

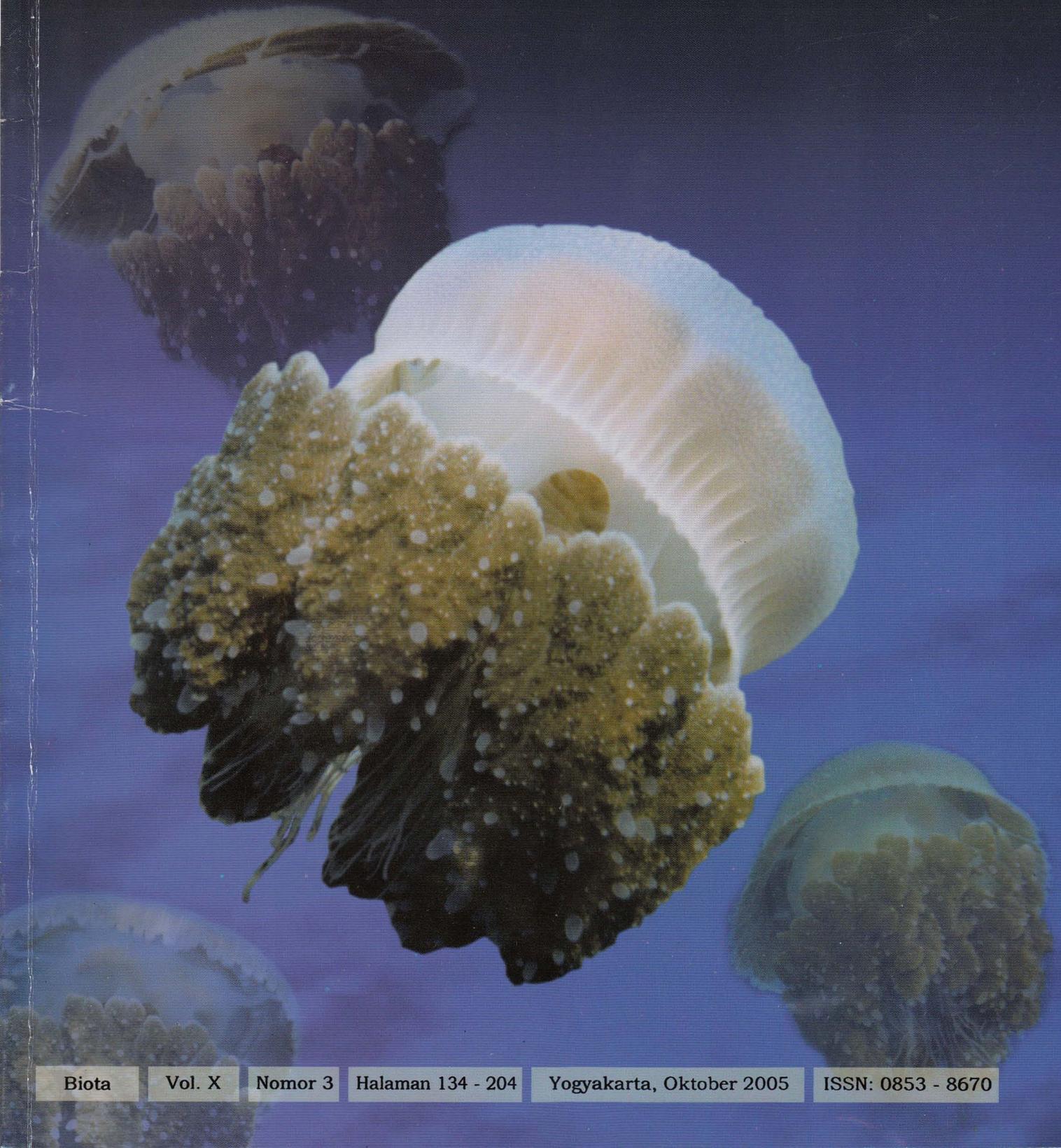
BIOTA'S FIRST DECADE ANNIVERSARY
10th
• JULY 2005 •

ISSN 0853-8670

Biota

Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Hayati

Volume X Nomor 3, Oktober 2005



BIOTA

Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati

Penanggung Jawab (*Advisor*)

Dekan Fakultas Biologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Sidang Penyunting (*Editors*)

P. Kianto Atmodjo (Ketua / *Chief of editors*)

B. Boy Rahardjo Sidharta

F. Sinung Pranata

Yuniarti Aida

Felicia Zahida

E. Mursyanti

A. Wibowo Nugroho Jati

L.M. Ekawati Purwijantiningsih

Sidang Penelaah (*Editorial Board*)

(untuk Nomor ini)

Dr. Tjut Sugandawaty Djohan (Fak. Biologi UGM)

Dr. Ir. Endang Sutriswati Rahayu, MS (Fak. Teknologi Pertanian UGM)

Prof. Dr. Santoso (Fak. Biologi UGM)

Dr. Ir. Djuwantoko, MSc. (Fak. Kehutanan UGM)

Dra. Th. Tri Suharni (Fak. Biologi UGM)

Prof. Dr. Ir. Deddy Muchtadi (Fak. Teknologi Pertanian IPB)

Biota (ISSN 0853-8670) diterbitkan oleh Fakultas Biologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta (UAJY), sebagai wahana informasi ilmiah bidang ilmu hayati berupa hasil penelitian, opini, makalah teknis, komunikasi pendek, dan kajian buku. **Biota** telah **terakreditasi** dengan SK Nomor: 39/DIKTI/Kep/2004.

