

# AFLATOKSIN DALAM PAKAN TERNAK DI INDONESIA: PERSYARATAN KADAR DAN PENGEMBANGAN TEKNIK DETEKSI-NYA

SRI RACHMAWATI

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

## ABSTRAK

Kontaminasi aflatoksin pada pakan ternak di Indonesia sangat mungkin terjadi dan dapat mempengaruhi kesehatan dan produktivitas ternak. Untuk mengurangi akibat yang merugikan, maka peraturan yang berkaitan dengan mutu pakan telah dikeluarkan pemerintah. Selain itu kontrol kualitas pakan secara kontinyu menjadi penting, dan memerlukan metoda analisis yang sederhana, cepat, sensitif dan murah. Pada makalah ini disajikan keadaan, situasi cemaran aflatoksin pada pakan dan bahan pakan jagung di Indonesia, perundang-undangan yang berkaitan dengan mutu pakan terutama aflatoksin, dan teknik deteksi yang dikembangkan Balai Penelitian Veteriner (Balitvet). Dari hasil penelitian, uji banding antar laboratorium, kerjasama penelitian yang pernah dilakukan di Indonesia, maka terbukti pakan ayam yang dikumpulkan dari berbagai daerah, umumnya tercemar aflatoksin. Hasil uji banding antar laboratorium dan hasil penelitian kerjasama dengan Balai Pengujian Mutu Pakan Ternak Direktorat Jendral Peternakan (BPMPT), menunjukkan bahwa 14% pakan ayam dari 207 sampel yang berasal dari berbagai sumber mengandung aflatoksin melebihi standar mutu berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI). Peraturan mutu pakan yang berkaitan dengan batas maksimum aflatoksin yang masih aman untuk dikonsumsi ternak tertuang dalam revisi SNI (1995), Persyaratan Teknis Minimal pakan konsentrat non ruminansia dan ruminansia serta SK Dirjen Peternakan Nomor 524/TN.250/Kpts/DJP/Deptan/ 1997. Teknik deteksi aflatoksin yang dikembangkan Balitvet adalah secara *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), yang dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu sintesa hapten, imunisasi dan produksi antibodi, pengembangan format, pengujian performan, perakitan kit ELISA. Pelatihan serta uji coba lapang dilakukan untuk validitas teknik ELISA ini. Telah dihasilkan kit ELISA "rapid assay" dengan waktu inkubasi konjugat 5 menit dan substrat 10 menit. Respon antibodi spesifik terhadap AFB<sub>1</sub> (100%), dengan reaksi silang terhadap AFB<sub>2</sub> 0,9%, AFG<sub>1</sub> 3,5% dan AFG<sub>2</sub> 1,6%. Limit deteksi 0,3 ppb, dan analisis dapat dilakukan sampai 30 ppb. Komposisi kit ELISA terdiri dari 7 botol AFB<sub>1</sub> standar (30, 10, 3,3, 1,2, 0,4, 0,12 dan 0 ppb), konjugat, substrat dan larutan penghenti, plat pencampuran dan plat yang terlapis antibodi. Kit ELISA stabil disimpan dalam suhu 4°C selama 2 bulan. Uji coba lapang, pengujian antar laboratorium menunjukkan hasil cukup akurat, perbandingan hasil analisa sampel pakan dan jagung secara ELISA dan HPLC menunjukkan hasil yang konsisten. Dengan disajikannya informasi di atas diharapkan potensi tercemarnya pakan dan bahan dasar pakan oleh aflatoksin serta bahayanya bagi kesehatan ternak dan manusia dapat lebih diwaspadai. Dengan tersedianya teknik deteksi yang dikembangkan, kontrol kualitas pakan dan jagung diharapkan dapat dilakukan secara lebih cepat dan berkesinambungan.

**Kata kunci:** Aflatoksin, ELISA, deteksi, pakan

## ABSTRACT

### AFLATOXIN IN ANIMAL FEED IN INDONESIA: THE REGULATION ON THE TOXIC CONTENT AND THE DEVELOPMENT OF DETECTION TECHNIQUE

Aflatoxin contamination of agricultural commodities including feedstuff potentially occurs in Indonesia, and can cause problem to animal health and productivity. To minimize the impact of such contamination to both human and animal health, regulations regarding feed quality have been issued by the government. A continuous monitoring of the contamination using a simple, sensitive, rapid and cost-effective method is greatly needed. This paper contains some information about the current situation of aflatoxin contamination in feed and its ingredient (corn), the regulation related to aflatoxin contamination and the development of detection technique for analysis aflatoxin B<sub>1</sub> in feedstuff conducted by Research Institute for Veterinary Science (RIVS). From research results, inter laboratory studies and collaboration research conducted in Indonesia, they indicate that poultry feed collected from different areas of Indonesia is contaminated by aflatoxins. Results of inter laboratory study and collaborative research with Feed Lab, Directorate General for Livestock Services (DGLS) showed that 14.0% of 207 feed samples from different sources contain aflatoxin above the standard determined by Standar Nasional Indonesia (SNI). Regulations related to aflatoxin content in feed are compiled in the SNI (revised formed), the Minimum Technical Requirement of feed concentrate for ruminant and non ruminant, and the regulation from DGLS, letter No 524/TN.250/Kpts/DJP/Deptan/1997. RIVS developed an ELISA technique for analysis aflatoxin in feed and corn, which was involving some steps of activities include hapten synthesis, production and characterization of antibody, development of assay performance, designing a method as a prototype kit. For validation of this technique, RIVS has conducted a training workshop and a field trial. Rapid assay ELISA kit has been designed with incubation time of 5 minutes for conjugate and 10 minutes for substrate. Antibody response was specific to AFB<sub>1</sub> (100%) with cross reactivity of 0.9, 3.5 and 1.6% for aflatoxins B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>, respectively. The limit of detection of

AFB<sub>1</sub> was 0.3 ppb. The range of analysis is from 0.3 ppb up to 30 ppb. An ELISA kit composed of seven bottles of AFB<sub>1</sub> standards solution of 30, 10, 3.3, 1.2, 0.4, and 0.12 ppb and blank (0 ppb AFB<sub>1</sub>), a conjugate of AFB<sub>1</sub>-HRPO, a substrate, a stopping solution, an antibody coated plate, and one mixing plate. The kit was stable at 4°C for two months. The field trial of ELISA kit showed an accurate result and when comparing the ELISA method with the standard method of HPLC, a consistent result was also found. With the information given above, people or farmers should be aware of the danger of aflatoxin and should take precaution to prevent aflatoxin contamination. RIVS ELISA kit is a useful technique to detect aflatoxin in feedstuff and, hence, controlling the aflatoxin contamination.

**Key words:** Aflatoxins, ELISA, detection, feed

## PENDAHULUAN

Kerugian akibat pencemaran kapang dan aflatoxin merupakan masalah di bidang peternakan, karena dapat mempengaruhi produktivitas ternak. Kapang dapat menyebabkan kerusakan fisik dan kimiawi pakan. Kerusakan fisik terjadi oleh peningkatan pertumbuhan dan populasi kapang sehingga warna, bentuk, dan bau pakan tersebut berubah, sedangkan kerusakan kimiawi terjadi oleh adanya produksi aflatoxin dari kapang tersebut, sehingga pakan tercemar aflatoxin. Peluang pencemaran ini cukup besar, karena iklim tropis di Indonesia sangat mendukung. Kondisi lingkungan yang diperlukan untuk terbentuknya aflatoxin oleh kapang adalah kelembaban minimum 85 persen dan suhu optimum 25–27°C. Kapang pencemar yang menghasilkan metabolit sekunder aflatoxin terutama adalah *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*. *A. flavus* umumnya memproduksi aflatoxin B (AFB<sub>1</sub> dan AFB<sub>2</sub>), sedangkan *A. parasiticus* dapat memproduksi aflatoxin B dan aflatoxin G (AFG). *A. flavus* terdapat di mana-mana, sedangkan *A. parasiticus* tidak. Saat ini ada 4 macam aflatoxin yaitu AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> dan AFG<sub>2</sub> yang merupakan aflatoxin induk yang telah dikenal secara alami dan dijumpai di alam. AFB<sub>1</sub> adalah jenis aflatoxin yang paling toksik. AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> dan AFG<sub>2</sub> mempunyai daya racun yang rendah, hanya 1/60-1/100 kali dibandingkan AFB<sub>1</sub> dan tidak terlalu berbahaya. Kapang tersebut banyak mencemari produk pertanian, diantaranya adalah kacang-kacangan, beras, jagung, gandum, biji kapas dan biji-bijian lainnya (DIENER dan DAVIS, 1969).

