

KAJIAN PRODUKSI AFLATOKSIN B1 KASAR DARI ISOLAT KAPANG *Aspergillus flavus* LOKAL PADA MEDIA JAGUNG DAN JAGUNG+KACANG TANAH**ASSESSMENT OF CRUDE AFLATOKSIN B1 PRODUCTION BASED ON LOCAL *Aspergillus flavus* MOLD ISOLATE IN CORN AND CORN+GROUND PEANUT MEDIA**

Listya Purnamasari^{*}, Ali Agus, dan Cuk Tri Noviandi
Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

Submitted: 23 February 2016, Accepted: 6 May 2016

INTISARI

Aflatoksin merupakan hasil metabolit sekunder kapang *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus* yang bersifat toksik. Kapang ini umum mengkontaminasi bahan pangan dan pakan berbasis pertanian, seperti jagung dan kacang tanah. Dalam setiap penelitian mengenai 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. Penelitian ini bertujuan mengkaji produksi aflatoksin B1 (AFB1) dari isolat lokal kapang *A. flavus* pada media jagung dan jagung+kacang tanah. Kapang lokal diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU), Universitas Gadjah Mada, yaitu: FNCC 6122 dan FNCC 6109. Isolat dibiakkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama 5 hari dan dipindahkan pada medium jagung dan kombinasi jagung dengan kacang tanah selama 10-15 hari pada suhu 25°C. Variabel yang diamati adalah kadar AFB1 dengan pengujian ELISA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat yang menghasilkan AFB1 lebih tinggi adalah FNCC 6122 dan isolat lokal FNCC 6122 pada media jagung+kacang tanah yang menghasilkan kandungan AFB1 lebih tinggi daripada media jagung saja. Kesimpulan penelitian ini adalah penambahan media kacang tanah akan memicu meningkatnya kadar aflatoksin B1.

(Kata kunci: Aflatoksin B1, Jagung, Kacang tanah, Kajian)

ABSTRACT

Aflatoxin, which known as toxigenic compound, is a secondary metabolite produced by Aspergillus flavus and A. parasiticus. Aflatoxin is found in both food and feed stuffs, such as: corn and peanut. Aflatoxin standard is needed in every research 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 A. flavus to producing aflatoxin that can be used to be the alternative aflatoxin standard. Local mold of A. flavus FNCC 6122 and FNCC 6109 are got from PAU University of Gadjah Mada. Isolate was enriched on PDA medium for 5 days and move to corn medium of corn+peanut combine medium for 10-15 day at 25°C. The variables was the content of AFB1 by ELISA test. The result is shown that isolat FNCC 6122 produced higher AFB1 than isolate FNCC 6109. The combine of corn and peanut medium stimulated FNCC 6122 to produce higher AFB1 and has potency to be the candidate of standard aflatoxin. In conclusion, the peanut addition on the medium would initiate increasing of the aflatoksine B1 level.

(Key words: Aflatoksin B1, Assessment, Corn, Peanut)

*Korespondensi (corresponding author):
Telp. +62 856 4245 4472
E-mail: listyashachan@gmail.com

Pendahuluan

Aflatoksin merupakan metabolit sekunder dari kapang *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus* yang bersifat sangat toksik. Kondisi lingkungan Indonesia yang memadai seperti kelembaban, kadar air dan suhu mendukung pertumbuhannya. Suatu penelitian mengenai cemaran aflatoksin memerlukan suatu standar aflatoksin. Namun permasalahan yang dihadapi dalam setiap analisis aflatoksin adalah ketersediaan standar aflatoksin murni di pasaran susah untuk diperoleh dan mahal harganya serta harus impor.