Penerimaan Naskah

Redaksi menerima naskah dari staf pengajar, peneliti, mahasiswa maupun praktisi dengan ketentuan penulisan seperti tercantum pada halaman dalam sampul belakang. Naskah yang disetujui untuk dimuat akan diminta kontribusi biaya sebesar Rp 150.000,- (*seratus lima puluh ribu rupiah*) per empat halaman pertama, selebihnya ditambah Rp 50.000,- (*lima puluh ribu rupiah*) per halaman. Biaya cetak untuk halaman berwarna sepenuhnya menjadi tanggung jawab penulis.

Langganan

Biota terbit tiga nomor dalam satu tahun (Februari, Juni, dan Oktober). Langganan untuk satu tahun (termasuk ongkos kirim), adalah sbb.:

1. Lembaga/institusi : Rp. 120.000,- (*seratus dua puluh ribu rupiah*)
2. Individu/pribadi : Rp. 80.000,- (*delapan puluh ribu rupiah*)

Pembayaran berlangganan dapat dilakukan dengan cara: a) pembayaran langsung, b) wesel, c) transfer ke **Tahapan Lippo, No. Rek. 990-10-03755-4, a.n. E. Sulastiyanti, Kantor Kas UAJY Babarsari Yogyakarta** atau **Taplus Bank BNI'46 Cab. UGM Yogyakarta, No. Rek. 228. 005766520. 901 a.n. E. Sulastiyanti, QQ. Fakultas Biologi UAJY**. Salinan bukti pembayaran (b dan c) mohon dikirim ke redaksi. Mahasiswa harus melampirkan salinan kartu mahasiswa atau surat keterangan dari Perguruan Tinggi atau Institut.

Alamat Redaksi :

Fakultas Biologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Jl. Babarsari 44 Yogyakarta 55281, Indonesia

Telp. 0274-487711 ext.1169/1170; Fax: 0274-487748

Website: <http://biota.uajy.ac.id>; E-mail: biota@mail.uajy.ac.id

SMS Hotline: 0888.275.9288

Cover: *Crambione mastigophora*, oleh : Atma Jaya Diving Club

Komposisi Vegetasi Mangrove Di Muara Sungai Siganoi Sorong Selatan - Papua <i>Yohanes Y. Rahawarin</i>	134 - 140
Direct Antagonistic Method for Screening Anti-methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Substance-Producing Marine Bacteria <i>Alim Isnansetyo dan Yuto Kamei</i>	141 - 145
Penghambatan Produksi Aflatoksin dari <i>Aspergillus flavus</i> oleh Kapang dan Khamir yang diisolasi dari Ragi Tempe <i>(alm.) Ekawati Purwijantiningsih, Ratih Dewanti-Hariyadi, C.C. Nurwitri dan Istiana</i>	146 - 153
Analisis Kandungan Artemisinin Pada Kultur Tunas <i>Artemisia annua</i> L. Dengan Lima Karakter Morfologi Yang Berbeda <i>Tri Muji Ermayanti, Erwin Al Hafizh, Aryanti dan Lenny Sutedja</i>	154 - 160
Chlorophyll Fluorescence of C3 and C4 Species in Response to Drought Stress <i>Hamim</i>	161 - 169
Studi Perilaku Teritorial Burung Cagak Abu (<i>Ardea cinerea</i> Linn.) Di Kebun Raya dan Kebun Binatang Gembiraloka Yogyakarta <i>Wahyu Nugroho, Djuwantoko dan Wibowo N. Jati</i>	170 - 175
Pengaruh Perbedaan Jarak Tanam terhadap Pertumbuhan Tiga Varietas Kedelai (Baluran, Bromo, dan Galunggung) <i>Djukri</i>	176 - 182
Indeks Glisemik Kacang Buncis (<i>Phaseolus vulgaris</i>) dan Kacang Panjang (<i>Vigna sesquipedalis</i>) Serta Uji Efek Hipoglisemiknya Pada Tikus <i>Sprague Dawley</i> <i>Y. Marsono, Pariyanto Triwitono dan sri Kanoni</i>	183 - 191
Kualitas Minyak Kelapa Hasil Fermentasi <i>Saccharomyces cereviceae</i> <i>Exsyupransia Mursyanti</i>	192 - 199
Short Communication : Keanekaragaman Burung di Sungai Mamberamo, Papua <i>Freddy Pattiselanno</i>	200 - 202
Kajian Buku : Eksplorasi Genom, terkuaknya manusia <i>Exsyupransia Mursyanti</i>	203 - 204

Penghambatan Produksi Aflatoksin dari *Aspergillus flavus* oleh Kapang dan Khamir yang Diisolasi dari Ragi Tempe

Inhibition of Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by Moulds and Yeasts Isolated from Ragi Tempe

Ekawati Purwijantiningsih^{1*}, Ratih Dewanti-Hariyadi², C.C. Nurwitri² dan Istiana (alm.)³

¹ Fakultas Biologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. e-mail: e_purwiyanti@yahoo.com

