

BAB III. TINJAUAN PUSTAKA

A. FUSARIUM

Iklim tropis mengakibatkan komoditas pangan di Indonesia rentan terhadap kontaminasi kapang dan toksin metabolitnya, seperti mikotoksin. Mikotoksin adalah senyawa organik beracun yang berasal dari sumber hayati berupa hasil metabolisme sekunder dari kapang. Hingga saat ini telah dipublikasikan sedikitnya 300 jenis mikotoksin, namun *Codex Alimentarius Commission* tahun 2006 memfokuskan perhatian pada lima jenis mikotoksin utama yaitu aflatoksin, deoksinivalenol, fumonisin, okratoksin A dan patulin, yang juga tercantum dalam Rancangan Standard Nasional Indonesia (RSNI, 2007).

Fusarium, *Aspergillus*, dan *Penicillium* merupakan tiga genus kapang utama pada pangan yang harus diwaspadai dalam produksi mikotoksinnya. Berbeda dengan *Aspergillus* dan *Penicillium*, *Fusarium* merupakan fungi lapang, yaitu tumbuh dan mengkontaminasi tanaman pangan sebelum proses pemanenan, sehingga membutuhkan proses pengontrolan yang lebih kompleks.

Fusarium merupakan genus dari fungi berfilamen yang banyak tersebar pada tanah dan tanaman. Genus yang sebagian besar bersifat saprofit ini diperkenalkan pertama kali oleh Link pada tahun 1809 (Link, 1809 *di dalam* Leslie and Summerrel, 2006). Klasifikasinya adalah sebagai berikut :

Kingdom : Fungi
Filum : Ascomycota
Kelas : Sordariomycetes
Ordo : Hypocreales
Genus : *Fusarium*

Fusarium memiliki spesies yang cukup banyak. Hingga sekarang telah dikenal lebih dari 80 spesies (Leslie and Summerrel, 2006). Sebagian besar spesies memproduksi mikotoksin pada hasil pertanian sereal yang dapat mengakibatkan gangguan kesehatan manusia dan hewan bila terikut

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

dalam rantai makanan. Kapang ini umumnya tumbuh pada komoditas pertanian di lapangan, namun dapat pula tumbuh pada komoditas yang disimpan di dalam gudang, terutama bila kondisi penyimpanannya buruk. FAO telah mengestimasi bahwa lebih dari 25 % hasil pertanian dunia rusak pertahun akibat kontaminasi mikotoksin, di mana spesies fusarium ini berkontribusi cukup tinggi (FAO, 1996). Toksin utama yang diproduksi oleh genus ini adalah fumonisin dan trichothecene (Omurtag, 2006).

F. verticillioides dan *F. proliferatum* adalah spesies fusarium yang dominan dalam memproduksi fumonisin pada produk-produk pertanian, meskipun spesies lain, termasuk *F. nygamai*, *F. phyllophilum*, *F. globosum*, *F. Fujikuroi MP-C*, dan *F. Oxysporum complex*, dilaporkan juga dapat memproduksi fumonisin dengan jumlah yang relatif rendah (Proctol *et al.*, 2006). *F. verticillioides* dan *F. proliferatum* banyak ditemukan pada komoditas jagung dan produk-produk olahan jagung di seluruh dunia, namun fungi ini memiliki tingkat proliferasi yang tinggi pada daerah tropis dan subtropis (Bakan *et al.*, 2002 di dalam Jackson and Jablonski, 2004). Walaupun begitu jumlah kandungan spesies ini pada jagung tidak selalu memiliki korelasi yang erat dengan konsentrasi fumonisin. Jagung dengan jumlah fusarium yang tinggi, belum tentu mengandung fumonisin dengan konsentrasi tinggi. Sebaliknya kandungan fumonisin yang tinggi juga pernah terdeteksi pada sampel jagung yang penampakannya masih baik (Chu and Li, 1994). Namun jagung berkapang memang cenderung mengandung fumonisin dalam jumlah yang lebih tinggi.