Berbagai penelitian telah dilakukan dengan lingkup tujuan memproduksi aflatoksin dengan memanfaatkan isolat kapang *A. Flavus* (Kusumaningrum et al., 2010; Samapundo et al., 2007). Sementara itu, Indonesia memiliki isolat *A. flavus* yang berpotensi menghasilkan aflatoksin dalam jumlah tinggi dan dapat dijadikan standar. Penelitian sebelumnya telah dilakukan oleh Sa'diah (2012) dengan menggunakan isolat lokal F0219 yang berasal dari Balai Penelitian Veteriner Bogor mampu menghasilkan AFB1 sebesar 1.213,3 ppb pada media *potato dextrose broth* (PDB) sedangkan pada penelitian Yuniata (2013) yang menggunakan isolat FNCC 6122 yang berasal dari PAU UGM mampu menghasilkan AFB1 sebesar 15.051 ppb pada media jagung+kacang tanah. Penggunaan standar aflatoksin lokal diharapkan dapat membantu penelitian dan pengembangan analisis aflatoksin menjadi lebih efektif, baik dari segi biaya maupun waktu. Hal inilah yang mendorong dilakukannya kajian ini sehingga dapat memberikan pengetahuan yang dapat digunakan sebagai dasar solusi yang terbaik untuk mendapatkan standar aflatoksin guna mengatasi keterbatasan aflatoksin standar di pasaran.

Materi dan Metode

Materi

Bahan yang digunakan dalam produksi AFB1 kasar adalah jagung, kacang tanah, isolat lokal jamur *A. flavus* dan aquades steril. Jagung yang digunakan adalah jagung yang sudah dipecah / digiling kasar. Reagen untuk analisis AFB1 berupa metanol 65%, aquades, dan bahan lain, yaitu: AFB1 *standard* (7 larutan), AFB1 *antibody* 1, *HRP-conjugated antibody* 2, 1X *wash solution*, *stop buffer*, dan

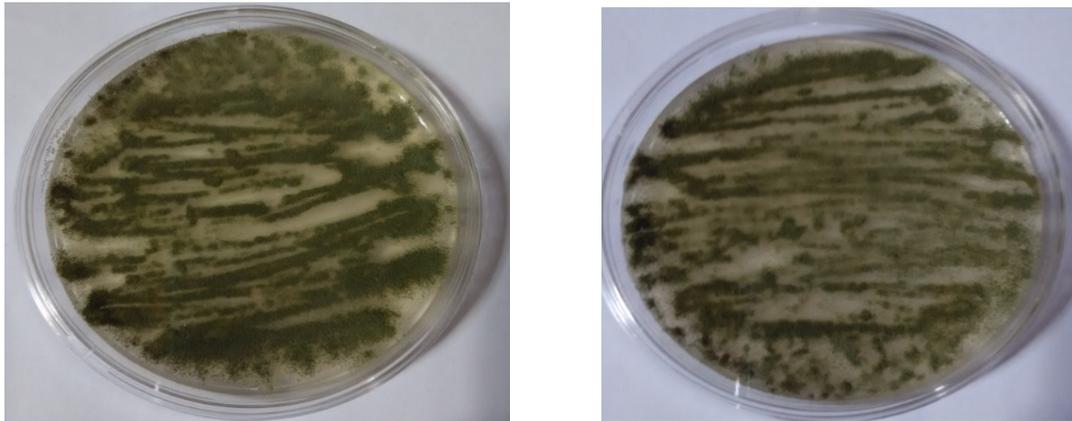
TMB substrate yang terdapat dalam ELISA kit yang diproduksi oleh Maxsignal® Aflatoxin B1 Elisa Test Kit Manual – 1055-03A, BIO Scientific. Isolat jamur *A. flavus* yang digunakan berasal dari Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada dengan kode FNCC 6122 dan FNCC 6109. Medium *potato dextrose agar* (PDA) yang digunakan untuk media tumbuh *A. flavus* sebelum dikontaminasikan ke jagung.

Alat yang digunakan adalah: *autoclave*, *laminar air flow*, timbangan digital, erlenmeyer, cawan petri dan ose. Alat analisis ELISA yaitu timbangan digital, tabung reaksi, gelas ukur, sentrifuge, kertas saring, dan ELISA reader (Shimadzu, Japan).

Metode

Isolat koleksi PAU Universitas Gadjah Mada dibiakkan pada medium PDA selama 5 hari kemudian dipindahkan pada media jagung pecah dan jagung pecah+kacang tanah dengan selama 10-15 hari pada suhu kamar 25°C. Selanjutnya dilakukan pengujian dengan metode ELISA untuk mengetahui konsentrasi AFB1 pada media yang dikontaminasi. Isolat yang telah dibiakkan pada media PDA dengan umur 7 hari dapat dilihat pada Gambar 1.

