

Homogenitas dan Stabilitas Kit ELISA OTA, serta Aplikasinya untuk Mendeteksi Ochratoxin A pada Pakan Unggas

(Homogeneity and Stability of OTA ELISA Kit and Its Application for Ochratoxin A Detection in Poultry Feed)

Maryam R, Widiyanti PM, Ramadhani F, Munawar H

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
rmaryam0186@gmail.com

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a harmful mycotoxins produced by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp which often contaminates agricultural products. The mycotoxin is nephrotoxic, immunotoxic, teratogenic, carcinogenic, neurotoxic and genotoxic to humans and livestock. To detect OTA, sensitive, rapid, accurate and economical detection techniques are needed. Previous studies have produced an ELISA kit based on polyclonal antibodies to detect OTA in animal feeds. The objectives of the study were to determine the homogeneity and stability of the ELISA kit, as well as its performance in detecting OTA in poultry feed. Homogeneity tests were performed using 10 kits, while stability tests were performed using 3 kits which were stored for 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, and 40 weeks in refrigerator (4-8°C). Statistical analysis (F test) showed that the 10 ELISA kits were homogeneous ($F_{\text{count}} < F_{\text{table}}$), while the stability test of 3 ELISA kits indicated no significant changes during the storage period. The kits showed consistency in detecting OTA in poultry feed and its ingredients. Detection of OTA using direct competitive ELISA (dc-ELISA) revealed that all samples collected from West Java and Lampung were contaminated by OTA with the average concentration was below the maximum residue limit (MRL) for poultry, i.e 100 ppb. Based on results obtained, it can be concluded that the homogeneity and stability of the developed ELISA kit met the requirements and can be applied for the detection of OTA in poultry feeds.

Key words: ELISA, homogeneity, Ochratoxin A, stability, feeds

ABSTRAK

Ochratoxin A (OTA) adalah salah satu mikotoksin berbahaya yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp yang sering mengkontaminasi produk pertanian. Mikotoksin ini bersifat nefrotoksik, imunotoksik, teratogenik, karsinogenik, neurotoksik, dan genotoksik pada manusia dan hewan ternak. Untuk mengetahui tingkat kontaminasi OTA dibutuhkan teknik deteksi yang sensitif, cepat, akurat, dan ekonomis. Pada penelitian sebelumnya telah dihasilkan kit ELISA berbasis antibodi poliklonal untuk mendeteksi OTA pada bahan pakan ternak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui homogenitas dan stabilitas kit ELISA OTA yang dikembangkan

dengan format kompetitif langsung (dc-ELISA), serta keragaannya dalam mendeteksi OTA pada pakan unggas. Uji homogenitas dilakukan terhadap 10 kit, sedangkan uji stabilitas dilakukan terhadap 3 kit yang disimpan selama 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, dan 40 minggu dalam lemari pendingin (4-8°C). Analisis statistik dengan uji F menunjukkan bahwa 10 kit ELISA OTA yang diuji memberikan hasil yang homogen ($F_{hitung} < F_{tabel}$). Hasil uji stabilitas terhadap 3 kit ELISA OTA tidak menunjukkan perubahan yang berarti selama masa penyimpanan (stabil). Kit juga menunjukkan konsistensi yang baik dalam mendeteksi OTA pada pakan dan bahan pakan ternak unggas. Pengujian sampel lapang menggunakan kit ELISA tersebut menunjukkan bahwa seluruh sampel asal Jawa Barat dan Lampung terkontaminasi OTA dengan rerata konsentrasi masih di bawah batas ambang residu (BMR) untuk ternak unggas, yaitu 100 ppb. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa kit ELISA yang dikembangkan memiliki homogenitas dan stabilitas yang memenuhi persyaratan, serta dapat diaplikasikan untuk mendeteksi OTA pada pakan ternak unggas.