* penulis untuk korespondensi

² Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

³ Balai Penelitian Veteriner, Bogor

Abstract

This research was carried out to study the inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by moulds and yeasts isolated from ragi tempe. The result showed that moulds found in the ragi tempe consisted of *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, *R. cohnii*, *Mucor rouxii*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus niger* and miselia sterilia. Yeasts found in the samples were *Candida* sp1, *Candida* sp2 and *Trichosporon* sp. Twelve mould, and yeast isolates were chosen to determine their ability on inhibition of aflatoxin production. *Aspergillus flavus* alone or in association with each of these isolates were inoculated in Potato Dextrose Broth and analysed for aflatoxin production at day 10. All combinations yielded less aflatoxin than the single culture of *A. flavus*. All isolates tested could inhibit aflatoxin production. The highest inhibition was shown by *Candida* sp1 (99,96%).

Key words : inhibition, aflatoxin, *Aspergillus flavus*, biocontrol, ragi tempe

Diterima : 12 Mei 2005, disetujui : 13 Juni 2005

Pendahuluan

Aflatoksin merupakan senyawa metabolit sekunder dari kapang *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, dan *A. nomius* yang banyak mengkontaminasi berbagai jenis komoditi pertanian seperti kacang-kacangan, jagung, beras, tanaman palawija lainnya serta hasil olahannya. Aflatoksin juga ditemukan pada bahan pakan dan pakan ternak sebagai penyebab terjadinya aflatoksikosis dan residu aflatoksin pada produk peternakan. Pembentukan aflatoksin oleh kapang tersebut sulit dihindari karena iklim tropis di Indonesia dengan tingkat kelembaban yang tinggi, curah hujan dan suhu tinggi sangat menunjang pertumbuhan dan perkembangbiakkan kapang

penghasil aflatoksin (Sutikno *et al.*, 1993; Bhatnagar *et al.*, 2000).

Aflatoksin dapat menyebabkan kerusakan hati akut, sirosis hati, induksi tumor dan efek teratogenik (Pitt and Hocking, 1997). Menurut Noer (2002) pada tahun 1991, Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) melaporkan bahwa 20% kasus kanker hati tidak berkorelasi dengan infeksi hepatitis B maupun hepatitis C, namun diduga disebabkan oleh aflatoksin B₁. Aflatoksin juga menyebabkan aflatoksikosis pada produk peternakan. Huff *et al.*, (1986) melaporkan aflatoksin dapat menyebabkan penurunan berat badan, peningkatan berat limfa dan ginjal, serta terjadinya atropi pada hati sampai *hepatomegaly* pada ayam broiler.

Selain berbahaya bagi kesehatan, aflatoksin mengakibatkan kerugian ekonomi yang cukup besar dan berpengaruh terhadap perdagangan internasional. Kerugian yang disebabkan oleh cemaran mikotoksin, terutama aflatoksin di Asia mencapai 400 juta dolar per tahun (Zanelli, 2000), sedangkan di Australia mencapai 10 juta dolar per tahun (Pitt and Hocking, 1997).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diketahui banyak komoditas pertanian di Indonesia memiliki kandungan aflatoksin melebihi ambang batas yang ditetapkan (Dharmaputra, 2002). Batas maksimum kandungan aflatoksin yang diperbolehkan dalam makanan dari FDA di Amerika Serikat yakni 20 ppb untuk makanan ternak dan 15 ppb untuk konsumsi manusia (Pitt and Hocking, 1997). Mengingat kerugian dan bahaya yang ditimbulkan oleh aflatoksin, maka perlu dilakukan suatu upaya penanggulangan yang efektif.

Penanggulangan secara fisik dapat menyebabkan hilangnya zat-zat gizi pada bahan pangan, sedangkan penambahan zat-zat kimia tidak mudah dilakukan pada bahan-bahan yang dikonsumsi manusia. Pendekatan lain untuk mengendalikan kontaminasi aflatoksin adalah penggunaan agen kontrol biologis, yaitu mikroba kompetitor atau antagonis untuk menghambat pertumbuhan *A. flavus* ataupun menghambat biosintesis aflatoksin.

Pada ragi tempe dijumpai beberapa jenis kapang dan khamir yang bersifat nontoksigenik. Isolat-isolat dari ragi tempe yang berpotensi sebagai biokompetitor *A. flavus* dan kemampuannya dalam menghambat produksi aflatoksin belum pernah dilaporkan. Penelitian ini merupakan penelitian awal yang bertujuan untuk mengetahui isolat-isolat kapang dan khamir yang berperan dalam menghambat produksi aflatoksin *A. flavus* sehingga dapat digunakan untuk mengatasi masalah kontaminasi aflatoksin pada bidang pertanian, peternakan serta pangan.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikologi dan Toksikologi Balai Penelitian

Veteriner Bogor pada bulan Mei 2003 hingga Januari 2004. Ragi tempe dikumpulkan dari berbagai daerah yakni DKI Jakarta, Jawa Barat (Bogor), Jawa Tengah (Purwokerto) Yogyakarta dan Jawa Timur (Malang). Kapang toksigen yang digunakan dalam penelitian ini yakni *Aspergillus flavus* 713 yang diperoleh dari Laboratorium Mikologi Balai Penelitian veteriner.