Produksi mikotoksin oleh kapang sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti kondisi iklim, sistem panen, penerapan GAP dan GMP, serta manajemen pascapanen (Reyneri, 2006). Semakin tinggi tingkat stres tanaman, konsentrasi mikotoksin yang diproduksi juga akan semakin tinggi. Beberapa pemicu stres pada tanaman antara lain: keberadaan serangga perusak, adanya pemanasan global, serta kekurangan nutrisi pada tanah.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritikan atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

B. FUMONISIN

Fumonisin merupakan salah satu jenis mikotoksin yang diproduksi terutama oleh *Fusarium moniliforme* (sinonim dari *F. verticillioides*) dan *Fusarium proliferatum*, suatu kontaminan kapang primer pada jagung di seluruh dunia (Schlichtherle, 1997). Tanaman jagung merupakan satu-satunya komoditi pangan di mana aktivitas biosintesis fumonisin oleh *F. verticillioides* paling tinggi, sehingga hanya jagung dan produk-produk turunan jagung yang mengandung fumonisin dalam jumlah signifikan (Kushiro *et al.*, 2008). Beberapa bahan pangan lain seperti beras, kentang, biji kopi hijau, gandum, bir, bawang putih juga dilaporkan mengandung fumonisin (Dasko *et al.* 2005; Frisvad *et al.*, 2007; dan Kushiro *et al.*, 2008), namun pada konsentrasi yang relatif rendah sehingga tidak membahayakan. Kandungan fumonisin yang tinggi pada jagung telah menjadi perhatian sejak keberadaan fumonisin pada jagung terkontaminasi dihubungkan dengan berbagai penyakit dan kerugian secara ekonomi.

Uji-uji toksisitas terhadap hewan percobaan menunjukkan bahwa organ hati merupakan target utama fumonisin (Jay *et al.*, 2005). Beberapa penyakit yang disebabkan oleh mikotoksin ini, antara lain: *equine leukoencephalomalacia* (ELEM) pada kuda (Marasas, 2001), *pulmonary oedema syndrome* (PES) pada babi (Harrison *et al.*, 1990) dan kanker hati pada tikus (Riley *et al.*, 2001). Selain itu, konsumsi pangan berbasis jagung yang terkontaminasi fumonisin terkait secara epidemiologi dengan HEC (*human esophageal cancer*) pada orang-orang di daerah Transkei Afrika Selatan dan Linxian Cina (Rheeder *et al.*, 1992; Chu and Li, 1994; dan Yoshizawa *et al.*, 1994), dan PLC (*primary liver cancer*) di daerah Haimen Cina (Ueno, *et al.*, 1997). Juga dilaporkan bahwa kehamilan yang terekspos dengan fumonisin, kemungkinan dapat menyebabkan cacat pada kelahiran, seperti NTD (*Neural Tube Defect*) (Missmer *et al.*, 2006; Voss, *et al.*, 2006).

Terdapat beberapa dalil yang menjelaskan cara fumonisin dalam menyebabkan keracunan, tetapi hipotesis utama mengaitkan dengan gangguan proses biosintesis spingolipid secara *de novo* (Wang *et al.*, 1991). Fumonisin sebagai inhibitor spesifik dari *sphinganine N-acyltransferase*

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

(*ceramide sintase*), yang merupakan enzim kunci pada biosintesis spingolipid, di mana spingolipid turut berperan aktif dalam pengaturan fungsi-fungsi sel, seperti proliferasi, diferensiasi, adhesi, serta kematian sel (Morales *et al.*, 2007). Meskipun efeknya pada manusia susah ditentukan secara langsung, *International Agency for Research on Cancer* telah mengklasifikasikan bahwa fumonisin potensial bersifat karsinogen pada manusia (karsinogen kelas 2B). FB1 juga dilaporkan sebagai promotor kanker dan bersama dengan mikotoksin lain berperan penting terhadap karsinogenesis pada manusia (Omurtag *et al.*, 2006).

SIFAT FISIK DAN KIMIA FUMONISIN

Fumonisin merupakan mikotoksin asiklik yang dikarakterisasi dengan 20 rantai karbon yang beresterifikasi dengan *tricarballylic acid* (TCA). Toksin ini pertama kali diisolasi dan dikarakterisasi secara kimia di Afrika Selatan tahun 1988 (Gelderblom *et al.*, 1988 *di dalam* Marasas, 2001). Hingga saat ini, terdapat sedikitnya 18 analog fumonisin yang telah teridentifikasi. Analog-analog ini terbagi menjadi empat kategori utama, yaitu fumonisin seri A, B, C, dan P berdasarkan struktur kimianya (Plattner *et al.*, 1996). Seri B, paling dominan terdiri dari fumonisin B1 (FB1) dan fumonisin B2 (FB2), diyakini merupakan analog yang paling melimpah keberadaannya dan terbukti bersifat toksik (Thiel *et al.*, 1992 *di dalam* CAC, 2009).

