



**KAJIAN PRODUKSI AFLATOKSIN DARI ISOLAT KAPANG
*Aspergillus flavus***

SKRIPSI

VENTY OKTOVANI SA'DIAH
F24052592



**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2012**



Assessment of Aflatoxin Production Based from Mold Isolate of *Aspergillus flavus*

Venty Oktovani Sa'diah¹, Rizal Syarief¹, Romsyah Maryam²

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, Bogor Agricultural University, IPB Darmaga Campus, P.O. Box 220, Bogor 16002, West Java, Indonesia

²Balai Besar Penelitian Veteriner, P.O. Box 151, Bogor 16114, West Java, Indonesia
Phone 62 856 173 1288, e-mail: venty_uktovani@yahoo.com

ABSTRACT

Aflatoxin is known as toxigenic compound as the secondary metabolite produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Aflatoxin* is found both in food and feed in Indonesia. *Aflatoxin* standard is needed in every analysis of *aflatoxin* contamination. But it is rather difficult to get. It is imported, high costs, and take times. The aim of the research is to assess the potential local isolate of producing *aflatoxin* that can be used to be the alternative *aflatoxin* standard. The comparison with foreign isolate is done to observe the productivity of *aflatoxin* by local isolate. The result is shown that local isolate F0219 is potential to be the candidate of standard *aflatoxin* even the productivity is lower than the foreign isolate. The most suitable pH condition of incubation is in the value of 4.0, below that the production of *aflatoxin* is decent as well as in the alkaline medium. Temperature of 25°C is considered to be the most favorable condition by molds to grow and produce secondary metabolites. YES medium was proved to be the recommended medium for growing molds than modified GAN. Although *aflatoxin* production does not only depend on medium but also other external factors.

Keywords: *aflatoxin*, *production*, *Aspergillus flavus*, *assessment*



RINGKASAN

Aflatoksin merupakan ancaman yang cukup besar bagi perkembangan dunia pertanian di Indonesia. Kondisi lingkungan Indonesia yang memadai seperti kelembaban, kadar air, dan suhu mendukung pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* sebagai kapang penghasil aflatoksin. Kapang jenis ini tidak hanya mengkontaminasi selama penyimpanan, tetapi juga prapanen dan pascapanen. Aflatoksin merupakan senyawa hasil metabolit sekunder dari yang terbentuk dari setelah fase logaritmik pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*. Kapang penghasilnya umum mengkontaminasi bahan pangan dan pakan berbasis pertanian, seperti jagung dan kacang tanah. Toksin jenis ini dikenal karsinogenik, mutagenik, teratogenik, dan imunosupresif sehingga sangat membahayakan manusia dan hewan. Selain itu, kontaminasi kapang dan toksinnya merugikan petani khususnya secara ekonomi.

Dalam setiap analisis cemaran aflatoksin diperlukan suatu standar aflatoksin. Namun ketersediaan standar aflatoksin sangat terbatas khususnya di Indonesia. Hal ini dikarenakan oleh penyediaan standar aflatoksin harus diimpor sehingga membutuhkan waktu yang lama dan harga relatif tinggi. Regulasi ketat yang mengatur tentang aflatoksin juga menyulitkan tersedianya standar aflatoksin sebab mikotoksin ini tergolong senyawa bioterrorisme.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji potensi produksi aflatoksin dari beberapa *strain* kapang *Aspergillus flavus* dan beberapa metode produksi aflatoksin. Pembandingan potensi isolat lokal Indonesia dengan luar negeri dilakukan untuk melihat potensi isolat lokal Indonesia dalam memproduksi aflatoksin. Hasil dari kajian ini dapat digunakan untuk memberikan informasi guna menemukan metode meliputi jenis isolat, jenis media serta kondisi yang terbaik dan sesuai untuk menghasilkan aflatoksin dalam jumlah yang potensial sehingga dapat digunakan sebagai alternatif standar aflatoksin..

Pemaparan data-data yang berkaitan dengan produksi aflatoksin dilakukan dan pembandingan masing-masing parameter dilakukan. Parameter yang dibandingkan adalah jenis isolat yang digunakan, medium pertumbuhan, serta kondisi inkubasi meliputi pH, suhu, dan lama inkubasi.

Isolat lokal yang difokuskan dalam kajian ini adalah kapang *Aspergillus flavus* dengan kode F0219 koleksi dari BCC (Balitvet Culture Collection). Berdasarkan hasil perbandingan secara kualitatif, isolat lokal memiliki produktivitas yang lebih rendah dari isolat luar negeri. Produksi aflatoksin yang dapat dihasilkan oleh isolat luar dalam medium YES (*yeast extract sucrose*) mencapai kisaran 2,000–630,000 ppb sedangkan aflatoksin isolat lokal dalam medium PDB (*potato dextrose broth*) melalui metode ELISA berkisar 17.7-1,213.3 ppb. Medium GAN termodifikasi tidak sesuai sebagai media tumbuh isolat F0219, ditandai dengan tidak terdeteksinya aflatoksin menggunakan metode TLC. Namun, isolat lokal F0219 tetap dapat digunakan sebagai alternatif standar aflatoksin dengan penelitian lebih lanjut berupa purifikasi sampel. Penggunaan YES medium juga dapat dipertimbangkan sebagai medium tumbuh kapang untuk melihat potensi produksi aflatoksin dari isolat F0219. Kondisi inkubasi meliputi pH 4.0, suhu 25°C, dan lama inkubasi 9 sampai 12 hari merupakan kondisi optimum untuk pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin.



KAJIAN PRODUKSI AFLATOKSIN DARI ISOLAT KAPANG *Aspergillus flavus*

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan,
Fakultas Teknologi Pertanian,
Institut Pertanian Bogor

Oleh

VENTY OKTOVANI SA'DIAH
F 24052592

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2012



Judul Skripsi : Kajian Produksi Aflatoksin dari Isolat Kapang *Aspergillus flavus*
Nama : Venty Oktovani Sa'diah
NIM : F24052592

Menyetujui

Pembimbing I,

Pembimbing II,

(Prof. Dr. Ir. Rizal Sjarief Sjaiful Nazli, DESS)
NIP: 19480409 197302 1 001

(Dr. Dra. Romsyah Maryam, M.MedSc.)
NIP: 19640618 198503 2 001

Mengetahui,
Ketua Departemen,

(Dr. Ir. Feri Kusnandar, M.Sc.)
NIP: 19680526 199303 1 004

Tanggal Lulus :



PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi dengan judul **Kajian Produksi Aflatoksin dari Isolat Kapang *Aspergillus flavus*** adalah hasil karya saya sendiri dengan arahan Dosen Pembimbing Akademik, dan belum diajukan dalam bentuk apapun pada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini.

Bogor, April 2012
Yang membuat pernyataan

Venty Oktovani Sa'diah
F24052592



© Hak cipta milik Venty Oktovani Sa'diah, tahun 2012
Hak cipta dilindungi

Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari Institut Pertanian Bogor dan Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun, baik cetak, fotokopi, mikrofilm, dan sebagainya.

RIWAYAT HIDUP



Venty Oktovani Sa'diah. Lahir di Brebes, 9 Oktober 1987 dari ayah Abdul Karnaen dan ibu Prihatin Trihandayani, sebagai putri pertama dari tiga bersaudara. Penulis menamatkan SMA pada tahun 2005 dari SMA Negeri 1 Bogor dan pada tahun yang sama diterima di Institut Pertanian Bogor melalui jalur Seleksi Penerimaan Mahasiswa Baru (SPMB). Pada tahun 2006, penulis memilih Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian.

Selama mengikuti perkuliahan, penulis aktif dalam berbagai kegiatan termasuk menjadi asisten mata kuliah Praktikum Teknologi Pengolahan Pangan pada tahun 2009. Penulis juga aktif dalam organisasi sebagai staf divisi Hubungan Luar Himpunan Mahasiswa Ilmu dan Teknologi Pangan (Himitepa) IPB pada tahun 2006 hingga 2008 serta dalam berbagai kegiatan kepanitiaan baik yang bersifat internal maupun eksternal. Penulis juga berkesempatan mengikuti berbagai pelatihan dan seminar, seperti Pelatihan Quality Management System 9001:2000, Pelatihan Food Safety Management System 22000:2005, serta Pelatihan Sistem Manajemen Halal. Pada tahun 2008 dan 2009 penulis berpartisipasi dalam Program Kreativitas Mahasiswa bidang penelitian dengan proposal yang didanai oleh DIKTI. Penulis melakukan magang penelitian sebagai tugas akhir di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Veteriner Bogor dan menulis skripsi dengan judul “Kajian Produksi Aflatoksin dari Isolat Kapang *Aspergillus flavus*” dibawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Rizal Sjarief Sjaiful Nazli, DESS dan Dr. Dra. Romsyah Maryam, M.MedSc.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur dipanjatkan ke hadapan Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya sehingga skripsi ini berhasil diselesaikan. Skripsi dengan judul “Kajian Produksi Aflatoksin dari Isolat Kapang *Aspergillus flavus*” disusun berdasarkan hasil magang penelitian yang dilaksanakan di Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet) Bogor.

Dengan dilaksanakannya penelitian hingga tersusunnya skripsi ini sebagai salah satu syarat mendapat gelar Sarjana Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, penulis ingin menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Papa Abdul Karnaen dan Mama Prihatin Trihandayani yang telah dengan sabar dan setia mendampingi, mendukung, mendoakan, dan memotivasi penulis
 2. Prof. Dr. Ir. Rizal Sjarief Sjaiful Nazli, DESS sebagai dosen pembimbing pertama yang dengan sabar dan bijaksana membimbing, mendukung, membantu, dan selalu memotivasi penulis selama perkuliahan hingga skripsi ini selesai
 3. Dr. Dra. Romsyah Maryam, M.MedSc selaku dosen pembimbing kedua atas bimbingan, kesempatan, bantuan, dan kesabaran selama penelitian hingga penyelesaian skripsi
 4. Dr. Dra. Suliantari, M.Si atas waktu dan kesediaanya sebagai dosen pengujii
 5. Adik-adik dan keluarga besar atas doa dan dukungan yang selalu diberikan kepada penulis
 6. Segenap dosen Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan atas ilmu yang diberikan
 7. Staf UPT dan ITP, Bu Novi, yang senantiasa membantu dalam urusan administrasi
 8. Kepala, Staf dan Teknisi Laboratorium Mikologi dan Toksikologi di Bbalitvet Bogor, atas izin, bantuan, dan kerja samanya selama penelitian dan penyelesaian skripsi
 9. Care IPB Baranangsiang yang membantu penulis selama penyelesaian skripsi
 10. Anggara Aldobrata H. S., drh. yang selalu mendukung dan memotivasi penulis
 11. Sahabat-sahabat tercinta, teman-teman F-Track, teman-teman ITP 42, teman-teman TPB B15, penghuni Astri A1 lorong 2, teman teman Pondok Indah Balio
 12. Keluarga ITP 39, 40, 41, 43, SJMP 41, dan yang tak dapat disebutkan satu per satu

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun dalam pencapaian kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga tulisan ini bermanfaat dan memberikan kontribusi yang nyata terhadap perkembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang Teknologi Pangan.

Bogor, April 2012

Venty Oktovani Sa'diah

**DAFTAR ISI**

	Halaman
RIWAYAT HIDUP	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	2
II. TINJAUAN UMUM INSTANSI	3
III. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Mikotoksin	5
B. <i>Aspergillus flavus</i>	6
C. Aflatoksin	11
1. Karakterisasi Aflatoksin	11
2. Toksisitas Aflatoksin	17
3. Regulasi Aflatoksin	18
4. Produksi Aflatoksin	21
IV. METODOLOGI PENELITIAN	24
A. Metode Penelitian	24
1. Metode Kerja Produksi Aflatoksin Davis <i>et al.</i> (1966)	24
2. Metode Kerja Produksi Aflatoksin Winn dan Lane (1978)	25
3. Metode Kerja Produksi Aflatoksin Sugiawan (2011)	26
4. Metode Kerja Produksi Aflatoksin Afiandi (2011)	27
B. Penyajian Data	29
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
A. Produksi Aflatoksin Metode Davis <i>et al.</i> (1966)	30
B. Produksi Aflatoksin Metode Winn dan Lane (1978)	34
C. Produksi Aflatoksin Metode Sugiawan (2011)	35
D. Produksi Aflatoksin Metode Afiandi (2011)	36
E. Rekapitulasi Perbandingan Produktivitas Antar Metode	38
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	42
A. Kesimpulan	42
B. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	49



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang	5
Tabel 2. Sifat fisikokimia aflatoksin	17
Tabel 3. Panduan FDA tentang level total aflatoksin yang dapat diterima pada pangan dan pakan	19
Tabel 4. Batas aflatoksin oleh negara pengimpor komoditas pertanian	20
Tabel 5. Batas maksimum kandungan aflatoksin dalam pangan dalam SNI 7385:2009...	20
Tabel 6. Pengaruh konsentrasi sukrosa pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada media mengandung 2% ekstrak khamir	30
Tabel 7. Pengaruh konsentrasi ekstrak khamir pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada media mengandung 20% sukrosa	31
Tabel 8. Pengaruh penambahan aditif pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada medium YES	31
Tabel 9. Pengaruh pH pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada medium YES.....	32
Tabel 10. Pengaruh waktu inkubasi pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada medium YES	33
Tabel 11. Produksi aflatoksin dari isolat <i>Aspergillus flavus</i> terpilih pada medium YES..	33
Tabel 12. Produksi aflatoksin B1 dan B2 oleh <i>A.flavus</i> pada jagung dan sorgum yang diinkubasi pada RH 90% dalam dua waktu dan dua suhu	34
Tabel 13. Kadar aflatoksin B ₁ pada supernatan dengan media tumbuh pH 4 dan pH 7 ...	35
Tabel 14. Kadar aflatoksin dalam sampel berdasarkan analisis ELISA Kit	36
Tabel 15. Hasil uji TLC kadar aflatoksin sampel pada media PDB	37
Tabel 16. Hasil uji HPLC kadar aflatoksin sampel ulangan 2 pada media PDB	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Penampakan <i>A.flavus</i> di bawah mikroskop elektron	7
Gambar 2.	Penampakan kontaminasi <i>A.flavus</i> pada kacang tanah	9
Gambar 3.	Penampakan kontaminasi <i>A.flavus</i> pada jagung	10
Gambar 4.	Struktur molekul cincin lima heterosiklik aflatoksin : Fig 1. B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , Fig 2. M ₁ , M ₂ , B _{2a} , G _{2a}	16
Gambar 5.	Penampakan makroskopik <i>A.flavus</i> yang ditumbuhkan dalam Czapek agar...	22
Gambar 6.	Isolat <i>A.flavus</i> Link berwarna hijau dalam PDA miring	22



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Tabel pengaruh konsentrasi sukrosa pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada media mengandung 2% ekstrak khamir	50
Lampiran 2. Tabel pengaruh konsentrasi ekstrak khamir pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada media mengandung 20% sukrosa	51
Lampiran 3. Tabel pengaruh penambahan aditif pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada medium YES	52
Lampiran 4. Tabel pengaruh pH pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada medium YES	53
Lampiran 5. Tabel pengaruh waktu inkubasi pada produksi aflatoksin oleh <i>A.flavus</i> pada medium YES	54
Lampiran 6. Tabel produksi aflatoksin dari isolat <i>Aspergillus flavus</i> terpilih pada medium YES	55
Lampiran 7. Tabel produksi aflatoksin B ₁ dan B ₂ oleh <i>Aspergillus flavus</i> pada jagung dan sorghum yang diinkubasi pada RH 90% pada dua waktu dan dua suhu	56
Lampiran 8. Tabel hasil analisis dengan TLC pada media PDB	57
Lampiran 9. Tabel hasil analisis HPLC pada media PDB	58



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kontaminasi aflatoksin pada komoditi pertanian merupakan kendala terbesar bagi perkembangan pertanian dan peternakan di Indonesia. Hal ini disebabkan oleh kondisi iklim dan lingkungan Indonesia yang tropis merupakan kondisi ideal bagi pertumbuhan kapang *Aspergillus* spp. sebagai kapang penghasil aflatoksin. Aflatoksin juga sangat berkaitan dengan keamanan pangan akibat kontaminasinya pada bahan pangan atau pakan.

Aflatoksin merupakan produk metabolik sekunder yang terbentuk setelah fase logaritmik pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* (Heathcote 1984). *Aspergillus flavus* banyak ditemukan pada bahan pangan dan pakan di Indonesia yang berbasis pertanian. Jagung dan kacang tanah contohnya, merupakan media yang potensial untuk pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus*. Kandungan aflatoksin pada bahan baku sangat mempengaruhi kualitas bahan pangan atau pakan. Semakin tinggi aflatoksin dalam bahan baku maka semakin tinggi pula kandungan aflatoksin pada pangan atau pakan jadi, yang berkorelasi dengan menurunnya kualitas pangan atau pakan. Kontaminasi aflatoksin yang melebihi batas ambang maksimum yang ditetapkan dalam dunia perdagangan menyebabkan banyak komoditi pertanian tidak layak diperdagangkan. Hal tersebut mengakibatkan kerugian yang besar terhadap perekonomian suatu negara secara luas.

Di dalam Reddy dan Wiliyar (2000), FAO memperkirakan 25% bahan pangan yang berasal dari komoditas pertanian terinfeksi aflatoksin setiap tahunnya. Kerugian yang sangat besar harus dialami oleh negara-negara maju maupun berkembang. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh kontaminasi aflatoksin di Asia mencapai 400 juta dolar per tahun (Zanelli 2000), di Amerika mencapai lebih dari 100 juta dolar per tahun (Reddy dan Wiliyar 2000), dan di Australia mencapai 10 juta dolar per tahun (Pitt dan Hocking 1997).

Di samping dampak ekonomi yang dihasilkan, dampak yang tidak kalah pentingnya adalah dampak kesehatan manusia dan hewan ternak. Kontaminasi aflatoksin pada bahan pangan dan pakan dapat menghasilkan residu dalam tubuh yang mengakibatkan keracunan pada manusia dan hewan ternak. Hal ini tidak sesuai dengan fungsi dan hakekat dari pangan dan pakan yakni memenuhi nilai gizi serta meningkatkan kesehatan. Kontaminasi aflatoksin dalam tubuh dapat menyebabkan radang hati, kelesuan, hepatitis, dan kematian (Siregar 1986). Pitt dan Hocking (1997) memperkirakan terdapat 20.000 kematian penderita kanker hati di Indonesia setiap tahunnya disebabkan oleh kontaminasi aflatoksin.

Aflatoksin dikategorikan sebagai mikotoksin utama yang termasuk ke dalam tujuh mikotoksin terpenting di dunia. Namun, aflatoksin mendapat perhatian yang lebih besar dibandingkan mikotoksin lainnya, baik dalam dunia medis maupun ekonomi. Oleh karena itu, kandungan aflatoksin dalam bahan pangan atau pakan telah diregulasi oleh negara-negara di dunia, termasuk Indonesia. FAO menetapkan batas maksimum kadar aflatoksin pada bahan pangan 20 ppb dan untuk produk berbasis susu 0.5 ppb. Di dalam SNI ditetapkan



kadar maksimum aflatoksin di Indonesia pada kacang tanah dan jagung serta produk olahannya adalah 15 ppb untuk AFB_1 , 20 ppb untuk total aflatoksin, dan pada susu serta produk olahannya adalah 0.5 ppb untuk AFM_1 (SNI 2009).

Untuk mengukur kadar aflatoksin pada suatu bahan diperlukan metode analisis. Metode yang tepat dapat mendukung kajian resiko aflatoksin dan dapat digunakan dalam regulasi aflatoksin. Berbagai variasi dan modifikasi dalam analisis dilakukan seiring dengan perkembangan kapang *Aspergillus flavus* dan kemampuannya menghasilkan aflatoksin. Adapun untuk mendukung metode analisis aflatoksin diperlukan suatu standar aflatoksin. Namun permasalahan yang dihadapi dalam setiap analisis aflatoksin adalah ketersediaan standar aflatoksin murni di pasaran. Hal ini dikarenakan oleh mikotoksin jenis ini telah dikategorikan sebagai senyawa bioterisme.