Isolasi Kapang dan Khamir (Daulay, 1989)

Sebanyak 5 g ragi tempe ditambah dengan 45 ml akuades steril, setelah itu dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-7} . Satu ml suspensi ragi tempe dimasukkan ke dalam cawan Petri diameter 9 cm, kemudian 15-20 ml medium APDA (*Potato Dextrose Agar* (Oxoid) + asam tartarat 10% sebanyak 10ml/l) yang suhunya $\pm 40^{\circ}\text{C}$ dituang ke dalam cawan tersebut lalu diratakan, setelah itu diinkubasi selama dua hari pada suhu kamar. Setiap koloni kapang dan khamir yang berbeda warna dan penampilannya dipisahkan dan dimurnikan, selanjutnya dibiakkan pada PDA miring untuk digunakan sebagai sediaan kultur.

Pembuatan Kultur Slide (Harrigan, 1998)

Untuk membuat kultur *slide* dibutuhkan cawan Petri yang di dalamnya terdapat kaca obyek yang diletakkan di atas batang U atau V, perangkat tersebut berada dalam keadaan steril. Potongan medium PDA steril berukuran 1x1 cm diletakkan di atas kaca obyek yang berada di dalam cawan Petri, setelah itu dilakukan inokulasi kapang pada potongan medium tepat di tengah-tengah keempat sisinya menggunakan ujung jarum ose.

Potongan agar-agar yang telah diinokulasi kemudian ditutup dengan kaca penutup. Akuades steril dituangkan ke dalam cawan Petri tanpa membasahi kaca obyek yang ada di dalamnya, selanjutnya kultur *slide* diinkubasi pada suhu kamar sampai terjadi sporulasi. Bila spora telah muncul, kaca penutup diangkat dan diletakkan pada kaca obyek lain yang telah diberi cairan pewarna *lactophenol cotton blue*, kemudian struktur kapang diamati di bawah mikroskop.

Identifikasi Isolat Kapang (Pitt and Hocking, 1997)

Identifikasi isolat kapang dilakukan baik secara makroskopik maupun mikroskopik. Identifikasi secara makroskopik dilakukan dengan cara melihat langsung koloni yang tumbuh pada medium *Czapek Yeast Extract Agar* (CYA), *Malt Extract Agar* (MEA) dan *25 Glycerol Nitrate Agar* (G25N) setelah dua hari inkubasi pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh akan mempunyai spora dengan bentuk dan warna yang berbeda-beda tergantung dari spesies kapang, sedangkan identifikasi secara mikroskopik dilakukan dengan cara mengamati struktur kapang dengan mikroskop berskala setelah sebelumnya ditumbuhkan dalam kultur *slide* selama tiga hari.

Untuk menentukan spesies kapang, ciri-ciri makroskopik dan mikroskopik yang dimiliki isolat kapang dibandingkan ciri-ciri kapang yang terdapat pada pustaka acuan "A Manual of Soil Fungi" (Gilman, 1957) dan "Fungi and Food Spoilage" (Pitt and Hocking, 1997). Konfirmasi spesies kapang dilakukan di Laboratorium Fitopatologi, SEAMEO BIOTROP Bogor.

Identifikasi Khamir

Identifikasi khamir dilakukan berdasarkan morfologi dan sifat fisiologis dengan melakukan beberapa uji seperti uji asimilasi, fermentasi gula-gula serta kemampuan pertumbuhan khamir pada suhu 37°C dan kemampuan membentuk pati ekstraseluler. Hasil pengamatan morfologi dan uji fisiologis kemudian dicocokkan dengan ciri-ciri khamir pada pustaka "Yeast Characteristic and Identification" (Barnett *et al.*, 2000) dan "The Yeasts: A Taxonomic Study" (Lodder, 1974).

Morfologi Khamir (Lodder, 1974)

Isolat khamir digoreskan pada permukaan medium *Corn Meal Agar* (CMA, Difco) lalu ditutup dengan kaca penutup dan diinkubasi pada suhu kamar selama tiga hari. Bagian sisi atau tepi dari koloni yang tumbuh diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 x untuk melihat ada tidaknya

miselium (semu atau sejati), blastospora, dan artrospora.

Uji Fermentasi Gula (Lodder, 1974)

Tabung miring berisi medium PDA diinokulasi dengan khamir lalu diinkubasi selama dua hari pada suhu kamar, kemudian secara aseptis dibuat suspensi khamir dengan menambah 10 ml akuades steril ke dalam tabung. Medium fermentasi gula di dalam tabung diinokulasi dengan menambahkan 0.1 ml suspensi khamir. Setelah dikocok, medium diinkubasi pada suhu kamar. Pada hari ke-3, 7 dan 14 dilakukan pengamatan terhadap pembentukan asam (perubahan warna indikator pH) dan pembentukan gas di dalam tabung Durham. Gula-gula yang diuji adalah dekstrosa, galaktosa, laktosa, maltosa, rafinosa, sukrosa, dan trehalosa.

Uji Asimilasi Karbon (Lodder, 1974)

Sebanyak 1 ml suspensi khamir dituang ke dalam cawan Petri, kemudian ditambahkan medium *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Difco) + *agar noble* sebanyak 15-20 ml. Setelah membeku, sebanyak 5 mg gula-gula yang akan diuji ditaburkan secara terpisah. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar dan diamati pada hari ke-3 dan 7 untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan yang menunjukkan sumber karbon tersebut diasimilasi atau tidak oleh khamir yang diuji. Gula-gula yang diuji adalah dekstrosa, galaktosa, laktosa, maltosa, rafinosa, sukrosa, dan trehalosa.