Kata kunci: ELISA, homogenitas, Okratoksin A, stabilitas, pakan

PENDAHULUAN

Okratoksin A (OTA) adalah mikotoksin yang dihasilkan oleh beberapa spesies kapang dari genus *Aspergillus* dan *Penicillium*. Genus *Aspergillus* yang dapat memproduksi OTA antara lain *A. Ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. albertensis*, *A. auricomus*, *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotiumniger*, *A. fumigates*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *A. awamori*, *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, dan *A. affinis*. Sedangkan genus *Penicillium* yang juga dapat memproduksi OTA, yaitu *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. glycyrrhizicola*, dan *P. polonicu* (Wang et al. 2016). Kapang-kapang tersebut banyak mengkontaminasi produk pertanian antara lain jagung, gandum, *barley*, *oats*, dan *rye* yang digunakan sebagai bahan pangan dan pakan (Denli & Perez 2010).

Okratoksin A (OTA) merupakan jenis okratoksin yang paling toksik dibandingkan dengan jenis lainnya. Oleh IARC, OTA diklasifikasi sebagai senyawa karsinogen group 2B pada hewan laboratorium meskipun mekanisme toksisitasnya belum diketahui secara pasti (Mally 2012). Selain itu, OTA juga bersifat hepatotoksik, teratogenik, dan imunotoksik (Duarte et al. 2011). Dengan sifat-sifat tersebut OTA berpotensi menimbulkan penyakit yang dikenal dengan okratoksikosis.

Okratoksikosis pada ternak disebabkan oleh adanya kontaminasi OTA pada pakan yang melebihi batas ambang. Keberadaan OTA mempengaruhi metabolisme yang berakibat terhadap penurunan produksi, reproduksi, dan kualitas serta keamanan pangan asal hewan (Battacone et al. 2010). Heussner & Bingle (2015) melaporkan bahwa pemberian ransum yang mengandung OTA

menyebabkan penurunan bobot badan, *nephropaty*, dan peningkatan mortalitas pada babi, sedangkan pada ayam petelur menyebabkan penurunan produksi telur. Denli & Perez (2010) juga melaporkan bahwa kandungan OTA 2 ppm pada pakan menimbulkan gejala okratoksikosis pada unggas antara lain penurunan bobot badan dan produksi telur, diare, gangguan ginjal, serta perubahan haematologis. Sedangkan pada konsentrasi tinggi (4 ppm) terjadi peningkatan mortalitas secara drastis.

Babi merupakan ternak yang paling sensitif terhadap toksisitas OTA penyebab *porcine nephropathy* pada babi dewasa dan kerusakan sel hati pada anak babi (Marin et al. 2016). Pada sapi bunting OTA menyebabkan abortus, dan kerusakan ginjal pada sapi pedet. Namun, informasi mengenai adanya residu OTA dalam susu sapi sangat terbatas dan konsentrasinya dalam susu sangat rendah (Pattono et al. 2011; Abad et al. 2016). Bukti lainnya menunjukkan bahwa OTA juga terdeteksi pada air susu manusia (Dehghan et al. 2014; Kamali et al. 2017).

Kontaminasi OTA pada pakan secara alami dilaporkan oleh Pietruszka et al. (2017) yang mendeteksi OTA pada pakan ternak di Polandia pada tahun 2014-2016 dengan kisaran konsentrasi 0,3-300 ppb. Krnjaja et al. (2014) juga menemukan kapang *Aspergillus* dan *Penicillium*, serta mendeteksi OTA pada pakan ayam pedaging dan ayam petelur dengan rerata konsentrasi 34,40 ppb dan 43,89 ppb. Kontaminasi OTA secara alami juga ditemukan pada pakan ayam petelur dan pakan ruminansia di Civas City, Brazil dengan konsentrasi di bawah batas toleransi (Gumus et al. 2018).