Prosedur analisa AFB1 yaitu dimulai dengan ekstraksi sampel jagung yang telah dikontaminasi dengan isolat lokal jamur *A. flavus*. Sampel jagung ditimbang sebanyak 2,5 g kemudian dimasukkan ke tabung konikel yang berisi 10ml methanol 70% dan disentrifuge kecepatan 3000rpm selama 5 menit kemudian disaring dengan kertas whatmann no 42. Filtrat diambil sebanyak 1,5 ml dan disimpan dalam tabung Eppendorf. Pengujian ELISA diawali dengan persiapan *plate wells*. Sebanyak 50 µL AFB1 *standards* (7 larutan) dan filtrat sampel yang akan diuji dimasukkan pada *wells* yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 50 µL *HRP-conjugated antibody* 2 pada setiap *wells*, dilanjutkan dengan 50 µL *antibody* 1, dan dicampurkan dengan lembut selama 1 menit kemudian diinkubasi pada suhu ruang 20-25°C selama 10 menit. *Wells* kemudian dicuci dengan menggunakan 250 µL *wash solution* sebanyak 3 kali dan diketukkan dengan lembut pada handuk hingga kering. Sebanyak 100 µL *TMB substrate* ditambahkan pada setiap *wells* kemudian dicampurkan dengan lembut selama 1 menit dan diinkubasi pada suhu ruang 20-25°C selama 5 menit. Langkah



Isolat FNCC 6109

Isolat FNCC 6122

Gambar 1. Isolat yang telah dibiakkan pada medium agar
(the isolated was cultured on agar).

terakhir yaitu penambahan 100 μ L *stop buffer* untuk mengakhiri reaksi enzim kemudian dilakukan pembacaan pada alat ELISA reader pada panjang gelombang 450nm.

Hasil dan pembahasan

Jagung sebagai bahan utama pakan ternak unggas, mudah terkontaminasi jamur *A. flavus* yang menghasilkan toksin yaitu AFB1 yang sangat berbahaya. Jamur ini mampu tumbuh dan berkembang pesat di lingkungan tropis seperti Indonesia. Produksi aflatoksin B1 (AFB1) kasar pada penelitian ini dilakukan untuk menekan biaya penelitian dimana harga AFB1 murni sangat mahal dan tidak mudah untuk mendapatkannya. Aflatoksin B1 kasar diproduksi dengan menumbuhkan isolate jamur penghasil aflatoksin yaitu *A. flavus* yang diperoleh dari PAU UGM ke dalam jagung.

Isolat yang digunakan yaitu isolate FNCC 6122, FNCC 6109 dari PAU. Isolate ditumbuhkan pada medium PDA selama 5 – 7 hari pada suhu ruang 25°C. Isolate kemudian ditumbuhkan dalam media jagung di dalam kantong plastik selama 10 – 15 hari pada suhu 25°C, sesuai dengan pernyataan Diener dan Davis (1987) bahwa jamur *Aspergillus sp*

pada media steril suhu kamar yaitu 25°C dalam 9 hari sudah mulai membentuk aflatoksin. Hasil ELISA isolat FNCC 6122 dan FNCC 6109 pada media jagung dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa isolat FNCC 6122 menghasilkan konsentrasi yang lebih tinggi dari FNCC 6109. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, konsentrasi aflatoksin B1 yang dihasilkan masih tergolong rendah, yaitu: rerata 217,29 ppb dan 174,14 ppb, berbeda dengan penelitian Yunianta (2013) dengan isolat 6122 dan media jagung+kacang mampu memproduksi AFB1 hingga 15.051 ppb. Hasil Aflatoksin pada penelitian ini tidak lebih baik dari penelitian Yunianta (2013) dengan isolat yang sama. Penanaman isolat jamur pada kantong plastik dimungkinkan terjadi kontaminasi jamur lain karena aerasi yang kurang baik. Pembiakan jamur pada media jagung dilakukan di dalam plastik dalam kondisi terikat sehingga pertukaran O₂ dan CO₂ tidak dapat terjadi dengan maksimal. Reverberi *et al.* (2008) menyatakan bahwa terdapat korelasi antara peningkatan produksi aflatoksin oleh jamur *A. flavus* dengan meningkatnya kadar oksigen. Faktor yang mempengaruhi

