. *Toxins*. 2010; 2(4) :758-770.
31. Belajova E, Rauova D. Determination of ochratoxin A and its occurrence in wines of Slovakian retail. *Journal of Food Nutrition Research*. 2007; 46(2): 68-74.
32. Nayeypoor F, Momeni M, Dehkordi FS. Incidence of ochratoxin A in raw and salted dried fruits using high performance liquid chromatography. *American- Eurasian Journal of Toxicological Science*. 2013; 5(1): 1-6.
33. Hadi AA, Magan N. Influence of physiological factor on growth, sporulation and ochratoxin A/B production. *World Mycotoxin J*. 2009; 2(4): 1-17.
34. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002; 66 (3) : 447-459.
35. Szilagy M, Miskei M, Karanyi, Lenkey B, Poci I, Emri T. Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*. 2013; 159 : 176- 190.
36. Khalezi M, Khatib N. The effect of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011; 32: 113-121.
37. Pardo E, Sanchis V, Ramos AJ, Marin S. Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus*. *Food Microbiology J*. 2006; 23(4) : 351-358.
38. Sardjono. The effect of phytic acid, zinc and soybean extract on the growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Agritech*. 2010; 30(1) : 6-9.

Hak cipta ©2014 Balai Besar Litbang Pascapanen
Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu
Jl. Tentara Pelajar no 12A, Cimanggu, Bogor, Jawa Barat, Indonesia