Uji Pertumbuhan pada Suhu 37°C (Lodder, 1974)

Isolat khamir digoreskan pada tabung yang berisi medium PDA dan diinkubasi pada suhu 37°C untuk menentukan kemampuan tumbuh khamir pada suhu tersebut.

Uji Kemampuan Membentuk Pati Ekstraseluler (Lodder, 1974)

Isolat khamir digoreskan pada cawan Petri yang mengandung medium PDA dan diinkubasi pada suhu kamar selama tiga hari, selanjutnya pada biakan isolat ditetesi larutan iod untuk mengetahui kemampuan khamir membentuk pati. Apabila terbentuk warna biru, maka khamir tersebut membentuk pati.

Persiapan Spora Kapang dan Sel Khamir (Kim *et al.*, 2000)

Kultur murni kapang dan khamir hasil isolasi diremajakan dengan cara menggoreskan kembali kultur murni tersebut pada medium PDA miring yang baru, kemudian kapang diinkubasi pada suhu kamar selama tujuh hari, sedangkan khamir selama dua hari. Suspensi spora kapang dibuat dengan menambahkan akuades steril yang mengandung 0.1 % Tween 80 ke dalam agar miring, sedangkan khamir tanpa Tween 80. Suspensi akhir diatur sampai konsentrasinya sekitar 10^6 spora/ml. Perhitungan spora dilakukan dengan menggunakan hemasitometer.

Uji Aktivitas Isolat Kapang dan Khamir terhadap Penghambatan Produksi Aflatoksin (Modifikasi Sardjono *et al.*, 1992)

Sebanyak 0.5 ml suspensi spora *A. flavus* dengan konsentrasi 10^6 spora/ml dicampur dengan 0.5 ml suspensi spora kapang atau sel khamir yang akan diuji dengan konsentrasi 10^6 spora atau sel/ml, diinokulasikan ke dalam 100 ml medium *Potato Dextrose Broth* (PDB, Oxoid) dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu kamar. Sebagai kontrol 0.5 ml suspensi spora *A. flavus* (10^6 spora/ml) diinokulasi ke dalam medium PDB, kemudian diinkubasi pada waktu dan kondisi yang sama. Setelah itu dilakukan analisis kandungan aflatoksin dan dihitung reduksi aflatoksin dari isolat kapang atau khamir uji dibandingkan dengan kandungan aflatoksin pada kontrol.

Ekstraksi Aflatoksin (Heathcot, 1984)

Sebanyak 10 ml filtrat dari isolat yang ditumbuhkan pada PDB ditambahkan dengan 10 ml kloroform, lalu diblender selama dua menit selanjutnya dikocok selama 30 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam labu pemisah sehingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas dan lapisan bawah (kloroform). Lapisan bawah yang mengandung aflatoksin disaring melalui Natrium sulfat bebas air, kemudian larutan ekstrak ini diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator. Residu yang ada dilarutkan kembali menggunakan kloroform. Hasil ekstraksi tersebut selanjutnya

dianalisis untuk mengetahui kandungan aflatoksinnya.

Analisis Aflatoksin (AOAC, 1995)

Pada penelitian ini analisis aflatoksin dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis satu dimensi dengan fase gerak kloroform : aseton = 9:1. Untuk konfirmasi aflatoksin digunakan dengan TLC dua dimensi dengan fase gerak II yakni etil asetat : toluena : asam format = 5 : 4 : 1. Plat TLC yang digunakan adalah plat dengan fase diam silika gel 60 (MERCK). Tahap identifikasi dilakukan dengan cara menyuntikkan cairan sampel dan larutan standar (secara kuantitatif) pada lempeng kromatografi. Setelah itu lempeng kromatografi dielusi di dalam bejana fase gerak I kloroform : aseton = 9 : 1, kemudian dikeringkan dengan pengering rambut. Hasil elusi yang telah dikeringkan diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm. *Rate of flow* (Rf) dari fluoresensi bercak sampel dan standar dibandingkan. Aflatoksin dikatakan positif jika Rf sampel sama dengan standar (deteksi aflatoksin secara kualitatif).

Kandungan aflatoksin pada sampel (deteksi aflatoksin secara semi kuantitatif) diperoleh dengan membandingkan intensitas fluoresensinya dengan standar. Hal tersebut diperoleh dari deret aflatoksin yang dielusi dengan fase gerak I dan kandungan aflatoksin ditentukan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kandungan aflatoksin (ppb)} = \frac{S \times Y \times V \times F_p}{W \times Z}$$

Keterangan :

S: Volume aflatoksin standar (μ l) yang memberikan perpendaraan setara dengan Z μ l sampel

Y: Konsentrasi aflatoksin standar dalam μ g/ ml

Z: Volume ekstrak sampel yang dibutuhkan untuk memberikan perpendaraan setara dengan S μ l standar aflatoksin

V: Volume pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel ekstrak akhir (μ l)

W: Volume sampel (ml)