Berbagai penelitian telah dilakukan dengan lingkup tujuan memproduksi aflatoksin dengan memanfaatkan isolat kapang *Aspergillus flavus*. Jenis media pertumbuhan, kondisi lingkungan, dan instrumen yang dipakai telah digunakan untuk mendukung pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* dalam meningkatkan produksi aflatoksin. Penggunaan isolat *Aspergillus flavus* dari berbagai *strain* juga menunjukkan adanya variasi produksi aflatoksin.

Selama ini, aflatoksin standar yang digunakan dalam analisis aflatoksin didapatkan dengan cara diimpor sehingga membutuhkan waktu yang lama dan harganya sangat mahal. Sementara itu, Indonesia memiliki isolat *A. flavus* yang berpotensi menghasilkan aflatoksin dalam jumlah tinggi dan dapat dijadikan standar. Penggunaan standar aflatoksin lokal diharapkan dapat membuat penelitian dan pengembangan analisis aflatoksin menjadi lebih efektif, baik dari segi biaya maupun waktu. Hal inilah yang mendorong dilakukannya magang penelitian ini sehingga dapat memberikan pengetahuan yang dapat digunakan sebagai dasar solusi yang terbaik untuk mendapatkan standar aflatoksin guna mengatasi keterbatasan aflatoksin standar di pasaran.

B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengkaji potensi produksi aflatoksin dari beberapa *strain* kapang *Aspergillus flavus* dan beberapa metode produksi aflatoksin. Pembandingan potensi isolat lokal Indonesia dengan luar negeri dilakukan untuk melihat potensi isolat lokal Indonesia dalam memproduksi aflatoksin. Hasil dari kajian ini dapat digunakan untuk memberikan informasi guna menemukan metode meliputi jenis isolat, jenis media serta kondisi yang terbaik dan sesuai untuk menghasilkan aflatoksin dalam jumlah yang potensial sehingga dapat digunakan sebagai alternatif standar aflatoksin. Kajian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam penelitian dan pengembangan analisis kontaminasi aflatoksin pada bahan pangan dan pakan, terutama dalam hal penyediaan standar aflatoksin berbasis isolat lokal.



BAB II

TINJAUAN UMUM INSTANSI

Magang penelitian ini dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor. Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet) merupakan unit pelaksanaan teknis (UPT) dalam bidang penelitian dan pengembangan yang berada di bawah dan bertanggung jawab kepada Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bbalitvet didirikan sejak tahun 1908 saat pemerintahan kolonial Belanda. Pada tahun 1974, Bbalitvet ditetapkan sebagai unit pelaksanaan teknis berdasarkan SK Presiden RI No. 44 dan 45 dan masuk ke dalam jajaran Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian. BBalivet berkantor di Jl. R.E. Martadinata No. 30 Bogor, Jawa Barat.

Unit kerja Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet) Bogor memiliki tugas pokok yaitu melaksanakan penelitian penyakit hewan. Selain itu, Bbalitvet Bogor juga memiliki fungsi sebagai berikut:

- a. penelitian veteriner di bidang bakteriologi, virology, parasitologi, patologi, toksikologi, mikologi, epidemiologi, dan bioteknologi untuk pengembangan produksi dan lingkungan
- b. penelitian farmakologi dan teknik penyehatan hewan
- c. melaksanakan eksplorasi, evaluasi, pelestarian, dan pemanfaatan plasma nutfah mikroba veteriner untuk pengembangan produksi dan pelestarian lingkungan
- d. sebagai Laboratorium Rujukan Nasional di bidang diagnosis penyakit hewan di Indonesia
- e. melaksanakan pelayanan teknis, kerja sama, dan penyebarluasan hasil-hasil penelitian
- f. melaksanakan fungsi penyelenggaraan tata usaha balai

Fasilitas yang dimiliki oleh Bbalitvet mencakup laboratorium yang terakreditasi, unit pelayanan, unit *Breeding* hewan laboratorium, kandang hewan percobaan, kebun rumput, perpustakaan, bengkel, kantor administrasi, dan internet. Bbalitvet memiliki delapan buah laboratorium, antara lain laboratorium bidang patologi, toksikologi, virologi, mikologi, bioteknologi, parasitologi, bakteriologi, dan penyakit zoonosis.

Sebagai fasilitas yang disediakan dalam laboratorium, terdapat 56 jenis peralatan laboratorium dari yang sederhana hingga modern dengan jumlah keseluruhan sebanyak 470 unit. Laboratorium Bbalitvet telah memperoleh sertifikat akreditasi Laboratorium Pengujian dari Komite Akreditasi Nasional – Badan Standarisasi Nasional dengan klasifikasi ISO – 17025 (SNI-19-17025-2000) sejak awal 2001. Sistem mutu laboratorium Bbalitvet telah diakui baik secara nasional maupun internasional. Bbalitvet telah mendapatkan sertifikat RE-Akreditasi ISO / IEC-17025-2005 sejak 4 Agustus 2006.

Sebanyak tiga buah unit pelayanan dimiliki oleh Bbalitvet yakni Unit Pelayanan Diagnostik, Unit Bbalitvet Culture Collection (BCC) dan Unit Komersialisasi Teknologi Bbalitvet. Unit produksi Bbalitvet Culture Collection (BCC) merupakan unit yang didirikan untuk mengelola pelestarian kekayaan plasma nutfah mikroba koleksi Balai Besar Penelitian Veteriner, sehingga dapat dimanfaatkan untuk tujuan pengembangan IPTEK yang dapat mensejahterakan bangsa.



Terdapat berbagai macam mikroorganisme yang dikoleksi oleh BCC, baik dari jenis bakteri, kapang, khamir, protozoa, maupun virus. Koleksi mikroorganisme di BCC disimpan menggunakan *freeze drying* atau *liquid drying* yang ditetapkan pada suhu 5°C dan -20°C serta *cryopreservation* pada suhu -70°C atau -196°C (nitrogen cair). Berbagai macam isolat kapang telah menjadi koleksi BCC termasuk kapang *Aspergillus flavus*. Salah satu isolat lokal yang digunakan sebagai dasar dalam magang penelitian ini merupakan koleksi kapang *Aspergillus flavus* dari BCC dengan nomor kode F0219.



BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

A. Mikotoksin

Mikotoksin merupakan senyawa hasil metabolisme sekunder dari kapang tertentu yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan bagi manusia maupun hewan (Fardiaz 1989). Bennett (1987) mendefinisikan mikotoksin sebagai molekul organik berukuran kecil yang dihasilkan oleh kapang berfilamen dan dapat menyebabkan respon toksik pada vertebrata tingkat tinggi dan hewan lainnya jika masuk dalam jumlah tertentu melalui jalur alami. Penamaan mikotoksin diambil dari bahasa Yunani yaitu *mykes* yang berarti kapang dan *toxicum* yang berarti racun. Buckle *et al.* (1987) menyebutkan bahwa mikotoksin merupakan senyawa heterosiklik yang berberat molekul rendah. Selain itu, mikotoksin umumnya tahan terhadap panas sehingga proses pengolahan dengan pemanasan tidak dapat menjamin hilangnya atau berkurangnya aktivitas toksin. Beragam jenis kapang yang mampu menghasilkan mikotoksin disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang^a

Kapang	Jenis Mikotoksin
<i>Fusarium</i> sp.	Dioksinivalenol, toksin T2, zearalenon, moniliformin, fumonisins
<i>Aspergillus terreus</i>	Sitreoviridin, asam tereat, patulin
<i>Aspergillus</i> sp.	Aflatoksin, asam kojat, asam aspergilat, asam sikolopiazonat, patulin, stereoviridin, fumigatin, okratoksin, sterigmatosistin, viriditoksin, sitrinin, palmotoksin, rubratoksin, luteoskiran, dekumbin, viridikatin
<i>Penicillium</i> sp.	Patulin, okratoksin, sitrinin, luteoskiran, tremorgenik, rubratoksin, mikofenolat, griseofulvin, fenitren, asam sekanolat
<i>Alternaria</i> sp.	Asam tenuazonik

^a Sumber Rahayu (2006) dalam Miskiyah *et al.* (2010)

Komoditas pertanian seperti kacang-kacangan, jagung, dan serealia lainnya banyak tercemar kapang penghasil mikotoksin. Namun, buah-buahan subtropis dan produk olahannya juga merupakan substrat yang potensial untuk pertumbuhan kapang mikotoksin. Berbeda dengan serealia, buah-buahan memiliki kadar air yang lebih tinggi serta lebih mudah rusak. Miskiyah *et al.* (2010) memperkirakan kerugian ekonomi yang diakibatkan kerusakan buah oleh bakteri maupun kapang mencapai 58 juta dolar setahun.

Mikotoksin dikenal sebagai kontaminan selama penyimpanan, namun mikotoksin dapat mengkontaminasi bahan baik sebelum panen (*pre-harvest contamination*) maupun



setelah panen (*post-harvest contamination*). Kontaminasi sebelum panen dapat terjadi dikarenakan oleh suhu tanah lebih dari 25°C dan banyaknya inokulum kapang di tanah. Rendahnya manajemen pascapanen dan kondisi penyimpanan serta adanya serangga merupakan faktor penyebab kontaminasi setelah panen. Adanya kontaminasi mikotoksin pada bahan pangan dan pakan mengembangkan isu keamanan pangan secara global, yang menyebabkan hasil panen rendah dan kerugian ekonomi.

Pada pertemuan gabungan antara *Food Agriculture Organization* (FAO), *World Health Organization* (WHO), dan *United Nation Development Program* (UNDP) dalam *Conference on Mycotoxins* di Nairobi, Kenya tahun 1977, dihasilkan suatu pernyataan bahwa masalah kesehatan akibat keracunan toksin asal kapang akan menjadi salah satu golongan penyakit tidak menular yang relevan dan potensial di negara-negara berkembang di masa yang akan datang. Dari konferensi tersebut, ditetapkan tujuh macam mikotoksin yang perlu mendapat perhatian, yaitu aflatoksin, zearalenon, okratoksin, trikotesen, sitrinin, patulin, dan asam penisilat. Menurut Budiarso (1995), tiga di antara mikotoksin tersebut yang menjadi masalah terbesar di Indonesia, yaitu aflatoksin, zearalenon, dan okratoksin.

Adapun gejala atau penyakit yang ditimbulkan sebagai akibat dari terkonsumsinya makanan yang terkontaminasi mikotoksin disebut mikotoksikosis. Mikotoksin dapat bersifat karsinogenik, mutagenik, teratogenik, nefrotoksik, diuresis, hemoragik, estrogenik, dan imunosupresif (menurunkan kekebalan tubuh).

Toksisitas mikotoksin berbeda antara satu jenis mikotoksin dengan jenis lainnya. Efek negatif mikotoksin terhadap kesehatan tergantung pada konsentrasi, rute dan lama pemaparan, spesies, umur dan jenis kelamin, status gizi dan hormon, sensitivitas individual, serta efek sinergis dari berbagai mikotoksin yang secara bersamaan terdapat dalam bahan pangan (Widiastuti 2006; Kusumandari 2010). Selain itu, perbedaan sifat kimia, biologis, dan toksikologi tiap jenis mikotoksin menyebabkan perbedaan efek toksik yang ditimbulkan.

Indonesia sebagai negara tropis dengan kelembaban yang tinggi merupakan wilayah yang sangat ideal untuk pertumbuhan kapang, terutama kapang penghasil mikotoksin. Faktor-faktor seperti penanganan baik saat prapanen maupun pascapanen, penyimpanan, dan distribusi pascapanen komoditi pertanian yang tidak memperhatikan kebersihan dan higienitas dapat mendukung pertumbuhan mikroba penghasil toksin yang dapat mengancam kesehatan manusia dan hewan ternak. Oleh karena itu penanganan yang tepat baik dari masa prapanen hingga sampai ke tangan konsumen perlu diambil untuk meminimalkan paparan mikotoksin pada manusia dan hewan.

Tidak hanya menyerang produk pertanian, kapang penghasil mikotoksin juga dapat mengancam kesehatan manusia melalui bangunan tempat tinggal, sebab spora kapang dapat tersebar melalui udara. Jika spora menempel pada dinding dengan material yang tepat dengan kondisi kelembaban dan a_w yang sesuai, kapang dapat tumbuh dan memungkinkan terjadinya sintesis mikotoksin (Nielsen 2003).

B. *Aspergillus flavus*

Kapang *Aspergillus* sudah dikenal sejak tahun 1729 dan pertama kali ditemukan oleh pendeta Florentine dan seorang mikologis P. A. Micheli dengan ragam spesies yang



mampu beradaptasi pada berbagai kondisi lingkungan (Wilson *et al.* 2002). Spesies kapang dari genus *Aspergillus* tersebar secara luas dan di antaranya dapat bersifat menguntungkan maupun merugikan bagi manusia. Beberapa kapang dapat menghasilkan enzim dan asam-asam organik yang dapat digunakan dalam industri fermentasi pangan sedangkan beberapa lainnya mampu menghasilkan senyawa beracun yang bersifat toksik, mutagenik, karsinogenik, seperti jenis *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, dan *A. fumigatus*. *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus* diketahui mampu menghasilkan mikotoksin jenis aflatoksin. Namun yang paling banyak dan dominan adalah *Aspergillus flavus* (Gambar 1).



Gambar 1. Penampakan *A.flavus* di bawah mikroskop elektron (Anonim^b 2011)

Seperti halnya mikroorganisme jenis kapang yang lain, taksonomi *Aspergillus* sangat kompleks dan terus berkembang. Umumnya genus dapat dengan mudah diidentifikasi berdasarkan karakteristik konidiofor, tetapi spesies ini diidentifikasi dan terdiferensiasi secara kompleks. Krishnan *et al.* (2009) menyebutkan bahwa *Aspergillus* spp. tergolong dalam filum Ascomycota dan famili Trichomycetidae, sedangkan spesiesnya dibedakan berdasarkan karakteristik morfologi dan warna. Koloni *Aspergillus* dapat tumbuh dengan cepat serta memiliki variasi warna dari putih, kuning, kuning kecoklatan, hijau, coklat, sampai hitam.

Adapun penamaan *Aspergillus flavus* pertama kali diperkenalkan oleh Johann Heinrich Friedrich pada tahun 1809. Awalnya kapang ini merupakan spesies aseksual berupa konidia dan sklerotia, namun penemuan terbaru menyebutkan bahwa *Petromyces flavus* dikenal sebagai tahap seksual dari *A.flavus*. Berikut penamaan *Aspergillus flavus*^a.

Kingdom	: Fungi
Filum	: Ascomycota
Kelas	: Eurotiomycetes
Ordo	: Eurotiales
Famili	: Trichomycetidae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus flavus</i>

^a Sumber Anonim^a (2011)



Aspergillus flavus umumnya tumbuh sebagai saprofit pada tanaman dan hewan yang sudah mati di dalam tanah berfungsi sebagai pendaur ulang nutrisi. Pada tanaman, kapang ini dapat menginfeksi jagung, gandum, kedelai, kacang tanah, dan biji kapas dengan kondisi yang mendukung pertumbuhannya. Infeksi tanaman oleh serangga dan burung dapat menimbulkan kerusakan tanaman yang memungkinkan kontaminasi lanjutan oleh kapang. Namun beberapa penemuan dalam Hedayati *et al.* (2007) membuktikan bahwa spora kapang *A.flavus* dapat pula ditemukan pada udara terbuka dan air. Untuk kontaminasi kapang dalam air, tidak mudah menghilangkan kontaminasi dengan proses perlakuan air pada umumnya dimana kontaminasi dapat terjadi mulai dari sumber air hingga dalam proses penyaringan dan penjernihan.

Aspergillus flavus memiliki hifa berseptum dan miselium bercabang umumnya tidak berwarna, koloni kompak, konidiofor kasar dan relatif panjang muncul dari kaki sel. Secara mikroskopik, ciri-ciri *A.flavus* ditandai dengan konidiofor yang berdinding tebal, tidak berwarna, panjang kurang dari 1 mm, vesikel panjang saat muda lalu menjadi subglobos atau globos dengan variasi diameter antara 10 sampai 65 mm, pialida dapat berupa uniseriat atau biseriat, panjang cabang utama bisa lebih dari 10 mm sedangkan yang kedua lebih dari 5 mm (Hedayati *et al.* 2007).

Kapang *Aspergillus flavus* dikenal sebagai kapang kuning kehijauan yang dapat tumbuh pada suhu 12–48°C dengan a_w minimal 0.8. Namun suhu optimal untuk pertumbuhannya adalah 25–42°C. Suhu pertumbuhan yang ideal dapat berkontribusi pada terbentuknya patogen dari *Aspergillus flavus* kepada manusia. Adapun pertumbuhan dan perkecambahan konidia yang ideal dapat terjadi pada kondisi a_w lebih rendah dari 0.9 dan akan terhambat jika a_w kurang dari 0.75. Vujanovic *et al.* (2001) dalam Hedayati *et al.* (2007) menyebutkan bahwa *A.flavus* dapat tumbuh dengan baik dengan kondisi a_w antara 0.86 dan 0.96.

Menurut Diener dan Davis (1969) kelembaban yang relatif aman untuk penyimpanan biji-bijian adalah 70%. Hal ini dikarenakan hanya sedikit kapang yang dapat tumbuh pada kondisi tersebut. *A.flavus* merupakan kapang mesofit yang membutuhkan RH minimal 80–90% untuk pertumbuhan dan germinasi spora dan 85% untuk sporulasi.

Sebagai kapang mesofilik, *A.flavus* memiliki suhu pertumbuhan minimum 6–8°C, optimum 36–38°C, dan maksimum 44–46°C. Kondisi lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan *Aspergillus flavus* antara lain konsentrasi oksigen, kadar air, unsur makro (karbon, nitrogen, fosfor, kalium, dan magnesium), unsur mikro (besi, seng, tembaga, mangan, dan molybdenum), cahaya, kelembaban, serta keberadaan kapang lain. Penurunan konsentrasi oksigen dapat menurunkan produksi aflatoksin karena *A. flavus* sebagai kapang penghasil aflatoksin menjadi bersifat aerobik obligat. Namun rendahnya kandungan oksigen tidak menyebabkan kematian pada miselia dan spora. Pada kondisi lingkungan tertentu, *A.flavus* dapat menghasilkan toksin yang disebut aflatoksin.

Kemampuan kapang membentuk dan menimbun aflatoksin tergantung pada beberapa faktor yaitu potensi genetik kapang, persyaratan lingkungan (substrat, kelembaban, suhu, pH), dan lamanya kontak antara kapang dengan substrat (Jay 1996). Substrat jagung, gandum, dan beras yang diinokulasikan dengan tiga isolat *A.flavus* dapat menghasilkan aflatoksin lebih tinggi dibandingkan dengan biakan sorgum dan kedelai pada kultur tetap maupun bergoyang. *Aspergillus flavus* juga dapat menghasilkan aflatoksin jenis lain bila



ditumbuhkan dalam media asam yang memiliki warna fluoresensi biru dan hijau dengan kepolaran lebih besar dan daya racun lebih kecil. Keadaan lingkungan seperti itu merupakan salah satu upaya yang dapat digunakan untuk inaktivasi aflatoksin pada bahan pangan maupun pakan.

Secara alami, *Aspergillus flavus* umumnya terdapat di tanah, terutama tanah-tanah garapan untuk tanaman pangan. Selain itu, terdapat pula pada bahan yang telah rusak, seperti biji-bijian, dengan kandungan kadar air yang memungkinkan untuk pertumbuhan *A.flavus*. Contohnya jagung. Christensen dan Kauffman (1969) menyebutkan bahwa kontaminasi *A.flavus* dapat terjadi saat jagung masih ditanam di kebun ataupun saat disimpan.