Masalah yang cukup berat akibat dari pencemaran aflatoxin pada pakan akan berlanjut dengan timbulnya gangguan keracunan bagi ternak yang mengkonsumsi pakan tercemar tersebut. Data FAO menyatakan bahwa 25% suplai biji-bijian di dunia terkontaminasi oleh kapang dan mikotoksin. Di negara Asia Tenggara malahan ditemukan sebanyak kira-kira 50% jagung dan 90% pakan ternak unggas terkontaminasi mikotoksin, yang merupakan sumber kerugian ekonomi utama pada industri peternakan di negara-negara tropis ini (LIU, 2002). Hasil studi di tiga negara ASEAN melaporkan bahwa sebesar 400 juta dollar kerugian setiap tahunnya terjadi akibat menurunnya produktivitas ternak (ZANNELI, 2000).

Hasil penelitian yang dilakukan *International Agency for Research on Cancer* terhadap hewan percobaan terbukti bahwa AFB<sub>1</sub> adalah senyawa racun bersifat karsinogen, dan pada tahun 1988 dimasukkan ke dalam urutan senyawa karsinogen bagi manusia. Pernyataan ini didukung oleh data studi epidemiologi yang dilakukan di negara Asia dan Afrika yang ternyata ada korelasi positif antara mengkonsumsi pangan yang mengandung AFB<sub>1</sub> dengan kejadian kanker sel hati. Kejadian penyakit akibat aflatoxin ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti umur, jenis kelamin, status pangan dan atau terjadi bersama-sama dengan agen penyebab lain seperti virus hepatitis atau infeksi parasit (GROOPMAN *et al.*, 1988).

Untuk menjaga agar kadar aflatoxin pada pakan dan pangan tetap dalam batas-batas yang masih dapat ditolerir dan tidak membahayakan ternak dan manusia, beberapa negara termasuk Indonesia telah menetapkan batas maksimum kadar aflatoxin pada pakan dan pangan. Metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dianggap dapat dilakukan lebih mudah dan cepat serta cukup sensitif. Kegiatan pengembangan kit ELISA aflatoxin B<sub>1</sub> telah dilakukan oleh Balitvet, dan telah dapat dirakit kit ELISA aflatoxin B<sub>1</sub> untuk analisis kandungan aflatoxin pada sampel pakan dan jagung.

Pada tulisan ini disajikan situasi cemaran aflatoxin pada pakan dan bahan pakan jagung di Indonesia, peraturan yang berkaitan dengan mutu pakan terutama aflatoxin, serta teknik deteksi yang dikembangkan. Tujuan dari penulisan ini adalah untuk lebih mewaspadaai potensi pencemaran pakan dan bahan dasar pakan oleh aflatoxin, serta bahayanya bagi kesehatan ternak dan manusia. Dengan tersedianya teknik deteksi yang dikembangkan ini, maka kontrol kualitas pakan dan jagung diharapkan dapat dilakukan secara lebih cepat dan berkesinambungan.

## SITUASI CEMARAN AFLATOKSIN PADA PAKAN DENGAN BAHAN DASAR JAGUNG DI INDONESIA

Kerugian di bidang peternakan akibat pencemaran pakan oleh aflatoxin antara lain penurunan kualitas dan kuantitas produk peternakan. Kualitas produk menurun karena adanya residu aflatoxin pada produk ternak tersebut. Aflatoxin terdeteksi sesekali pada

susu dan daging, karena ternaknya mengkonsumsi pakan yang mengandung aflatoksin. Dari hasil penelitian yang pernah dilakukan di Indonesia terbukti pakan ayam yang dikumpulkan dari berbagai daerah di Indonesia umumnya tercemar aflatoksin (BAHRI *et al.*, 1994a). Hasil uji banding antar laboratorium dan hasil penelitian kerjasama dengan Pengujian Mutu Pakan Ternak (BPMPT), Direktorat Jenderal Peternakan (tahun 2003–2004) juga menunjukkan bahwa 14% pakan ayam dari jumlah 207 sampel pakan yang dianalisis mengandung aflatoksin melebihi standar mutu berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI). Sampel tersebut dikumpulkan dari beberapa sumber termasuk pabrik pakan, penjual pakan ternak, dan sampel-sampel pakan yang datang ke BPMPT, yang berasal dari beberapa propinsi di Indonesia. Data kandungan aflatoksin pada sampel-sampel tersebut disajikan pada Tabel 1. Ternyata jumlah sampel pakan yang mengandung aflatoksin tinggi ( $>$ SNI,  $>$ 50 ppb) relatif lebih sedikit, karena pabrik-pabrik pakan telah mengantisipasi kadar aflatoksin pada bahan bakunya, terutama pada jagung. Kadar aflatoksin pada bahan dasar jagung dapat dilihat pada Tabel 2. Jagung merupakan bahan dasar pakan dan digunakan paling banyak (50–60%) dalam ransum unggas. Jagung lokal ternyata mengandung aflatoksin lebih tinggi dibandingkan dengan jagung impor terutama yang berasal dari Cina yang kadar aflatoksinnya rendah. Kadar aflatoksin pada jagung sebagai bahan baku pakan harus rendah, maksimal 50 ppb (SK Dirjen Peternakan), sehingga pakan jadinya akan mengandung aflatoksin yang lebih rendah lagi. Biasanya pakan yang sudah disimpan cukup lama dengan cara penyimpanan yang kurang baik, seperti disimpan pada ruang atau gudang yang lembab, bocor akan mengandung aflatoksin tinggi.

Dari hasil penelitian, residu aflatoksin pada produk ternak (hati, daging) dan susu sapi juga ditemukan. Dari 31 sampel hati ayam, sebanyak 14 sampel positif mengandung residu AFB<sub>1</sub> dengan kadar rata-rata 0,007 ppb dan 30 sampel mengandung AFM<sub>1</sub> kadar rata-rata 12,072 ppb. Pada 31 sampel daging ayam yang dianalisis ternyata semuanya mengandung AFM<sub>1</sub> kadar rata-rata 7,364 ppb dan sebanyak 24 sampel terdeteksi adanya residu AFB<sub>1</sub> kadar rata-rata 0,002 ppb. Sampel hati dan daging sapi yang dikumpulkan dari pasar tradisional dan swalayan di daerah Jawa Barat ternyata juga mengandung residu AFB<sub>1</sub> dan AFM<sub>1</sub>. Tiga belas dari 21 sampel hati sapi yang dikumpulkan mengandung residu AFB<sub>1</sub> dalam kisaran 0,33–1,44 ppb, tujuh sampel diantaranya juga mengandung AFM<sub>1</sub> kadar  $<$ 0,1 ppb. Hanya lima dari 31 sampel daging sapi terdeteksi residu AFB<sub>1</sub> kadar dalam kisaran 0,46–1,14 ppb, dan empat sampel tersebut juga mengandung residu AFM<sub>1</sub>  $<$ 0,1 ppb. Sementara itu, residu AFM<sub>1</sub> pada 12 sampel susu

terdeteksi dalam kisaran 0,04–0,17 ppb (MARYAM, 1996; BAHRI *et al.*, 1994b; WIDIASTUTI, 2000). Hasil penelitian juga menyimpulkan adanya penurunan bobot badan ternak, baik pada unggas maupun ruminansia akibat pencemaran aflatoksin pada pakan yang dikonsumsi. Hasil penelitian GINTING (1988) memperlihatkan bahwa, pemberian 300 ppb AFB<sub>1</sub> (0,3 mg/kg BB) pada DOC broiler selama 35 hari mengakibatkan penurunan konsumsi ransum dan bobot badan dari 1049 gram (kontrol) menjadi 640 gram (ayam perlakuan AFB<sub>1</sub>). Penurunan bobot ayam pedaging juga terjadi pada pemberian pakan yang mengandung AFB<sub>1</sub> 200 ppb selama 8 minggu. Bobot ayam turun secara nyata yaitu  $1853,3 \pm 18,9$  gram pada ayam yang diberi perlakuan AFB<sub>1</sub> dibandingkan dengan bobot ayam kontrol  $1999,3 \pm 25,1$  gram (MANI *et al.*, 2001).