Fp: Faktor pengenceran

Penghambatan produksi aflatoksin dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A: Konsentrasi aflatoksin yang dihasilkan oleh *A. flavus* pada medium PDB

B: Konsentrasi aflatoksin yang dihasilkan oleh *A. flavus* yang dikultur bersama isolat kapang atau khamir dari ragi tempe pada medium PDB

Hasil dan Pembahasan

A. Isolasi dan Identifikasi Kapang dan Khamir dari Ragi Tempe

Identifikasi kapang dari ragi tempe dilakukan secara mikroskopis untuk

mengetahui morfologi kapang menggunakan metode kultur *slide* yang dilengkapi dengan pengamatan makroskopis. Berdasarkan kunci identifikasi Pitt and Hocking (1997) penggolongan ordo Mucorales ke dalam genus berdasarkan pada bentuk kolumela dan ukuran spora, selanjutnya penggolongan *Rhizopus* ke dalam spesies berdasarkan pada perkembangan rizoid, ukuran spora, sporangiofor serta kolumela. Sedangkan menurut Gilman (1957) penggolongan *Mucor* ke dalam spesies berdasarkan ukuran sporangium dan ukuran sporangiospora, warna hifa serta suhu optimum pertumbuhan. Karakterisasi isolat kapang dari ragi tempe dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakterisasi isolat kapang ragi tempe

Karakterisasi isolat kapang	Hasil identifikasi kapang
Hifa berseptum, konidia dibentuk oleh fialid yang terletak di atas metula, terdapat di seluruh permukaan vesikel, konidia berwarna hitam, diameter koloni lebih dari 50 mm pada medium CYA	<i>Aspergillus niger</i>
Miselium seperti benang-benang tipis, tidak menghasilkan spora aseksual.	<i>Miselia sterilia</i>
Diameter sporangium kurang dari 100µm, berwarna putih sampai coklat emas, tumbuh pada suhu 37°C, spora 4-5 µm, kolumela berbentuk bulat.	<i>Mucor rouxii</i>
Kolumela berbentuk payung, rizoid sedikit atau kurang berkembang, pada sporangiofor tidak menggembung, panjang sporangiofor kurang dari 150 µm.	<i>Rhizopus cohnii</i>
Kolumela berbentuk payung, tidak memproduksi zigospora, pertumbuhan cepat pada suhu 37°C, diameter spora kurang dari 8µm, diameter kolumela 75µm.	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Rizoid berkembang dengan baik, tidak memproduksi zigospora, pertumbuhan cepat pada suhu 37°C, kolumela berbentuk payung dengan diameter lebih dari 100µm.	<i>Rhizopus oryzae</i>
Rizoid tidak berkembang dengan baik, kadangkala tidak muncul dari bagian dasar sporangiofor, kolumela berbentuk bulat, berwarna coklat keabuan, diameter spora jarang melebihi 5 µm.	<i>Rhizomucor pusillus</i>

Penggolongan khamir ke dalam spesies dapat dilakukan berdasarkan sifat morfologi dan fisiologis. Pada penelitian ini, pengamatan khamir dilakukan terhadap morfologi dan uji sifat fisiologis khamir yang meliputi uji asimilasi, fermentasi gula-gula dan kemampuan tumbuh pada suhu 37°C serta membentuk pati ekstraseluler (Tabel 2). Identifikasi spesies khamir secara lengkap

dilakukan dengan uji-uji lainnya seperti uji asimilasi N, kebutuhan vitamin, kemampuan menghasilkan amilase, pembentukan pigmen, produksi ester, produksi asam asetat, hidrolisis urea, pertumbuhan pada medium dengan tekanan osmotik tinggi serta reaksi dengan *diazonium blue* (Barnett *et al.*, 2000; Lodder, 1974).

Tabel 2. Karakterisasi isolat khamir

Karakterisasi isolat khamir	Hasil identifikasi khamir
Sel tumbuh membentuk pseudomiselium, dapat tumbuh pada suhu 37°C, tidak membentuk pati ekstraseluler, dapat melakukan fermentasi pada dekstrosa, galaktosa, maltosa, sukrosa dan trehalosa, dapat melakukan asimilasi pada dekstrosa, galaktosa, maltosa, sukrosa, trehalosa.	<i>Candida</i> sp1
Sel tumbuh membentuk pseudomiselium, dapat tumbuh pada suhu 37°C, tidak membentuk pati ekstraseluler, tidak dapat melakukan proses fermentasi, dapat melakukan asimilasi pada dekstrosa, galaktosa, maltosa, sukrosa, dan trehalosa.	<i>Candida</i> sp2
Sel tumbuh membentuk artrospora, dapat tumbuh pada suhu 37°C, tidak membentuk pati ekstraseluler, tidak dapat melakukan proses fermentasi, dapat melakukan asimilasi pada dekstrosa, galaktosa, laktosa, maltosa, rafinosa, sukrosa, dan trehalosa.	<i>Trichosporon</i> sp.

Secara lengkap hasil yang diperoleh dari isolasi dan identifikasi kapang serta khamir yang berasal dari ragi tempe dapat dilihat pada Tabel 3. Kapang yang sering dijumpai adalah *Rhizopus oligosporus*, selain itu juga dijumpai *R. oryzae*, *R. cohnii*, *Mucor rouxii*, *Rhizomucor pusillus* (*Mucor pusillus*), *Aspergillus niger*, dan miselia sterilia.