Kontaminasi kapang sebelum panen dikaitkan dengan kekeringan (*drought*) dan suhu selama pengisian biji (*grain fill*), sedangkan kontaminasi yang terjadi setelah panen dapat berkembang saat biji tidak diperlakukan secara tepat selama tahap pengeringan dan penyimpanan dengan kondisi kadar air lingkungan sangat mendukung pertumbuhan kapang. Pemanenan yang dilakukan sebelum waktunya, bahan tidak langsung dikeringkan, atau bahan yang belum kering ditumpuk-tumpuk dan mengalami kontak dengan tanah menyebabkan tingginya kontaminasi aflatoksin pada bahan. Sumner (2003) menambahkan adanya kontaminasi serangga juga dapat mempercepat cemaran *A.flavus*.

Umumnya spora kapang dapat hidup pada biji yang terbuka atau yang mengalami perlukaan. Walaupun saat panen belum terinfeksi, akibat adanya perlukaan spora yang menempel pada permukaan biji dapat mengkontaminasi bahan selama pasca panen. Didukung oleh suhu dan keadaan kelembaban pada ruang penyimpanan, spora akan mampu bergerminasi dan akhirnya menginfeksi biji.

Menurut Kasno (2004), kontaminasi *A.flavus* pada komoditi pertanian seperti kacang tanah dapat terjadi akibat adanya interaksi antara varietas yang peka, kapang *A.flavus* yang agresif, serta kondisi yang kondusif. Adapun contoh biji-bijian seperti kacang tanah dan jagung yang terkontaminasi kapang *A.flavus* dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3. Bila *A.flavus* telah memproduksi aflatoksin, maka biji yang terkontaminasi kapang akan terasa pahit bila dimakan. Kandungan aflatoksin yang tinggi pada bahan dapat dikenali secara fisik dan sensori, ditandai dengan warna yang semakin coklat gelap dan rasa semakin pahit.



Gambar 2. Penampakan kontaminasi *A.flavus* pada kacang tanah (Anonim^c 2011)



Gambar 3. Penampakan kontaminasi *A.flavus* pada jagung (Anonim^c 2011)

Makfoeld (1993) menyebutkan bahwa cemaran *Aspergillus flavus* dapat menyebabkan kerugian secara ekonomi dalam industri dan dapat juga menimbulkan masalah kesehatan yaitu menghasilkan aflatoxin yang mempunyai efek racun (toksigenik), mutagenik, hepatotoksik, teratogenik, imunosupresif, dan karsinogenik. Menurut Diener dan Davis (1969), adanya pertumbuhan *Aspergillus flavus* pada beberapa bahan pangan dapat mengindikasikan kemungkinan terjadinya pencemaran aflatoxin pada bahan pangan tersebut. Suatu penelitian menunjukkan bahwa dari 1390 isolat *Aspergillus flavus* di berbagai negara, 803 diantaranya (sekitar 60%) mampu menghasilkan aflatoxin. Pasien yang terinfeksi *A.flavus* biasanya menjadi *immunocompromised* atau *neutropenic*. Kapangnya juga bertanggung jawab dalam beberapa penyakit akibat alergi seperti asma dan sistis fibrosis.

Selain aflatoxin, *A.flavus* juga menghasilkan komponen toksik seperti sterigmatosistin, *cyclopiazonic acid*, *kojic acid*, *benzylpropionic acid*, aspertoxin, aflatrem, gliotoxin, dan asam aspergilik (Hedayati *et al.* 2007). Bahaya *Aspergillus flavus* bervariasi dari hipersensititas hingga infeksi invasif yang dihubungkan dengan *angioinvasion*. Gejala klinis yang ditimbulkan dapat berupa granulomatous sinusitis kronis, keratitis, aspergillosis, luka, dan osteomyelitis (Hedayati *et al.* 2007). Bahaya tersebut juga dipengaruhi oleh iklim dan geografi dimana kapang tersebut hidup. Di Arab Saudi dan Sudan dengan kondisi yang kering, bahaya yang ditimbulkan akibat kapang adalah *invasive aspergillosis* sedangkan daerah di Afrika cenderung *pulmonary aspergillosis*. Namun pengaruh kondisi lingkungan geografis terhadap efek penyakit yang ditimbulkan perlu diteliti lebih dalam.

Kontaminasi *A.flavus* terhadap komoditi pertanian dapat terjadi di lapangan, penyimpanan, hingga proses pengolahan. Di setiap titik proses merupakan tahap yang potensial meningkatkan kontaminasi dan bahaya ditimbulkan oleh kapang jika tidak memperhatikan kondisi lingkungan dan cara penanganan yang tepat. Berbagai perlakuan diperlukan sebagai upaya pencegahan kontaminasi kapang *Aspergillus flavus* dalam rantai komoditi, untuk mencegah kerugian besar baik secara ekonomi maupun kesehatan. Namun di laboratorium pengkondisian lingkungan serta penggunaan analisis yang akurat kerap dilakukan untuk melihat potensi kapang *Aspergillus flavus* memproduksi aflatoxin dalam skala besar untuk berbagai kepentingan, salah satunya mendapatkan standar aflatoxin murni.



C. Aflatoksin

1. Karakterisasi Aflatoksin

Pada tahun 1960, para peternak dan pemerintah Inggris mengalami kerugian yang sangat besar dari kekurangan pasokan daging unggas. Hal tersebut dikarenakan adanya kematian sebagian besar ternak unggas, terutama kalkun, sebanyak lebih dari 100.000 ekor dalam jangka waktu tiga bulan, diikuti dengan kematian 14.000 ekor anak bebek dan 9 ekor anak sapi (Makfoeld 1993). Penyakit itu bersifat akut ditandai dengan kehilangan nafsu makan, lesu, dan sayap melemah, lalu dalam waktu satu minggu mati dengan gejala yang khas yaitu leher membengkak, kepala tertarik ke belakang, dan kaki menjulur.

Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya pendarahan pada hati, kerusakan nekrotik hati, dan pembengkakan ginjal. Saat itu penyebab kematian belum diketahui, sehingga penyakit tersebut dikenal sebagai “*Turkeys-X Diseases*”. Ternyata penyakit tersebut tidak hanya menyerang ternak unggas, babi dan sapi juga mengalami gejala yang sama. Hal inilah yang mendorong dilakukannya berbagai penelitian guna mencari penyebab dan mengatasi kejadian *outbreak* tersebut.

Penelitian menunjukkan bahwa penyebab kematian ternak tersebut berasal dari tepung kacang tanah yang diimpor dari Brazil sebagai campuran pakan ternak yang ternyata telah ditumbuhi kapang. Tahun 1961, kapang itulah yang kemudian diidentifikasi sebagai *Aspergillus flavus*. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa kapang *A. flavus* dapat menghasilkan senyawa metabolik toksik (mikotoksin), senyawa yang bersifat racun, yang kemudian dikenal sebagai aflatoksin. Istilah aflatoksin sendiri diambil dari nama kapang penghasilnya (*Aspergillus flavus toxin* → *Aflatoxin*). Hasil penemuan tersebut kemudian diumumkan pada kongres internasional yang diadakan di Inggris yaitu *International Working Party in Groundnut Toxicity Research* (Wilson dan Hayes 1973).

Aflatoksin merupakan segolongan senyawa toksik (mikotoksin, toksin yang berasal dari fungi) yang dikenal mematikan dan bersifat karsinogenik bagi manusia dan hewan. Menurut Heathcote (1984), aflatoksin merupakan produk metabolik sekunder yang terbentuk setelah fase logaritmik pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*. Aflatoksin mulai diproduksi pada hari kedua setelah inkubasi hingga mencapai maksimum sekitar hari ketujuh. Aflatoksin sebagai senyawa metabolit sekunder memiliki fungsi sebagai daya tahan kapang terhadap ekologi dimana sifat toksik dari aflatoksin digunakan untuk melawan kompetitor mikroba pada ekosistem (antibiotik lemah) serta sebagai penarik serangga untuk membantu proses reproduksi.

Bogley (1997) menyebutkan bahwa aflatoksin merupakan metabolit sekunder yang berbentuk turunan poliketida. Biosintesis aflatoksin sebagai metabolit sekunder terjadi melalui derivat poliketida yang berasal dari sintesis protein dan lemak dari metabolit primer. Berbagai pendapat mengemukakan bahwa jenis kapang *Aspergillus* seperti *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. ruber*, *A. wentii*, *A. ostianus*, *Penicillium citrinum*, *P. frequentans*, *P. expansum*, *P. variabile*, *P. puberulum*, *Rhizopus*

sp., dan *Mucor mucedo* dapat menghasilkan aflatoksin. Namun jenis-jenis kapang tersebut harus dibuktikan kembali kebenarannya sebagai penghasil aflatoksin.

Hasil identifikasi lebih lanjut membuktikan bahwa hanya kelompok *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* yang mampu memproduksi aflatoksin, yang berasosiasi dengan produk biji-bijian berminyak atau berkarbohidrat tinggi. Beberapa jenis kapang lain seperti *A. nomius*, *A. tamarii*, dan *A. pseudotamarii* juga dapat menghasilkan toksin sejenis aflatoksin (Schroeder dan Boller 1973 ; Kurtzman *et al.* 1987; Erlich *et al.* 2006; Martins *et al.* 2008). Adapun kemampuan kapang *Aspergilla* dalam memproduksi aflatoksin tergantung pada sistem metabolisme individunya, terutama metabolisme primer lipida dan enzim spesifik untuk memproduksi metabolit (Betina 1989).

Aflatoksin umumnya ditemukan pada komoditi pertanian seperti kacang-kacangan (kacang tanah, kedelai, pistachio, bunga matahari), rempah-rempah (ketumbar, jahe, lada, kunyit, cabai), dan serealia (gandum, padi, sorgum, jagung). Aflatoksin juga dapat dijumpai pada susu yang dihasilkan oleh hewan ternak yang mengkonsumsi pakan terinfestasi *A.flavus* atau *A. parasiticus*.

Semua produk pertanian memiliki resiko terkontaminasi aflatoksin, namun biasanya dalam batas toleransi. Komoditi bahan pangan atau pakan yang memiliki resiko paling besar terkontaminasi aflatoksin adalah jagung, kacang tanah, dan biji kapas dan berbagai produk olahannya. Aryantha dan Lunggani (2007) melaporkan sebanyak 80% produk kacang-kacangan sebagai sampel yang diambil di pasar terkontaminasi *A.flavus* dan mengandung AFB₁ sebesar rata-rata 30 ppm dan 47% kecap yang tersebar di Jawa terkontaminasi aflatoksin.

Kapang penghasil aflatoksin umumnya tumbuh selama proses penyimpanan yang tidak memperhatikan kelembaban dan temperatur. Kondisi geografis Indonesia yang merupakan daerah tropis sangat ideal bagi pertumbuhan kapang ini. Namun praktik dalam masa tanam juga tidak menutup kemungkinan terjadinya kontaminasi.

Produksi aflatoksin oleh kapang penghasilnya dipengaruhi oleh faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal meliputi jenis dan galur kapang penghasilnya (toksigenik dan nontoksigenik). Menurut WHO (1979), *Aspergillus flavus* mampu menghasilkan aflatoksin jauh lebih banyak dibandingkan dengan *Aspergillus parasiticus*. Bahkan 20 hingga 98% dari galur *A.flavus* memiliki kemampuan menghasilkan aflatoksin. Faktor eksternal yang mempengaruhi produksi aflatoksin disebabkan oleh kondisi lingkungan sebagai berikut:

a. Jenis substrat

Secara umum kandungan lemak, protein, *trace element*, asam amino, dan asam lemak pada suatu bahan mampu mendorong produksi aflatoksin oleh *A.flavus* (Diener dan Davis 1969). Salah satu mineral esensial yang dibutuhkan adalah Zn. Mineral Zn berperan dalam glikolisis enzim untuk menghasilkan aflatoksin. Kebutuhan Zn yang optimum untuk pertumbuhan dan produksi aflatoksin adalah 800 ppb.

Di lapangan, komoditi pertanian seperti jagung, beras, dan kacang-kacangan merupakan substrat atau bahan yang paling sering ditumbuhinya kapang *Aspergillus flavus* penghasil aflatoksin. Namun kontaminasi pada serealia dan kacang-kacangan



cukup bervariasi. Substrat jagung, gandum, dan beras yang diinokulasikan dengan tiga isolat *Aspergillus flavus* dapat menghasilkan aflatoksin lebih tinggi dibandingkan dengan biakan pada sorghum dan kedelai pada kultur tetap maupun bergoyang. Syarief *et al.* (2003) mengungkapkan bahwa frekuensi penemuan aflatoksin B1 adalah 98% pada kacang tanah, 76% pada biji kapas, 49% pada sorgum, dan 36% pada padi (beras).

b. Kelembaban, a_w dan kadar air

Diener dan Davis (1969) menyebutkan bahwa kelembaban relatif minimum untuk pertumbuhan *A.flavus* adalah 80% dan untuk sporulasi adalah 85%. Menurut Lacey *et al.* (1992), pada a_w 0.9 produksi aflatoksin mencapai nilai tertinggi dan pertumbuhan *A.flavus* lebih baik dibandingkan dengan kompetitornya yaitu *Fusarium graminearum*, *Penicillium viridicatum*, dan *Aspergillus niger*, dan akan mengalami penurunan seiring dengan peningkatan a_w hingga 0.98.

Aflatoksin tidak dapat dihasilkan pada a_w 0.83, namun pertumbuhan *A.flavus* masih dapat terjadi pada a_w yang lebih rendah. Bullerman *et al.* (1984) menunjukkan bahwa batas a_w yang dapat mendukung *A.flavus* membentuk aflatoksin yaitu 0.83–0.87, tetapi batas untuk pertumbuhan kapang pada a_w yang lebih rendah dari 0.83. Tandiabang (2010) menyebutkan bahwa perlakuan pengeringan biji hingga diperoleh kadar air biji yang rendah, lebih kecil dari 18%, dan a_w di bawah 0.8, dapat menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus* sp.

c. Suhu dan waktu inkubasi

Produksi aflatoksin tergantung dari pertumbuhan *A.flavus* sebagai kapang penghasilnya. Umumnya *A.flavus* dapat tumbuh dengan baik dan menghasilkan aflatoksin pada suhu 25–42°C. Suhu juga mempengaruhi produksi jenis aflatoksin yang dihasilkan. WHO (1979) menyebutkan bahwa produksi aflatoksin pada beras, biji, dan kacang-kacangan pada suhu 15–18°C adalah sebanding untuk aflatoksin B1 dan G1, pada suhu 25°C produksi aflatoksin B1 dan G1 menjadi berbanding 2:1, pada suhu 28°C menjadi 4:1, dan pada suhu 32 °C menjadi 12:1. Suhu minimum, optimum, dan maksimum untuk memproduksi aflatoksin adalah 12°C, 27°C, dan 40–42°C.

Suhu optimum untuk memproduksi aflatoksin adalah 25–35°C dan hasil produksi bervariasi berdasarkan komposisi substrat. Di bawah suhu 12°C tidak terjadi metabolisme yang menghasilkan aflatoksin. Kalaupun ada jumlahnya sangat kecil, terutama pada suhu 15°C (Syarief *et al.* 2003).

d. Kondisi atmosfer

Pater dan Bullerman (1988) melaporkan bahwa pertumbuhan dan produksi aflatoksin lebih sensitif pada kadar CO₂ yang tinggi dibandingkan pada kadar N₂ dan O₂ yang rendah. Syarief *et al.* (2003) melaporkan bahwa produksi aflatoksin pada percobaan kacang tanah menurun ketika kandungan O₂ dikurangi dari 21% menjadi 5%. Bahkan produksi aflatoksin sama sekali terhambat pada kadar O₂ kurang dari 1%. Peningkatan kandungan CO₂ hingga 20% dan pengurangan tekanan parsial oksigen, mengakibatkan pengurangan produksi aflatoksin secara signifikan. Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan oleh proses produksi aflatoksin merupakan proses aerobik.



e. pH

pH yang baik untuk pertumbuhan kapang adalah 4.6–4.8. Penurunan pH hingga di bawah 4 dapat menghambat pertumbuhan kapang (Diener dan Davis 1969). Namun beberapa penelitian menyimpulkan bahwa pengkondisian pH tidak terlalu berpengaruh secara signifikan pada produksi aflatoksin.

f. Kondisi geografis dan musim panen

Panenan di daerah tropis dan subtropis merupakan sasaran utama pencemaran aflatoksin (WHO 1979). Indonesia yang berada di wilayah dengan iklim hujan tropis dengan kelembaban udara tinggi (> 80%) dan suhu rata-rata cukup tinggi (28–33°C) merupakan wilayah dengan kondisi yang sangat mendukung pertumbuhan kapang penghasil aflatoksin.

Pemanenan yang dilakukan pada musim hujan memiliki resiko kontaminasi aflatoksin lebih tinggi dibandingkan pada musim kemarau. Hal ini disebabkan kadar air dalam bahan cukup tinggi untuk pertumbuhan kapang. Keadaan akan diperparah dengan adanya serangga dan organisme perusak bahan. Yodgiri dan Reddy (1976), menyebutkan bahwa aflatoksin paling cepat dihasilkan pada jagung yang dipanen di musim hujan dan keadaan ditambah oleh adanya serangga dan organisme lain perusak jagung.

g. Kerusakan mekanik dan infeksi serangga

Kerusakan yang terjadi saat panen, seperti perlukaan atau memar dapat memudahkan mikroba menginfeksi bahan. Pada kadar air yang cukup tinggi dan terdapat infeksi serangga bersama *A.flavus*, hasil buangan serangga akan menyediakan sumber nitrogen dan karbon yang potensial untuk pertumbuhan mikroba (Sinha 1969).

Menurut Dunkel (1988), ada beberapa serangga yang menghambat pertumbuhan kapang dan ada juga yang meningkatkan pertumbuhan kapang. Walaupun demikian hubungan antara infeksi serangga dan pertumbuhan mikroba belum dapat diprediksi secara pasti.

h. Interaksi mikrobial

Adanya mikroorganisme lain dalam satu lingkungan hidup dengan kapang penghasil aflatoksin dapat mempengaruhi kemampuan dalam menghasilkan aflatoksin, baik bersifat sinergis maupun antagonis. *A. flavipes* dan *A. candidus* bersifat sinergis sedangkan *A. niger* dan *A. terreus* diketahui memiliki sifat antagonis terhadap produksi aflatoksin.

Ketika *Aspergillus flavus* tumbuh bersama *A. parasiticus* atau *A. ochraceus*, tidak mempengaruhi pertumbuhan aflatoksin. Akan tetapi jika *A.flavus* tumbuh bersama-sama *Aspergillus niger* atau *Trichoderma viride* Pers., tidak akan memproduksi aflatoksin.

Wilson *et al.* (2002) melaporkan bahwa dalam kultur campuran yang terdiri atas *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*, produksi aflatoksin G1 dan G2 yang biasa dihasilkan oleh *A. parasiticus* tertekan oleh *A.flavus*. Hadirnya mikroorganisme lain jenis bakteri, seperti bakteri asam laktat (BAL) diketahui pula dapat menghambat pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin. Hal ini disebabkan oleh ketersediaan nutrisi dalam media lebih cepat digunakan oleh BAL untuk



menjalankan metabolismenya dibandingkan dengan kapang *A.flavus* (Lunggani 2007)

Proses pembentukan aflatoksin melibatkan setidaknya 18 reaksi konversi multienzimatis yang diinisiasi oleh sintesis polipeptida dari asetat, yang persis seperti sintesis asam lemak. Secara umum jalur pembentukan aflatoksin terutama aflatoksin B1 adalah sebagai berikut : norsicoloric acid (NOR) ---- averantin ----averufanin ----averufin (AVF) ---- hidroksiversikoloron ---- versiconal hemiasetal asetat (VHA) ---- versicolorin A ---- sterigmatosistin (ST) ---- O-metilsterigmatosistin (OMST) ---- aflatoksin B1. Dalam biosintesis aflatoksin, NOR adalah intermediate yang pertama stabil. Konversi dari ST menjadi OMST dan OMST menjadi aflatoksin sebagai tahap terakhir dalam jalur biosintesis merupakan tahapan unik pada *A.flavus* dan *A.parasiticus*. Beberapa enzim yang sudah diidentifikasi dan dikarakterisasi serta gen yang bertanggung jawab sudah diklon. Beberapa diantaranya adalah *pksA*, *pksL1*, *fas1A*, *nor1*, *norA*, *avf1*, *vbs*, *ver1* (Ruiqian *et al.* 2004).

