

Pengembangan *Indirect Dipstick ELISA* untuk Deteksi Aflatoxin B₁ pada Pakan dan Jagung

Sri Rachmawati, Prima Mei Widiyanti, Hasim Munawar

Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl. R E Martadinata 30, Bogor
Email: srizai@hotmail.com

Diterima Maret 2013 disetujui untuk diterbitkan Mei 2013

Abstract

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is an immunological method can be used to analyze aflatoxin B₁ (AFB₁) in feed. *ELISA* technique must be done by using an instrument (*ELISA reader*) which is not effective when used in the field. Therefore, the simple *ELISA* technique is needed such as *indirect dipstick ELISA (d-ELISA)*. The aim of research is to develop AFB₁ screening method using *d-ELISA*. The research is focusing on development and validation of *indirect d-ELISA*, and its application on sample of feed and corn. The results showed that the best *coating* time for antigen AFB₁-BSA (0,4 ug/ml) is 24 hours, reaction time for antibody anti AFB₁ (1/800) and AFB₁ standard is 15 minutes, and reaction time for *goat anti rabbit*-HRPO conjugate 1/2500 and substrate of orthodiasianin (ODN) is 20 minutes. The results of *indirect d-ELISA* on 22 samples are found that 7 samples are contaminated by AFB₁ with concentration above 20 ng/g and 7 samples are contaminated by AFB₁ with concentration in the range of 0 – 20 ng/g. Finally, it is concluded that the *indirect d-ELISA* is applicable to be used in the fields.

Key words: feed, aflatoxin B₁ (AFB₁), indirect d-*ELISA*

Abstrak

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah metode imunologi yang dapat digunakan untuk menganalisis aflatoxin B₁ (AFB₁) pada pakan. Teknik *ELISA* harus dilakukan dengan menggunakan instrumen (*ELISA reader*) yang tidak efektif pada saat digunakan di lapangan. Oleh karena itu, suatu teknik *ELISA* sederhana diperlukan seperti *indirect dipstick ELISA (d-ELISA)*. Penelitian ini terfokus pada pengembangan dan validasi *indirect d-ELISA*, dan aplikasinya pada sampel pakan dan jagung. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa waktu *coating* terbaik untuk antigen AFB₁-BSA (0,4 ug/ml) adalah 24 jam, waktu reaksi untuk antibody anti AFB₁ (1/800) dan AFB₁ standar adalah 15 menit, dan waktu reaksi untuk *goat anti rabbit*-HRPO conjugate 1/2500 dan substrat orthodiasianin (ODN) adalah 20 menit. Hasil analisis *indirect d-ELISA* pada 22 sampel menunjukkan bahwa 7 sampel terkontaminasi AFB₁ dengan konsentrasi di atas 20 ng/g dan 7 sampel lainnya terkontaminasi oleh AFB₁ dengan konsentrasi antara 0 – 20 ng/g. Akhirnya, dapat disimpulkan bahwa *indirect d-ELISA* dapat diaplikasikan di lapangan.

Kata kunci: pakan, aflatoxin B₁ (AFB₁), indirect d-*ELISA*

Pendahuluan

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah metode imunologi yang melibatkan suatu enzim untuk

mendeteksi antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Pemanfaatan *ELISA* secara luas dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa toksik dalam makanan (Asensio *et al.*, 2008). Metode ini dapat digunakan

juga untuk berbagai matrik sampel (jagung, pakan, kacang, hati dan telur) dengan *ELISA* format *indirect* dan *direct microplate-ELISA (p-ELISA)* untuk mendeteksi Aflatoksin B₁ (AFB₁) (Rachmawati, 2005; Rachmawati, 2006). *ELISA* mempunyai kelebihan dibandingkan dengan alat sebelumnya yaitu kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yaitu lebih spesifik, murah, mudah, dan sensitif. Aflatoksin adalah senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari kapang, terutama oleh *Aspergillus flavus*, yang diketahui dapat membahayakan kesehatan hewan dan manusia. Diantara jenis-jenis aflatoksin yang paling banyak mendominasi di alam adalah Aflatoksin B₁ (AFB₁) dan merupakan jenis aflatoksin yang paling berbahaya. AFB₁ diketahui sering kali mencemari berbagai komoditas pertanian seperti kelompok sereal dan bahan pakan ternak terutama di daerah tropis dan sub-tropis yang mendukung pertumbuhan kapang dan produksi senyawa tersebut (Eraslan *et al.*, 2005).