Genus *Rhizopus*, *Mucor*, dan *Rhizomucor* termasuk dalam ordo Mucorales. Ketiga genus tersebut merupakan kapang tidak berseptum, memiliki struktur reproduksi

aseksual yang disebut sporangiospora, terdapat di dalam sporangium. *Aspergillus niger* merupakan kapang berseptum, konidia dibentuk oleh fialid yang terletak di atas metula, terdapat di seluruh permukaan vesikel. Pada medium CYA, koloni *A. niger* berdiameter lebih dari 50 mm, koloni berwarna hitam. Pada vesikel terdapat metula dan fialid (Pitt and Hocking, 1997). Kapang lain yang dijumpai yakni miselia sterilia. Jika dilihat di bawah mikroskop, penampakan miselium tersebut hanya seperti benang-benang tipis.

Tabel 3. Hasil isolasi dan identifikasi kapang dan khamir dari ragi tempe

Asal daerah	Nama ragi	Kapang dan khamir
Jakarta	Raprima	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Bogor	Raprima	<i>R. oligosporus</i>
Purwokerto	Biang Premix	<i>R. oligosporus</i> , <i>A. Niger</i>
	Gamma	<i>R. oligosporus</i>
	Parabola	<i>R. oligosporus</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>A. Niger</i>
	Payung	<i>R. oligosporus</i> , <i>Rhizomucor pusillus</i> , <i>Mucor rouxii</i>
	Tiga Berlian	<i>R. oligosporus</i> , <i>Mucor rouxii</i>
Yogyakarta	Usar daun jati	<i>Candida</i> sp1, <i>Candida</i> sp2, <i>Trichosporon</i> sp., miselia sterilia
	Usar daun Jati	<i>R. oligosporus</i>
	Usar daun waru	<i>R. oligosporus</i>
Malang	Usar daun waru	<i>R. cohnii</i>

Khamir yang ditemukan adalah *Candida* sp1, *Candida* sp2 dan *Trichosporon* sp. Sel *Candida* tumbuh membentuk pseudomiselium yang mengandung banyak sel-sel tunas atau disebut blastospora, sedangkan *Trichosporon* membentuk artrospora (Lodder, 1974).

Spesies khamir hanya ditemukan pada usar daun jati yang berasal dari Purwokerto,

sedangkan pada usar lainnya tidak ditemukan adanya khamir. Hal tersebut dapat disebabkan karena usar daun jati yang berasal dari Purwokerto adalah usar yang baru dibuat, sedangkan usar yang lain tidak diketahui secara pasti waktu pembuatannya. Menurut Jutono (1985) viabilitas mikrob pada usar dapat bertahan selama 4 - 6 minggu jika disimpan

pada suhu ruang, sedangkan jika disimpan pada suhu 4°C akan bertahan lebih dari 24 minggu. Beberapa penelitian yang dilakukan pada usar yang baru dibuat menunjukkan adanya khamir pada usar tersebut.

Samson *et al.*, (1987) melaporkan bahwa pada 110 sampel tempe, kapang dan khamir yang sering dijumpai adalah *R. oryzae*, *R. oligosporus*, *M. indicus*, *Trichosporon beigelii*, *Candida lusitaniae*, *C. maltosa* dan *C. intermedium*. Pada tempe ditemukan beberapa spesies khamir, oleh karena usar dibuat dengan meletakkan tempe pada permukaan daun, maka pada usar yang belum terlalu lama waktu pembuatannya akan ditemukan berbagai spesies khamir.

B. Kemampuan Isolat Kapang dan Khamir dalam Menghambat Produksi Aflatoksin

Pengujian kemampuan isolat kapang dan khamir dalam menghambat produksi aflatoksin dilakukan pada dua belas isolat yang berasal dari ragi tempe. Berdasarkan analisis kandungan aflatoksin diketahui bahwa produksi aflatoksin menurun dibandingkan kontrol.

Kapang dan khamir yang diisolasi dari ragi tempe memiliki kemampuan yang bervariasi dalam menghambat produksi aflatoksin (Tabel 4). *Rhizopus cohnii* memiliki kemampuan terendah dalam menghambat produksi AFB₁ 45%, AFB₂ yakni sebesar 19.23%, dan total aflatoksin sebesar 37.21%, sedangkan *Candida sp1* memiliki kemampuan tertinggi yakni AFB₁ 99.95%, AFB₂ 99.98%, dan total aflatoksin sebesar 99.96%. Penurunan kadar aflatoksin dapat disebabkan karena terhambatnya pertumbuhan *A. flavus* dan/atau karena terhambatnya biosintesis aflatoksin.