Susunan kimia aflatoksin dikenal pada tahun 1964, yang mula-mula dibagi menjadi dua golongan yaitu jenis B dan jenis G. Penggolongan tersebut didasarkan pada warna fluoresensi yang dipendarkan pada lempeng kromatografi berupa *silica gel* yang dikenai sinar ultraviolet pada panjang gelombang 365 nm, warna biru (*blue*) untuk AFB dan warna hijau (*green*) untuk AFG. Pemberian indeks angka pada B₁, B₂, G₁, dan G₂ didasarkan pada mobilitas masing-masing jenis aflatoksin pada kromatografi lapis tipis. Semakin kecil indeks angkanya, semakin cepat Rf (*Rate of Flow*) dari spot sehingga rasio antara jarak spot dan eluen semakin besar.

Menurut Reddy dan Wiliyar (2000), di antara 18 tipe aflatoksin yang teridentifikasi, jenis aflatoksin yang paling utama adalah aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin B₂ (AFB₂), aflatoksin G₁ (AFG₁), dan aflatoksin G₂ (AFG₂). *A.flavus* juga dapat menghasilkan dua macam aflatoksin lain jika ditumbuhkan dalam media asam. Kedua aflatoksin tersebut berfluoresensi biru dan hijau, namun memiliki kepolaran yang lebih besar dan daya racun yang lebih kecil. Aflatoksin tersebut diidentifikasi dengan nama aflatoksin G_{2a} dan B_{2a} (Syarief *et al.* 2003).

Rumus umum untuk AFB₁ adalah C₁₇H₁₂O₆ dan AFG₁ adalah C₁₇H₁₂O₇. AFB₂ dan AFG₂ merupakan turunan dari AFB₁ dan AFG₁. Aflatoksin B₁ merupakan toksik yang paling banyak dihasilkan dan terdapat pada bahan pangan. AFB₁ murni bersifat kristalin berwarna putih pucat kekuningan dan tidak berbau.

Pada tahun 1963 dilakukan pengamatan pada ekstrak susu dari sapi yang diberi pakan mengandung aflatoksin. Susu tersebut menyebabkan kerusakan hati pada anak itik. Gejala yang sama ditunjukkan jika anak itik diberikan AFB₁. Mulai saat itu ditemukanlah jenis aflatoksin baru dalam susu yaitu aflatoksin M₁ dan M₂ yang ditemukan pada urin hewan percobaan. Penamaan M didasarkan dari media asal ditemukannya aflatoksin yaitu susu (*milk*). Aflatoksin yang mencemari susu umumnya berasal dari perubahan aflatoksin B₁ yang terdapat pada pakan menjadi aflatoksin M₁. AFM₁ merupakan 4-hidroksiaflatoksin B₁ dan AFM₂ adalah 4-hidroksiaflatoksin B₂.

Keenam aflatoksin yang ada, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, dan AFM₂, memiliki kemiripan struktur yang membentuknya, terdiri dari komponen heterosiklik. Pada Gambar 4 diperlihatkan struktur molekul cincin lima heterosiklik aflatoksin.

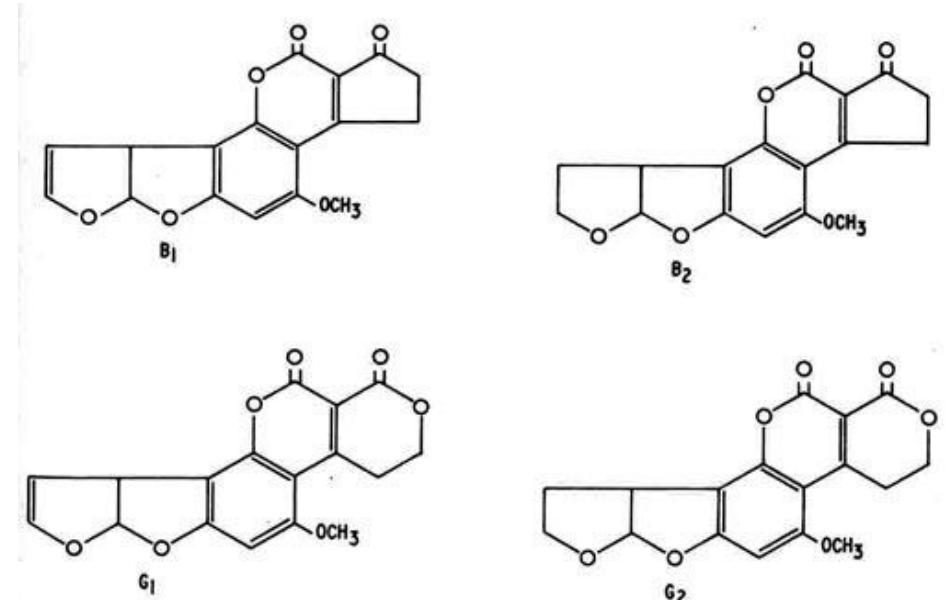


Fig. 1 Structures of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂.

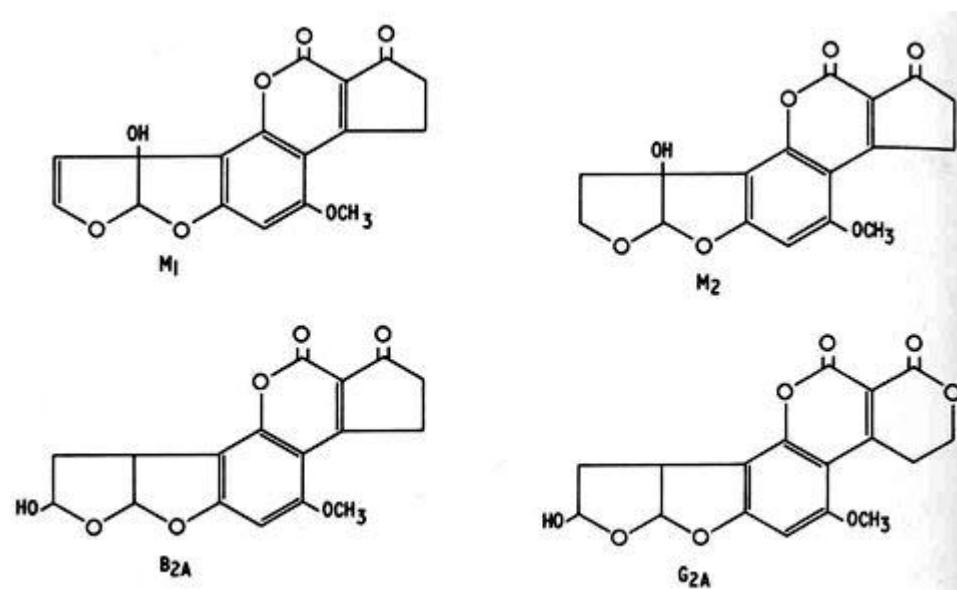


Fig. 2 Structures of aflatoxins M₁, M₂, B_{2a}, and G_{2a}.

Gambar 4. Struktur molekul cincin lima heterosiklik aflatoksin : Fig. 1. B₁, B₂, G₁, G₂.
 Fig 2. M₁, M₂, B_{2a}, G_{2a} (Reddy dan Wiliyar 2000)

Aflatoksin mempunyai titik cair relatif tinggi, tidak rusak terhadap pemanasan dan udara terbuka sebab merupakan senyawa yang sangat stabil pada suhu tinggi. Oleh karena itu pengolahan bahan terutama pangan menggunakan proses pemanasan tidak akan menghilangkan kontaminasi toksin. Namun dapat dirusak oleh reaksi dengan asam dan basa serta oksidasi sehingga acap kali digunakan untuk mengurangi toksitas aflatoksin. Kelarutan aflatoksin dalam air sangat rendah (10-20 µg/mL), tetapi dapat



larut dalam pelarut organik seperti kloroform, aseton, dan mudah dikristalkan kembali. Aflatoksin dapat tereduksi oleh CO_2 sehingga dapat menurunkan kadar aflatoksin dari 5% menjadi 1%. Tabel 2 memaparkan sifat fisik dan kimia berbagai jenis aflatoksin.

Tabel 2. Sifat fisikokimia aflatoksin^a

Aflatoksin	Rumus Molekul	Bobot Molekul	Titik Cair (°C)
B1	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$	312	268-269
B2	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	314	286-289
G1	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$	328	244-246
G2	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	330	237-240
M1	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$	328	299
M2	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	330	293
B2A	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	330	240
G2A	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	346	190

^a Sumber Reddy dan Wiliyar (2000)

2. Toksisitas Aflatoksin

Aflatoksin dapat bersifat toksigenik (menimbulkan keracunan), mutagenik (menimbulkan mutasi), teratogenik (menimbulkan penghambatan dalam pertumbuhan janin) dan karsinogenik (menimbulkan kanker pada jaringan) (Makfoeld 1993). Karsinogenitas aflatoksin disebabkan oleh pembentukan metabolit 2,2-epokside yang mampu merusak reseptor sel hati (Heathcote dan Hibbert 1969).

Aflatoksin akan sangat berpengaruh pada perkembangan mikrobial, kultur jaringan, tumbuhan, dan hewan. Pengaruh tersebut dapat berakibat akut atau kronis, tergantung pada dosis dan frekuensi pemberian aflatoksin. Pengaruh biologis dari toksisitas aflatoksin secara akut ditandai dengan gejala klinis tertentu pada manusia, unggas, sapi, anjing, ikan, dan hewan percobaan, sedangkan secara kronis berpengaruh pada kesehatan dan produktivitas, serta pada respon imun dan daya tahan, misalnya mudah terkena hepatitis B. Pada sejumlah spesies hewan, senyawa ini menyebabkan nekrosis, sirosis, dan karsinoma organ hati. Telah dilaporkan bahwa tidak ada hewan yang resisten terhadap efek toksik akut dari aflatoksin sehingga dapat diasumsikan bahwa manusia pun dapat terkena dampak yang sama (SNI 2009).

Adapun tingkat toksisitas aflatoksin sangat bervariasi, tergantung pada jenis dan umur ternak, serta jenis aflatoksin yang dikonsumsi. Hal tersebut berhubungan dengan struktur kimia aflatoksin. Di antara keenam jenis aflatoksin, AFB1 memiliki tingkat toksisitas yang paling tinggi dan paling banyak dihasilkan, diikuti dengan AFG1, AFB2, AFG2, AFM1, dan AFM2. Efek aflatoksin pada manusia dan hewan ternak dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti jenis spesies yang terpapar aflatoksin, umur dan jenis kelamin yang juga berhubungan dengan kandungan hormon spesies, dosis yang termakan, kondisi kesehatan, status gizi, lamanya aflatoksin terpapar, rute pemaparan dan jenis makanan (Krausz 2001; SNI 2009).



Aflatoksin akan masuk ke dalam tubuh penderita bersama makanan dan melalui sistem peredaran aflatoksin akan tersebar ke bagian-bagian tertentu dalam tubuh. Adapun pengaruh yang ditimbulkan oleh aflatoksin disebut aflatoksikosis. Aflatoksin yang terkandung dalam tubuh akan mengakibatkan terjadinya perubahan patologis pada hati, paru-paru, ginjal, dan sebagainya. AFB1 dikenal sebagai mikotoksin hepatoksis karena target organ aflatoksin B1 adalah hati. Hati merupakan pusat organ metabolisme kimiawi dan akan menerima mikotoksin khususnya aflatoksin B1 yang terkonsentrasi setelah zat tersebut masuk. Akumulasi aflatoksin dalam hati dapat menyebabkan berbagai gangguan, antara lain nekrosis hepatoseluler, pendarahan, radang hati, kelesuan, dan infiltrasi lemak hingga kematian.

Aflatoksin pada tubuh manusia dapat merangsang proses hidrosilasi oksidatif O-dimetilasi dan epoksida dengan membentuk AFM, Q1, P1, dan 8,9-oxide B1. 8,9-oxide B1 merupakan bentuk aktif elektrofilik yang menyerang nitrogen nukleofilik, oksigen, sulfur dan atom hydrogen pada sel. 8,9-oxide B1 akan bereaksi dengan N7 basa guanine DNA melalui kompleks interkalasi prekovalen antaulir ganda DNA dan elektrofilik dari AFB1 yang tidak stabil. Jika terjadi mutasi pada gen p53 sebagai supresor tumor dapat terjadi mutagenic, terotogenik, dan karsinogenik. International Agency for Research on Cancer (IARC) telah mengklasifikasikan aflatoksin sebagai karnogen pada manusia (Stoloff 1982; Park 2002).

3. Regulasi Aflatoksin

Masyarakat Indonesia mempunyai peluang yang cukup besar terpapar aflatoksin. Hal ini disebabkan sebagian besar komoditi pangan yang popular di kalangan masyarakat Indonesia merupakan sumber substrat yang potensial bagi pertumbuhan kapang penghasil aflatoksin dan pembentukan aflatoksin. Adapun prevalensi kejadian paparan aflatoksin di Indonesia cukup beragam. Hal ini disebabkan oleh perbedaan aplikasi teknologi penanganan pascapanen yang diterapkan pada daerah masing-masing.

Rachmawati (2005) melakukan penelitian pada 2003-2004 dan hasilnya menunjukkan bahwa umumnya pakan di Indonesia mengandung aflatoksin. Penelitian yang dilakukan oleh Yusrini (2005) membuktikan bahwa dari 13 contoh pakan jadi dan 17 contoh bahan dasar pakan yang diperiksa menggunakan ELISA, 100% sampel mengandung aflatoksin B₁. Hal tersebut membuktikan bahwa aflatoksin perlu mendapat perhatian dan penanganan yang lebih serius.

Umumnya kontaminasi yang terjadi pada tingkat petani disebabkan oleh penanganan yang kurang tepat selama produksi dan pascaproduksi. Kontaminasi akan semakin meningkat seiring dengan kondisi penyimpanan yang kurang tepat dan memadai. Kontaminasi aflatoksin pada komoditi pertanian, seperti jagung, yang umum digunakan sebagai bahan baku pakan akan berpengaruh positif terhadap menurunnya kualitas pakan. Pakan yang mengandung aflatoksin dapat meninggalkan residu pada ternak dan produk turunannya dan mengancam kesehatan manusia sebagai konsumen (Rachmawati 2005).



Dengan mengetahui dampak buruk yang diakibatkan oleh kontaminasi aflatoksin, baik dampak dalam bidang ekonomi maupun kesehatan, maka pemerintah dari setiap negara telah meregulasi batas maksimum kandungan aflatoksin pada komoditi bahan pangan dan pakan. Regulasi mikotoksin juga didorong oleh semakin meningkatnya kesadaran masyarakat akan pentingnya mutu dan keamanan pangan. Konsumen menghendaki setiap komoditas pangan yang dikonsumsi memiliki persyaratan aman, sehat, utuh, dan halal (ASUH). Oleh karena itu regulasi yang jelas dan tegas dapat menjaga mutu dan keamanan pangan yang akan dikonsumsi.

Adapun batas toleransi kontaminasi aflatoksin yang diterapkan setiap negara berbeda-beda. Food and Drugs Administration (FDA), suatu badan yang bertanggung jawab terhadap keamanan makanan, obat, dan kosmetik, mengeluarkan kadar baku tertinggi untuk aflatoksin pada makanan yaitu sebesar 20 ppb, untuk susu 0.5 ppb (Tabel 3).

Tabel 3. Panduan FDA tentang level total aflatoksin yang dapat diterima pada pangan dan pakan

Kandungan	Komoditas	Spesies
Aflatoksin (ppb)^b		
0.5 (aflatoksin M ₁) ^a	Susu	Manusia
20.0	Semua pangan kecuali susu	Manusia
20.0	Pakan	Semua Ternak
Pengecualian		
100.0	Jagung	Ternak lembu, ternak babi, dan unggas dewasa
200.0	Jagung	Karkas babi (>100 lbs)
300.0	Jagung	Karkas sapi/lembu
300.0	Biji kapas untuk pakan	Semua Ternak

^a Spesifik untuk aflatoksin M₁, metabolit toksik dari aflatoksin B₁ yang ditemukan di susu

^b part per billion

Lebih dari 100 negara di dunia mengikuti batas ini namun variasi toleransi kadar maksimum aflatoksin di berbagai negara tetap terjadi tergantung kebijakan negara masing-masing. Beberapa negara di dunia yang menjadi pengimpor komoditi pertanian telah menetapkan batas aflatoksin untuk komoditas yang akan masuk ke negaranya. Batas aflatoksin tersebut disajikan dalam Tabel 4. Sementara di Indonesia, kadar aflatoksin ditetapkan dalam SNI 7385:2009 seperti pada Tabel 5. Sangat ketatnya peraturan yang ditetapkan untuk aflatoksin itulah yang menyebabkan sulitnya mendapatkan standar aflatoksin untuk keperluan analisis. Hal ini disebabkan oleh aflatoksin ditetapkan sebagai senyawa bioterisme.

**Tabel 4.** Batas aflatoksin oleh negara pengimpor komoditi pertanian^a

Negara	Aflatoksin	Kacang tanah	Kacang, serealia	Jagung, produk olahannya	Pakan sapi, anak ternak, dan babi	Pakan babi dan hewan ternak
USA	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	20	20	20	20	20
Jepang	B ₁	10	10	10	10	20
EU	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	5-50	1-30	5-50	10	20
Perancis	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	0.1(pasta)	5	10	5	10
Jerman	B ₁	5	2	-	5	10
Belanda	B ₁	50	-	-	5	10
Inggris	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	10	10	10	-	-

^a Sumber Lubulwa dan Davis (1994) dalam Dharmaputra (2002)

Tabel 5. Batas maksimum kandungan aflatoksin dalam pangan dalam SNI 7385:2009^a

No.	Pangan	Jenis	Batas Maksimum (ppb ^b atau $\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	Susu dan minuman berbasis susu	M ₁	0,5
2	Susu fermentasi dan produk susu hasil hidrolisa enzim rennin (plain)	M ₁	0,5
3	Susu kental dan analognya	M ₁	0,5
4	Krim (plain) dan sejenisnya	M ₁	0,5
5	Susu bubuk dan krim bubuk dan bubuk analog (plain)	M ₁	5
6	Keju dan keju analog	M ₁	0,5
7	Makanan pencuci mulut berbahan dasar susu (misalnya pudding, yogurt berperisa atau yogurt dengan buah)	M ₁	0,5
8	Whey dan produk whey, kecuali keju whey	M ₁	0,5
9	Kacang tanah dan produk olahan	B ₁	15
		Total	20
10	Jagung dan produk olahan	B ₁	15
		Total	20
11	Rempah-rempah bubuk	B ₁	15
		Total	20

^a Sumber SNI (2009)

^b part per billion



4. Produksi Aflatoksin

Untuk kepentingan penelitian dan pengembangan, *Aspergillus flavus* sering ditumbuhkan pada keadaan yang disesuaikan dengan kebutuhannya, baik dalam pertumbuhan maupun reproduksi. Beragam media baik alami, semisintesis, maupun sintesis digunakan dalam laboratorium untuk menunjang pertumbuhan kapang *A.flavus*.

Pengkondisian lingkungan laboratorium juga dilakukan untuk mendukung pertumbuhan. Hal tersebut dilakukan dengan berbagai tujuan baik identifikasi, kemampuan menghasilkan aflatoksin, hingga produksi dalam skala besar dan komersial, termasuk sebagai upaya menemukan cara meminimalkan paparan kapang *A.flavus* serta toksin yang dihasilkan kepada manusia dan hewan. Selain itu, produksi aflatoksin dalam jumlah besar akan menjadi solusi atas terbatasnya ketersediaan standar aflatoksin murni di pasaran.