Penurunan produksi telur juga terjadi pada ayam yang pakannya mengandung aflatoksin. Hasil penelitian EXARHOS dan GENTRY (1982), menunjukkan adanya penurunan produksi telur dari 85 persen (kontrol) menjadi 40 persen pada ayam yang diberi AFB<sub>1</sub> 1,0 mg/kg BB/hari selama 6 minggu. MUTHIAH *et al.* (1998) juga melaporkan bahwa pada percobaan ayam petelur, makin tinggi AFB<sub>1</sub> dalam pakan yang diberikan, maka produksi telur makin menurun. Ayam petelur yang diberi pakan mengandung AFB<sub>1</sub> 0; 0,5; 1,0 dan 1,5 ppm menghasilkan telur yang berbeda nyata untuk masing-masing perlakuan. Produksi telur ayam kontrol 81,3 persen, sedangkan produksi telur ayam perlakuan masing-masing adalah 73,6 persen, 68,9 persen dan 64,7 persen.

Pengaruh aflatoksin pada ternak ruminansia dilaporkan oleh DASS dan ARORA (1994). Pada percobaan ini kerbau Murrah umur 10 hari diberi susu yang mengandung AFB<sub>1</sub> 0; 0,3; 0,6; dan 1,0 ppm selama 13 minggu. Ternyata rata-rata pertumbuhan bobot badan menurun secara nyata dengan meningkatnya dosis AFB<sub>1</sub> yang diberikan. Pertambahan bobot badan kerbau masing-masing adalah 2,76; 2,15; 1,86; dan 1,5 kg. Analisis lebih lanjut dari data pertumbuhan disarankan bahwa 0,14 ppm AFB<sub>1</sub> adalah *level* aman yang dapat diberikan pada ternak besar pada periode umur di atas. Tercemarnya pakan ternak oleh kapang dan aflatoksin yang dihasilkannya juga dilaporkan dapat mengganggu fungsi metabolisme, absorpsi lemak, penyerapan unsur mineral, khususnya tembaga (Cu), besi (Fe), kalsium (Ca), dan fosfor (P), serta beta-karoten, penurunan kekebalan tubuh, kegagalan program vaksinasi, kerusakan kromosom, perdarahan, dan memar. Semua gangguan tersebut berakibat pertumbuhan terhambat dan kematian meningkat sehingga produksi ternak menurun (JASSAR dan BALWANT SINGH, 1989; ABDELHAMID dan DORRA, 1990; DIMRI *et al.*, 1994; MANI *et al.*, 2001; PRABAHARAN *et al.*, 1999).

**Tabel 1.** Kadar aflatoksin pada pakan yang diperoleh dari beberapa sumber

| Sumber pakan          | Jumlah sampel | Kisaran kadar (ppb) | Jumlah sampel (>standar)** | Sumber pustaka    |
|-----------------------|---------------|---------------------|----------------------------|-------------------|
| PT Behn Meyer Kimia   | 4             | 12,0-50,0           | 0                          | SUPARTO, 2004     |
| Disnak Prop. Sumut    | 15            | 0,3-123,3           | 2                          | Idem              |
| PT Altech             | 1             | 60                  | 1                          | Idem              |
| BPMPT*                | 26            | <0,3-123,3          | 4                          | RACHMAWATI, 2004a |
| PT Sinta Prima        | 11            | 0,96- 175,1         | 4                          | Idem              |
| PT Sierad Tbk         | 15            | 0,3-26,0            | 0                          | Idem              |
| Toko pakan, Jabotabek | 12            | 2,0-38,0            | 0                          | Idem              |
| Toko Pakan, Bogor     | 20            | <0,3-23,9           | 0                          | RACHMAWATI, 2004b |
| BPMPT* (Tahap 1)      | 30            | <0,3-107,3          | 7                          | RACHMAWATI, 2004c |
| BPMPT*(Tahap 2)       | 53            | 2,2-105,29          | 6                          | Idem              |
| BPMPT*(Tahap 3)       | 40            | 1,0-88,9            | 8                          | Idem              |

\*sampel datang dari berbagai propinsi di Indonesia

\*\*> 50 ppb (*part per billion*)**Tabel 2.** Kadar aflatoksin (AFL) pada bahan baku pakan (jagung) yang diperoleh dari beberapa sumber

| Sumber bahan             | Jenis jagung      | Jumlah sampel | Kisaran AFL, ppb | Jumlah sampel (> standar)* | Sumber pustaka    |
|--------------------------|-------------------|---------------|------------------|----------------------------|-------------------|
| PT Sinta                 | Lokal, Jatim      | 3             | 123,0-165,0      | 3                          | RACHMAWATI, 2004a |
|                          | Lokal Lampung     | 3             | 24,5-131         | 2                          | Idem              |
|                          | Lokal, Jatim      | TD            | 2-214            | TD                         | YANUARTIN, 2004   |
|                          | Lokal Lampung     | TD            | 2,0-36,0         | 0                          | Idem              |
|                          | Lokal, Makasar    | TD            | 218,0-517,0      | TD                         | Idem              |
|                          | Impor, Thailand   | TD            | 43,0-82,0        | TD                         | Idem              |
|                          | Impor, Thailand   | 3             | 47,3-74,6        | 2                          | RACHMAWATI, 2004a |
|                          | Impor, China      | 3             | 1,8-4,2          | 0                          | Idem              |
|                          | TD                | 7             | 2,1-91,6         | 5                          | Idem              |
|                          | Impor, China      | TD            | 1,0-7,0          | 0                          | YANUARTIN, 2004   |
| PT Sierad Tbk            | Impor, India      | TD            | 4,0-8,0          | TD                         | Idem              |
|                          | Lokal             | 1             | 32,1             | 0                          | RACHMAWATI, 2004a |
| Toko Pakan, Jabotabek    | Impor China       | 17            | <0,3-1,2         | 0                          | Idem              |
|                          | TD                | 12            | 0,5-182,9        | 6                          | Idem              |
| Toko Pakan, daerah Bogor | TD                | 12            | 5,1-36,9         | 0                          | RACHMAWATI, 2004b |
| BPMPT (1)                | Lokal, Lampung    | 3             | 0,3->60          | 1                          | RACHMAWATI, 2004c |
|                          | TD, Pabrik pakan  | 5             | 0,58->60         | 1                          | Idem              |
|                          | Lokal, Boyolali   | 1             | 1,05             | 0                          | Idem              |
|                          | Lokal, Purwokerto | 1             | >60              | 1                          | Idem              |
| BPMPT (2)                | TD                | 21            | <0,3->60         | 15                         | Idem              |

TD = Tidak diketahui

\*>50 ppb (*part per billion*)

## PERATURAN YANG BERKAITAN DENGAN MUTU PAKAN DAN BAHAN BAKU PAKAN

Pengeluaran terbesar dari biaya produksi usaha peternakan adalah untuk pakan, oleh sebab itu mutu pakan harus benar-benar terjaga agar tidak merugikan peternak. Mutu pakan tidak hanya ditentukan oleh komposisi nilai gizi dari pakan tersebut, tetapi juga harus bebas dari kontaminan seperti senyawa racun aflatoksin yang berpotensi mencemari pakan ternak. Senyawa aflatoksin yang terkandung pada pakan dapat menyebabkan kerugian peternak, karena kesehatan dan produktivitas ternak menurun. Kadar aflatoksin yang tinggi pada pakan juga dapat menyebabkan adanya residu toksin pada produk ternak daging, hati dan susu, yang akhirnya berbahaya bagi manusia yang mengkonsumsi produk ternak yang mengandung residu toksin tersebut. Meskipun dosis mematikan ( $LD_{50}$ ) AFB<sub>1</sub> untuk ternak ayam cukup tinggi yaitu 8,80 mg AFB<sub>1</sub>/kg bobot badan (BAITON *et al.*, 1980), namun efek kronis senyawa racun tersebut tidak dapat diabaikan. Oleh sebab itu untuk menghindari kerugian dan melindungi konsumen produk peternakan, pemerintah merasa perlu untuk menetapkan peraturan berkaitan dengan mutu pakan.