Kontaminasi OTA pada pakan tidak hanya membahayakan kesehatan ternak, tetapi juga menimbulkan residu pada produk ternak antara lain daging, hati, ginjal, telur, dan susu. Hasil studi yang dilakukan Pietruszka et al. (2017) menunjukkan bahwa pemberian pakan mengandung OTA menyebabkan terjadinya residu pada ginjal, hati, dan daging babi dengan konsentrasi 0,2-150 ppb, di mana pada beberapa sampel konsentrasinya melebihi batas regulasi. Pattono et al. (2011) mendeteksi adanya residu OTA dengan konsentrasi 0,07-0,11 ppb pada sampel susu sapi, kambing, dan domba di Italia. Abad et al. (2016) juga melaporkan adanya residu OTA pada sampel susu di Iran dengan konsentrasi mencapai 21,4 ppb. Keberadaan OTA pada pangan asal hewan dikhawatirkan menyebabkan terjadinya okratoksikosis yang membahayakan kesehatan manusia sebagai konsumen.

Kasus okratoksikosis pada manusia terjadi karena terkonsumsinya bahan pangan nabati dan produk hewani yang mengandung OTA (Duarte et al. 2011). Hal ini terbukti dengan dilaporkannya kasus *Balkan Endemic Nephropathy* (BEN) dan *chronic interstitial nephropathy* (CIN) yang terkait erat dengan OTA. Studi epidemiologi yang dilakukan oleh Bui-Klimke & Wu (2015) di Mesir menunjukkan sindrom nefritik yang terjadi pada manusia berhubungan dengan terdeteksinya OTA pada urin berkonsentrasi tinggi. Indikasi okratoksikosis juga ditemukan di

Iran, di mana kontaminasi OTA ditemukan pada air susu manusia dengan konsentrasi 0,11-7,34 ppb dan 14% sampel melebihi batas regulasi (3 ppb) (Kamali et al. 2017).

Pada manusia, gejala penyakit yang ditimbulkan oleh OTA antara lain penurunan nafsu makan, penurunan berat badan, depresi, dehidrasi, dan poliuria (Azizi et al. 2012). Efek dari OTA pada manusia dapat mempengaruhi fungsi ginjal dan hati, serta mengakibatkan teratogenik (melalui plasenta) dan immunosupresi. Dalam ginjal, OTA juga mengakibatkan *focal segmental glomerulosclerosis* (FSGS) yang diindikasikan dengan adanya OTA dalam urin pasien yang mengalami FSGS. Hope & Hope (2012) menyatakan bahwa pada sel syaraf di otak pasien yang terpapar OTA terjadi *neurodegenerative* yang dapat menyebabkan alzheimer dan parkinson.

Oleh karena OTA merupakan senyawa yang stabil dan tidak rusak oleh proses pemanasan, maka keberadaannya pada bahan pakan dan pangan dikhawatirkan dapat menimbulkan gangguan kesehatan. Oleh karena itu, sebanyak 8 negara telah mengeluarkan regulasi OTA dalam bahan pangan berkisar antara 1-50 ng/g dengan batas toleransi harian sebesar 14 ng/kg BB (WHO 2007). Sedangkan WHO menentukan batas maksimum OTA pada sereal sebesar 5 µg/kg dan produknya 3 µg/kg (WHO 2002). Residu OTA pada bahan pangan dan produk hewani menjadi kekhawatiran dunia, sehingga, beberapa negara telah menentukan batas maksimum residu (BMR) OTA pada bahan pangan sebagai persyaratan dalam perdagangan global. Untuk menentukan BMR dibutuhkan metode yang sensitif, spesifik, akurat, mudah digunakan, dan ekonomis.

Sejauh ini metode yang banyak digunakan untuk analisis OTA, yaitu khromatografi (HPLC, LC-MS/MS) (Skarkova et al. 2013) yang umumnya menggunakan pereaksi organik berbahaya, proses analisis yang lama, biaya yang tinggi, serta peralatan yang mahal. Imunoasai merupakan metode alternatif yang banyak digunakan karena memiliki keunggulan ditinjau dari aspek spesifitas, sensitifitas, kecepatan, kemudahan, dan ekonomis (Meulenberg 2012; Skarkova et al. 2013; Ha 2015). Di antara imunoasai yang paling banyak digunakan untuk mendeteksi OTA adalah *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang beredar secara komersial. ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi OTA dengan cepat, mudah, dan lebih efisien dibandingkan metode yang lainnya. Berbagai jenis sampel dapat dideteksi dengan metode ELISA OTA antara lain bahan mentah (jagung, kopi, dan biji-bijian lainnya), pangan, pakan hewan, serum, plasma, susu, jaringan tubuh, dan sampel lainnya (Meulenberg 2012; Hampikyan et al. 2015).