Seperti halnya makhluk hidup lain, mikroorganisme juga membutuhkan nutrisi sebagai sumber energi dan kondisi lingkungan yang sesuai untuk siklus hidupnya. Dalam kondisi alaminya, mikroorganisme secara alami akan beradaptasi pada lingkungan yang paling dibutuhkannya untuk menunjang kehidupan. Pada laboratorium kebutuhan akan lingkungan hidup yang sesuai untuk mikroba harus dapat dipenuhi oleh medium kultur. Stephens (2003) mengemukakan bahwa metode kultur merupakan metode yang mencakup menumbuhkan atau mempertahankan mikroorganisme dalam medium bernutrisi.

Medium untuk kultur mikroba umumnya digunakan untuk berbagai tujuan mulai dari identifikasi mikroorganisme hingga produksi mikroorganisme dalam jumlah dan skala besar untuk memenuhi kebutuhan bioteknologi. *Aspergillus* sp. contohnya. *Aspergillus* sp. yang dikenal sebagai kapang penghasil mikotoksin jenis aflatoksin merupakan salah satu mikroorganisme jenis kapang yang telah lama dijadikan sebagai objek penelitian di laboratorium. Berbagai macam media dapat dan sering digunakan untuk membiakkan *Aspergillus* sp. seperti media *crude*, semisintesis, maupun media sintesis.

Baik di lingkungan alami maupun laboratorium, media merupakan faktor yang memberikan pengaruh yang sangat besar dalam memproduksi aflatoksin. Beragam nutrisi dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan kapang penghasil aflatoksin. Sebagai sumber karbon, yang paling sering digunakan dalam produksi aflatoksin adalah glukosa, sukrosa, atau fruktosa. Selain karbon, beberapa mineral dibutuhkan juga untuk mendukung produksi aflatoksin antara lain zinc dan mangan, namun campuran kandungan cadmium dan besi dapat menghambat pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin.

Media padat yang umum digunakan antara lain SDA (*sucrose dextrose agar*), PDA (*potato dextrose agar*), *Czapek Iprodine Dichloran Agar*, dan berupa media *crude* seperti jagung, beras maupun kacang-kacangan. Media sintesis yang biasa digunakan seperti *potato dextrose broth* (PDB) maupun media cair yang lebih kompleks seperti *glucose ammonium sulfate* (AM), *glucose ammonium nitrate medium* (GAN), *high salt medium* (HS), *czapek-dox agar medium* (CDA), *synthetic low salt* (SL), *yeast extract sucrose* (YES), *malt extract agar* (MEA), dan *lablemo tripton broth* (LTB) (Reddy *et al.*



1971; Fente *et al.* 2001; Handayani dan Setyaningsih 2006; Aryantha dan Lunggani 2007; Zain *et al.* 2009).

Media sintesis kompleks biasanya memiliki komposisi yang mengalami modifikasi. Umumnya digunakan untuk mempelajari aspek hubungan antara komposisi media biakan dan pertumbuhan mikroorganisme yang dibiakkan dan menemukan komposisi media yang paling tepat untuk jenis mikroorganisme tertentu. Media yang tepat dipilih untuk membiakkan *Aspergillus flavus* akan mempengaruhi pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin.

Beberapa media yang umum digunakan untuk pertumbuhan kapang antara lain Czapek Dox Agar, Sabouraud Dextrose agar, dan ekstrak malt yang diinkubasi pada 37°C. Setelah 24 jam germinasi spora mulai terjadi. Saat ditumbuhkan dalam media Czapek agar, kapang *Aspergillus flavus* berwarna kuning kehijauan bahkan coklat (Gambar 5). Selain kapang jenis *Aspergillus*, media Czapek agar juga umum digunakan untuk kultivasi kapang *Penicillium*. PDA (*potato dextrose agar*) juga dapat digunakan untuk menumbuhkan koloni dan inkubasi pada suhu 25°C akan menghasilkan koloni *A.flavus* berwarna hijau *olive* atau jeruk nipis (Gambar 6). Telah dikembangkan pula medium spesifik yang dapat digunakan untuk *screening* dan identifikasi *A.flavus*. Medium tersebut diberi nama *A.flavus* dan parasiticus agar (AFPA) dan warna yang ditunjukkan bervariasi dari bening hingga hijau *olive*.



Gambar 5. Penampakan makroskopik *A.flavus* yang ditumbuhkan dalam Czapek agar (Hedayati *et al.* 2007)



Gambar 6. Isolat *A.flavus* Link berwarna hijau dalam PDA miring (Handajani dan Setyaningsih 2006)

Saat ini permasalahan yang dihadapi dalam penelitian aflatoksin di Indonesia adalah ketersediaan standar aflatoksin. Standar aflatoksin murni merupakan bagian penting dalam setiap analisis aflatoksin. Selama ini, untuk mendapatkan standar aflatoksin dengan cara diimpor yang membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang tidak sedikit. Padahal Indonesia memiliki potensi yang sangat besar untuk menghasilkan aflatoksin mengingat Indonesia berada di daerah tropis yang paparan kontaminasi aflatoksin terbilang tinggi. Oleh karena itu, fokus penelitian mengenai aflatoksin yang dilakukan di Bbalitvet mengarah pada produksi aflatoksin yang dihasilkan oleh isolat lokal kapang *Aspergillus flavus* sehingga dapat dijadikan alternatif standar aflatoksin.



BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah memaparkan metode produksi aflatoksin yang dilakukan oleh beberapa peneliti yang terkait dengan produksi aflatoksin baik dari dalam maupun luar negeri dan yang dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet) Bogor. Kemudian dilakukan pembandingan hasil dari produksi aflatoksin di Bbalitvet dengan data sekunder yang diperoleh dari hasil penerapan metode yang dilakukan peneliti-peneliti sebelumnya secara kualitatif. Penarikan kesimpulan diambil dengan menggunakan hasil perbandingan tersebut.

1. Metode Kerja Produksi Aflatoksin Davis *et al.* (1966)

a. Persiapan Isolat dan Media

Isolat yang digunakan terdiri dari 7 isolat antara lain *A. flavus* 2 (*culture variant of British Isolat 3734/10*), *A. flavus* 6 dan 8 (dari Alabama grown peanuts), ATCC (*American Type Culture Collection*), dan US *Department of Agriculture* (NURDD). Kultur isolat tersebut ditumbuhkan pada medium Czapek *solution agar* dengan kandungan 20% sukrosa dan dimodifikasi dengan penambahan 7 g/L Difco *yeast-extract*.

Medium pertumbuhan yang digunakan dalam penelitian adalah medium basal YES (*yeast extract sucrose*) dengan kandungan 2% *yeast-extract* (Difco) dan 20% sukrosa. Air demineralisasi digunakan dalam penelitian ini.

b. Pembiakan dan Analisis

Sebelum dikultivasi, medium YES disiapkan terlebih dahulu dengan cara mensterilkan 100 mL media dalam Erlenmeyer 1 L yang ditutup sumbat kapas menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tekanan 20 psi. Lalu media diinokulasikan dengan spora yang berumur 1 sampai 3 minggu dan diinkubasikan selama 6 sampai 8 hari pada suhu 25°C. Inkubasi dilakukan dengan cara stasioner (diam). Penelitian menggunakan 3 ulangan dan hasilnya berupa rataan.

Ekstraksi kemudian dilakukan dengan cara menyaring kultur dan memisahkan antara filtrat cair dan miselium. Berat kering miselium diukur setelah pengeringan selama 12 sampai 24 jam pada 70°C. Ekstraksi aflatoksin menggunakan cara *reflux* selama 1 sampai 2 jam dengan pelarut berupa kloroform.



Untuk mendapatkan hasil aflatoksin yang tinggi 1-2 mL media dikocok cepat oleh 25 mL menggunakan corong pisah. Lapisan bawah yang merupakan lapisan kloroform dikumpulkan dan diuapkan di atas *steam bath* baru kemudian diencerkan kembali dengan kloroform pada konsentrasi yang sesuai untuk analisis.

Analisis aflatoksin menggunakan metode TLC (*thin layer chromatography*). Lempeng yang digunakan sebagai fase diam adalah lempeng *silica gel* setebal 0.4 mm yang dielusikan menggunakan campuran 2.5% metanol dalam kloroform. Hasil elusi kemudian dikeringkan dan diperiksa menggunakan sinar ultraviolet. Pengukuran aflatoksin secara kuantitatif dilakukan dengan cara perbandingan visual dengan standar aflatoksin eksternal dan internal.

2. Metode Kerja Produksi Aflatoksin Winn dan Lane (1978)

a. Persiapan Isolat dan Media

Isolat yang digunakan adalah *Aspergillus flavus* # 15546 (*American Tyoe Culture Collection*). Isolat diinokulasi dalam cawan petri berisi *Sabouraud's agar*. Kemudian diinkubasikan selama 7 hari di suhu ruang. Spora diambil dari dalam cawan petri dengan cara membilasnya dengan akuades steril dan spatula steril.

Bahan yang digunakan sebagai media adalah serealia berupa jagung dan sorgum dalam 3 bentuk, yaitu utuh, grits, dan tepung. Penggilingan dilakukan menggunakan Wiley mill dengan ukuran saringan 2.38 mm. Biji-bijian yang dapat melewati ukuran 841 μm disebut tepung dan yang tidak berhasil disebut grits. Kemudian bahan dikeringkan di oven dengan suhu 90°C selama 36 jam.

Masing-masing sampel yang terdiri atas 6 jenis (jagung bentuk utuh, grits, dan tepung serta sorghum bentuk utuh, grits, dan tepung) kemudian diambil sebanyak 25 gram setelah dicampurkan terlebih dulu dan ditempatkan dalam cawan petri. Setelah dingin, media dalam cawan petri kemudian dibungkus dengan rapi hingga saat inokulasi.

b. Pembiakan dan Analisis

Sebanyak 7.7 mL spora dalam air diinokulasi ke dalam 25 gram sampel media lalu diinkubasi pada suhu 25-30°C dan RH 90% selama 48 sampai 72 jam. Incubator yang digunakan terbuat dari inkubator telur yang dimodifikasi menggunakan *evaporated forced air humidifier* dan pengukuran RH menggunakan *wet bulb thermometer*. Setelah inkubasi, sampel disimpan pada suhu 5°C sampai waktu analisis.

Sebelum dilakukan analisis aflatoksin, ekstraksi aflatoksin dilakukan untuk mengeluarkan toksin dari bahan. Tahapan ekstraksi dimulai dengan mencampurkan 25 g sampel dan 650 mL aseton:air (85:15) dalam Waring blender selama 5 menit.

Kemudian disaring menggunakan kertas Whatman no.4 berukuran 18.5 cm dan dikumpulkan filtrat berjumlah 100 mL. Filtrat kemudian dicampurkan dengan 20% (w/v) larutan asetat sebanyak 20 mL dan biarkan hingga menggumpal. Kemudian disaring kembali dan dihasilkan 100 mL filtrat.

Butt *tube* disiapkan dengan memasukkan *glass wool* di bagian bawah silinder, diikuti dengan 2 cm lapisan granular sodium sulfat, 5 gram *acidic* alumina, dan ditutup dengan 2 cm sodium sulfat. Filtrat yang terkumpul kemudian dialirkan ke dalam silinder (kolom).

Cairan yang dihasilkan setelah melalui kolom ditempatkan ke dalam corong pisah dan diekstrak dengan 50 mL klorofom. Hasilnya dikumpulkan dan diuapkan kloroformnya di atas *steam bath*. Bilas kembali dengan kloroform lalu ditempatkan dalam vial berukuran 4.7 gram. Residu yang tersimpan dalam vial kemudian diencerkan dengan 500 μ L kloroform. Perhitungan secara kuantitatif dilakukan menggunakan metode TLC.

3. Metode Kerja Produksi Aflatoksin Sugiawan (2011)

a. Persiapan isolat dan media

Isolat yang digunakan adalah *A. flavus* dari Balitvet *Culture Collection* (BCC) No. F2013. Medium yang digunakan adalah SDA (*Sabouraud dextrose agar*) sebagai media penyegaran dan PDB (*potato dextrose broth*) sebagai media pertumbuhan.

Medium SDA yang digunakan adalah keluaran OXOID No. CM 0041 ditambah 0.5% bacto agar komersial keluaran OXOID LP 011. Medium SDA dibuat dengan cara molarutkan 6.5 gram medium dan 100 mL akuades dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Media yang homogen ditandai dengan warna yang kuning keruh berubah menjadi kuning cerah. Kemudian disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Medium yang sudah steril kemudian dituang ke dalam tabung reaksi dan diletakkan miring hingga ujung permukaan media mencapai $\frac{3}{4}$ tabung (*slant medium SDA*). Medium diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam untuk menguji sterilitas medium. Medium steril jika tidak ada kontaminan yang terbentuk.

Medium PDB sebagai media pertumbuhan dibuat dalam dua Erlenmeyer berukuran 3000 mL. Masing-masing labu diisi 130 gram media dilarutkan 2000 mL akuades sambil diaduk dan dipanaskan hingga homogen (warna kuning kerung menjadi kuning cerah). Kemudian pH media diatur menjadi dua kondisi yaitu 4 dan 7. Masing masing media dibagi sebanyak 250 mL ke dalam 8 erlenmeyer berukuran 500 mL lalu disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.



b. Pembiakan dan Analisis

Isolat *A. flavus* yang digunakan berupa kemasan ampul kering beku yang telah dibuka dan ditumbuhkan pada medium SDA cawan petri. Kemudian biakan *A. flavus* dalam cawan petri di ambil satu ose dan digoreskan pada medium SDA miring dalam tabung sebanyak 5 tabung. Lalu biakan diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 hari.

Sebanyak 2 tabung biakan *A. flavus* dalam SDA miring diperpanjang dan disuspensi dalam 10 mL akuades steril. Kemudian pengenceran hingga 10^{-4} dilakukan dan didapatkan lima tabung suspensi *A. flavus* dengan pengenceran 10^0 (suspensi awal) dan 10^{-1} sampai 10^{-4} . Dari tabung suspensi 10^{-4} diambil ± 0.5 mL menggunakan pipet Pasteur lalu dituangkan ke dalam haemacytometer untuk perhitungan jumlah spora. Jumlah spora dari setiap tabung dapat diketahui dengan menggunakan manual haemacytometer. Dari tabung yang mempunyai jumlah spora sebanyak 10^6 per mL dituangkan ke dalam seluruh media PDB pH 4 dan pH 7 sebanyak 250 μ L. Medium berisi spora dikocok perlahan lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 10 hari.

Setelah 10 hari, biakan *A. flavus* dalam medium dimatikan dengan sterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Biakan yang sudah mati kemudian disaring. Miseliumnya dibuang sedangkan hasil saringan akan dianalisis menggunakan teknik ELISA.

Untuk analisis aflatoksin menggunakan ELISA, medium dihomogenkan menggunakan *stirrer*. Medium diencerkan secara berkala menggunakan methanol 60% dengan mengambil 100 μ L medium dimasukkan ke dalam 1000 μ L methanol 60% (larutan A). Dari larutan A diambil sebanyak 100 μ L dan dimasukkan ke dalam 1000 μ L methanol 60% (larutan B). Dari larutan B sebanyak 100 μ L diambil kemudian dimasukkan ke dalam 1000 μ L methanol 60% (larutan C). Selanjutnya, larutan telah siap dianalisis menggunakan kit aflatoksin B₁ dengan teknik ELISA.

4. Metode Kerja Produksi Aflatoksin Afandi (2011)

a. Persiapan isolat dan media

Isolat yang digunakan adalah *Aspergillus flavus* koleksi Bbalityet Culture Collection (BCC) No. F0219. Isolat disegarkan dalam media SDA (*Sucrose Dextrose Agar*) selama satu minggu pada suhu 25°C. Koloni yang tumbuh pada SDA kemudian dikumpulkan dan disuspensi hingga diperoleh jumlah 10^9 spora/mL.

Medium yang digunakan adalah medium cair berupa PDB (*potato dextrose broth*) dengan pH 4.0 (Kusumaningtyas 2007) dan GAN (*glucose ammonium nitrate*) termodifikasi yang terdiri atas 30 g glukosa, 30 g sukrosa, 2.4 g NH₄NO₃, 10.0 g KH₂PO₄, 2.0 g MgSO₄.7H₂O, dan suplemen mineral mencakup 26.6 mg



$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.67 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.36 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 66.67 mg CaCl_2 dengan pH 7.00 (Brian dan Dawking 1961).

b. Pembiakan dan Ekstraksi

Suspensi *Aspergillus flavus* yang sudah disegarkan dengan jumlah 10^9 spora/mL kemudian diinokulasikan sebanyak 1.5 mL pada media cair sebanyak 150 mL sehingga didapatkan jumlahnya menjadi 10^7 spora/mL pada media yang siap digunakan untuk pertumbuhan. Inkubasi dilakukan pada suhu 25°C dengan kelembaban normal.

Inkubasi dilakukan selama 21 hari dengan pengamatan terhadap tren produksi aflatoksin melalui *sampling* sebanyak 10 kali dengan interval antara 1 sampai 2 hari selama masa inkubasi.

Sebelum dilakukan analisis, sampel harus diekstrak terlebih dahulu dengan cara mencampurkan 1 mL sampel dengan 1mL kloroform dalam tabung reaksi tertutup dan divorteks selama 1 menit. Lalu dilakukan pemisahan fase kloroform dan ditempatkan dalam botol hasil ekstrak. Ekstraksi pada media diulangi lagi menggunakan 1 mL kloroform, divorteks 1 menit, diambil fase kloroform, lalu ditempatkan dalam botol. Kloroform kemudian diuapkan dengan meletakkan botol di atas *waterbath*.

c. Analisis deteksi

Sampling hasil ekstraksi kemudian dianalisis menggunakan metode *thin layer chromatography* (TLC) untuk melihat total aflatoksin yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* yang ditumbuhkan pada media. Total aflatoksin dari masing-masing sampel digambarkan dalam kurva produksi aflatoksin untuk memperoleh puncak produksi maksimum aflatoksin. Media dengan jumlah maksimum akan dipanen untuk dilakukan tahapan produksi massal.

Analisis deteksi yang digunakan adalah *thin layer chromatography* (TLC) (Bainton *et al.* 1980) dengan menggunakan lempeng *silica gel* dan eluen berupa kloroform : aseton (9:1). Sebelumnya bejana dijenuhkan menggunakan eluen dan lempeng didiamkan dalam oven 80°C selama 1 jam.

Ekstrak kemudian ditotolkan dalam lempeng secara kuantitatif dan dimasukkan dalam bejana berisi pelarut. Tahapan elusi berjalan selama pergerakan pelarut dari batas bawah hingga batas atas lempeng. Kemudian lempeng dikeringkan. Setelah kering lempeng diamati di bawah lampu ultraviolet dengan panjang gelombang 365 nm. Perpendaran dan waktu rambatnya (Rf) dari bercak sampel dan standar dibandingkan.

d. Analisis konfirmasi

Hasil deteksi yang telah dilakukan dengan metode TLC kemudian dikonfirmasi menggunakan metode HPLC. Pada metode HPLC terdiri atas 3 tahap, yakni tahap derivatisasi, analisis, serta perhitungan. Metode HPLC yang digunakan adalah fase terbalik (*reversed phase*) dengan fase gerak (akuabides : *methanol grade* : asam asetat glacial = 65 : 15 : 20) yang telah melalui proses *vacuum filtering* dengan sonikator.

Sebanyak 1 mL ekstrak sampel diderivatisasi dengan menambahkan 50 μ L TFA dan 200 μ L n-heksana lalu didiamkan selama 15 menit di ruang asam. Selanjutnya sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Kemudian sampel dilarutkan dalam 1 mL fase gerak dan diinjeksikan ke dalam HPLC. Hasil analisis kemudian ditampilkan dalam bentuk kromatogram.