FB1 juga disebut macrofusin dan jumlahnya mencapai 70-80 % dari total kandungan fumonisin pada kultur *F. verticillioides* dan pangan yang terkontaminasi secara alami (Rheeder *et al.*, 2002 *di dalam* Jackson and Jablonski, 2004). Sedangkan fumonisin B2 dan B3 hanya mencapai 15-25 % dan 3-8 % kandungan fumonisin pada pangan. Penelitian mengenai toksisitas FB2 dan FB3 masih sangat sedikit, dan hingga saat ini diduga bahwa profil toksikologi FB2 dan FB3 mirip dengan FB1 (EC, 2003).

Fumonisin B1 (**Gambar 1**) merupakan diester dari asam propana-1, 2, 3 trikarboksilat (TCA) dan 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10, 14, 15-penta-hidroksieikosana, di mana gugus hidroksil pada C14 dan C15 berikatan ester

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

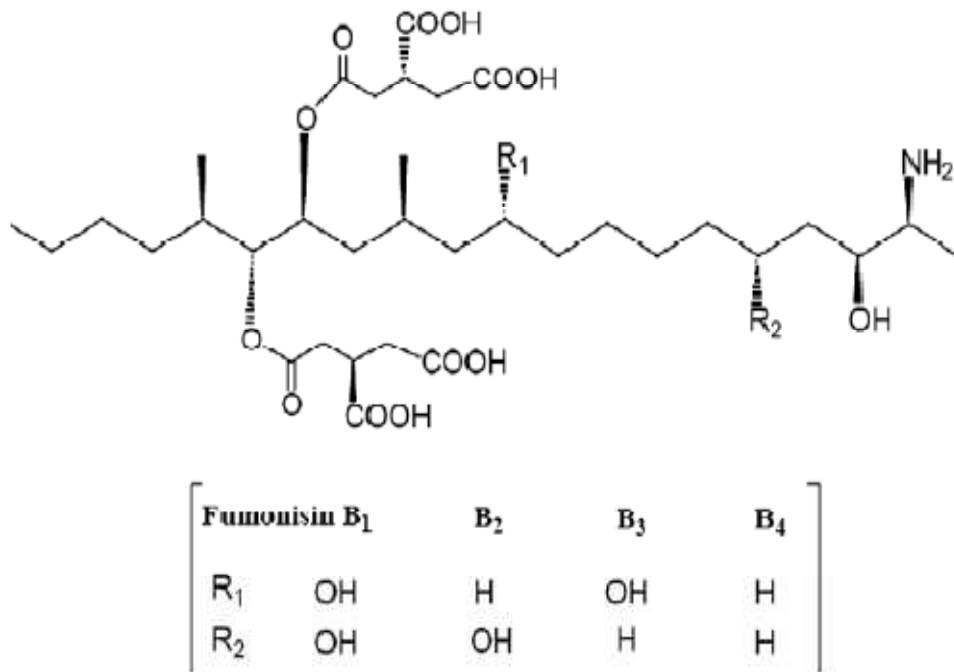
2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memungut dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

dengan gugus karboksil terminal pada TCA. FB2 berbeda dengan FB1 karena kekurangan gugus hidroksil pada C-10, FB3 berbeda dengan FB1 karena kekurangan gugus hidroksil pada C-5, dan FB4 berbeda dengan FB1 akibat kekurangan gugus hidroksil pada C-5 dan C-10.

Sejauh ini karakterisasi kimia dan fisik fumonisin masih terbatas pada fumonisin B1. FB1 memiliki rumus empiris $C_{34}H_{59}NO_{15}$ dengan berat molekul relatif 721. Secara fisik, substansi murninya berupa bubuk higroskopis berwarna putih, yang larut air, asetonitril-air atau metanol. Stabil pada asetonitril-air (1;1), tidak stabil dalam metanol, serta relatif stabil terhadap suhu pengolahan dan cahaya (WHO, 2000).