AFB₁ juga dapat menimbulkan kerugian ekonomi karena terjadi penurunan kualitas dan kuantitas produk peternakan. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh cemaran mikotoksin terutama aflatoksin di Asia mencapai 400 juta dolar per tahun (Zanelli, 2000). Berbeda dengan di Amerika, kerugian akibat senyawa ini dapat ditaksir dari laporan tahunan kehilangan sekitar 932 juta dolar dan 446 juta dolar untuk penanggulangan dari aflatoksin (Cast, 2003). AFB₁ dilaporkan dapat menyebabkan efek toksisitas pada hewan ternak (Mani *et al.*, 2001). Efek kronis dari keracunan AFB₁ dapat menyebabkan penurunan bobot badan ternak ayam pedaging secara nyata terjadi pada pemberian pakan yang mengandung AFB₁ 200 ng/g selama 8 minggu. Selain itu, AFB₁ menyebabkan gangguan kesehatan ternak seperti pertumbuhan terhambat dan kematian, sehingga produksi ternak menurun (Muthiah *et al.*, 1998). Keberadaan aflatoksin dalam telur tetap juga berpengaruh terhadap daya tetas

maupun status kesehatan ayam yang ditetaskan. Percobaan mengenai efek berbagai dosis AFB₁ (15,6 - 250 ng) terhadap embrio (telur bertunas) ayam menunjukkan adanya gangguan perkembangan, kematian dan daya tetasnya terutama pada dosis 250 ng (Bahri *et al.*, 2005). Sedangkan residu AFB₁ dan senyawa turunannya seperti Aflatoksikol dan Aflatoksin M₁, juga ditemukan pada jaringan tubuh (daging) dan hati dari ayam yang berhasil menetas (Widiastuti *et al.*, 2003). Selain pada hewan, AFB₁ sangat berbahaya juga bagi manusia. *International Agency for Research on Cancer (IARC)* mengklasifikasikan aflatoksin sebagai salah satu penyebab kanker pada manusia sehingga AFB₁ diklasifikasikan dalam grup 1 (bahan yang bersifat karsinogenik terhadap manusia) (IARC, 1993). AFB₁ dapat menyebabkan kanker hati yang akut dan secara epidemiologi melalui *biomarker*, pengaruh AFB₁ dengan kanker hati menunjukkan korelasi positif (Probst *et al.*, 2007; Groopman *et al.*, 2005).

Pencemaran pakan oleh aflatoksin banyak juga dilaporkan di Indonesia. Status cemaran AFB₁ di Propinsi Lampung dan Jawa Timur menunjukkan tingkat kejadian 100% untuk pakan komersial dan jagung asal Jawa Timur. Selain itu, tingkat kejadian 86,7% dan 70% untuk jagung dan pakan komersial asal Lampung (Bahri *et al.*, 2005). Sedangkan, hasil pengujian mikotoksin pada jagung lokal (Jawa, Sumatera Utara, Lampung dan Sulawesi Selatan) maupun impor (USA dan Argentina) asal berbagai pabrik pakan di Indonesia yang diuji secara *ELISA* menunjukkan bahwa AFB₁ terdeteksi pada kisaran konsentrasi 19,1 - 87,4 ng/g (Tangendjaja *et al.*, 2008). Sehingga, keadaan di atas bertentangan dengan SNI tentang batas kadar aflatoksin yang dipersyaratkan yaitu 20 ng/g untuk pangan dan 50 ng/g untuk pakan (Dewan Standardisasi Nasional, 2000).

Penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan metode skrining AFB₁ menggunakan *indirect dipstick ELISA (d-*

ELISA) yang menggunakan prinsip relatif sama dengan *p-ELISA*. Namun, *p-ELISA* memerlukan alat *ELISA reader* sebagai alat ukurnya sehingga membutuhkan tenaga teknis yang handal untuk pengoperasiannya dan juga tidak efektif digunakan di lapang sedangkan *d-ELISA* sebaliknya tidak perlu alat ukur dan tidak perlu teknis yang handal. Oleh karena itu, *d-ELISA* mempunyai keuntungan yaitu biaya analisis relatif murah, mudah dilakukan dan dapat diaplikasikan di lapang (Zheng *et al.*, 2006).

Materi dan Metode

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah antibodi anti AFB₁ (Produksi Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet)) (Rachmawati *et al.*, 2004), Antigen AFB₁-BSA SIGMA, dan konjugat *goat anti rabbit-HRPO SIGMA*, TMB dan ODN. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode purposive sampling dengan jumlah yang disesuaikan dengan jumlah maksimum adalah 22 sampel yang disesuaikan menurut Isaac dan Michael (Isaac and Michael, 1995).

Sensitifitas antibodi anti AFB₁ tes, indirect p-ELISA

Metode analisis dengan *p-ELISA* dilakukan dengan *coating* 100 µl (10 µg/ml) antigen AFB₁-BSA dalam *microplate*, diinkubasi semalam, dicuci dengan akuades, *di blocking* dengan 200 µl *skim milk* (2,5%) selama 2 jam, dicuci dengan akuades, ditambahkan 100 µl antibodi anti AFB₁ yang di tes, selanjutnya diinkubasi selama 1 jam, *plate* di cuci kembali dan ditambahkan konjugat *goat anti rabbit-HRPO* (1/2500) selama 1 jam, dicuci dengan akuades, direaksikan dengan 100 µl substrat tetrametilbenzidin (TMB) selama 30 menit, ditambah 50 µl H₂SO₄ 2,5 M, diukur *optical density* (OD) dengan *ELISA reader*.

Optimasi waktu uji indirect d-ELISA

Stick dicelupkan pada 400 µl larutan AFB₁-BSA 0,4 µg/ml dan diinkubasi semalam. Kemudian, *stick* dicuci menggunakan air keran, *di blocking* dengan susu skim 2,5% dalam PBS, dan diinkubasi selama 2 jam. Selanjutnya, *stick* dicuci, dicelupkan pada campuran antibodi anti AFB₁ (1/800) dan standar AFB₁ (0, 20 dan 50 ng/g) atau *spike* ekstrak sampel (0, kontrol negatif dan 20 ng/g serta 50 ng/g, positif AFB₁) atau ekstrak sampel, selanjutnya diinkubasi 10-60 menit. Setelah itu, *stick* dicuci, ditambah konjugat *goat anti rabbit-HRPO* (1/2500) dan diinkubasi 10-30 menit. Kemudian, *stick* dicuci, dicelupkan kembali kedalam larutan substrat ODN selama 10-30 menit, dan diamati warna yang menempel pada *stick*. Makin tinggi analit AFB₁ yang terkandung pada sampel, warna yang terbentuk semakin pudar atau warna hilang, sedangkan warna kuning kecoklatan pada *stick* kontrol negatif paling jelas terlihat. Lamanya waktu pencelupan pada setiap tahap dipelajari dan yang memberikan respon cepat dan sensitif dipilih. Evaluasi warna yang terbentuk/terlihat menempel pada *stick*, dilakukan dengan memberikan tanda (simbol) sbb:

* = terlihat warna kuning kecoklatan sedikit menempel pada *stick*.

**= terlihat warna kuning kecoklatan lebih banyak menempel pada *stick*

Tidak ada bintang (-) = tidak terbentuk warna

Validasi metode

Validasi metoda dilakukan dengan membuat *spiked sample* dengan menambahkan standar AFB₁ konsentrasi 50 ng/g pada matrik sampel jagung dan pakan dan menggunakan prosedur seperti pada bagian pengembangan metode.