B. Penvajian Data

Data disajikan dalam bentuk tabel. Pengolahan data seperti penyeragaman satuan dalam bentuk satuan ppb (*part per billion*) dilakukan untuk memudahkan dalam melakukan perbandingan hasil dari masing-masing penelitian.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Produksi Aflatoksin Metode Davis *et al.* (1966)

Penelitian yang dilakukan oleh N. D. Davis, U. L. Diener, dan D. W. Eldridge di Alabama bertujuan untuk melihat bagaimana kondisi kultur mempengaruhi produksi aflatoksin B₁ dan G₁ yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* ditumbuhkan pada medium cair yang mengandung *sucrose yeast extract* dalam kultur tetap dan membandingkan kemampuan dalam menghasilkan aflatoksin oleh beberapa isolat *A. flavus*. Dalam penelitian dilihat bagaimana pengaruh konsentrasi sukrosa, konsentrasi ekstrak khamir, penggunaan bahan tambahan, variasi pH, waktu inkubasi, dan berbagai isolat terhadap produktivitas aflatoksin. Pengukuran berat miselia kering dilakukan dengan tujuan mengevaluasi pertumbuhan kapang.

Tabel 6. Pengaruh konsentrasi sukrosa pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada media mengandung 2% ekstrak khamir^a

Sukrosa (%)	Berat miselia kering (g/100mL)	Aflatoksin ^c (ppb) ^b		
		B ₁	G ₁	Total (B ₁ + G ₁)
0	0.3	1,000	1,000	2,000
1	1.0	5,000	7,000	12,000
5	1.6	7,000	9,000	16,000
10	3.0	14,000	17,000	31,000
15	3.0	27,000	35,000	62,000
20	2.8	28,000	36,000	64,000
30	3.2	27,000	23,000	50,000
50	3.2	26,000	20,000	46,000

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

^b part per billion

^c data diolah

Dari Tabel 6 dapat dilihat bahwa total aflatoksin terbesar terjadi pada media yang mengandung 15 dan 20% sukrosa dengan besaran 62,000 sampai 64,000 ppb. Total aflatoksin yang terendah terjadi pada medium tanpa tambahan sukrosa sama sekali. Hal ini menunjukkan bagaimana kandungan nutrisi dalam medium mempengaruhi produksi aflatoksin. Sukrosa dan ekstrak khamir merupakan nutrisi yang dibutuhkan untuk menghasilkan aflatoksin. Namun pada jumlah sukrosa yang lebih besar terjadi penurunan total aflatoksin. Pada YES medium yang sudah mengandung 20% sukrosa merupakan media yang cukup baik untuk menumbuhkan *Aspergillus flavus* dan menghasilkan aflatoksin.

Tabel 7. Pengaruh konsentrasi ekstrak khamir pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada media mengandung 20% sukrosa^a

Ekstrak khamir (%)	Berat miselia kering (g/100 mL)	Aflatoksin^c (ppb)^b		
		B₁	G₁	Total (B₁ + G₁)
Tidak ada	0	0	0	0
0.7	3.3	24,000	38,000	62,000
2.0	4.1	36,000	43,000	79,000
3.0	4.2	43,000	32,000	75,000
5.0	5.2	30,000	27,000	57,000

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

^b part per billion

^c data diolal

Pengaruh konsentrasi ekstrak khamir dalam pertumbuhan dan produksi aflatoksin ditunjukkan pada Tabel 7. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa pada penambahan 2.0% ekstrak khamir dihasilkan total aflatoksin terbesar sedangkan terendah pada konsentrasi yang lebih tinggi. Media dengan kandungan yang tepat akan mendukung optimasi pertumbuhan dan produksi aflatoksin. Dalam medium basal YES, sudah mengandung ekstrak khamir sebanyak 2.0%.

Tabel 8. Pengaruh penambahan aditif pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada medium YES^a

Bahan aditif	Jumlah (g/L)	Berat Miselia Kering (g/100 mL)	Aflatoksin ^c (ppb) ^b		
			B ₁	G ₁	Total (B ₁ +G ₁)
Tanpa aditif	-	2.8	32,000	26,000	58,000
ZnSO ₄	0.01	2.9	21,000	26,000	47,000
ZnSO ₄	0.1	2.9	10,000	26,000	36,000
MgSO ₄	1.0	2.9	25,000	21,000	46,000
KNO ₃	2.0	3.0	31,000	21,000	52,000
KH ₂ PO ₄	2.0	2.7	20,000	17,000	37,000
K ₂ HPO ₄	2.0	2.1	20,000	17,000	37,000
K ₂ PO ₄	2.0	2.3	10,000	8,000	18,000
Glutamat	2.0	3.9	31,000	26,000	57,000

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

^b part per billion

^c data diolab

Pada Tabel 8 dapat dikatakan bahwa penambahan aditif tidak berpengaruh secara nyata pada peningkatan produksi. Media tanpa aditif memiliki total aflatoksin yang paling besar. Bahkan jika dibandingkan dengan tanpa penambahan aditif, penambahan zat aditif menurunkan produksi aflatoksin secara drastis yaitu penambahan K_2PO_4 sebanyak 2 g/L. Namun penambahan glutamat tidak jauh berbeda dengan tanpa aditif.

Hasil yang ditunjukkan didukung pula penelitian yang dilakukan oleh Reddy *et al.* (1971). Reddy *et al.* melaporkan bahwa penambahan aditif pada medium pertumbuhan lain seperti SH (*high salt medium*) dan SL (*low salt medium*) tidak berkontribusi pada peningkatan produksi aflatoksin, melainkan cenderung menurunkan produktivitas meskipun dalam jumlah yang tidak signifikan. Zat aditif seperti KH_2PO_4 dapat menghambat produksi aflatoksin. Hal tersebut berkaitan dengan mekanisme penghambatan produksi streptomisin oleh fosfat dimana fosfatase ikut terlibat dalam biosintesis streptomisin. Namun teori mengenai mekanisme penghambatan tersebut masih perlu ditelaah lebih lanjut.

Tabel 9. Pengaruh pH pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada medium YES^a

pH awal ^d	pH akhir	Berat miselia kering (g/100 mL)	B ₁	G ₁	Aflatoksin ^c (ppb) ^b Total (B ₁ +G ₁)
3.0	3.4	2.1	32,000	26,000	58,000
3.8	3.9	3.4	21,000	26,000	47,000
4.8	4.0	3.0	21,000	26,000	47,000
5.9	4.1	2.8	32,000	26,000	58,000
6.4 ^e	4.1	2.9	32,000	26,000	58,000

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

^b part per billion

^c data diolah

^d pH diatur menggunakan 1 N HCl

pH awal media tanpa pengaturan

Tabel 9 menunjukkan bahwa pH tidak memberikan pengaruh secara signifikan terhadap produksi aflatoksin. Yang terjadi pada pH 3.8 dan 4.8 terjadi penurunan jumlah aflatoksin terutama AFB_1 namun berat miselia keringnya tertinggi. Berat miselia kering diukur untuk menunjuukkan pertumbuhan kapang dalam media.

Data yang disajikan pada Tabel 10 menunjukkan bagaimana lama inkubasi mempengaruhi produktivitas aflatoksin oleh kapang *Aspergillus flavus*. Dapat dilihat bahwa inkubasi dengan kisaran waktu mulai dari hari ke 5 sampai ke 12 merupakan masa inkubasi yang optimum dalam menghasilkan jumlah aflatoksin yang maksimal. Masa inkubasi yang lebih lama memberikan jumlah aflatoksin yang menurun. Hal ini mungkin diakibatkan oleh ketersediaan nutrisi dalam medium yang semakin menurun sehingga tidak dapat lagi digunakan oleh kapang *A.flavus* untuk menghasilkan produk metabolitnya. Beberapa pendapat menyebutkan bahwa toksin digunakan oleh kapang sebagai pengganti nutrisi yang habis dalam medium.

**Tabel 10.** Pengaruh waktu inkubasi pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada medium YES^a

Waktu inkubasi (hari)	Berat miselia kering (g/100 mL)	Aflatoksin ^c (ppb) ^b		
		B ₁	G ₁	Total (B ₁ +G ₁)
2	0.9	1,000	1,000	2,000
3	2.1	4,000	10,000	14,000
5	3.8	20,000	53,000	73,000
7	3.5	20,000	53,000	73,000
12	4.2	20,000	53,000	73,000
15	3.8	18,000	48,000	66,000
18	4.1	16,000	42,000	58,000

^a Sumber Davis *et al.* (1966)^b part per billion^c data diolah**Tabel 11.** Produksi aflatoksin dari isolat *Aspergillus flavus* terpilih pada medium YES^a

Isolat	Berat miselia kering (g/100 mL)	Aflatoksin ^c (ppb) ^b		
		B ₁	G ₁	Total (B ₁ +G ₁)
2	2.6	38,000	32,000	70,000
6	4.6	171,000	144,000	315,000
8	3.7	152,000	14,000	166,000
NRRL 2999	4.3	247,000	208,000	455,000
ATCC 15517	5.3	285,000	240,000	525,000
ATCC 15548	6.5	342,000	288,000	630,000
ATCC 15547	2.1	1,000	1,000	2,000

^a Sumber Davis *et al.* (1966)^b part per billion^c data diolah

Dari ketujuh isolat yang digunakan dalam penelitian (Tabel 11) yang ditumbuhkan pada medium YES, dapat dilihat bahwa isolat kapang dengan kode ATCC 15548 memiliki kemampuan dalam memproduksi aflatoksin lebih tinggi dibandingkan keenam isolat kapang lainnya. Produktivitas aflatoksin berdasarkan isolat inilah yang kemudian akan dibandingkan dengan produktivitas isolat kapang lokal yang dimiliki oleh Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor yaitu isolat dengan kode F0219.

Dari semua data yang disajikan dapat dilihat bahwa di dalam YES medium yang mengandung 20% sukrosa dan 2% ekstrak khamir sudah menyediakan semua kebutuhan untuk produksi aflatoksin secara maksimal. Tanpa perlu adanya penambahan sukrosa, ekstrak khamir, serta aditif lainnya, kandungan dan komposisi dalam medium YES sudah



cukup efektif dalam produksi aflatoksin. Medium YES memiliki beragam keunggulan antara lain sangat mudah untuk disiapkan, harga terjangkau, dan lebih sesuai untuk produksi aflatoksin. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa YES medium merupakan media yang sesuai untuk digunakan baik dalam proses *screening* kapang berdasarkan kemampuan menghasilkan aflatoksin maupun untuk produksi aflatoksin.

B. Produksi Aflatoksin Metode Winn dan Lane (1978)

Penelitian yang dilakukan R. T. Winn dan G. T. Lane di Texas pada tahun 1978 dimaksudkan untuk melihat pertumbuhan *A. flavus* dan potensi produksi aflatoksin dalam media padat (*crude*) yaitu sorgum dan jagung, lalu diinkubasi pada jangka waktu yang singkat. Medium yang digunakan, yaitu sorgum dan beras, dikondisikan memiliki kelembaban yang sangat tinggi serta kondisi kelembaban udara dipertahankan pada RH 90%. Data hasil percobaan disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12. Produksi aflatoksin B₁ dan B₂ oleh *A. flavus* pada jagung dan sorgum yang diinkubasi pada RH 90% dalam dua waktu dan dua suhu^a

Media	Jenis aflatoksin	Jumlah Aflatoksin ^b (ppb) ^c			
		25°C		30°C	
		48 jam	72 jam	48 jam	72 jam
Sorghum					
Tepung	B ₁	2,000	19,000	20,000	44,000
	B ₂	2,000	6,000	6,000	29,000
Grits	B ₁	8,000	19,000	50,000	586,000
	B ₂	8,000	20,000	30,000	214,000
Utuh	B ₁	1,000	500,000	17,000	49,000
	B ₂	1,000	300,000	8,000	60,000
Jagung					
Tepung	B ₁	1,000	20,000	65,000	142,000
	B ₂	1,000	8,000	30,000	110,000
Grits	B ₁	4,000	35,000	60,000	70,000
	B ₂	8,000	15,000	45,000	65,000
Utuh	B ₁	10,000	100,000	40,000	70,000
	B ₂	15,000	41,000	30,000	87,000

^a Sumber Winn dan Lane (1978)

^b part per billion

^c data diolah



Berdasarkan data dapat dilihat bahwa biji-bijian dengan kandungan kelembaban yang tinggi jika diinkubasikan dalam waktu singkat dengan didukung keberadaan oksigen serta suhu yang tepat dapat menghasilkan aflatoksin dalam jumlah yang potensial. Jarvis (1971) mengemukakan bahwa adanya peningkatan produksi aflatoksin secara signifikan dalam waktu yang singkat diduga karena terjadi kelebihan karbohidrat terfermentasi dan munculnya autolysis miselium. Selain itu, penggunaan media *crude* berupa sorgum dan jagung dapat memberikan kontribusi dalam meningkatkan produksi aflatoksin sebab merupakan kondisi hidup alami dari kapang *Aspergillus flavus*. Hal ini perlu diperhatikan dengan baik mengingat biji-biji dengan kelembaban tinggi sering digunakan sebagai bahan baku pakan ternak unggas dan babi.

C. Produksi Aflatoksin Metode Sugiawan (2011)

Percobaan yang dilakukan oleh Sugiawan dimaksudkan untuk melihat produksi aflatoksin yang dapat dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus* koleksi BCC dengan kode F0213 jika ditumbuhkan dalam media dengan dua kondisi pH yaitu pH 4 dan pH 7. Data yang diperoleh kemudian dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya yaitu pengujian efektivitas pengikatan suatu bahan pengikat toksin dalam pakan. Hasil yang diperoleh dipergunakan sebagai standar sekunder dalam analisis aflatoksin.

Tabel 13. Kadar aflatoksin B₁ pada supernatan dengan media tumbuh pH 4 dan pH 7^a

No. ulangan	Kadar Aflatoksin B ₁ (ppb) ^b	
	pH 4	pH 7
1	7,398.0	1,927.5
2	6,983.2	3,563.4
3	8,144.9	182.8
4	5,579.5	221.1
5	5,291.0	1,714.6
6	5,062.0	539.8
7	7,066.0	580.7
8	5,271.0	318.8

^a Sumber Sugiawan (2011)

^b part per billion

Dari data di atas dapat dilihat bahwa produksi aflatoksin terutama aflatoksin B₁ lebih tinggi jumlahnya pada media tumbuh pH 4 dibandingkan dengan pH 7. Hal ini menunjukkan bahwa aflatoksin optimum dihasilkan dalam keadaan asam sedangkan pada pH mendekati netral aflatoksin memiliki kecenderungan sedikit dalam kuantitas.

D. Produksi Aflatoksin Metode Afiandi (2011)

Penelitian yang dilakukan oleh Afiandi pada tahun 2011 memiliki tujuan untuk melihat potensi produksi aflatoksin yang dihasilkan oleh isolat lokal kapang *Aspergillus flavus* yang didapat dari daerah Jawa Barat dan Jabodetabek. Pada penelitian tersebut terbagi menjadi dua tahap, yaitu tahap *screening* dan tahap identifikasi. Tabel 14 memaparkan data hasil *screening* beberapa isolat sampel menggunakan teknik ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Tabel 14. Kadar aflatoksin dalam sampel berdasarkan analisis^g menggunakan ELISA Kit^c

Sampel ^b	Kadar		Sampel		Kadar		Sampel		Kadar	
	aflatoksin ^a (ppb) ^f				aflatoksin ^a (ppb) ^f				aflatoksin ^a (ppb) ^f	
S3	H1	534,0		H1	27,7		H1		H1	319,7
	H3	267,0		H3	29,4		H3		H3	108,4
	H5	491,4	S14	H5	878,6		S26	H5		1212,3
	H8	n.d		H8	145,7		H8		H8	145,1
	H11	31,4		H11	79,9		H11		H11	143,7
S5	H1	219,9		H1	n.d		H1		H1	14,7
	H3	234,2		H3	n.d		H3		H3	84,5
	H5	219,9	S17	H5	n.d		F-0213	H5		25,6
	H8	101,2		H8	n.d		H8		H8	252,8
	H11	433,7		H11	n.d		H11		H11	64,9
S9	H1	267,0		H1	n.d		H1		H1	n.d
	H3	178,6		H3	n.d		H3		H3	734,6
	H5	223,0	S19	H5	n.d		JCM ^h	H5		556,7
	H8	302,5		H8	n.d		H8		H8	809,4
	H11	178,6		H11	n.d		H11		H11	445,9
S11	H1	38,3		H1	n.d					
	H3	135,4		H3	n.d					
	H5	18,1	S23	H5	n.d					
	H8	108,4		H8	n.d					
	H11	249,0		H11	n.d					

^a Aflatoxin B

^bSampel isolat lokal *Aspergillus flavus* koleksi Bbalityvet Culture Collection (BCC) yang ditumbuhkan dalam media PDB (inkubasi 9 hari, suhu 25°C). data merupakan hasil sampling pada hari ke 1, 3, 5, 8, dan 11

^cELISA-Kit Aflavet dengan format *direct competitive ELISA* yang dikembangkan oleh Balitvet (Balai Besar Penelitian Veteriner) Cimanggu, Bogor

^dsampel diinkubasi tambahan selama 10 menit sebelum dibaca persen inhibisi pada ELISA- reader

^esampel isolat lokal kapang *Aspergillus flavus* yang dipilih untuk dilanjutkan dalam tahapan penelitian berikutnya

^fpart per billion

^gPersamaan yang digunakan dalam menentukan nilai persen inalah : $y=14,721\ln(x) + 25,931$; $R^2=0,9159$. Pengecualian pada sampel S3 H11, S5 H3, S26 H5 dan F-0213 H8 yang menggunakan persamaan $y=14,551\ln(x) + 22$; $R^2=0,9406$

Sampel dengan kadar aflatoksin tertinggi ialah sampel S26 H5 dengan kandungan aflatoksin sebesar **1212,3 ppb**

^{n.d= not detected}

^hIsolat JCM merupakan isolat kontrol positif

Sumber Afiandi (2011)

Hasil *screening* menunjukkan bahwa isolat S26 merupakan isolat yang terbaik dalam menghasilkan aflatoksin dengan menggunakan metode ELISA. Isolat ini kemudian berubah nama kode menjadi F0219 setelah dikoleksi oleh BCC (Balitvet *culture collection*).

Isolat F0219 tersebut kemudian digunakan dalam tahap selanjutnya, yaitu tahap identifikasi aflatoksin menggunakan dua medium pertumbuhan yaitu PDB (*potato dextrose broth*) dan GAN (*glucose ammonium nitrate*) termodifikasi. Analisis dilakukan menggunakan metode *thin layer chromatography* (TLC) dan dikonfirmasi menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC). Data hasil analisis menggunakan TLC disajikan pada Tabel 15.

Tabel 15. Hasil uji TLC^a kadar aflatoksin sampel pada media PDB^b

Sampling	Kadar Aflatoksin (ppb) ^f	
	(+) ^e	Rataan ^d
H0	0.0	0.0
H2	0.0	0.0
H5	40	40
H7	130	150
H9	200	290
H12	240	230
H14	180	130
H16	110	120
H19	60	90
H21	35	25

^a Semua sampel dianalisis menggunakan standar 0,2 ppm, volume pengenceran 500 μ L, dan volume spotting 2 μ L. Konsentrasi standar yang digunakan adalah: B₁ = 200 ppb, B₂ = 100 ppb, G₁ = 1000 ppb, G₂ = 300 ppb. LoD = 0.4 ppb (Meilawati 2007)

^b Media *potato dextrose broth* dikondisikan pada pH 4.0 dan inkubasi 25°C

^c Isolat koleksi BCC yang sebelumnya diberi kode S26

^d Nilai rataan dari lima ulangan

^e Kontrol positif JCM koleksi BCC

^f part per billion

Sumber Afiandi (2011)

Penelitian yang dilakukan menggambarkan hanya medium PDB yang dapat menunjukkan adanya pembentukan aflatoksin oleh isolat F0219. Pada medium GAN tidak



terdeteksi adanya aflatoksin. Afandi (2011) menyebutkan bahwa secara visual koloni yang tumbuh pada media tersebut berbeda daripada yang tumbuh pada media PDB. Setelah dilakukan uji deteksi menggunakan TLC, isolat kemudian dikonfirmasi menggunakan HPLC untuk mengidentifikasi jenis aflatoksin yang dihasilkan. Data hasil konfirmasi disajikan pada Tabel 16.