**Tabel 3.** Kadar maksimum aflatoksin (AFL) dalam persyaratan pakan non ruminansia (revisi SNI)

| No | Jenis pakan                | AFL ppb | Kode SNI     |
|----|----------------------------|---------|--------------|
| A  | Ayam ras petelur           |         |              |
|    | Anak ( <i>starter</i> )    | 50      | 01-3927-1995 |
|    | Dara ( <i>grower</i> )     | 50      | 01-3928-1995 |
|    | Petelur ( <i>layer</i> )   | 50      | 01-3929-1995 |
| B  | Ayam pedaging              |         |              |
|    | Broiler <i>starter</i>     | 50      | 01-3930-1995 |
|    | Broiler <i>finisher</i>    | 50      | 01-3931-1995 |
| C  | Puyuh petelur              |         |              |
|    | Anak ( <i>starter</i> )    | 40      | 01-3905-1995 |
|    | Dara ( <i>grower</i> )     | 40      | 01-3906-1995 |
|    | Petelur ( <i>layer</i> )   | 40      | 01-3907-1995 |
| D  | Itik petelur               |         |              |
|    | Anak ( <i>starter</i> )    | 20      | 01-3908-1995 |
|    | Dara ( <i>grower</i> )     | 20      | 01-3909-1995 |
|    | Petelur ( <i>layer</i> )   | 20      | 01-3910-1995 |
| E  | Babi                       |         |              |
|    | Anak prasapah              | 50      | 01-3911-1995 |
|    | Anak sapah, <i>Starter</i> | 50      | 01-3912-1995 |
|    | Pembesaran, <i>Grower</i>  | 50      | 01-3913-1995 |
|    | <i>Finisher</i>            | 50      | 01-3914-1995 |
|    | Induk bunting              | 50      | 01-3915-1995 |
|    | Induk menyusui             | 50      | -            |
|    | Pejantan                   | 50      | 01-3916-1995 |

**Sumber:** Revisi Standar Nasional Indonesia, SNI, dalam SUPARTO (2004)

Pengujian bahan baku pakan dan pakan mengacu pada persyaratan Standar Nasional Indonesia (SNI) dan Persyaratan Teknis Minimal yang berlaku secara nasional. SNI adalah standar yang dikeluarkan oleh Badan Standarisasi Nasional (BSN) dan berlaku secara nasional, sedangkan terhadap standar mutu pakan yang tidak atau belum ditetapkan dalam SNI, maka Menteri Pertanian telah menetapkan Persyaratan Teknis Minimal (PTM) seperti untuk PTM pakan konsentrat non ruminansia dan ruminansia, serta ada pula peraturan yang tertuang dalam keputusan Direktur Jenderal Peternakan, seperti kriteria mutu bahan baku pakan yang baik sehingga layak diproses untuk dijadikan pakan.

Peraturan untuk mutu pakan yang berkaitan dengan batas maksimum aflatoksin yang masih aman untuk dikonsumsi ternak tertuang dalam revisi SNI, PTM pakan konsentrat non ruminansia dan ruminansia serta SK Dirjen Peternakan Nomor 524/TN.250/Kpts/ DJP/ Deptan/1997, seperti disajikan pada Tabel 3, 4 dan 5.

**Tabel 4.** Kadar aflatoksin (AFL) dalam Persyaratan Teknis Minimal (PTM) pakan konsentrat non ruminansia dan ruminansia

| Jenis pakan                     | AFL maks (ppb) |
|---------------------------------|----------------|
| Non Ruminansia                  |                |
| Konsentrat broiler              | 50             |
| Konsentrat <i>layer grower</i>  | 50             |
| Konsentrat <i>layer</i>         | 50             |
| Konsentrat babi <i>grower</i>   | 50             |
| Konsentrat babi <i>finisher</i> | 50             |
| Konsentrat babi induk           | 50             |
| Konsentrat itik                 | 50             |
| Konsentrat ayam buras           | 50             |
| Pakan ayan buras                | 50             |
| Pakan burung berkicau           | 50             |
| Konsentrat Ruminansia           |                |
| Sapi perah laktasi              | 200            |
| Sapi perah laktasi produksi     | 200            |
| Sapi perah kering bunting       | 200            |
| Pengganti air susu              | 100            |
| Pemula, <i>calf starter</i>     | 100            |
| Sapi dara                       | 200            |
| Sapi pejantan                   | 200            |
| Sapi potong penggemukan         | 200            |
| Sapi potong induk               | 200            |

**Sumber:** SUPARTO, 2004

Sebagai perbandingan persyaratan kadar aflatoksin yang ditetapkan beberapa negara lain disajikan pula pada Tabel 6. Pada umumnya batas maksimum kadar aflatoksin yang ditetapkan di Indonesia relatif lebih tinggi jika dibandingkan dengan negara-negara di Eropa dan Amerika baik bagi ternak unggas maupun ruminansia. Negara di Eropa dan beberapa lainnya menetapkan kadar maksimum spesifik terhadap AFB<sub>1</sub>, sedangkan Indonesia batas maksimum aflatoksin ditujukan untuk total aflatoksin (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> dan AFG<sub>2</sub>). Berbeda dengan negara maju, meskipun peraturan telah ditetapkan di Indonesia, namun implementasinya belum begitu ketat.

**Tabel 5.** Kadar aflatoksin (AFL) dalam persyaratan mutu bahan pakan

| Bahan baku pakan           | AFL, maks (ppb) |
|----------------------------|-----------------|
| <i>Canola meal</i>         | 100             |
| <i>Repeseed meal</i>       | 100             |
| <i>Sunflower seed meal</i> | 90              |
| <i>Cotton seed meal</i>    | 100             |
| <i>Sesame seed meal</i>    | 200             |
| Jagung                     | 50              |
| Hasil ikutan, CGM 60       | 50              |
| CGM 40                     | 50              |
| CGF                        | 50              |
| Homini                     | 50              |

CGM = *Corn Gluten Meal*; CGF = *Corn Gluten Feed*

**Sumber:** Lampiran 1 dan 2 SK Dirjen Peternakan No. 524/TN.250/Kpts/DJP/Deptan/1997, dalam SUPARTO (2004)

**Tabel 6.** Kadar maksimum aflatoksin yang ditetapkan negara lain

| Negara   | Jenis ternak                                            | Kadar aflatoksin maksimum (ppb) |           |                  |                               | Jenis bahan dasar pakan                                                  |
|----------|---------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
|          |                                                         | Pakan komplit                   |           | Pakan tambahan   | Bahan dasar pakan (total AFL) |                                                                          |
|          |                                                         | AFB <sub>1</sub>                | Total AFL | AFB <sub>1</sub> |                               |                                                                          |
| Austria  | Semua ternak                                            | AFB <sub>1</sub>                | 50        | AFB <sub>1</sub> | -                             |                                                                          |
| Brazil   |                                                         | -                               | -         | -                | 50                            | Bungkil kacang (ekspor)                                                  |
| Kanada   | Semua ternak                                            | -                               | 20        | -                | -                             |                                                                          |
| Cina     |                                                         | -                               | -         | -                | 1000                          | Bungkil kacang, kedelai                                                  |
| Dominika |                                                         | -                               | -         | -                | 30                            | Jagung                                                                   |
| Eropa*   | Ruminansia (kecuali: sapi perah, anak sapi, anak domba) | 50                              | -         | 50               | 200                           | Bungkil kacang, kopra, bungkil kelapa, biji kapas, jagung, produk jagung |
|          | Babi, unggas                                            | 20                              | -         | 30               | -                             |                                                                          |
|          | Ternak lain                                             | 10                              | -         | 10               | -                             |                                                                          |
| India    |                                                         | -                               | -         | -                | 120 (AFB <sub>1</sub> )       | Bungkil kacang (ekspor)                                                  |
| Jordania | Semua ternak                                            | 15                              | -         | 30               | -                             |                                                                          |
| Nigeria  | Semua ternak                                            | 50                              | -         | -                | -                             |                                                                          |
| Norwegia | Tergantung jenis ternak                                 | 10-50                           | -         | -                | -                             |                                                                          |
| Oman     | Unggas                                                  | 20                              | -         | -                | -                             |                                                                          |
|          | Anak ayam                                               | 10                              | -         | -                | -                             |                                                                          |
| Peru     | Unggas                                                  | 20                              | -         | -                | -                             |                                                                          |
| Polandia | Unggas, babi, sapi perah                                | 20                              | -         | -                | -                             |                                                                          |
|          | Sapi, kambing, domba                                    | 50                              | -         | -                | -                             |                                                                          |
| Romania  | Semua ternak                                            | -                               | 50        | -                | -                             |                                                                          |
| Swedia   | Sapi potong, kambing, domba                             | 50                              | -         | 50               | 100 (AFB <sub>1</sub> )       |                                                                          |
|          | Babi, unggas                                            | 20                              | -         | -                | -                             |                                                                          |
|          | Sapi perah, anak kambing, domba                         | 10                              | -         | -                | -                             |                                                                          |
| USA      | Semua ternak                                            | -                               | 20        | -                | 20                            |                                                                          |