Gambar 1. Struktur kimia fumonisin seri B (Wang, 2008)

Walaupun molekul fumonisin ini cukup stabil terhadap panas, penurunan konsentrasi fumonisin dapat terjadi saat pengolahan termal terutama jika suhu pengolahan di atas 175 °C (Bullerman *et al.*, 2000). Beberapa proses pengolahan produk-produk jagung juga dilaporkan dapat mengubah struktur fumonisin menjadi bentuk-bentuk yang sulit terdeteksi dengan metode analisis konvensional. Beberapa perubahan yang sering terjadi antara lain pada gugus amina primer dan rantai-rantai samping TCA



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

fumonisin. Gugus amina primer merupakan kunci pada proses deteksi (derivatisasi) dengan metode kromatografi maupun analisis imunologi. Namun gugus ini mudah bereaksi dengan komponen-komponen makromolekul (seperti pati dan protein) serta gula pereduksi (reaksi Maillard) selama pengolahan dengan panas, yang mengakibatkan sulitnya proses deteksi. Selain itu, keberadaan esterifikasi TCA pada molekul fumonisin menyebabkan struktur fumonisin mudah berubah menjadi fumonisin terhidrolisis (HFB1), terutama jika pengolahan mencakup proses nikstamalisasi, yaitu proses pemasakan alkali yang umum dilakukan pada produk jagung (Rocha *et al.*, 2002).

Toksisitas produk-produk turunan fumonisin ini belum banyak diketahui. Beberapa laporan banyak menunjukkan hasil yang kontradiktif. Menurut Gelderblom *et al.*(1993), Fumonisin seri B murni lebih bersifat toksik dibanding derivat-derivatnya yang terhidrolisis maupun terasetilasi gugus aminonya. Namun menurut Shetty and Bhat (1999), perlakuan amoniasi dan hidrolisis alkali akan menyebabkan fumonisin lebih bersifat toksik pada tikus percobaan.

D. REGULASI FUMONISIN PADA PANGAN

Melihat profil toksisitas dan keberadaannya pada pangan, beberapa negara telah memiliki regulasi spesifik mengenai fumonisin. Berikut ini akan dijabarkan beberapa regulasi fumonisin yang telah ditetapkan oleh FDA, European Commission, dan SNI Indonesia :

1. Food and Drug Administration, USA (FDA, 2001)

Regulasi FDA mengenai fumonisin pada pangan ditunjukkan dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Batas maksimum fumonisin total pada pangan menurut FDA

Produk pangan	Fumonisin Total (FB ₁ +FB ₂ +FB ₃) (ppm)
Produk jagung giling kering dengan pemisahan germ (mis : <i>flaking grits, corn grits, corn meal, corn flour</i> dengan kadar lemak < 2.25 % bk)	2
Produk jagung giling kering dengan pemisahan seluruh atau sebagian germ (mis : <i>flaking grits, corn grits, corn meal, corn flour</i> dengan kadar lemak ≥ 2.25 % bk)	4
Dedak jagung giling kering	4
Jagung untuk produksi masa yang telah dicuci	4
Jagung popcorn yang telah dicuci	3

FDA telah memiliki standar resmi AOAC International dalam pengujian fumonisin, yaitu pendeteksian fumonisin B1, B2, dan B3 pada jagung dengan derivatisasi OPA (AOAC Method 995.15) dan pendeteksian fumonisin menggunakan kolom imunoafinitas untuk tahap isolasi (AOAC Method 2001.04). Kedua metode ini menggunakan instrumen HPLC fase terbalik yang dilengkapi dengan detektor fluoresensi.

2. European Commission (EC, 2007)

European Commission telah menetapkan batas maksimum yang diijinkan untuk fumonisin B1 dan B2 pada produk-produk berbasis jagung. Batasan ini ditetapkan antara 0.2 hingga 4 ppm, berdasarkan pada pengolahan lanjutan produk. Dengan metode standar yang digunakan yaitu proses isolasi dengan kolom imunoafinitas atau *ion exchange*, derivatisasi via OPA (o-ftalaldehid), dan pengukuran HPLC fase terbalik dengan detektor fluoresensi. Detail batas maksimum fumonisin dijabarkan pada **Tabel 2**.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Selain itu EU juga telah menetapkan TDI (*Tolerable Daily Intake*) untuk fumonisin yaitu 2 µg/kg berat badan untuk total fumonisin B1, B2, dan B3, sejenis maupun dalam kombinasi (EC, 2003).