Tabel 16. Hasil uji HPLC kadar aflatoksin sampel ulangan 2 pada media PDB^a

Ulangan	Sampel ^c		Kadar Aflatoksin (ppb) ^b			
	Jenis Sampel	Kode sampel	B1	B2	G1	G2
Ulangan 2	Isolat JCM	PDB(+)H7	369.1	n.d	n.d	3.7
		PDB(+)H9	652.6	n.d	n.d	7.8
		PDB(+)H12	847.7	17.9	n.d	n.d
		PDB(+)H14	447.7	0.9	n.d	n.d
		PDB(+)H16	74.7	n.d	n.d	n.d
	Isolat Aspergillus flavus lokal	PDB H7	290.2	n.d	n.d	n.d
		PDB H9	935.8	n.d	n.d	n.d
		PDB H12	596.2	n.d	n.d	n.d
		PDB H14	148.6	4.7	304.2	n.d
		PDB H16	201.5	82.6	1,772.3	n.d

^a Media potato dextrose broth dengan pH awal 4.0

^b part per billion

^c sampel ulangan kedua dari ulangan

HPLC digunakan dalam analisis karena mampu mengukur kandungan aflatoksin dalam sampel dengan keakuratan yang tinggi, sehingga didapatkan hasil dari masing-masing jenis aflatoksin yang terkandung dalam bahan.

E. Rekapitulasi Perbandingan Produktivitas Antar Metode

1. Isolat Luar Negeri dan Isolat Lokal

Penggunaan isolat lokal dalam negeri khususnya daerah Jawa Barat dan Jabodetabek ternyata mampu memproduksi aflatoksin dalam jumlah yang cukup signifikan. Hal ini dapat dilihat dari produksi yang dihasilkan pada metode Afandi (2011). Namun, kapang *Aspergillus flavus* dengan kode F0219 koleksi BCC menghasilkan aflatoksin dengan jumlah yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan isolat-isolat koleksi luar negeri yang kisarannya berada pada 2,000 ppb hingga 630,000 ppb. Akan tetapi, untuk menghasilkan produksi aflatoksin yang tinggi tidak hanya dipengaruhi oleh jenis isolat, faktor lain seperti medium yang digunakan juga sangat mempengaruhi jumlah aflatoksin yang dihasilkan. Oleh karena itu, dengan memperhatikan parameter-parameter yang lain, isolat lokal kapang *A.flavus* tetap dapat dijadikan potensi dalam menghasilkan aflatoksin standar



2. Jenis Medium Pertumbuhan

Dalam berbagai penelitian telah digunakan beberapa medium untuk menumbuhkan kapang *A. flavus* dan melihat potensi produksi aflatoksin. Medium seperti GAN, YES, PDB, dan sebagainya dapat digunakan sebagai media pertumbuhan yang sesuai bagi pertumbuhan kapang serta produksi metabolit toksik.

Menurut Northolt dan Bullerman (1982), pertumbuhan kapang tergantung dari komposisi media pertumbuhan, aktivitas air (a_w), pH, suhu, cahaya, dan campuran gas di atmosfer. Faktor lingkungan tidak terlalu berpengaruh pada pertumbuhan kapang melainkan lebih berpengaruh pada pembentukan metabolit sekunder.

Medium kompleks dan sintesis telah banyak dikembangkan untuk menumbuhkan kapang *A. flavus* dan produksi aflatoksin. Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Reddy *et al.* (1971). Pada percobaan tersebut, dilakukan modifikasi pada medium AM dan GAN dengan dilakukan penambahan asparagin serta perlakuan alumina untuk menghilangkan pengotor. Hasil menunjukkan jumlah aflatoksin yang dihasilkan pada medium termodifikasi lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa modifikasi.

Namun hal ini tidak berlaku pada isolat lokal F0219 yang ditumbuhkan pada medium GAN modifikasi (Afiandi 2011). Secara visual, koloni yang terbentuk berwarna putih pada medium GAN sedangkan pada medium PDB berwarna kuning kehijauan hingga hijau tua. Dengan menetapkan parameter lain seperti pH, suhu, dan lama inkubasi dalam kondisi yang sama yaitu pH 4, 25°C, dan 21 hari serta isolat yang sama, aflatoksin pada medium GAN tidak terdeteksi sama sekali. Menurut Maggon *et al.* (1969), medium GAN dapat memberikan hasil yang bervariasi tergantung dari jenis *strain* yang ditumbuhkan di dalamnya.

Raper dan Fennell (1965) sebelumnya merekomendasikan bahwa medium GAN dapat digunakan untuk produksi toksin yang tinggi, namun penelitian yang dilakukan Maggon *et al.* (1969) menunjukkan bahwa produksi aflatoksin pada medium YES (*yeast extract sucrose*) lebih tinggi dibandingkan pada medium GAN. Seperti yang dilakukan oleh Davis *et al.* (1966), medium YES memberikan hasil produksi dalam jumlah yang relatif tinggi. Dari tujuh isolat yang diujikan, produksi aflatoksin bervariasi dari 2,000 ppb hingga 630,000 ppb. Hal yang sama juga apabila dibandingkan dengan media *crude* (Winn dan Lane 1978), medium YES lebih baik dalam mendukung produktivitas aflatoksin. Namun, penggunaan media *crude* seperti sorghum dan jagung yang dilakukan Winn dan Lane juga menghasilkan aflatoksin dengan kisaran 2,000 ppb hingga 586,000 ppb. Reddy *et al.* (1971) mendukung penelitian yang dilakukan Winn dan Lane (1978). Sebanyak 13,000 ppb sampai 415,000 ppb aflatoksin dapat dihasilkan menggunakan medium beras.

Secara umum, medium YES merupakan medium yang sangat mendukung produktivitas aflatoksin oleh kapang *A. flavus*. Meskipun media PDB untuk isolat lokal F0213 (Sugiawan 2011) memiliki hasil dengan kisaran yang cukup tinggi yaitu 5,062.0 ppb sampai 8,144.9 ppb, untuk isolat F0219 hasil produksinya tidak terlalu tinggi. Kadar aflatoksin pada isolat F0219 mengalami perbedaan yang cukup jauh antara pengukuran menggunakan ELISA dengan pengukuran menggunakan TLC dan HPLC. Afiandi



(2011) menyebutkan bahwa terjadinya penurunan kadar aflatoksin dapat disebabkan oleh adanya degradasi aflatoksin serta keberadaan komponen lain yang terdeteksi dalam kromatogram. Tahap pemurnian selanjutnya dapat menjadi solusi untuk mendapatkan aflatoksin yang sesuai untuk dijadikan standar. Dengan membandingkan produktivitas aflatoksin pada metode Davis *et al.* (1966), penelitian lebih lanjut dengan menggunakan medium YES (*yeast extract sucrose*) dapat dijadikan bahan pertimbangan untuk melihat potensi produksi aflatoksin dari isolat lokal kapang *A.flavus* F0219.

3. Kondisi Inkubasi

Selain medium pertumbuhan, kondisi inkubasi juga perlu dijaga dalam hal pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin agar didapatkan hasil yang optimum. Adapun kondisi inkubasi yang perlu diperhatikan meliputi kondisi pH medium pertumbuhan, suhu inkubasi dan lama inkubasi.

Kondisi pH merupakan suatu fungsi dari ketersediaan nutrisi yang terkandung dalam medium dan metabolit yang dihasilkan selama pertumbuhan. Davis *et al.* (1966) menyebutkan bahwa kondisi pH tidak terlalu berpengaruh pada produksi aflatoksin. Pengaruh pH akan bervariasi tergantung komposisi medium pertumbuhan kapang.

A. flavus dikenal sebagai mikroorganisme yang memiliki toleransi pada kisaran pH yang cukup rendah. Hal ini dapat dilihat dari percobaan yang dilakukan oleh Sugiawan (2011) dimana pada medium dengan pH 4 jumlah aflatoksin yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan pada medium dengan pH 7. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Joffe dan Lisker (1969) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan produksi aflatoksin pada medium Czapex Dox agar saat pH diturunkan dari 7.4 menjadi 4.0

Namun, pada kondisi yang lebih asam, di bawah 4, produktivitas aflatoksin pada kapang akan menurun. Hal ini disebabkan oleh kapang membutuhkan energi yang lebih banyak untuk merespon lingkungannya yang asam daripada untuk proses metabolismenya (Fardiaz 1992).

Terdapat teori yang menjelaskan bagaimana kondisi asam dapat mengakibatkan menurunnya produksi aflatoksin. Salah satunya yang dikemukakan oleh Haskard *et al.* (2001). Kondisi asam yang terlalu tinggi pada medium akan memicu terjadinya lubang pada dinding sel. Pada kondisi tersebut terjadi peristiwa pemutusan ikatan oleh asam yang melonggarkan ikatan silang antar komponen dan akhirnya memperbesar ukuran lubang. Hal itu memungkinkan aflatoksin terikat pada dinding sel dan membrane plasma dengan suatu mekanisme tertentu.

Berbeda dengan yang diungkapkan Fardiaz (1992), Lie dan Marth (1968) melaporkan adanya peningkatan jumlah aflatoksin oleh kapang pada kondisi pH yang ekstrim, sangat asam maupun sangat alkalin (pH 2 dan pH 9.5), jika ditumbuhkan dalam media mengandung substrat kasein.

Cotty dan Garcia (2007) menyebutkan bahwa suhu dan kelembaban lingkungan memberikan pengaruh pada kontaminasi kapang yang memicu produksi aflatoksin terutama pada kondisi yang hangat. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Schroeder dan Hein Jr. (1967), dibuktikan dari inkubasi *A.flavus* selama 10 hari dengan variasi



suhu 10 sampai 40°C, kisaran suhu optimal dalam menghasilkan aflatoksin adalah 20 sampai 35°C. Suhu kurang dari 10°C dan lebih dari 40°C hanya menghasilkan aflatoksin dalam jumlah yang sedikit. Dalam kisaran waktu tersebut terdapat hubungan antara waktu untuk produksi toksin serta jumlah toksin yang dihasilkan dengan suhu inkubasi. Semakin tinggi suhu, maka semakin cepat waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi aflatoksin dan hasilnya semakin banyak. Hal ini dikaitkan dengan adanya stress akibat perlakuan suhu.

Dapat dikatakan bahwa kisaran suhu yang optimal untuk kapang memproduksi aflatoksin adalah 20 sampai 35°C. Kisaran suhu ini pun sesuai dengan kondisi pertumbuhan alami kapang di lahan pertanian. Suhu tanah yang sesuai sangat berkontribusi terhadap berkembangnya kontaminasi kapang *A.flavus* sebelum panen, bukan hanya saat penyimpanan.

Jika dibandingkan dengan hasil yang diperoleh oleh Winn dan Lane (1978) pada Tabel 12, suhu 30°C memberikan hasil rata-rata lebih tinggi daripada pada inkubasi 25°C. Hal yang ditekankan pada percobaan tersebut adalah kondisi kelembaban yang tinggi dengan keberadaan oksigen. Faktor tersebut yang memungkinkan produksi aflatoksin dapat terjadi dalam waktu yang sangat pendek serta jumlah yang tinggi. Selain itu, penggunaan substrat dan bentuk substrat juga memberikan hasil produksi yang bervariasi. Namun tidak dapat dikatakan bahwa kondisi tertentu ditetapkan sebagai kondisi dengan hasil produksi tertinggi. Menurut Jarvis (1971), adanya kelebihan produksi dengan parameter suhu disebabkan adanya karbohidrat yang dapat difermentasi serta terjadi autolisis miselium.

Dari beberapa hasil penelitian yang telah dipaparkan sebelumnya mengenai produktivitas aflatoksin berdasarkan parameter lama inkubasi, dapat dikatakan bahwa 7 sampai 12 hari merupakan kisaran waktu optimum dalam menghasilkan aflatoksin dengan jumlah yang tinggi. Hasil produksi dapat bervariasi tergantung dari jenis substrat yang digunakan untuk pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin (Schroeder dan Hein Jr. 1967). Afiandi (2011) menunjukkan bahwa isolat lokal kapang *A.flavus* mengalami produksi aflatoksin yang optimum mulai hari ke 9 sampai hari ke 12.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Isolat lokal yang difokuskan dalam penelitian ini merupakan isolat lokal kapang *Aspergillus flavus* koleksi BCC Bbalitvet Bogor dengan nomor kode F0219. Isolat F0219 itu merupakan kapang hasil *screening* dari sampel yang dikumpulkan di daerah Jawa Barat dan Jabodetabek. Sebelumnya isolat ini diberi kode S26.

Berbagai medium dapat digunakan untuk pertumbuhan dan sintesis aflatoksin. Untuk isolat luar negeri, medium yang sesuai untuk pertumbuhan dan sintesis aflatoksin adalah *yeast extract sucrose medium* (YES), tanpa perlu adanya penambahan nutrisi lainnya, sedangkan untuk isolat lokal medium *potato dextrose broth* (PDB) memenuhi kebutuhan pertumbuhan dan produksi aflatoksin. Medium GAN termodifikasi tidak dapat mendukung pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin.

Kondisi lingkungan ikut berperan dalam pertumbuhan dan produksi aflatoksin. Kondisi lingkungan tersebut meliputi pH, suhu inkubasi, dan lama inkubasi. pH 4 merupakan kondisi pH untuk inkubasi kapang. Suhu inkubasi sekitar 25°C merupakan suhu yang optimum dalam mendukung pertumbuhan terutama isolat lokal kapang, dikarenakan sesuai dengan kondisi lingkungan alami kapang *A.flavus*. Inkubasi selama kisaran waktu 9 sampai 12 hari merupakan waktu yang optimum dalam menghasilkan aflatoksin dalam jumlah yang maksimal.

Setelah dibandingkan dengan kemampuan produksi aflatoksin dari isolat luar negeri, dapat dikatakan bahwa isolat lokal memiliki produktivitas yang lebih rendah. Penurunan kadar yang terukur dari metode ELISA kemudian TLC dan HPLC juga terjadi karena faktor kesalahan positif dan adanya komponen lain yang terukur. Namun, isolat lokal F0219 memiliki potensi untuk menghasilkan aflatoksin yang dapat dijadikan standar alternatif aflatoksin namun perlu adanya perlakuan dan penelitian lebih lanjut seperti purifikasi untuk dapat memenuhi standar. Medium lain seperti YES dan media *crude* dapat digunakan untuk melihat potensi pertumbuhan isolat lokal dan produksi aflatoksin.

B. Saran

Isolat lokal Indonesia berpotensi menghasilkan aflatoksin untuk dijadikan alternatif aflatoksin standar. Namun untuk penggunaan di masa depan dalam kepentingan sebagai aflatoksin standar masih perlu dilakukan penelitian lanjutan dalam hal purifikasi dan identifikasi jenis aflatoksin sehingga didapatkan kemurnian aflatoksin yang diinginkan. Selain itu keberlangsungan jangka panjang dalam pengadaan isolat lokal perlu dijaga agar mampu secara penuh menggantikan aflatoksin standar yang sebelumnya diperoleh dengan cara impor.



DAFTAR PUSTAKA

- Afiandi, N. 2011. Uji potensi isolat lokal *Aspergillus flavus* sebagai penghasil aflatoksin [skripsi]. Bogor : Program Sarjana, Institut Pertanian Bogor
- Anonim^a. _____. *Aspergillus flavus*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillusflavus> [23 Mei 2011]
- Anonim^b. _____. *Aspergillus flavus*.
<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html> [23 Mei 2011]
- Anonim^c. _____. *Aspergillus flavus*. <http://www.aspergillusflavus.org/aflavus> [23 Mei 2011]
- Aryantha , I. N. P. dan A. T. Lunggani. 2007. Supresion on the Aflatoxin-B production and the growth of *Aspergillus flavus* by Lactic acid bacteria (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum*). *Biotechnology* 6 (2) : 257-262
- Bainton, S.J., R. D. Coker, B. D. Jones, E. M. Morlet, M. J. Nagrelan, R. L. Turner. 1980. *Mycotoxin Training Manual*. London: Tropical Product Institute
- Bennett, J. W. 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology. *Mycopathologia* 100 : 3-5
- Betina, V. 1989. Mycotoxins, Chemical, Biological, and Environmental Aspects. Elsevier, New York : 42-145
- Bogley, C. V. 1997. Aflatoxins. <http://www.mycotoxins.com> [23 Mei 2011]
- Brian, P. W. dan A. W. Dawking. 1961. Phytotoxic compounds produced by *Fusarium* sp. J. Espel. *Botany* 12 : 1-12.
- Buckle, K.A., R. A. Edwards, G. H. Fleet, dan M. Wooton. 1987. *Ilmu Pangan*. UI Press, Jakarta
- Budiarso, I.T. 1995. Dampak mikotoksin terhadap kesehatan. *Cermin Dunia Kedokteran* (103) : 5-10
- Bullerman, L. B., L. L. Schroeder, dan K. Y. Park. 1984. Formation and control of mycotoxin in food. *J. Food Protection* 47 : 637-646
- Christensen, C. M. dan H. H. Kauffman. 1969. *Grain Storage : The Role of Fungi and Quality Loss*. Minneapolis: University of Minnesota



- Cotty, P. J., R. J. Garcia. 2007. Influence of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. International Journal of Food Microbiology 119 : 109-115
- Davis, N. D., U. L. Diener, dan D. W. Eldrigde. 1966. Production of aflatoxins B₁ dan G₁ by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. Applied Microbiology (14) 3 : 378-380
- Detroy, R. W., C. W. Hesseltine. 1969. Net synthesis of ¹⁴C labeled lipids and aflatoxins in resting cells of *Aspergillus parasiticus*. Develop. Ind. Microbiology 10 : 127-135
- Dharmaputra, O. S. 2002. Review on aflatoxin in Indonesia food and feedstuffs and their products. Biotropia 19 : 26-46
- Diener, U. L. dan N. D. Davis. 1969. Aflatoxin Formation by *Aspergillus flavus*. *Di dalam* L. A. Godblatt (ed.). Aflatoxin Scientific Background, Control, and, Implication. New York : Academic Press
- Dunkel, F. V. 1988. The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. International Journal of Food Microbial 7 : 227-244
- Erlich, K. C., K. Kobbeman, B. G. Montalbana, P. J. Cotty. 2006. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. International Journal of Food Microbiology 114 : 153-159
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. PAU IPB, Bogor
- _____. 1992. *Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut*. PAU Pangan dan Gizi, Bogor
- Fente, C. A., J. J. Ordaz, B. I. Vazquez, C. M. Franco, A. Cepeda. 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. Applied and Environmental Microbiology 67 (10) : 4848-4862
- Handajani, N. S. dan R. Setyaningsih. 2006. Identifikasi jamur dan deteksi aflatoksin B₁ terhadapa petis udang komersial. Biodiversitas 7 (3) : 212-215
- Haskard, C. A., H. Nezami, P. E. Kankapaa, S. Salminen, J. T. Ahokas. 2001. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 67 (7) : 3086-3091
- Heathcote, J. G. dan J. R. Hibbert. 1969. Aflatoxin : Chemical and Biological Aspect. Amsterdam: Elsevier Science Publishing
- Heathcote, J. G. 1984. Aflatoxin and Related Toxins. *Di dalam* Betina, V.(ed.), Mycotoxins: Production, Isolation, Separation, and Purification. Amsterdam : Elsevier Science Publisher