Analisis sampel dengan indirect d-ELISA

Sampel ditimbang 5 g jagung atau pakan, dimasukkan dalam tabung sentrifugasi, ditambahkan 25 ml metanol 60%, dikocok, disentrifus, diambil lapisan atas untuk dianalisis dengan *d-ELISA*

(sesuai prosedur pada bagian optimasi *d-ELISA*).

Analisis sampel dengan *direct p-ELISA*

Metode analisis dengan *p-ELISA* dilakukan dengan *coating* 100 μ l antibody-anti AFB₁ dalam *microplate*, diinkubasi semalam, dicuci dengan akuades, diblokir dengan 200 μ l *skim milk* selama 2 jam, dicuci dengan akuades, direaksikan 75 μ l campuran sampel dan konjugat *goat*

anti rabbit-HRPO (1:2) selama 1 jam, dicuci dengan akuades, direaksikan dengan 100 μ l substrat TMB selama 30 menit, ditambah 50 μ l H₂SO₄ 2,5 M, diukur nilai OD dengan *ELISA reader*, dan dihitung persen inhibisinya dengan rumus. Kadar AFB₁ dihitung dengan membandingkan % inhibisi sampel dan % inhibisi seri standar AFB₁ pada linier kalibrasi (Rachmawati *et al.*, 2012).

$$\% \text{ Inhibisi Standar} = \left\{ 1 - \frac{A_{\text{standar}} - A_{\text{blanko standar}}}{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko standar}}} \right\} \times 100$$

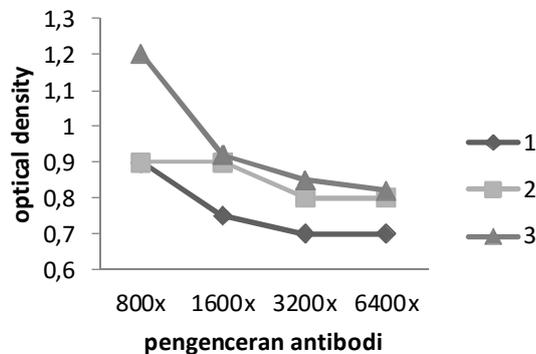
$$\% \text{ Inhibisi Sampel} = \left\{ 1 - \frac{A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko standar}}}{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko standar}}} \right\} \times 100$$

Hasil dan pembahasan

Sensitifitas antibodi anti AFB₁ tes, *indirect p-ELISA*

Penelitian pengembangan *d-ELISA* diawali dengan pengujian sensitifitas antibodi yang dilakukan secara *indirect p-ELISA*. Hasil pengujian ditunjukkan pada

Gambar 1, bahwa antibodi-anti AFB₁ (terutama kode 2 dan 3) masih dapat digunakan untuk pengembangan *d-ELISA*. Nilai OD antibodi masih cukup tinggi yaitu berkisar 0,9 - 1,2 untuk penggunaan pada pengenceran 800-1600 kali.



Gambar 1. Respon aktifitas antibodi-anti AFB₁(nilai OD) pada berbagai pengenceran

Figure 1. Antibody anti AFB₁ activity response (OD value) on variety of dilution factor

Optimasi waktu uji *indirect d-ELISA*

Waktu kondisi optimum dari metode *d-ELISA* diketahui yaitu waktu *coating* antigen AFB₁-BSA (0,4 μ g/ml) adalah 24 jam, waktu pencelupan dalam antibodi anti AFB₁(1/800) (AB) dan standar AFB₁ 20 dan 50 ng/g adalah 15 menit, waktu