Total AFL adalah AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> dan AFG<sub>2</sub>

\* Meliputi: Belgia, Denmark, Perancis, Jerman, Italy, UK, Belanda, Portugal

**Sumber:** VAN EGMOND (1989)

## TEKNIK DETEKSI SENYAWA AFLATOKSIN YANG DIKEMBANGKAN

Teknik deteksi aflatoksin berdasarkan AOAC (1984) adalah menggunakan kromatografi lapis tipis (*Thin Layer Chromatography- TLC*) atau kromatografi cair kinerja tinggi (*High Performance Liquid Chromatography-HPLC*). Metode ELISA sudah mulai dipakai untuk analisis kuantitatif, dan diakui dapat digunakan sebagai metode skrining yang cepat dan sensitif serta sudah banyak dikembangkan dan digunakan. Dibandingkan dengan metoda kimia fisika (kromatografi), metoda ELISA mempunyai beberapa keuntungan karena dinilai cukup cepat, sensitif dan relatif murah. Sementara itu, metoda kimia fisika mempunyai kelemahan selain harga instrumen yang mahal, diperlukan pelaksana yang betul-betul terlatih, dan tahap analisis yang cukup panjang melalui tahapan ekstraksi, pemurnian, pemisahan, dan memerlukan pereaksi cukup banyak, sehingga biaya analisis menjadi mahal.

Metode ELISA dengan monoklonal dan poliklonal antibodi sudah diterapkan untuk analisis AFB<sub>1</sub> pada kacang tanah (KAWAMURA *et al.*, 1988), total aflatoksin pada sampel jagung dan pakan ternak (TRUCKSESS *et al.*, 1989) dan sampel-sampel biologi seperti urin manusia dan hewan ternak (STUBBLE *et al.*, 1991). Limit deteksi untuk analisis metode ELISA dapat membaca sampai konsentrasi 0,1 ppb.

Format ELISA yang umum dikembangkan untuk senyawa dengan bobot molekul rendah (hapten) adalah ELISA kompetitif. Pada dasarnya terdiri dari 2 format yaitu kompetitif langsung dan kompetitif tidak langsung (STANKER dan Beier, 1995). Teknik deteksi senyawa racun aflatoksin yang dikembangkan Balitvet adalah secara format ELISA kompetitif langsung. Pengembangan ELISA format kompetitif langsung menggunakan antibodi poliklonal dan konjugat enzim yang dibuat Balitvet ini ternyata cukup sensitif dan lebih spesifik terhadap senyawa racun AFB<sub>1</sub>, dengan reaksi silang yang rendah terhadap jenis AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> dan AFG<sub>2</sub>. Pengembangan teknik deteksi tersebut meliputi beberapa tahapan sebagai berikut (RACHMAWATI *et al.*, 2004):

- 1) Sintesa hapten
- 2) Imunisasi kelinci, untuk produksi antibodi
- 3) Pengembangan format ELISA
- 4) Pengujian performan tes ELISA
- 5) Perakitan prototipe ELISA kit, pelatihan dan uji coba lapang

### Sintesa hapten

Hapten adalah senyawa dengan bobot molekul rendah biasanya lebih kecil dari 10.000. Antibiotik,

pestisida, mikotoksin termasuk senyawa ini dan umumnya tidak dapat merangsang terbentuknya antibodi pada ternak, karena tidak bersifat imunogenik, atau sifat imunogeniknya lemah. Berbeda dengan senyawa dengan berat molekul besar seperti polisakarida, protein, asam nukleat dan mikroorganisme, yang masuk tubuh sebagai antigen dan bersifat imunogenik, dapat merangsang terbentuknya antibodi, sehingga dapat diproduksi antibodi spesifik. Hapten sebagai antigen, dan supaya terbentuk antibodi pada tubuh ternak jika disuntikkan maka senyawa hapten tersebut harus dikonjugasi secara kimiawi dengan senyawa bermolekul besar seperti protein (*Bovine Serum Albumin-BSA* atau *Keyhole Limpet Haemocyanin-KLH*, dll.) sehingga bersifat imunogenik dan dapat merangsang respon kekebalan pada ternak. Untuk keperluan kompetitor pada ELISA kompetitif langsung (*direct competitive ELISA*), hapten ini dikonjugasi dengan enzim (*Horse Raddish Peroxidase-HRPO*).

Aflatoksin B<sub>1</sub> merupakan senyawa hapten dengan ikatan cincin yang tertutup, sehingga tidak reaktif. Untuk dapat mengikat protein atau enzim perlu disintesa menjadi senyawa aflatoksin B<sub>1</sub> carboxymetil oxime, dan ester aktif hydroxysuccinamida. Hasil konjugasi berupa AFB<sub>1</sub>-BSA dan/atau AFB<sub>1</sub>-KLH diimunisasikan pada kelinci. Sedangkan hasil berupa AFB<sub>1</sub>-HRPO digunakan sebagai kompetitor pada penetapan ELISA kompetitif langsung.

### Imunisasi kelinci

Imunisasi dilakukan dengan menyuntikkan antigen AFB<sub>1</sub>-BSA dan AFB<sub>1</sub>-KLH masing-masing terhadap dua kelinci untuk mendapatkan antibodi yang akan digunakan untuk pengembangan metode ELISA. Jadwal imunisasi kelinci adalah sebagai berikut:

- a) Penyuntikkan pertama sebanyak 0,5 mg/ml AFB<sub>1</sub>-BSA atau AFB<sub>1</sub>-KLH yang diemulsikan dalam *freund's complete adjuvant*.
- b) Penyuntikan kedua dan ketiga adalah penyuntikan boster dengan interval waktu 2 minggu yaitu sebanyak masing-masing 0,25 mg/ml yang diemulsikan dalam 250 µl *incomplete adjuvant*.
- c) Penyuntikan boster selanjutnya diberikan setiap bulan dengan dosis 0,25 mg/ml antigen AFB<sub>1</sub>-BSA atau AFB<sub>1</sub>-KLH yang diemulsikan dalam *incomplete adjuvant*.

Selanjutnya darah dikumpulkan setiap bulan, 10 hari setelah penyuntikan boster, dipisahkan serumnya dan dilakukan pemurnian serum dengan menggunakan kolom Protein A Sepharose, dan inilah antibodi AFB<sub>1</sub>-BSA atau antibodi AFB<sub>1</sub>-KLH murni yang

digunakan untuk pengujian ELISA. Kadar Immunoglobulin G (IgG) yang terkandung dalam antibodi selanjutnya dihitung dengan mengukur absorbansi larutan antibodi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Antibodi dengan kadar IgG dalam kisaran 2,2–4,0 mg/ml untuk penyimpanan waktu yang lama perlu ditambahkan natrium azide dan disimpan beku.

Pengujian respon antibodi pada plat ELISA dilakukan dengan mentitrasi antibodi dan konjugat enzim. Antibodi yang dikumpulkan pada perdarahan ke-5 yaitu setelah penyuntikan booster yang ke-6 kali menghasilkan antibodi yang cukup baik dengan respon yang sensitif, dimana nilai absorpsi pada ELISA *reader* (OD) kontrol mencapai 0,8–>1,0.

### Pengembangan format ELISA

Setelah dapat diidentifikasi antibodi dengan respon yang cukup sensitif, studi diteruskan dengan pengembangan format ELISA. Format untuk ELISA yang dikembangkan adalah ELISA kompetitif langsung. Dengan menggunakan antibodi AFB<sub>1</sub>-BSA yang dikumpulkan pada perdarahan kelima (5BSA) didapatkan bahwa format ELISA kompetitif langsung lebih sensitif dibandingkan dengan format ELISA kompetitif tidak langsung. Mekanisme analisis format ELISA kompetitif langsung seperti pada Gambar 1. Pengembangan analisis yang dilakukan pertama kali masih cukup lama "*long assay*" dengan waktu inkubasi antibodi, semalam, konjugat 45 menit dan substrat 30 menit, dan pembacaan serapan warna dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm. Format ELISA kompetitif langsung dipilih untuk studi selanjutnya.