Tabel 2. Batas maksimum total fumonisin B1 dan B2 dalam pangan menurut regulasi EU

No.	Komoditas	Batas Maksimum Total FB1 dan FB2 (ppm)
1	Jagung segar, kecuali jagung yang akan diolah dengan penggilingan basah	4
2	Jagung untuk konsumsi langsung dan pangan berbasis jagung untuk konsumsi langsung (kecuali pangan pada nomor 3 dan 4)	1
3	Sereal sarapan berbasis jagung dan snack berbasis jagung	0.8
4	Pangan olahan berbasis jagung dan makanan bayi untuk balita dan anak-anak	0.2
5	Fraksi giling jagung dengan ukuran partikel > 500 mikron dengan kode CN 1103 13 atau 1103 20 40 dan produk hasil giling jagung yang lain dengan ukuran partikel > 500 mikron yang bukan untuk konsumsi langsung dengan kode CN 1904 10 10	1.4
6	Fraksi giling jagung dengan ukuran partikel ≤ 500 mikron dengan kode CN 1102 20 dan produk hasil giling jagung dengan ukuran partikel ≤ 500 mikron yang bukan untuk konsumsi langsung dengan kode CN 1904 10 10	2

3. Indonesia (SNI, 2009)

Sebagai negara tropis yang rentan terhadap kontaminasi mikotoksin, Indonesia perlu menetapkan batas maksimum fumonisin pada pangan. Batasan ini harus cukup aman untuk membatasi paparan terhadap konsumsi harian, namun juga cukup mudah terpenuhi dengan penerapan GAP dan GMP secara normal. Regulasi mengenai mikotoksin fumonisin ini telah ditetapkan dalam SNI tahun 2009 (**Tabel 3**), yaitu

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

berkisar 2 ppm untuk komoditi jagung dan produk olahan jagung sebagai bahan baku dan 1 ppm untuk produk olahan jagung siap konsumsi.

Tabel 3. Batas maksimum kandungan fumonisin B₁+B₂ dalam pangan menurut SNI 01-2009.

No	Jenis Pangan	Batas maksimum (ppm)
1	Jagung	2
2	Produk olahan jagung sebagai bahan baku	2
3	Produk olahan jagung siap konsumsi (corn flakes, popcorn, corn chips)	1

Penelitian Nuryono *et al.* (2004) terhadap sampel-sampel pangan berbasis jagung di Indonesia (Yogyakarta) menunjukkan kisaran konsentrasi fumonisin dari 0.130- 2.471 ppm untuk jagung dan produk-produk turunan jagung (industri besar dan rumah tangga). Namun pengujian-pengujian ini masih berdasarkan uji skrining, yaitu penggunaan *Mycotoxin Test Kits* (uji cepat). Belum ada pengujian sampel-sampel lokal dengan metode kuantitatif yang dipublikasikan.

Keberadaan regulasi yang ditetapkan harus dibarengi dengan adanya metode analisis standar. Metode ini harus dapat memberikan hasil pengukuran analit pada konsentrasi yang lebih rendah daripada limit regulasi, dengan presisi dan akurasi yang baik untuk program monitoring dan keamanan perdagangan pangan. Beberapa tahapan umum pada proses deteksi fumonisin antara lain: 1) Sampling dan Preparasi sampel; 2) Ekstraksi; 3) Filtrasi; 4) Isolasi; 5) Konsentrasi; 6) Deteksi/Kuantitasi; dan 7) Konfirmasi (Nielsen, 2003).

METODE ANALISIS FUMONISIN

Berbagai metode analisis untuk proses skrining, identifikasi, dan kuantifikasi kontaminan pada pangan telah banyak dikembangkan. Masing-masing teknik yang ada memiliki keunggulan dan kelemahan tersendiri yang harus diseleksi dengan teliti berdasarkan kesesuaiannya untuk analit tertentu pada matriks pangannya. Beberapa metode analisis saat ini juga telah dipermudah dengan keberadaan standar analisis secara komersial. Seperti

proses determinasi fumonisin, yang telah dibantu dengan keberadaan secara komersial standar analisis untuk FB1 dan FB2. Kemurnian standar analisis FB1 dan FB2 yang telah tersedia mencapai $> 97\%$ (Freudenschuss, 2003), sehingga memungkinkan pengujian yang lebih kuantitatif.