Tabel 4 . Penghambatan produksi aflatoksin oleh isolat kapang dan khamir yang berasal dari ragi tempe

NO.	Cendawan	Ragi	Persentase penghambatan aflatoksin		
			AFB ₁	AFB ₂	Total
1.	<i>Aspergillus niger</i>	Biang Premix	82.50	90.00	87.44
2.	<i>Candida sp1</i>	Usar daun jati	99.95	99.98	99.96
3.	<i>Candida sp2</i>	Usar daun jati	89.84	92.22	95.56
4.	<i>Mucor rouxii</i>	Tiga Berlian	80.00	48.28	71.15
5.	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Payung	99.17	98.95	99.15
6.	<i>Rhizopus cohnii</i>	Usar daun waru	45.00	19.23	37.21
7.	<i>R. oligosporus</i>	Gamma	51.25	62.50	54.65
8.	<i>R. oligosporus</i>	Raprima	47.20	46.00	46.86
9.	<i>R. oligosporus</i>	Usar daun jati	70.00	82.69	73.84
10.	<i>R. oligosporus</i>	Usar daun waru	60.00	65.38	61.63
11.	<i>R. oryzae</i>	Parabola	55.00	52.63	54.31
12.	<i>Trichosporon sp.</i>	Usar daun jati	97.00	96.57	96.88

Rhizopus oligosporus yang berasal dari ragi tempe yang berbeda memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghambat produksi aflatoksin. Kemampuan tersebut bervariasi antara 46.86 – 73.84%. Menurut Suzzi *et al.*, (1995) aktivitas biokontrol tidak sepenuhnya tergantung pada spesies atau genus melainkan setiap galur memiliki karakteristik yang spesifik.

Kesimpulan

Kapang yang sering dijumpai pada ragi tempe adalah *Rhizopus oligosporus*. Dua belas isolat kapang dan khamir yang diisolasi dari ragi tempe memiliki kemampuan yang bervariasi dalam menghambat produksi aflatoksin. *Rhizopus cohnii* memiliki kemampuan terendah dalam menghambat produksi total aflatoksin sebesar 37.21%, sedangkan *Candida sp1* memiliki kemampuan tertinggi yakni sebesar 99.96%.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Penelitian Veteriner, Bogor dan Kelti Laboratorium Toksikologi yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini. Penelitian ini terlaksana dengan dukungan bahan, sarana dan prasarana dari Balai Penelitian Veteriner. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dra. Romsyah Maryam M.Sc, Drh. Jainudin Gholib, Dr. R. Widiastuti, B.Sc dan Eni Kusumaningtyas, M.Sc serta para teknisi di Laboratorium Mikologi dan Toksikologi atas bantuan selama penelitian.

Daftar Pustaka

- AOAC (Association of Official Analytical Chemist), 1995. Natural poison. In: Hoewitz, W. (ed.) *Official Methods Analysis of The Association of Official Analytical Chemists* 11st ed. Assosiation of Analytical Chemist. Washington DC.
- Barnett, J.A., Payne R.W. and Yarrow, D. 2000. *Yeast Characteristic and Identification*. 3th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. and Payne, G.A. 2000. *Aspergillus flavus*. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., and Patel, P.A. (Eds.). *Encyclopedia of Food Microbiology* vol 3. pp. 72-79. Academic Press, New York.
- Daulay, D. 1989. *Identifikasi Mikroba yang Berperan dalam Fermentasi Tauco*. Laporan Penelitian, Laboratorium Mikrobiologi Pangan PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Dharmaputra, O.S. 2002. Review on aflatoxin in Indonesian food and feedstuffs and their products. *BIOTROPIA* 19: 26-46.
- Gilman, J.C. 1957. *A Manual of Soil Fungi* 2nd ed. The Iowa State College Press, Iowa.
- Harrigan, W.F. 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology* 3th ed. Academic Press, San Diego
- Heathcot, J.G. 1984. Aflatoxin and related toxin. In: Betina, V (ed.). *Mycotoxins: Production, Isolation, Separation & Purification*. Pp 89-126. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.
- Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, L.B., Corrier, D.E. and Mollenhauer, H.H. 1986. Progression aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science* 65: 1891-1899.
- Jutono. 1985. The microbial of usar, a traditional tempe inoculum. In: *Proceeding of Asian symposium on non-salted soybean fermentation*, July 1985. Tsukuba, Japan.
- Kim, J.G., Lee, Y.W., Kim, P.G., Roh, W.S. and Shintani, H. 2000. Reduction of aflatoxin by korean soybean paste and its effect on cytotoxicity and reproductive toxicity-part 1. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by korean soybean paste (doen-jang) and identification of active component. *J.Food.Prot.* 63: 1295-1298.
- Lodder, J. 1974. *The Yeast: A Taxonomic Study* 2nd ed. North-Holland Publ. Comp. Amsterdam.
- Noer S. 2002. Ancaman kanker hati dari makanan tercemar jamur. *KOMPAS* 11 September 2002: 11.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional. London.
- Samson, R.A., Van Kooij, J.A. and De Broer, E. 1987. Microbial quality of commercial tempeh in the Netherlands. *J. Food. Prot* 50: 92-94.
- Sardjono, Rahayu, K. and Sudarmadji, S. 1992. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in mixed culture with *Aspergillus oryzae*. *Asean Food Jour.* 7: 30-33.
- Sutikno, A.I., Haryati, T. dan Suherman, D. 1993. Kontaminasi aflatoksin pada ransum itik. *Ilmu & Peternakan* 6 (1): 37-41.
- Suzzi, G., Romano, P., Ponti, I. and Montuschi C. 1995. Natural wine yeast as biocontrol agent. *J. Appl. Bacteriol* 78: 304-308.
- Zanelli, L. 2000. *Moulds, Bacteria and Solutions*. Feed Industry Servis, Italy.