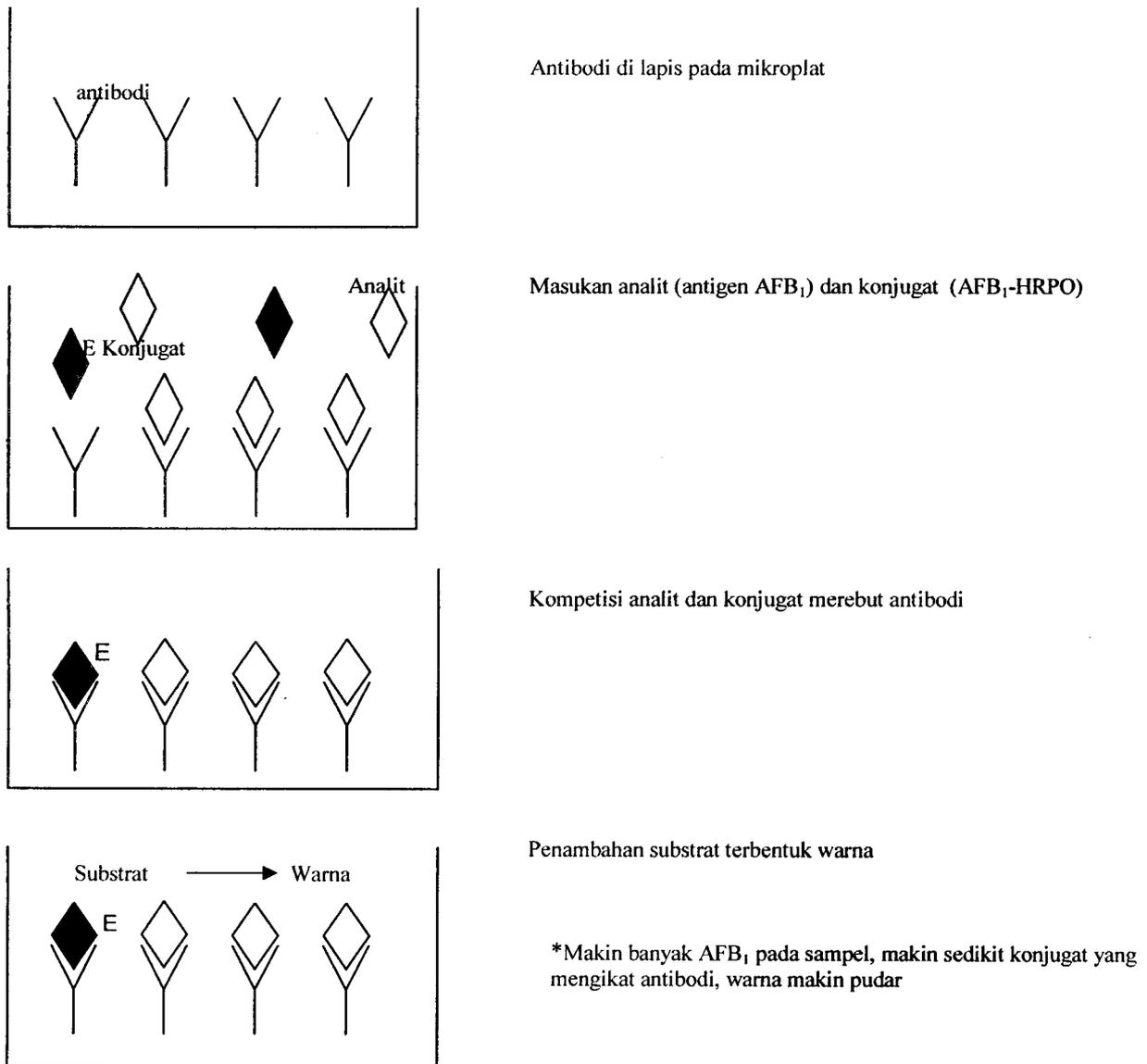
### Pengujian performan tes ELISA

Pengujian spesifitas dilakukan dengan mengevaluasi respon antibodi AFB<sub>1</sub> terhadap jenis aflatoxin lainnya yaitu AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> dan AFG<sub>2</sub>. Antibodi ternyata memberikan respon yang spesifik terhadap AFB<sub>1</sub> (100%), tetapi memberikan sedikit reaksi silang dengan jenis aflatoxin lainnya (0,9; 3,5 dan 1,6%) untuk masing-masing AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> dan AFG<sub>2</sub>. Perhitungan reaksi silang didasarkan atas konsentrasi pada nilai inhibisi 50% (IC<sub>50</sub>) yaitu titik yang paling tepat pada kurva kalibrasi, dimana didapatkan nilai untuk masing-masing AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> dan AFG<sub>2</sub> yaitu 99,3; 25,1 dan 52,8 ng/ml serta 0,87 ng/ml untuk aflatoxin B<sub>1</sub>. Dari nilai IC<sub>50</sub> tersebut selanjutnya dihitung persen reaksi silang yaitu perbandingan nilai IC<sub>50</sub> AFB<sub>1</sub> dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing jenis aflatoxin. Perhitungan limit deteksi ditetapkan pada

konsentrasi AFB<sub>1</sub> yang memberikan nilai inhibisi 15% (IC<sub>15</sub>) dari 10 penetapan. Pada percobaan ini diperoleh IC<sub>15</sub> yaitu 0,18 ± 0,06 ppb. Maka limit deteksi adalah rata-rata penetapan 10 replikat ± 2 kali standar deviasi yaitu 0,3 ppb. Konsentrasi AFB<sub>1</sub> 0,3 ppb adalah yang terendah dapat dideteksi dengan metode ELISA yang dikembangkan, dengan kisaran analisis sampai 30 ppb.

Selanjutnya tes ELISA diuji toleransinya terhadap beberapa pelarut organik seperti metanol, etanol, asetonitril, aseton yang sering digunakan untuk ekstraksi AFB<sub>1</sub> pada sampel. OD menjadi lebih kecil pada pelarut dengan konsentrasi yang semakin tinggi dan tes ELISA dengan menggunakan antibodi 5 BSA dan konjugat yang dihasilkan hanya toleran terhadap metanol dengan konsentrasi maksimum 60%. Aseton dan asetonitril dapat digunakan sampai maksimum 40%, sedangkan respon terhadap etanol kurang begitu baik. Pengujian ELISA hanya tahan pada pH antara 7,2–9,6. Pada pH 4 pembentukan warna sangat rendah, sedangkan pada pH 3, tidak terbentuk/warna hilang sehingga OD rendah sekali.

Pengujian selanjutnya terhadap matrik sampel. Matrik sampel dapat berpengaruh terhadap sensitifitas, perubahan/penurunan nilai absorbansi (OD) atau keduanya. Pakan tersusun dari berbagai bahan diantaranya jagung, dedak padi, bungkil kedelai (*soybean meal*-SBM), gluten (*corn gluten meal*-CGM), canola meal, tepung ikan (*fish meal*). Toleransi tes ELISA diuji terhadap larutan bahan pakan tersebut dalam metanol. OD dari kontrol dengan matrik jagung tidak begitu berbeda dibandingkan OD dari kontrol dalam metanol saja, yang menunjukkan bahwa matrik jagung tidak begitu berpengaruh terhadap penetapan secara ELISA. Terdapat sedikit pengaruh matrik dari tepung ikan, bungkil kedelai dan dedak padi, sedangkan gluten dan canola memberikan efek matrik yang sedikit lebih besar dan ditandai dengan penurunan OD pada kontrol dengan bahan tersebut dibandingkan kontrol dalam metanol. Efek matrik pakan bervariasi, nampaknya pakan yang banyak mengandung bahan seperti gluten dan canola, memberikan pengaruh terhadap penurunan nilai OD. Pengaruh matrik dapat dihilangkan dengan prosedur "*clean up*" atau dengan menganalisa sampel mengacu pada kalibrasi standar dalam matrik. Cara pengenceran ekstrak sampel sebelum analisa cukup efektif, jika sensitivitas penetapan mencukupi. Penambahan protein atau deterjen pada pelarut dapat dilakukan untuk menghilangkan efek dari matrik, namun cara ini terbatas pada tingkat kecocokan antibodi dan konjugat enzim terhadap pereaksi ini. Pengaruh matrik pakan pada analisis secara ELISA ternyata dapat diatasi dengan cara pengenceran ekstrak sampel.