- Hedayati, M. T., A. C. Pasqualotto, P. A. Warn, P. Bowyer, D. W. Denning. 2007. *Aspergillus flavus* : human pathogen, allergen, and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692
- Jarvis, B. 1971. Factors affecting the production of mycotoxins. *Journal Appl. Bact.* 34 : 199
- Jay, J. M. 1996. *Modern Food Microbiology 5th Edition*. New York: Chapman and Hall
- Joffe, A. Z., N. Lisker. 1969. Effects of light, temperature, and pH value on aflatoxin production in vitro. *Applied Microbiology* 18 : 517-518
- Kasno, A. 2004. Pencegahan Infeksi *Aspergillus flavus* dan Kontaminasi Aflatoksin pada Kacang Tanah. *Jurnal Litbang Pertanian* 23 (3) : 75-81
- Krausz, J. P. 2001. Aflatoxin in Texas. http://www.plant_pathology [23 Mei 2011]
- Krishnan, S., E. K. Mnavathu, P. H. Chandrasekar. 2009. *Aspergillus flavus: An emerging non fumigates Aspergillus species of Significance*. Blackwell Verlag GmbH.
- Kurtzman, C.P., B. W. Horn, C. W. Hesseltine. 1987. *Aspergillus nomius*, a New aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53 (3) : 147-158
- Kusumandari. 2010. Studi Literatur : Aflatoksin sebagai Penyebab Kanker Hati. <http://www.duniaveteriner.com> [23 Mei 2011]
- Kusumaningtyas, E. 2007. Potensi Kapang *Aspergillus* sp. dalam Memproduksi Aflatoksin (*Unpublished Research*)
- Lacey, J., N. Ramakrishna, dan J. Smith. 1992. Interaction between water activity, temperaturre, and different species on colonization of grain and mycotoxin formation. Canada: University of Manitoba
- Lie, J. L., E. H. Marth. 1968. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in a casein substrate at different pH values. *Journal of Dairy Science* 51 : 1743-1747
- Lubulwa, A. S. G., J. S. Davis. 1994. Estimating the social costs of the impacts of fungi and aflatoxins in maize and peanuts. Dalam: Stored Product Protection. Prociding of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection. International Walling Ford UK : 1017-1042
- Lunggani, A. T. 2007. Kemampuan bakteri asam laktat dalam menghambat pertumbuhan dan produksi aflatoksin B₂ *Aspergillus flavus*. *BIOMA* 9 (2) : 45-51



- Maggon, K. K., L. Viswanathan, T. A. Venkatasubramanian, K. G. Mukerji. 1969. Aflatoxin production by some Indian strains of *Aspergillus flavus* Link ex Fries. *J. Gen. Microbiol* 59 : 119-124
- Makfoeld, D. 1993. Mikotoksin Pangan. Kanisius, Yogyakarta
- Martins, H. M., I. Almeida, M. Marques, dan F. Bernardo. 2008. Interaction of Wild Strains of *Aspergilla* with *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517 on Aflatoxins Production. *Int. J. Mol. Sci.* 9 : 394-400
- Meilawati. 2007. Unjuk Kerja Metode Penetapan Kadar Residu Aflatoksin G1, B1, G2, dan B2 pada Jagung secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). [Laporan Magang]. Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor
- Miskiyah, C. Winarti, dan W. Broto. 2010. Kontaminasi mikotoksin pada buah segar dan produk olahannya serta penanggulangannya. *Jurnal Litbang Pertanian* 29 (3) : 79-85
- Nielsen, K. F. 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology* 39 : 103-117
- Northolt, M. D., L. B. Bullerman. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental condition. *J. Food. Prot.* 6 : 519-526
- Park, D. L. 2002. Effect of processing on aflatoxin. Dalam Trucksess, M.W., J. W. DeVries, dan L.S. Jackson (Eds). *Mycotoxins and Food Safety*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers
- Pater, N. dan L. B. Bullerman. 1988. Mold Spoilage and Mycotoxin Formation in Grains as Controlled by Physical Means. *International Journal of Food Microbial* 7 : 257-265
- Pitt, J. I. dan Hocking A. D. 1997. *Fungi and Food Spoilage* 2nd Edition. Blackie Academic & Professional. An Imprint of Chapman & Hall 593
- Rachmawati, S. 2003. Aflatoksin dan Pengembangan Elisa Kit. Pelatihan Elisa Aflatoksin pada Pakan. Balitvet, Bogor
- _____, 2005. Aflatoksin dalam pakan ternak di Indonesia. Persyaratan kadar dan pengembangan teknik deteksinya. *Wartazoa* 15 (1) : 26-37
- Rahayu, W. P. 2006. Mikotoksin dan Mikotoksis : Mikrobiologi Keamanan Pangan, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan. Institut Pertanian Bogor
- Raper, K. B., D. I. Fennell. 1965. *The genus Aspergillus*. Baltimore, MD, USA : The Willians and Wilkins Company



- Reddy, T.V., L. Viswanathan, T.A. Venkitasubramanian. 1971. High aflatoxin production on a chemically defined medium. *Applied microbiology* 22(3) : 393-396
- Reddy, S. V. dan F. Wiliyar. 2000. Properties of Aflatoxin and It Producing Fungi. <http://www.icrisat.org/aflatoxin> [23 Mei 2011]
- Ruiqian, L., Y. Qian, D. Thanaboripat, P. Thansukon. 2004. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. Di dalam Abbas H. K. (ed). *Aflatoxin and Food Safety*. London : CRC Press, Taylor & Francis Group
- Schroeder, H. W., H. Hein Jr. 1967. Aflatoxins : Production of the toxins in vitro in relation to temperature. *Applied Microbiology* 15 (2) : 441
- Schroeder, H. W., R. A. Boller. 1973. Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* Group Isolates from field crops. *Applied Microbiology* 25 (6) : 885-889
- Sinha, R. N., H. A. H. Wallace, dan F. S. Chebib. 1989. Principal Component Analysis of Interrelations Among Fungi, Mites, and Insects in Grain Bulk ecosystem. *Ecology* 50 : 536-547
- Siregar, H. B. 1986. Detoksifikasi Aflatoksin dalam Pakan Ternak dengan Menambahkan Zat Pengikat Polivinylpyrolidone. Akademi Kimia Analisis, Bogor
- SNI. 2009. Batas Maksimum Kandungan Mikotoksin dalam Pangan. SNI 7385:2009. Badan Standardisasi Nasional
- Stephens, P. 2003. Culture Methods. Dalam McMeekin, T. A. (ed). Inggris : Detecting Pathogens in Food. Woodhead Publishing Limited
- Stoloff, L. 1982. Mycotoxins, potential environmental carcinogens. In *Carcinogens and mutagens in the environment*. H.F. Stich (ed). Boca Raton : CRC Press p 97
- Sugiawan, W. 2011. Pembentukan aflatoksin B₁ pada media tumbuh pH 4 dan pH 7. *Buletin Teknik Pertanian* 16 (1) : 12-15
- Sumner, P. E. 2003. Reducing Aflatoxin in Corn during Harvest and Storage. New York: University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences
- Syarief, R., La Ega, C.C. Nurwitri. 2003. *Mikotoksin Bahan Pangan*. IPB Press, Bogor



- Tandiabang. J. 2010. Pengendalian aflatoksin untuk perbaikan kualitas biji jagung. Prosiding Seminar Ilmiah dan Pertemuan Tahunan PBJ dan PFJ XX Komisariat Daerah Sulawesi Selatan
- Vujanovic, V., W. Smoragiewics, dan K. Krzyszyniak. 2001. Airborne Fungak Ecological Niche Determination as one of the Possibilities for Indirect Mycotoxin Risk Assessment in Indoor air. Environ. Toxicol 16: 1-8
- WHO. 1979. *Environmental Health Criteria II. Mycotoxins* The Limited Kingdom, Geneva
- Widiastuti, R. 2006. Mikotoksin : Pengaruh terhadap kesehatan ternak dan residunya dalam produk ternak serta pengendaliannya. Wartazoa 16 (3) : 116-127
- Wilson, B. J. dan A. W. Hayes. 1993. Toxicants Occuring Naturally in Food and Nutrition Board National Research Council USA Second Edition. Washington: National Academy of Science
- Wilson, D. M., W. Mubatanhema, dan Z. Jurjevic. 2002. Biology and Ecology of Mycotoxicogenic aspergillus species as related to economic and health concerns. Dalam Trucksess, M.W., J. W. DeVries, dan L.S. Jackson (eds.). *Mycotoxins and Food Safety*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers
- Winn, R. T. dan G. T. Lane. 1978. Aflatoxin Production on High Moisture Corn and Sorghum with a Limited Incubation. Journal of Dairy Science 61: 762-764
- Yodgiri, B. dan E. M. Reddy. 1976. *Aflatoxicoses in Poultry*. Poult. Advis. April : 35-40
- Yusrini, H. 2005. Teknik analisis kandungan aflatoksin B₁ secara ELISA pada pakan ternak dan bahan dasarnya. Buletin Teknik Pertanian 10 (1) : 16-19
- Zanelli, L. 2000. Moulds, Bacteria, and Solution. Italy : Feed Industry Service FIS
- Zain, M. E., A. A. Razak, H. H. El-Sheikh, H. G. Soliman, A. M. Khalil. 2009. Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. African Journal of Microbiology Research 3 (5) : 280-286



Hasil Cek Data Dikti Untuk Pengajuan
1. Dikti akan meninjau data yang diajukan oleh target institusi untuk data ini yakni:
a. Pengajuan hanya untuk konseling dan penitikan, penitikan, penitikan konseling, penitikan konseling dan pengajuan
b. Pengajuan tidak memungkinkan beroperasi yang valid oleh Dikti
2. Dikti akan meninjau data ini melalui suryak yang akan diajukan oleh target institusi yakni IPB University

LAMPIRAN



Lampiran 1. Tabel pengaruh konsentrasi sukrosa pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada media mengandung 2% ekstrak khamir^a

Sukrosa (%)	Berat miselia kering (g/100mL)	Aflatoksin (mg/100 mL)		
		B ₁	G ₁	Total (B ₁ + G ₁)
0	0.3	0.1	0.1	0.2
1	1.0	0.5	0.7	1.2
5	1.6	0.7	0.9	1.6
10	3.0	1.4	1.7	3.1
15	3.0	2.7	3.5	6.2
20	2.8	2.8	3.6	6.4
30	3.2	2.7	2.3	5.0
50	3.2	2.6	2.0	4.6

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

Penyeragaman data dari mg / 100 mL menjadi ppb

Contoh

Aflatoksin B₁ pada sukrosa 5% = 0.7 mg/100 mL

0.7 mg/100 mL = 0.007 mg/mL = 7 mg/L = 7 ppm = **7000 ppb**



Lampiran 2. Tabel pengaruh konsentrasi ekstrak khamir pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada media mengandung 20% sukrosa^a

Ekstrak khamir (%)	Berat miselia kering (g/100 mL)	Aflatoksin (mg/100 mL)		
		B ₁	G ₁	Total (B ₁ + G ₁)
Tidak ada	0	0	0	0
0.7	3.3	2.4	3.8	6.2
2.0	4.1	3.6	4.3	7.9
3.0	4.2	4.3	3.2	7.5
5.0	5.2	3.0	2.7	5.7

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

Penyeragaman data dari mg / 100 mL menjadi ppb

Contoh

Aflatoksin B₁ pada ekstrak khamir 2.0 % = 3.6 mg/100 mL

3.6 mg/100 mL = 0.036 mg/mL = 36 mg/L = 36 ppm = **36,000 ppb**

Lampiran 3. Tabel pengaruh penambahan aditif pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada medium YES^a

Bahan aditif	Jumlah (g/L)	Berat Miselia Kering (g/100 mL)	Aflatoksin (mg/100mL)		
			B ₁	G ₁	Total (B ₁ +G ₁)
Tanpa aditif	-	2.8	3.2	2.6	5.8
ZnSO ₄	0.01	2.9	2.1	2.6	4.7
ZnSO ₄	0.1	2.9	1.0	2.6	3.6
MgSO ₄	1.0	2.9	2.5	2.1	3.6
KNO ₃	2.0	3.0	3.1	2.1	5.2
KH ₂ PO ₄	2.0	2.7	2.0	1.7	3.7
K ₂ HPO ₄	2.0	2.1	2.0	1.7	3.7
K ₂ PO ₄	2.0	2.3	1.0	0.8	1.8
Glutamat	2.0	3.9	3.1	2.6	5.7

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

Penyeragaman data dari mg / 100 mL menjadi ppb

Contoh

Aflatoksin B₁ pada penambahan aditif Glutamat = 3.1 mg/100 mL

$$3.1 \text{ mg/100 mL} = 0.031 \text{ mg/mL} = 31 \text{ mg/L} = 31 \text{ ppm} = \mathbf{31000 \text{ ppb}}$$

Lampiran 4. Tabel pengaruh pH pada produksi aflatoxin oleh *A. flavus* pada medium YES^a

pH awal ^b	pH akhir	Berat miselia kering (g/100 mL)	Aflatoksin (mg/100mL)		
			B ₁	G ₁	Total (B ₁ +G ₁)
3.0	3.4	2.1	3.2	2.6	5.8
3.8	3.9	3.4	2.1	2.6	4.7
4.8	4.0	3.0	2.1	2.6	4.7
5.9	4.1	2.8	3.2	2.6	5.8
6.4 ^c	4.1	2.9	3.2	2.6	5.8

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

^b pH diatur menggunakan 1 N HC

^c pH awal media tanpa pengaturan

Penyeragaman data dari mg / 100 mL menjadi ppb

Contoh

Aflatoksin B₁ pada pH awal 6.4 = 3.2 mg/100 mL

$$3.2 \text{ mg/100 mL} = 0.032 \text{ mg/mL} = 32 \text{ mg/L} = 32 \text{ ppm} = \mathbf{32000 \text{ ppb}}$$



Lampiran 5. Tabel Pengaruh waktu inkubasi pada produksi aflatoksin oleh *A. flavus* pada medium YES^a

Waktu inkubasi (hari)	Berat miselia kering (g/100 mL)	Aflatoksin (mg/100mL)		
		B ₁	G ₁	Total (B ₁ +G ₁)
2	0.9	0.1	0.1	0.2
3	2.1	0.4	1.0	1.4
5	3.8	2.0	5.3	7.3
7	3.5	2.0	5.3	7.3
12	4.2	2.0	5.3	7.3
15	3.8	1.8	4.8	6.6
18	4.1	1.6	4.2	5.8

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

Penyeragaman data dari mg / 100 mL menjadi ppb

Contoh

Aflatoksin B₁ pada lama inkubasi 12 hari = 2.0 mg/100 mL

$2.0 \text{ mg/100 mL} = 0.020 \text{ mg/mL} = 20 \text{ mg/L} = 20 \text{ ppm} = \mathbf{20,000 \text{ ppb}}$



Lampiran 6. Tabel produksi aflatoksin dari isolat *Aspergillus flavus* terpilih pada medium YES^a

Isolat	Berat miselia kering (g/100 mL)	Aflatoksin ^c (ppb) ^b		
		B ₁	G ₁	Total (B ₁ +G ₁)
2	2.6	3.8	3.2	7.0
6	4.6	17.1	14.4	31.5
8	3.7	15.2	1.4	16.6
NRRL 2999	4.3	24.7	20.8	45.5
ATCC 15517	5.3	28.5	24.0	52.5
ATCC 15548	6.5	34.2	28.8	63.0
ATCC 15547	2.1	0.1	0.1	0.2

^a Sumber Davis *et al.* (1966)

Penyeragaman data dari mg / 100 mL menjadi ppb

Contoh

Aflatoksin B₁ untuk isolat ATCC 15548 = 34.2 mg/100 mL

34,2 mg/100 mL = 0.342 mg/mL = 342 mg/L = 342 ppm = **342,000 ppb**



Lampiran 7. Tabel Produksi Aflatoksin B₁ dan B₂ oleh *Aspergillus flavus* pada jagung dan sorghum yang diinkubasi pada RH 90% pada dua waktu dan dua suhu^a

Media	Jenis aflatoksin	Jumlah Aflatoksin (µg/g)			
		25°C		30°C	
		48 jam	72 jam	48 jam	72 jam
Sorghum					
Tepung	B ₁	2	19	20	44
	B ₂	2	6	6	29
Grits	B ₁	8	19	50	586
	B ₂	8	20	30	214
Utuh	B ₁	1	500	17	49
	B ₂	1	300	8	60
Jagung					
Tepung	B ₁	1	20	65	142
	B ₂	1	8	30	110
Grits	B ₁	4	35	60	70
	B ₂	8	15	45	65
Utuh	B ₁	10	100	40	70
	B ₂	15	41	30	87

^a Sumber Winn dan Lane (1978)

Penyeragaman data dari µg/g menjadi ppb

Contoh

Aflatoksin pada tepung selama inkubasi 72 jam pada suhu 25°C = 19 µg/g

19 µg/g = 19,000 µg/kg = **19,000 ppb**

Lampiran 8. Tabel Hasil Analisis dengan TLC pada media PDB^b

Sampling	Pembacaan TLC (µL) ^a											
	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 3		Ulangan 4		Ulangan 5		Rataan	
	(+) ^b	S26 ^c	(+) ^b	S26 ^c	(+) ^b	S26 ^c	(+) ^b	S26 ^c	(+) ^b	S26 ^c	(+) ^b	S26 ^c
H0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
H2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
H5	2	2	0.0	0.0	2	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
H7	2	5	5	5	3	2	1	1	2	2	2.6	3
H9	3	9	6	10	4	4	4	4	3	3	4	5.8
H12	4	6	8	6	4	3	5	4	3	4	4.8	4.6
H14	4	2	5	4	4	3	2	2	3	2	3.6	2.6
H16	2	2	2	3	3	3	2	1	2	3	2.2	2.4
H19	0.0	2	1	3	2	1	1	1	2	2	1.2	1.6
H21	0.0	0.0	1	1	1	0.0	0.5	0.5	1	1	0.7	0.5

^a semua sampel dianalisis menggunakan standar 0,2 ppm, volume pengenceran 500 μ L, dan volume spotting 2 μ L

^b Sumber Afiandi (2011)

contoh perhitungan S26 ulangan 1 H9

$$kandungan\;aflatoksin\;(ppm) = \frac{S \times Y \times V \times FP}{W \times Z}$$

Diketahui :

$$S = 9 \mu\text{L}$$

$$Y = 0.2 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$V = 5$$

$$\text{FP} = 1$$

$$W = 1 \text{ mL}$$

Kandungan aflatoksin (ppm) = $\frac{9 \mu\text{L} \times 0.2 \mu\text{g/mL} \times 500 \mu\text{L}}{1}$

1 mL :

$$= 0.450 \text{ } \mu\text{g/l}$$

$$= 0.450 \text{ ppb}$$

Kandungan aflatoksin = 450 ppb

Lampiran 9. Tabel hasil analisis HPLC pada media PDB⁴

Ulangan	Jenis Sampel	Kode sampel	Kadar Aflatoksin (ppb)				Faktor Pengenceran
			B1	B2	G1	G2	
Ulangan 2	Isolat S.26 H9	HPLC 3 H9	44	1.1	n.d	n.d	50
	Isolat JCM	PDB(+)H7	7.4	n.d	n.d	0.1	50
		PDB(+)H9	13.1	n.d	n.d	0.2	50
		PDB(+)H12	16.9	0.4	n.d	n.d	50
		PDB(+)H14	8.9	0.2	n.d	n.d	50
		PDB(+)H16	14.9	n.d	n.d	n.d	5
	Isolat Aspergillus flavus lokal	PDB(+)H19	0.0	n.d	n.d	n.d	-
		PDB(+)H21	0.0	n.d	n.d	n.d	-
		PDB H7	5.8	n.d	n.d	n.d	50
		PDB H9	18.7	n.d	n.d	n.d	50
Ulangan 3	Isolat S.26	PDB H12	11.9	n.d	n.d	n.d	50
		PDB H 14	29.7	0.9	60.8	n.d	5
		PDB H16	40.3	16.5	354.5	n.d	5
		PDB H19	0.0	n.d	n.d	n.d	-
		PDB H21	0.0	n.d	n.d	n.d	-

^a Sumber Afiandi (2011)

Conoth perhitungan : sampel S26 PDB HT

$$Cp = \frac{(Ch \times Fp)}{Bc}$$

Diketahui : Ch = 5.8 ppb

$$F_p = 50$$

$$B_C = 1 \text{ mL}$$

$$\text{Cp} = \frac{5.8 \text{ ppb} \times 50}{1 \text{ mL}}$$

Kadar aflatoksin = 290.2 ppb