Tabel 1. Hasil ELISA dari isolat FNCC 6122 dan FNCC 6109 pada media jagung
(the result of ELISA test from isolate FNCC 6122 and FNCC 6109 in corn medium)

Ulangan (<i>replication</i>)	Kontrol (<i>control</i>) (ppb)	Isolat FNCC 6122 (<i>isolate FNCC 6122</i>)	Isolat FNCC 6109 (<i>isolate FNCC 6109</i>)
Ulangan 1 (<i>replication 1</i>)	0,00	233,71	189,06
Ulangan 2 (<i>replication 2</i>)	0,00	209,54	136,30
Ulangan 3 (<i>replication 3</i>)	0,00	208,61	197,06
Rerata (<i>average</i>)	0,00	217,29	174,14

pertumbuhan kapang dan produksi aflatoksin adalah: 1). pengaruh aerasi di mana proses fermentasi yang dilakukan pada wadah yang tidak memiliki aerasi yang bagus; 2). pengaruh atmosfer (gas udara) seperti O₂ dan CO₂; 3). suhu, di mana suhu optimum untuk memproduksi toksin yaitu 25°C; 4). pengaruh kelembaban di mana RH pada proses fermentasi lebih dari 80% (Wangge *et al.*, 2012). Selain itu penambahan kacang tanah diduga membantu dalam produksi AFB1 yang tinggi. Sehingga hasil tersebut dijadikan acuan dalam produksi AFB1 pada media selanjutnya yaitu jagung+kacang tanah. Hasil ELISA pada jagung dan jagung+kacang tanah dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa media jagung+kacang tanah menghasilkan kadar aflatoksin yang lebih tinggi yaitu 1382,79 ppb dibandingkan dengan media jagung 349,04 ppb. Pertumbuhan jamur *A. flavus* dalam media jagung dan jagung+kacang tanah dapat dilihat pada Gambar 2.

Tingginya kandungan aflatoksin pada media jagung+kacang tanah disebabkan kacang tanah merupakan substrat yang lebih baik sebagai tempat tumbuh jamur *Aspergillus sp.* Kacang tanah merupakan

substrat yang penting dalam pertumbuhan dan penghasil aflatoksin (Sultan dan Magan, 2010). Jagung dan kacang tanah merupakan kelompok bijian yang sering terkena infeksi jamur *A. flavus* yang memproduksi aflatoksin (Rubak, 2011; Setiarto, 2011). Penambahan kacang tanah diharapkan mampu meningkatkan produksi aflatoksin yang dihasilkan jagung.

Aspergillus membutuhkan lingkungan tumbuh yang memenuhi persyaratan guna pembentukan aflatoksin. Samapundo *et al.* (2007) dan Yunus *et al.* (2011) menyatakan bahwa faktor utama dalam pembentukan aflatoksin yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus sp.* adalah suhu 5-45°C dan memiliki kelembaban relatif (Rh) minimum sebesar 80%. Derajat keasaman (pH) medium yang dibutuhkan untuk pembentukan aflatoksin adalah pH 5,5-7,0. Selain persyaratan lingkungan, maka pembentukan aflatoksin sangat ditentukan pula oleh faktor potensial genetik fungi dan lama kontak antara fungi dengan substrat.

Potensial genetik fungi ditentukan oleh strain fungi, misalnya terdapat fungi yang khusus menghasilkan AFB1. Pertumbuhan *A. flavus* dan *A. parasiticus* ditentukan oleh jenis

Tabel 2. Hasil ELISA pada jagung dan jagung+kacang tanah dengan isolate 6122
(the result of ELISA test in medium corn and corn+peanut)

Ulangan (<i>replication</i>)	Kontrol (<i>control</i>) (ppb)	Jagung (<i>corn</i>) (ppb)	Jagung+kacang tanah (<i>corn+peanut</i>) (ppb)
Ulangan 1 (<i>replication 1</i>)	0,00	348,76	1214,18
Ulangan 2 (<i>replication 2</i>)	0,00	332,03	1442,76
Ulangan 3 (<i>replication 3</i>)	0,32	366,33	1491,42
Rerata (<i>average</i>)	0,106	349,04	1382,79

ppb=part per billion.