Keamanan pangan hewani sangat tergantung pada kualitas pakan yang digunakan. Oleh karena itu, pengawasan (*monitoring*) terhadap proses penyediaan bahan pangan asal ternak secara intensif, mulai dari penyediaan pakan sampai dengan produk akhir perlu dilakukan oleh produsen pakan. Untuk itu, dibutuhkan teknik deteksi yang mudah, cepat, dan akurat antara lain ELISA. Homogenitas, dan kestabilan kit ELISA sangat menentukan presisi dan akurasi

dari hasil pengujian dengan menggunakan kit tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui homogenitas dan stabilitas kit ELISA OTA yang dikembangkan di laboratorium, serta keragaannya dalam mendeteksi OTA pada pakan ternak unggas.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu standar OTA (Sigma), metanol pa, kit ELISA OTA yang terdiri dari pelat mikro berlapis antibodi anti OTA, pelat pencampur, konjugat OTA-HRP, substrat TMB), serta sampel lapang berupa bahan pakan (jagung dan dedak) serta pakan unggas.

Metode

Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui keseragaman dari kit ELISA yang dikembangkan. Disiapkan 20 kit ELISA OTA dan diambil 10 kit secara acak untuk diuji keseragamannya. Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan standar OTA pada konsentrasi 10 ppb secara *duplo*. Data hasil uji homogenitas dianalisis secara statistik menggunakan "uji F" dengan menghitung *mean square between* (MSB) dan *mean square within* (MSW) menggunakan persamaan berikut

$$MSB = \frac{\sum [(a_i + b_i) - \bar{X}_{(a_i+b_i)}]^2}{2(n-1)}$$
$$MSW = \frac{\sum [(a_i + b_i) - \bar{X}_{(a_i+b_i)}]^2}{2n}$$

Selanjutnya nilai F dihitung (F_{hitung}) sebagai MSB/MSW. Kit dinyatakan homogen apabila $F_{hitung} < F_{tabel}$.

Uji Stabilitas

Uji stabilitas dilakukan dengan menyiapkan 10 kit ELISA OTA dan diambil 3 kit secara acak untuk dilakukan uji stabilitas. Pengujian dilakukan dengan menggunakan standar OTA pada konsentrasi 10 ppb secara *duplo* selama penyimpanan 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, dan 40 minggu pada suhu 4-8°C. Data hasil uji stabilitas dianalisis dan dihitung menggunakan persamaan

$$|\bar{X}_i - \bar{X}_{HM}| < 0,3 \times \delta_{Hm}$$

di mana \bar{X}_i = rata-rata contoh hasil uji ke- i , \bar{X}_{HM} = rata-rata hasil uji homogenitas 0,3 = konstanta yang ditetapkan oleh *Asia Pasific Laboratory Accreditation Cooperation* (APLAC), δ_{HM} = *Standar Deviasi* uji homogenitas. Kit dikatakan stabil jika selisih rerata hasil pengujian ke- n dengan rerata hasil uji homogenitas $< 0,3$ SD uji homogenitas (δ_{HM}).

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan mengunjungi *poultry shop* di provinsi Jawa Barat dan Lampung selama tahun 2018. Lokasi pengambilan sampel di Jawa Barat meliputi Kota Depok, Kabupaten Tangerang, Kabupaten Bekasi, dan Kabupaten Bogor. Sedangkan untuk provinsi Lampung pengambilan sampel dilakukan di Kabupaten Pringsewu, Lampung Selatan, dan Bandar Lampung. Sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi identitas peternak dan lokasinya, selanjutnya disimpan di dalam *freezer* sebelum dilakukan analisis terhadap kandungan OTA.