Beberapa metode analisis telah dikembangkan untuk deteksi fumonisin, antara lain menggunakan HPLC, GC-MS, TLC, dan ELISA. Semua instrumen ini berguna dan hasilnya dapat diterima, namun metode HPLC yang paling banyak digunakan untuk penentuan level fumonisin pada jagung dan produk-produk turunan jagung karena lebih sensitif, dipercaya, dan akurat (Castelo *et al.*, 1998). Selain itu, sifat fumonisin yang non-volatil dan larut dalam pelarut polar menjadikannya ideal diuji dengan HPLC, terutama dengan pengujian fase terbalik. Saat ini HPLC atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan instrumen standard untuk determinasi mikotoksin dalam bidang regulasi dan penelitian, hal ini karena kemampuan analisisnya yang memuaskan dalam mengimbangi kebutuhan analisis berbagai matriks kompleks untuk berbagai analit yang jumlahnya terus meningkat. Namun penggunaan instrumen lain dalam pengujian fumonisin juga tidak mustahil. Beberapa keunggulan dan kelemahan berbagai instrumen untuk deteksi fumonisin dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Pada awalnya digunakan TLC untuk proses separasi dan identifikasi fumonisin, namun metode ini memberikan hasil yang kurang spesifik sebagai metode kuantitatif. Adanya modifikasi penggunaan fluorescamine sebagai reagen visualisasi memungkinkan prosedur ini berguna sebagai metode skrining keberadaan FB1 dan FB2. Selain murah, metode ini juga memberikan hasil yang cukup linear dengan metode HPLC (Schaafsma, 1998). Untuk menganalisis fumonisin dengan konsentrasi yang sangat rendah umumnya digunakan GC/MS. Limit deteksinya mencapai kurang dari 100 ppb. Namun, umumnya sebagian besar metode yang dilaporkan tidak pernah didorong/diusahakan serendah mungkin. Hal ini karena pangan dan pakan berbasis jagung hampir secara universal mengandung fumonisin dengan konsentrasi >0.1 ppm dan belum ada informasi terbaru yang mengindikasikan perlunya menganalisis fumonisin

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang memungut dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

pada konsentrasi yang lebih rendah pada matriks-matriks ini, sehingga analisis dengan HPLC merupakan pilihan yang paling ideal.

Tabel 4. Perbandingan keunggulan dan kelemahan berbagai instrumen analisis (Pascale and Visconti, 2008).

No	Instrumen	Keunggulan	Kelemahan
1	TLC (<i>Thin Layer Chromatography</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Analisis cepat, relatif murah, dan mudah Baik digunakan untuk uji skrining Sensitif untuk aflatoksin dan okratoksin A 	<ul style="list-style-type: none"> Sensitivitas dan presisi rendah Mebutuhkan tahap separasi yang tepat untuk analisis dua dimensi Kuantitatif hanya jika menggunakan densitometer
2	GC (<i>Gas Chromatography</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Sensitivitas tinggi Dapat di upgrade autosampler Menyediakan metode konfirmasi (MS) 	<ul style="list-style-type: none"> Mahal dan membutuhkan pakar yang spesialis Bervariasi dalam <i>reproducibility</i> dan <i>repeatability</i> Mebutuhkan derivatisasi Masalah matriks pengganggu, kurva kalibrasi non-linear, dan <i>carry-over effect</i> dari sampel sebelumnya.
3	HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Sensitivitas dan selektivitas tinggi <i>Repeatability</i> baik dan dapat dibuat autosampler Waktu analisis singkat Banyak tersedia <i>ofisial method</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Mahal dan membutuhkan pakar yang spesialis Beberapa analit membutuhkan derivatisasi
4	ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Persiapan sampel mudah Murah dan sesuai untuk uji skrining Sensitifitas tinggi Menggunakan sedikit solven organik 	<ul style="list-style-type: none"> Terjadinya <i>cross-reactivity</i> (kesalahan positif) Mebutuhkan konfirmasi (analisis LC) Semi-kuantitatif (<i>visual assessment</i>) Umumnya LOD mendekati limit regulasi

Tabel 4. Perbandingan keunggulan dan kelemahan berbagai instrumen analisis (Pascale dan Visconti, 2008). (Lanjutan)