Gambar 2. Kontaminasi aflatoksin pada media kombinasi jagung+kacang tanah dan jagung saja
(*aflatoxin contamination in corn+peanut combination corn*).

dan kadar karbohidrat. Jenis karbohidrat yang paling baik untuk media fungi antara lain: glukosa, galaktosa dan sukrosa. Kemampuan tumbuh fungi pada media maltosa dan laktosa akan lebih rendah daripada glukosa, galaktosa dan sukrosa. Lebih-lebih pada media sorbitol dan mannitol, maka kemampuan tumbuh fungi akan lebih rendah lagi (Anonim, 2008). Dijelaskan pula oleh Sultan dan Magan (2010) bahwa produksi aflatoxin ditentukan oleh macam karbohidrat dalam substrat dan *afla-amilase* yang diproduksi oleh *A. flavus*. Gibson *et al.* (1994) dan Kusumaningrum *et al.* (2010) menyatakan bahwa faktor terpenting yang mempengaruhi tingkat cemaran dan pertumbuhan *A. flavus* adalah faktor kelembaban relatif lingkungan selama penyimpanan dan lamanya penyimpanan. Tingkat cemaran tersebut akan berpengaruh terhadap terbentuknya aflatoxin.

Kesimpulan

Isolat terbaik dalam memproduksi AFB1 dalam penelitian ini adalah FNCC 6122. Media terbaik dalam memproduksi AFB1 kasar dalam penelitian ini adalah jagung+kacang tanah. Penambahan kacang tanah dapat meningkatkan kandungan AFB1 dalam jagung.

Daftar Pustaka

- Anonim. 2008. Stress dan mikotoksikosis. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Diener, U. L. and N. D. Davis. 1987. Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In proceedings of the workshop: Aflatoxin in Maize, CIMMYT, Mexico, pp. 33-40.
- Gibson, A. M., J. Baranyi, M. J. Pitt, M. J. Eyles and T. A. Roberts. 1994. Predicting fungal growth: The effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 419-431.
- Kusumaningrum, H. D., Suliantari, D. T. Aris, H. P. Sindhu, dan S. U. Aldilla. 2010. Cemaran *Aspergillus flavus* dan aflatoxin pada rantai distribusi produk pangan berbasis jagung dan faktor yang mempengaruhinya. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 21: 171-176.
- Rubak, Y. T. 2011. Tingkat cemaran aflatoxin B1 pada produk olahan jagung dan kacang tanah di Kabupaten Kupang dan Timor Tengah Selatan (NTT). *Media Exacta* 11 no 1.
- Samapundo, S., F. Devlieghere, A. H. Geeraerd, B. de Meulenaer, J. F. van Impe and J. Debevere. 2007. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. Parasiticus* on corn. *J. Food Microbiol* 24: 517-529.
- Sa'diah, V. O. 2012. Kajian produksi aflatoxin dari isolat kapang *Aspergillus flavus*. Skripsi Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Setiarto, R. H. B. 2011. Studi Komparatif toksisitas LC₅₀ Aflatoxin, okhratoksin, zearalenon pada kacang tanah (*Arachis hypogaea* L). *Widyariset* 14: 535-540.
- Sultan, Y. and N. Magan. 2010. Mycotoxigenic fungi in peanuts from different geographic regions of Egypt. *Mycotoxin Research* 26: 133-144.
- Wangge, E. S. A., D. N. Suprpta, dan G. N. A. S. Wiryana. 2012. Isolasi dan identifikasi jamur penghasil mikotoksin pada biji kakao kering yang dihasilkan di flores. *J. Agric. Sci. Biotechnol.* 1: 39-47.
- Yuniarta. 2013. Upaya penurunan tingkat toksisitas aflatoxin B1 pada jagung serta penggunaannya sebagai pakan broiler. Tesis Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Yunus, A. W., E. Razzazi-Fazeli and J. Bohm. 2011. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *J. Toxins* 3: 566-590.
- Reverberi, M., S. Zjalic, A. Ricelli, F. Punelli, E. Camera and C. Fabbri. 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryot. Cell* 7: 988-1000.