Analisis OTA pada sampel pakan dan bahan pakan

Untuk analisis dengan dc-ELISA, sampel pakan/bahan pakan ditimbang 25 gram, diekstrak dengan 100 mL metanol 70% menggunakan blender selama 2 menit, disaring, dan disentrifus pada 3000 rpm selama 5 menit. Diambil 50 μ L ekstrak sampel dan dilarutkan dengan 150 μ L akuades.

Tabel 1. Standar Ochratoksin A (OTA)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K	K	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33
B	40	5.0	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34
C	20	2.5	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
D	10	1.0	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
E	5	0.5	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
F	2.5	0.25	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
G	1.25	0.125	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S32	S39	S39
H	0	0	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40

K: kontrol (berisi antibodi dan substrat), S: Sampel (1-40), Std OTA, standar okratoksin A (0-40 ppb)

Kit ELISA dikondisikan pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya, sebanyak 75 μ L standar OTA atau ekstrak sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam pelat pencampur, kemudian ditambahkan 150 μ L konjugat OTA-HRP

(pengenceran 1:25) dan dihomogenkan. Sebanyak 75 µL standar OTA atau ekstrak sampel dipipet dan dipindahkan ke dalam pelat berlapis antibodi (*duplo*) seperti pada Tabel 1.

Selanjutnya pelat diinkubasi selama 30 menit sehingga terjadi reaksi kompetisi antara OTA yang terdapat dalam sampel dengan OTA pada konjugat OTA-HRP untuk berikatan dengan antibodi anti OTA-KLH yang dilapiskan pada pelat ELISA. Kemudian pelat dicuci 3 kali dengan akuades dan dikeringkan, selanjutnya ditambahkan 100 µL substrat yang terdiri dari substrat A dan substrat B dengan perbandingan 97:3 (v/v). Reaksi dibiarkan selama 15 menit hingga terbentuk warna biru, dan dihentikan dengan 50 µL larutan penghenti yang mengandung (H₂SO₄ 0,5 M). Pelat dibaca menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot nilai rerata absorbansi standar OTA dengan % inhibisi menggunakan program excels. Konsentrasi OTA dalam sampel dihitung dengan menggunakan persamaan dari kurva kalibrasi yang dihasilkan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji homogenitas

Hasil uji homogenitas 10 kit ELISA yang dikembangkan untuk mendeteksi OTA pada pakan tercantum pada Tabel 2. Dari data tersebut dihitung *mean square between* (MSB) dan *mean square within* (MSW) menggunakan persamaan berikut:

$$MSB = \frac{\sum [(a_i + b_i) - \bar{X}_{(a_i+b_i)}]^2}{2(n-1)} = 0,0089 / 2 (10-1) = 0,0005$$

$$MSW = \frac{\sum [(a_i + b_i) - \bar{X}_{(a_i+b_i)}]^2}{2n} = 0,0089 / 2 (10) = 0,0004$$

sehingga diperoleh nilai $F_{hitung} = MSB/MSW = 1,1111$. Nilai F tabel $\alpha = 0,05 = 3,18$, sehingga nilai $F_{hitung} < F_{tabel}$. Dengan demikian diketahui bahwa 10 kit ELISA OTA yang diuji HOMOGEN.

Uji Stabilitas

Hasil uji stabilitas yang dilakukan pada minggu ke-0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, dan 40 terlihat pada Tabel 3. Berdasarkan data pada Tabel 2 dan Tabel 3 dapat dihitung:

$$|\bar{X}_i - \bar{X}_{HM}| < 0,3 \times \delta_{Hm}$$

$$0,0003 < 0,3 \times 0,02 = 0,0003 < 0,006$$

Nilai tersebut menunjukkan bahwa KIT STABIL selama penyimpanan 40 minggu (10 bulan) pada suhu 4-8°C.