Gambar 1. Format ELISA kompetitif langsung

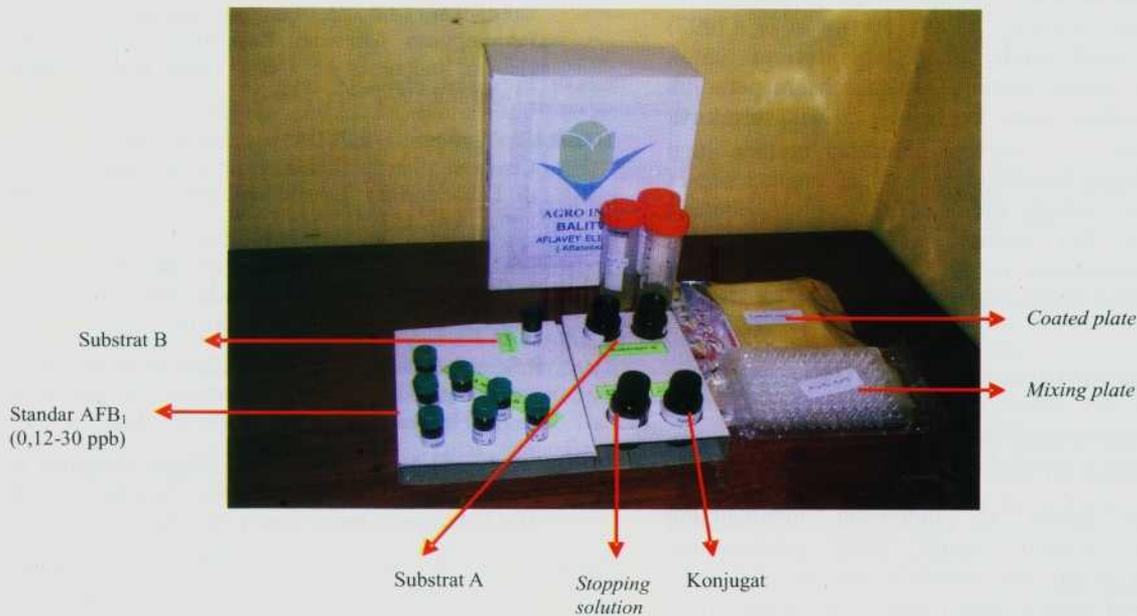
Sumber: STANKER dan BEIER (1995)

### PERAKITAN PROTOTYPE KIT ELISA, PELATIHAN DAN UJI COBA LAPANG (VALIDITAS METODE)

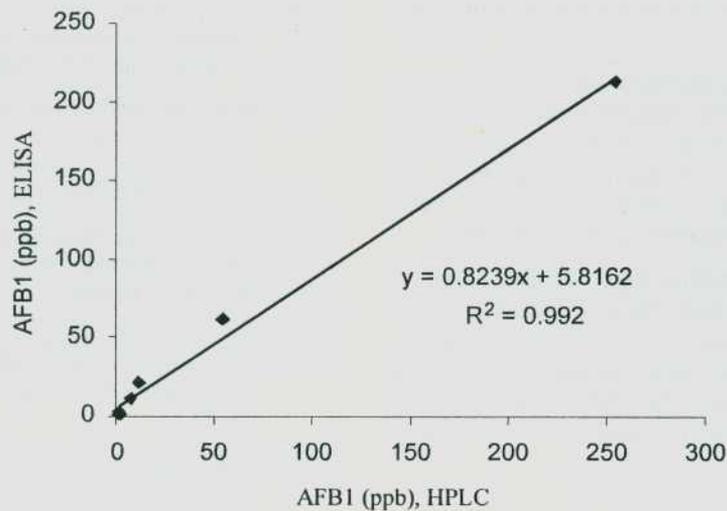
Untuk penerapan di lapangan, kit ELISA dengan waktu analisis lebih cepat "rapid assay" perlu dirakit dan kestabilan pereaksi perlu dipelajari untuk produksi kit dan evaluasi selanjutnya. Antibodi dilapis pada plat mikro, diblok, selanjutnya dikeringbekukan sehingga tahan untuk disimpan lama. Demikian pula dengan konjugat enzim disiapkan dan dikeringbekukan kemudian dilarutkan dalam pengenceran tertentu. Selanjutnya dipelajari efek penyimpanan pada 4°C dan

suhu kamar untuk konjugat dalam bentuk larutan dan kering beku serta antibodi yang sudah dilapis pada mikro plat. Penyimpanan sampai 2 bulan pada suhu 4°C (*refrigerator*) menunjukkan respon yang masih baik.

Kit ELISA "rapid assay" dengan waktu analisis 5 dan 10 menit inkubasi konjugat dan substrat telah dapat dirakit (Gambar 2). Kit berisi antibodi yang sudah dilapis pada mikro plat dan sudah dikeringbekukan (*coated plate*), plat untuk mencampur sampel/standar dan konjugat (*mixing plate*), seri dari larutan standar AFB<sub>1</sub>, konjugat kering beku dan diluen atau larutan konjugat, substrat dan larutan penghenti reaksi (*stopping solution*).



Gambar 2. Kit ELISA aflatoksin B<sub>1</sub> yang dikembangkan



Gambar 3. Hubungan antara hasil analisis sampel jagung dan pakan secara HPLC dan ELISA, n= 10

Pelatihan dan ELISA "workshop" dilakukan dengan partisipan yang datang dari staf "quality control" pabrik-pabrik pakan dan juga laboratorium pemerintah dengan tujuan memperkenalkan teknologi yang dikembangkan. Pemilihan 2 laboratorium pabrik pakan dan 2 laboratorium pemerintah dilakukan untuk uji lapang dan validitas metode (*inter laboratory study*). Hasil analisis aflatoksin sampel standar (kadar

AFB<sub>1</sub> 10–250 ppb) yang disiapkan Balitvet dan diujicobakan di keempat laboratorium mitra dengan menggunakan kit ELISA aflatoksin menunjukkan persentase perolehan kembali rata-rata 89,8–103,8 persen dengan koefisien variasi 5,3–13,3 persen untuk sampel standar jagung dan 95,9–100,7 persen dengan koefisien variasi 2,8–6,5 persen untuk sampel standar

pakan. Hasil ini menunjukkan persentase perolehan yang baik. Hasil penelitian terdahulu rata-rata perolehan kembali untuk standar sampel jagung adalah 94–108 persen (SPILMAN, 1985). PATEY *et al.* (1992) melaporkan hasil studi antar laboratorium untuk analisis AFB<sub>1</sub> dalam kacang, bahwa sebagai petunjuk ketepatan analisa, nilai koefisien variasi sebaiknya dalam kisaran 5–15 persen. Validitas metode juga dilakukan dengan membandingkan hasil analisis secara ELISA dengan metoda standar HPLC untuk beberapa sampel pakan dan jagung. Hasil yang akurat dan konsisten ditunjukkan untuk kedua metode tersebut dengan koefisien korelasi  $R^2 = 0,99$  (Gambar 3).

### KESIMPULAN DAN SARAN

Dari uraian di atas, maka dapat ditarik kesimpulan dan saran sebagai berikut:

1. Umumnya pakan di Indonesia mengandung aflatoxin, namun sampel yang mengandung aflatoxin tinggi dan melebihi standar SNI (>50 ppb) relatif sedikit. Hasil penelitian tahun 2003-2004, hanya 14% dari 207 sampel yang mengandung aflatoxin lebih dari 50 ppb, namun demikian potensi tercemarnya pakan oleh aflatoxin perlu selalu diwaspadai, karena bahan baku pakan, jagung lokal ternyata mengandung aflatoxin cukup tinggi.
2. Peraturan perundang-undangan di Indonesia yang berkaitan dengan batas maksimal aflatoxin pada pakan, pakan konsentrat dan bahan baku pakan termasuk jagung sudah ditetapkan dan implementasinya harus dilakukan secara benar untuk melindungi konsumen produk peternakan.
3. Balai Penelitian Veteriner telah dapat merakit kit ELISA aflatoxin yang dapat digunakan untuk analisis aflatoxin secara cepat dan akurat. Dengan tersedianya perangkat deteksi cepat ini diharapkan kontrol kualitas pakan dan bahan pakan jagung dapat dilaksanakan lebih mudah, dan secara terus menerus.