No	Instrumen	Keunggulan	Kelemahan
5	LC-MS (Liquid chromatography- Mass Spectrometry)	<ul style="list-style-type: none"> • Dapat mendeteksi beberapa mikotoksin sekaligus • Sensitivitas tinggi • Mencakup metode konfirmasi • Tidak membutuhkan tahap derivatisasi 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangat mahal • Membutuhkan spesialis yang sangat berpengalaman • Sensitivitas dipengaruhi teknik ionisasi • Metode <i>ofisial</i> masih terbatas
6	Rapid Test Kits (ROSA®Fumonisin, Microtiter Well Plate Assay, Myco√ dan lain sebagainya)	<ul style="list-style-type: none"> • Mudah dan cepat (5-10 menit) • Tidak membutuhkan peralatan mahal • Penggunaan pelarut organik terbatas • Cocok untuk tujuan skrining • Dapat digunakan secara <i>in situ</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • kualitatif atau semikuantitatif • Peluang kesalahan positif/negatif • Masalah matriks pengganggu • <i>Cross-reactivity</i> dengan mikotoksin lain • Kurangnya sensitivitas (mendekati batas regulasi)

Metode kuantifikasi HPLC pertama untuk penentuan fumonisin B1 dan B2 pada jagung yang terkontaminasi alami mencakup proses ekstraksi dengan metanol:air (3:1), proses isolasi dengan SAX (*Strong Anion Exchange*), dan proses kuantifikasi dengan HPLC fase terbalik setelah derivatisasi prekolum dengan reagen fluoresense, orto-ftalaldehid (Shephard *et al.*, 1990 di dalam Jackson and Jablonski, 2004). Metode ini kemudian mengalami pengembangan-pengembangan bertahap untuk peningkatan akurasi dan reproduibilitasnya di bawah lembaga-lembaga internasional *Commision on Food Chemistry of IUPAC* dan AOAC International. Saat ini metode tersebut telah diakui menjadi metode ofisial AOAC 995.15 untuk penentuan fumonisin B1, B2, dan B3 pada jagung.

Berbagai modifikasi terhadap metode ofisial tersebut meningkat seiring dengan waktu, yang menyebabkan pengembangan berbagai metode

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang memungut dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritikan atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

dan reagen alternatif lain. Pengembangan metode yang sangat signifikan terjadi ketika ditemukannya kolom imunoafinitas sebagai tahap isolasi (Duncan *et al.*, 1998). Kolom ini mengandung antibodi spesifik fumonisin yang meningkatkan presisi hasil secara stabil dan signifikan dalam studi-studi kolaborasi internasional. Metode ini menurunkan limit deteksi hingga lima kali lebih rendah dan telah terdaftar sebagai metode resmi AOAC 2001.04 (AOAC, 2002), yaitu untuk penentuan fumonisin B1 dan B2 pada sampel jagung dan cornflakes (*Liquid Chromatography with Immunoaffinity Column Clean Up*).

Immunoaffinity column (IAC) atau kolom imunoafinitas telah dirancang untuk memurnikan ekstrak sebelum pemisahan dengan HPLC untuk kuantifikasi fumonisin B₁, B₂, dan B₃, dan juga telah digunakan dalam metode fluorometer untuk determinasi cepat fumonisin total (Duncan *et al.*, 1998). Penggunaan metode fluorometer berguna untuk proses skrining fumonisin. Proses skrining ini bermanfaat untuk mendeteksi kadar fumonisin total sampel secara cepat serta mempermudah penentuan kisaran konsentrasi baku pada pembuatan kurva kalibrasi standar fumonisin pada uji HPLC.

Keberadaan kolom imunoafinitas secara komersial telah meningkatkan kemampuan deteksi fumonisin di berbagai negara. Kolom imunoafinitas FumoniTest™ dari *Vicam Company* (Watertown, MA) merupakan kolom yang paling sesuai dan direkomendasikan pada metode resmi AOAC 2001.04 (AOAC, 2002).

Beberapa keunggulan dalam menggunakan HPLC ini antara lain dapat digunakan untuk menganalisis senyawa-senyawa yang kestabilannya rendah terhadap suhu, mampu memisahkan senyawa-senyawa yang mirip dengan resolusi tinggi, waktu pemisahannya relatif singkat, presisi cukup tinggi, serta teknik analisisnya yang peka. Komponen inti HPLC adalah reservoir zat pelarut, pompa, injektor, kolom, detektor, dan rekorder (Adnan, 1997).