Tabel 2. Hasil uji homogenitas kit ELISA Ochratoksin A (OTA)

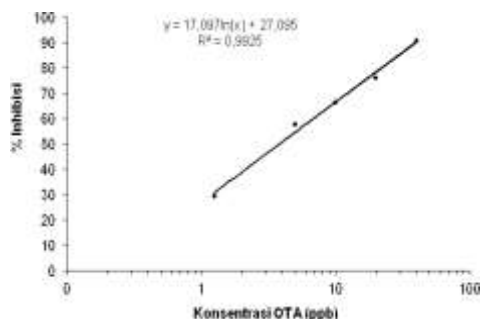
No Kit	Ulangan		(ai + bi)	(ai + bi) - X (ai + bi)	((ai + bi) - X (ai -bi)) ²
	1	2			
1	9,73	9,68	19,41	-0,05	0,00
2	9,76	9,72	19,48	0,02	0,00
3	9,72	9,74	19,46	0,00	0,00
4	9,73	9,72	19,45	-0,01	0,00
5	9,73	9,73	19,46	0,00	0,00
6	9,72	9,81	19,53	0,07	0,01
7	9,73	9,71	19,44	-0,02	0,00
8	9,74	9,73	19,47	0,01	0,00
9	9,73	9,71	19,44	-0,02	0,00
10	9,72	9,73	19,45	-0,01	0,00
rerata	9,73	9,73	19,46		
STDev (s)	0,01	0,03	0,02		
$\Sigma =$			194,59		0,01
$X (ai + bi) =$	Σ/n		19,46		

Tabel 3. Hasil uji stabilitas kit ELISA Ochratoksin A (OTA)

Minggu	Kit 1 (ppb)	Kit 2 (ppb)	Kit 3 (ppb)	rerata (ppb)	$X_i - X_{Hm}$ (ppb)
0	9,73	9,73	9,74	9,73	0,01
2	9,71	9,72	9,73	9,72	-0,01
4	9,72	9,72	9,73	9,72	0,00
8	9,74	9,71	9,74	9,73	0,00
12	9,73	9,72	9,73	9,73	0,00
16	9,74	9,72	9,74	9,73	0,01
20	9,72	9,73	9,72	9,72	0,00
24	9,74	9,73	9,72	9,73	0,00
28	9,72	9,74	9,71	9,72	0,00
32	9,73	9,73	9,71	9,72	0,00
36	9,73	9,74	9,73	9,73	0,01
40	9,74	9,75	9,73	9,74	0,01
rerata	9,729	9,728	9,728	9,728	0,0003

Analisis OTA pada pakan dan bahan pakan

Hasil analisis terhadap sampel pakan dan bahan pakan yang diperoleh dari *poultry shop* di provinsi Jawa Barat dan Lampung dengan lokasi dan jumlah sampel terlihat pada Tabel 4. Analisis sampel dilakukan secara ELISA dengan format kompetisi langsung (dc-ELISA). Kit ELISA yang dikembangkan memiliki limit deteksi sebesar 0,10 ppb. Konsentrasi OTA dalam sampel dihitung menggunakan persamaan garis yang dihasilkan dari kurva kalibrasi standar (Gambar 1).



Gambar 1. Kurva kalibrasi standar Ochratoxin A (OTA)

Tabel 4. Konsentrasi Ochratoxin A (OTA) pada sampel pakan dan bahan pakan unggas asal provinsi Jawa Barat dan Lampung

No.	Lokasi Sampling	rerata OTA (ppb)		
		Pakan	Jagung	Dedak
1.	Provinsi Jawa Barat:			
	Depok	-	14,97 (n=22)	1,12 (n=17)
	Tangerang	-	20,83 (n=18)	0,94 (n=6)
	Bekasi	-	19,61 (n=25)	2,12 (n=9)
	Bogor	-	13,02 (n=87)	4,49 (n=20)
2.	Provinsi Lampung:			
	Pringsewu	8,29 (n=28)	26,10 (n=17)	7,27 (n=4)
	Lampung Selatan	6,24(n=38)	6,00 (n=20)	0,45 (n=6)
	Bandar Lampung	23,13 (n=20)	4,48 (n=11)	0,13 (n=6)