### DAFTAR PUSTAKA

ABDELHAMID, A.M. and T.M. DORRA. 1990. Study on effect of feeding laying hens on separate mycotoxins (aflatoxins, patulin, or citrinin)-contaminated diets on the egg quality and tissue constituents. *Arch. Anim. Nutr.* 40(4): 305–316.

AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis*. 14<sup>th</sup> Ed., AOAC, Arlington VA. Section 26.026–26-031, 26.049–26.051.

BAHRI, S., OHIM dan R. MARYAM. 1994b. Residu aflatoxin M<sub>1</sub> pada air susu sapi dan hubungannya dengan keberadaan aflatoxin B<sub>1</sub> pada pakan sapi. Dalam Kumpulan Makalah Lengkap Kongres Nasional Perhimpunan Mikologi Kedokteran Manusia dan Hewan, Indonesia ke I dan Temu Ilmiah, Bogor, 21–24 Juli 1994. hlm. 269–275.

BAHRI, S., YUNINGSIH, R. MARYAM dan P. ZAHARI. 1994a. Cemaran aflatoxin pada pakan ayam yang diperiksa di Laboratorium Toksikologi Balitvet tahun 1988-1991. *Peny. Hewan* 47: 39–42.

BAITON, S.J., R.D. JONES, E.M. MORLEY, M.J. NAGLER and R.L. TURNER. 1980. *Mycotoxin Training Manual*. Tropical Product Institute London. pp. 20–65.

DASS, R.S. and S.P. ARORA. 1994. Effect of aflatoxins on immunoglobulin level in blood and the growth of buffalo calves. *Buffalo Bull.* 13(2): 37–41.

DIENER, U.L. and N. DAVIS. 1969. Aflatoxin formation by *aspergillus flavus*. In: *Aflatoxins*. GOLDBLATT L.A. (Ed.). Academic Press, New York, USA. pp. 77–105.

DIMRI, U., V.N. RAO and H.C. JOSHI. 1994. Effect of chronic aflatoxin B<sub>1</sub> feeding on serum-calcium, magnesium and iron profile in chicken. *Indian. Vet. J.* 71 (9): 907–910.

EXARHOS, C.C. and R.E. GENTRY. 1982. Effect of aflatoxin on egg production. *Avian Dis.* 26: 191–195.

GINTING, NG. 1988. Sumber dan Pengaruh Aflatoxin Terhadap Pertumbuhan dan Performan Ayam Broiler. Disertasi. Universitas Pajajaran, Bandung.

GROOPMEN, J.D, L.G. CAIN and T.W. KENSLER. 1988. Aflatoxin exposure in human populations measurement relationship to cancer. *Crit. Rev. Toxicol.* 19(2): 113–145.

JASSAR, B.S. and BALWANT-SINGH. 1989. Immunosuppressive effect of aflatoxin in broiler chicks. *Indian. J. Anim. Sci.* 59 (1): 61–62.

KAWAMURA, A.O., S. NAGAYAMA, S. SATO, K. OHTANI, I. UENO and Y. UENO. 1988. Development of aflatoxin immunoassay technique of peanut. *Mycotoxin Res.* 4: 76–87.

LIU, Y.G.K. 2002. Prevention and control of molds and mycotoxins in raw materials and final feeds in tropical countries. In: *Feed and grain quality Workshop*, Balitvet, Bogor Indonesia, 30 Januari-1 Februari 2002. US Grain Council, American Soybean Association. pp. 1–23.

MANI, K., K. SUNDARESAN and K. VISWANATHAN. 2001. Effect of immunomodulators on the performance of broilers in aflatoxicosis. *Indian. Vet. J.* 78(12): 1126–1129.

MARYAM, R. 1996. Residu aflatoxin dan metabolitnya dalam daging dan hati ayam. *Pros. Temu Ilmiah Nasional Bidang Veteriner*. Balai Penelitian Veteriner, Bogor: hlm. 336–339.

- MUTHIAH, J., P. REDDY and N.D.J. CHANDRAN. 1998. Effect of graded levels of aflatoxin B<sub>1</sub> and the effect of direct fed microbials (DFM) on egg production in egg type breeders. *Indian. Vet. J.* 75(3): 231–233.
- PATEY, A.L., M. SHARMAN and J. GILBERT. 1992. Determination of total aflatoxin levels in peanut butter by *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*: Collaborative Study. *J AOAC International* 75(4): 693–697.
- PRABAHARAN, S., V.T. GEORGE and G.A. BALASUBRAMANIAM. 1999. Influence of dietary aflatoxin and coccidiosis on growth rate in broiler chicken. *Indian. Vet. J.* 76(9): 827–828.
- RACHMAWATI, S. 2004a. Uji Banding Antar Laboratorium, Pengujian ELISA Kit Aflatoksin. Laporan hasil kegiatan kerjasama antara Balai Penelitian Veteriner dengan PT Sinta Prima Feedmill, PT Sierad Tbk, Balai Pengujian Mutu Pakan Ternak, dan Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional IV. hlm. 2–9.
- RACHMAWATI, S. 2004b. Kit ELISA (Aflavet) untuk deteksi aflatoksin pada produk pertanian. Makalah dipresentasikan pada sesi poster fgW Food Conference. 6–7 Oktober, 2004. Jakarta. fgW School of Food Technology.
- RACHMAWATI, S. 2004c. Pengujian Lapang Perangkat ELISA Kit Aflatoksin B<sub>1</sub> Untuk Monitoring Kualitas Pakan Dan Jagung. Laporan akhir kerjasama penelitian antara Balai Penelitian Veteriner dengan Balai Pengujian Mutu Pakan Ternak. Proyek Pengkajian Teknologi Pertanian Partisipatif. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian. hlm. 14–17.
- RACHMAWATI, S., A. LEE, T.B. MURDIATI dan I. KENNEDY. 2004. Pengembangan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) teknik untuk analisis aflatoksin B<sub>1</sub> pada pakan ternak. Pros. Seminar Parasitologi dan Toksikologi Veteriner. Kerjasama Balai Penelitian Veteriner, Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan dengan Department for International Development (DfID-UK), Bogor 20-21 April, 2004. hlm. 143–160.
- SPILMAN, J.R. 1985. Modification of rapid screening method for aflatoxin in corn for quantitative use. *JAOAC* 68(3): 453–456.
- STANKER, L.H. and R.C. BEIER. 1995. Introduction to immunoassay for residue analysis: Concept, formats and applications in immunoassays for residue analysis. *In. ELISA workshop. Simple test for monitoring mycotoxins and pesticides in produce.* Post Harvest Technology Institute. Ho Chi Minh City, Vietnam, November 15–17, 1999. University of Sydney. pp. 12–22.
- STUBBLE, F., R.D.J. GREER, O.L. SKOTWELL and A.M. AIKENS. 1989. Direct competitive ELISA of aflatoxins in biological material. *JAOAC* 74(3): 530–532.
- SUPARTO, Dj. A.H. 2004. Situasi cemaran mikotoksin pada pakan di Indonesia dan perundang-undangannya. Seminar Parasitologi dan Toksikologi Veteriner. Kerjasama Balai Penelitian Veteriner, Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan dengan Department for International Development (DfID-UK), Bogor 20–21 April, 2004. hlm. 131–142.
- TRUCKSESS, M.W., M.E. STACK, S. NESHEIM, D.L. PARK and A.E. POHLAND. 1989. Enzyme Linked Immunosorbent Assay of Aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and G<sub>1</sub> in corn, cottonseed, peanut, peanut butter and poultry feed: Collaborative study. *JAOAC* 72(6): 957–961.
- VAN EGMOND H.P. 1989. Current situation on regulation for mycotoxin overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Additive and contaminant* 6(2): 169–188.
- WIDIASTUTI, R. 2000. Residu aflatoksin pada daging dan hati sapi di pasar tradisional dan swalayan di Jawa Barat. Pros. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Bogor, 18–19 oktober 1999. hlm. 609–614.
- YANUARTIN, C. 2004. Permasalahan kualitas pakan di Indonesia. Pros. Seminar Parasitologi dan Toksikologi Veteriner. Kerjasama Balai Penelitian Veteriner, Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan dengan Department for International Development (DfID-UK), Bogor 20-21 April, 2004. hlm. 127–130.
- ZANNELI. 2000. Mould, Bacteria and Solution. Feed Industry Service (FIS). Italy: 1–21.