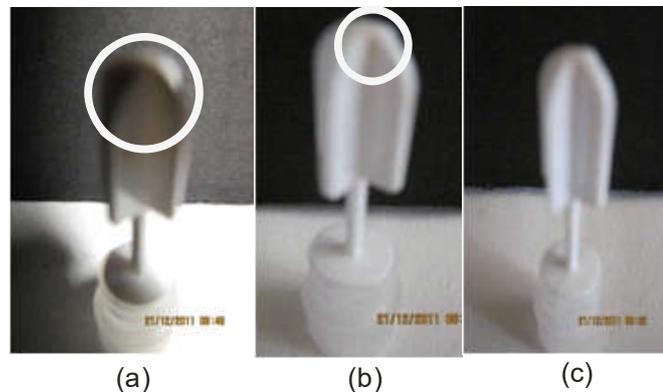
pencelupan dalam konjugat *goat anti rabbit-HRPO* 1/2500 dan substrat masing-masing 10 menit, sehingga total waktu uji yang diperlukan adalah 35 menit. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Waktu optimum reaksi antibodi,, standar AFB₁ dan konjugat pada pengembangan uji *d-ELISA*Table 1. Optimization time of reaction between antibody, AFB₁ standard and conjugate on development of *d-ELISA*

Waktu inkubasi (menit) AB + std AFB ₁	Waktu inkubasi (menit) Konjugat (1/2500)	Pengamatan warna			+ substrat (terbentuk warna pada menit ke-
		Negatif AFB ₁	Positif AFB ₁		
			20 ng/g	50 ng/g	
60	30	**	*	(-)	5
30	15	**	*	(-)	5
15	10	**	*	(-)	10

Keterangan: AB= Antibodi anti AFB₁, **= stick berwarna kuning kecoklatan; *= warna memudar; (-) = tidak berwarna

Selain waktu optimum, hasil pengamatan visual menunjukkan terbentuknya warna kuning kecoklatan pada *stick* sebagai kontrol negatif yang menunjukkan tidak adanya AFB₁, dan warna semakin memudar pada stick sebagai kontrol positif yang menunjukkan naiknya konsentrasi AFB₁. Visualisasi pembentukan warna pada stick dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 2. *d-ELISA* kondisi optimum (a) Kontrol negatif (tidak ada AFB₁), stick berwarna kecoklatan (**), (b) AB + 20 ng/g AFB₁, stick berwarna sedikit coklat (*), dan (c) AB + 50 ng/g AFB₁, stick tidak berwarna (-)

Figure 2. Optimum condition of *d-ELISA*. a) Negative control, stick was colored (**), (b) AB + 20 ng/g AFB₁, stick was less colored (*), dan (c) AB + 50 ng/g AFB₁, stick was not colored (-)

Validasi Metode

Validasi uji *d-ELISA* dilakukan dalam matrik sampel jagung dan pakan yang tidak mengandung aflatoxin. Sampel-sampel tersebut diekstrak dalam metanol 60%, kemudian ditambahkan (*spiked*) standar AFB₁ 50 ng/g, selanjutnya sampel

spiked tersebut dianalisis secara *d-ELISA* pada kondisi optimum. Hasil validasi menunjukkan bahwa dari sampel *spiked* matriks jagung, hanya satu dari tiga ulangan yang memberikan sedikit warna kecoklatan. Sedangkan pada sampel *spiked* matrik pakan, semua perlakuan

menunjukkan tidak berwarna. Berdasarkan hasil tersebut, *d-ELISA* dapat mengukur konsentrasi AFB₁ 50 ng/g dalam jagung dan pakan sehingga hal ini sangat sesuai dengan yang diharapkan. Jika uji ini dianggap seperti uji *recovery* (perolehan

kembali) pada analisa kuantitatif, maka metode *d-ELISA* mempunyai validasi yang cukup baik, *recovery* sebesar 83,3%, karena 5 dari 6 perlakuan menunjukkan kesesuaian. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji validasi *d-ELISA* pada matrik sampel jagung dan pakan

Table 2. Method validation of *d-ELISA* on corn and feed samples

Uraian sampel	Hasil pengamatan warna pada <i>dipstick</i> (ulangan)		
	1	2	3
Kontrol negatif	**	**	**
<i>Spike</i> (Jagung + 50ng/g AFB ₁)	*	(-)	(-)
<i>Spike</i> (Pakan + 50 ng/g AFB ₁)	(-)	(-)	(-)