Perhitungan konsentrasi OTA pada sampel lapang berdasarkan persamaan garis $y = 17,097 \ln(x) + 27$, sehingga diperoleh hasil pengujian seperti yang terlihat pada Tabel 4. Hasil tersebut menunjukkan bahwa OTA terdeteksi pada semua sampel asal provinsi Jawa Barat dan Lampung. Kisaran konsentrasi OTA pada

sampel pakan, adalah 2,32-62,51 ppb, jagung 0,13-83,90 ppb, dan dedak 0,10-13,90 ppb. Keseluruhan kisaran konsentrasi OTA pada sampel-sampel tersebut baik yang berasal dari Provinsi Jawa Barat maupun Lampung masih berada di bawah batas maksimum residu (BMR) untuk pakan unggas, yaitu 100 ppb (European 2016), sehingga pakan tersebut aman untuk ayam. Kisaran konsentrasi OTA yang terdeteksi pada pakan dan bahan pakan ayam tersebut lebih rendah jika dibandingkan dengan konsentrasi OTA yang dilaporkan oleh Gumus et al. (2018) yaitu 8,40-96,30 ppb. Demikian juga jika dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan oleh Krnjaja et al. (2014) yang mendeteksi OTA dalam pakan ayam pedaging dan ayam petelur dengan rerata konsentrasi 34,40 ppb dan 43,89 ppb. Sementara itu, Al Khalaileh (2018) juga melaporkan adanya kontaminasi alami OTA pada jagung (50%) dan pakan ayam (100%) dengan rerata konsentrasi berturut-turut $2,35 \pm 0,32$ ppb dan $10,30 \pm 0,59$ ppb.

KESIMPULAN

Kit ELISA yang dikembangkan memiliki homogenitas dan stabilitas yang memenuhi persyaratan. Hasil uji stabilitas menunjukkan bahwa kit masih stabil selama penyimpanan 10 bulan. Berdasarkan hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa masa kedaluarsa kit ELISA OTA yang dikembangkan lebih dari 6 bulan, di mana pada umumnya kit komersial memiliki waktu kedaluarsa selama 6 bulan dari sejak diproduksi. Kit juga dapat diaplikasikan untuk mendeteksi OTA pada sampel pakan dan bahan pakan yang dikoleksi dari lapang dengan hasil di bawah BMR. Meskipun konsentrasi OTA pada sampel yang diperiksa masih dalam batas aman untuk ayam, namun tetap perlu diwaspadai karena efek immunosupresi masih dapat terjadi pada konsentrasi rendah. Selain itu, kemungkinan adanya kontaminasi bersama OTA dengan mikotoksin lainnya juga perlu diantisipasi karena dapat meningkatkan toksisitas OTA pada ternak.

Meskipun kit ELISA yang dikembangkan ini telah divalidasi, akan tetapi masih perlu dilakukan uji banding antar laboratorium untuk memastikan *robustness* dari kit tersebut dalam mendeteksi OTA pada pakan dengan kondisi yang berbeda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala BB Litvet, Kabid Program dan Tim Ilmiah yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk melaksanakan kegiatan penelitian ini. Selain itu, terima kasih yang sebesar-besarnya juga kami ucapkan kepada Dinas Peternakan Bogor, Tangerang, Bekasi, dan Kotip Depok, Pringsewu, Lampung Selatan, dan Bandar Lampung yang telah memberikan izin untuk dapat melakukan pengambilan sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Abad S, Joshaghani H, Nejabat M, Rahimzadeh H, Niknejad F, Kiaie M. 2016. Ochratoxin A in Cow's milk collected from cattle farms of Golestan Province. *Med Lab J*. 10:13-16.
- Al Khalaileh NI. 2018. Prevalence of ochratoxin a in poultry feed and meat from Jordan. *Pakistan J Biol Sci*. 21:239-244.
- Azizi I, Rahimi K, Shateri S. 2012. Ochratoxin: Contamination and toxicity (A review). *Glob Vet*. 8:519-524.
- Battacone G, Nudda A, Pulina G. 2010. Effects of Ochratoxin A on Livestock Production. *Toxins (Basel)*. 2:1796-1824.
- Bui-Klimke TR, Wu F. 2015. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. [place unknown].
- Dehghan P, Pakshir K, Rafiei H, Chadeganipour M, Akbari M. 2014. Prevalence of ochratoxin A in human milk in the Khorrambid Town, Fars Province, south of Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 7:1-4.
- Denli M, Perez JF. 2010. Ochratoxins in feed, a risk for animal and human health: Control strategies. *Toxins (Basel)*. 2:1065-1077.
- Duarte SC, Lino CM, Pena A. 2011. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. *Vet Microbiol* 154:1-13.
- European C. 2016. Commission Regulation (EC) No 2016/1319 of 29 July 2016-amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food. *Off J Eur Union*. 73:58-60.
- Gumus R, Ercan N, Imik H. 2018. Determination of Ochratoxin A levels in mixed feed and feed stuffs used in some laying hens and ruminants enterprises of Sivas city. *J Poult Sci*. 20:85-90.
- Ha TH. 2015. Recent advances for the detection of ochratoxin A. *Toxins (Basel)*. 7:5276-5300.
- Hampikyan H, Bingol EB, Colak H, Cetin O, Bingol B. 2015. Determination of ochratoxin a in baby foods by ELISA and HPLC. *Acta Aliment*. 44:578-584.
- Heussner AH, Bingle LEH. 2015. Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins (Basel)*. 7:4253-4282.
- Hope JH, Hope BE. 2012. A review of the diagnosis and treatment of ochratoxin a inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *J Environ Public Health*. 2012:1-10.
- Kamali A, Mehni S, Kamali M, Sarvtin M. 2017. Detection of ochratoxin A in human breast milk in Jiroft city, south of Iran. *Curr Med Mycol*. 3:1-4.