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Reservoir pelarut

Reservoir pelarut ini harus memungkinkan proses penghilangan gas atau udara yang ada dalam pelarut yang digunakan. Cara yang dipakai dapat bermacam-macam, misalnya dengan pemanasan, perlakuan vakum, atau dengan mengalirkan gas yang bersifat inert seperti helium. Hal ini cukup kritis karena bila terdapat gelembung gas pada pelarut yang dialirkan, dapat menyebabkan aliran menjadi diskontinyu, yang selanjutnya akan mengganggu kromatogram yang dihasilkan. Dan bila digunakan detektor yang peka, gas tersebut akan dapat menyebabkan terjadinya pergeseran garis dasar (*baseline*).

- Pompa

Komponen ini diperlukan untuk mengalirkan pelarut dengan kecepatan dan tekanan yang tetap. Gangguan pada pompa biasanya diakibatkan karena perawatan yang kurang teratur akibat pelarut tidak difiltrasi dengan baik, adanya klorida yang tinggi pada pH rendah, atau terjadinya endapan dalam pompa. Pompa yang baik dapat mengatur kecepatan aliran dengan konstan. Karena identifikasi puncak-puncak kromatogram didasarkan pada waktu retensi, maka aliran pelarut diharapkan dapat konstan.

- Injektor

Injektor ini merupakan tempat memasukkan sampel ke dalam kolom untuk proses separasi. Saat sampel diinjeksi, diharapkan agar aliran pelarut tidak mengganggu masuknya keseluruhan sampel ke dalam kolom. Sampel dapat langsung diinjeksikan ke dalam kolom atau digunakan katup injeksi, di mana sampel diinjeksikan ke dalam holding loop ($V: 25 \mu\text{l}$) terlebih dahulu. Aliran pelarut dari pompa kemudian dialirkan melalui loop yang seterusnya akan mendesak sampai masuk ke ujung kolom.

- Kolom

Kolom merupakan tempat terjadinya proses pemisahan sampel. Pada penelitian ini digunakan sistem cartridge, di mana bahan isian diisikan ke dalam kolom kaca yang kemudian dimasukkan ke dalam

kolom *stainless steel*, sehingga penggantian kolom akan lebih mudah dikerjakan. Meskipun banyak analisis yang dikerjakan pada suhu kamar, suhu kolom sering dapat diatur konstan dengan berbagai cara pemanasan. Sering diperlukan suhu kolom yang lebih tinggi dari suhu kamar untuk mengatasi masalah daya larut solut yang dianalisis dan viskositas fase mobil yang agak tinggi.

- Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi kandungan target pada eluen. Sifat-sifat detektor yang penting yaitu: mempunyai sensitivitas yang tinggi, bersifat linear untuk jangka konsentrasi tertentu, dan dapat mendeteksi eluen tanpa mempengaruhi resolusi kromatogram. Berbagai detektor pada HPLC antara lain: detektor UV-Vis, detektor fluoresens, detektor refrakto indeks, dan detektor konektivitas.

Detektor yang sesuai pada pengujian fumonisin adalah detektor fluoresens. Detektor ini peka untuk senyawa yang memiliki konsentrasi kecil dan mampu berfluoresens. Untuk dapat berfluoresens fumonisin harus direaksikan dahulu dengan komponen berfluoresens pada tahap derivatisasi. Tahap derivatisasi ini umumnya dilakukan sebelum proses separasi (prekolom), namun metode uji dengan tahap derivatisasi postkolom juga telah tersedia (Akiyama *et al.*, 1998). Agen fluorosens yang sering digunakan adalah *o-phthalaldehyde* (OPA), *4-fluoro-7-nitrobenzofuran*, *naphthalena-2,3-dikarboksaldehida* (NDA), *4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole* (DBD-F) (Jackson and Jablonski, 2004). Dengan berdasarkan sifat fluorosens, detektor ini lebih bersifat spesifik dan selektif.

Beberapa penelitian terbaru menunjukkan penggunaan HPLC dengan detektor ELSD (*Evaporative Light Scattering Detection*) (Wang *et al.*, 2008) dan detektor Mass Spectrometry (MS) atau Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) dengan LC (Silva *et al.*, 2009) dalam pengujian fumonisin yang cukup sensitif dan akurat. Penggunaan detektor ini, tidak dibutuhkan tahap derivatisasi dengan reagen fluoresens.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.