- Krnjaja V, Pavlovski Z, Lukic M, Skrbic Z, Stojanovic L, Bijelic Z, Mandic V. 2014. Fungal contamination and natural occurrence of ochratoxin A (OTA) in poultry feed. *Biotechnol Anim Husbandry* Biotehnologija u Stoc. 30:481-488.
- Mally A. 2012. Ochratoxin a and mitotic disruption: Mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. *Toxicol Sci.* 127:315-330.
- Marin DE, Motiu M, Pistol GC, Gras MA, Israel-Roming F, Calin L, Stancu M, Taranu I. 2016. Diet contaminated with ochratoxin A at the highest level allowed by EU recommendation disturbs liver metabolism in weaned piglets. *World Mycotoxin J.* 9:587-596.
- Meulenber EP. 2012. Immunochemical methods for ochratoxin A detection: A review. *Toxins (Basel).* 4:244-266.
- Pattono D, Gallo PF, Civera T. 2011. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chem.* 127:374-377.
- Pietruszka K, Piątkowska M, Jedziniak P. 2017. Occurrence of ochratoxin a in animal tissues and feeds in Poland in 2014-2016. *J Vet Res.* 61:483-487.
- Skarkova J, Ostry V, Malir F, Roubal T. 2013. Determination of Ochratoxin A in Food by High Performance Liquid Chromatography. *Anal Lett.* 46:1495-1504.
- Wang Y, Wang L, Liu F, Wang Q, Selvaraj JN, Xing F, Zhao Y, Liu Y. 2016. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins (Basel).* 8:1-15.
- WHO. 2002. Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva.
- WHO. 2007. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: sixty-eighth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva.

DISKUSI

Pertanyaan

1. *Pertanyaan: Jamur penghasil okratoksin apa yang mendominasi pada pakan ternak.*
4. *Pertanyaan: Mungkin ibu bisa menjelaskan kerusakan yang spesifik pada ginjal yang disebabkan okratoksin seperti apa?*

Jawaban

1. *Kapang penghasil okratoksin yang mendominasi dalam pakan ternak adalah *Aspergillus ochraceus*. Selain menghasilkan okratoksin, kapang tersebut juga memproduksi aflatoksin, sehingga keberadaan kedua mikotoksin dalam pakan dikhawatirkan akan meningkatkan toksisitas pada ternak.*

2. *Pada ternak ayam, efek okratoksin pada ginjal menyebabkan edema dan nekrotik pada tubul (tubular necrotic). Pada manusia, okratoksin mengakibatkan terjadinya focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) pada ginjal.*