Keterangan:** = berwarna kuning kecoklatan, * = warna memudar (sedikit terlihat warna), (-) = tidak terlihat warna

Tes *d-ELISA* sudah dikembangkan untuk pengujian penyakit toksoplasma pada hewan ternak, dimana sampel yang dianalisis adalah serum (Subekti, 2007). *Rapid test* tidak hanya menggunakan *stick polystyrene*, tetapi juga menggunakan *membrane nitrocellulose* sebagai media, seperti pada deteksi cepat analisis AFB₁ pakan babi dengan melihat perbedaan intensitas warna. Kontrol negatif akan memberikan warna merah muda sedangkan kontrol positif akan memberikan warna yang memudar berdasarkan tingkat konsentrasi AFB₁ (Demulle *et al.*, 2005). Secara prinsip, pendekatan pembentukan warna pada penelitiannya cenderung memiliki kesamaan dengan penelitian yang dilaporkan pada makalah ini.

Hasil analisis sampel jagung dan pakan secara d-ELISA dan p-ELISA

Selanjutnya, metoda *d-ELISA* diuji cobakan untuk menganalisis 22 sampel dengan rincian 10 sampel jagung dari mulai kode sampel J1- J10 dan 12 sampel pakan dari mulai kode sampel P1-P12 dan

hasilnya akan dibandingkan dengan hasil pengukuran dengan *p-ELISA*.

Pada sampel jagung dan pakan, hasil uji *d-ELISA* diperoleh 7 sampel yaitu J2, J6, J7, J10, P1, P5, dan P8, mempunyai kandungan AFB₁ diatas 20 ng/g yang ditandai dengan tidak terbentuk warna pada stick (-). Sampel jagung J4, J8, dan J9 dan sampel pakan P6, P7, P11 dan P12 terbentuk sedikit warna pada stick (*) yang menunjukkan sampel tersebut mempunyai kandungan AFB₁ berada disekitar 0-20 ng/g. Sampel jagung dan pakan lainnya menunjukkan kandungan AFB₁ sangat rendah yang ditunjukkan dengan pembentukan warna pekat pada stick (**). Hasil uji *d-ELISA* pada sampel jagung dan pakan, menunjukkan bahwa semua sampel yang dianalisis mempunyai hasil yang sama jika diukur dengan *p-ELISA*. Kesesuaian ini ditunjukkan dengan adanya kesamaan dengan ketentuan pengukuran dari *d-ELISA* yaitu jika konsentrasi diatas 20 ng/g maka tidak akan memberikan warna, tetapi jika dibawah 20 ng/g maka akan memberikan warna pada *stick* dengan intensitas warna yang berbeda tergantung

dari konsentrasi AFB₁. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kandungan AFB₁ (ng/g) sampel jagung dan pakan dengan metode *d-ELISA* dan *p-ELISA*

Table 4. AFB₁ concentration of corn and feed samples (ng/g) analyzed by *d-ELISA* and *p-ELISA*

Kode sampel	<i>d-ELISA</i>	<i>p-ELISA</i>	Kode sampel	<i>d-ELISA</i>	<i>p-ELISA</i>
J1	**	Tt	P2	**	Tt
J2	(-)	34,1	P3	**	Tt
J3	**	Tt	P4	**	Tt
J4	*	10,9	P5	(-)	26,5
J5	**	Tt	P6	*	11,5
J6	(-)	26	P7	*	0,7
J7	(-)	47,2	P8	(-)	37,1
J8	*	10	P9	**	Tt
J9	*	1,9	P10	**	Tt
J10	(-)	46,8	P11	*	6,3
P1	(-)	45	P12	*	10,8

Keterangan: J = sampel jagung, P = sampel pakan, tt= tidak terdeteksi (kadar lebih kecil dari 0,3ng/g) pada pengujian dengan *p-ELISA*, ** = *stick* berwarna kuning kecoklatan (kadar AFB₁ tidak terdeteksi), * = *stick* sedikit berwarna (tt > kadar AFB₁ ≤ 20 ng/g), (-) = *stick* tidak berwarna (kadar AFB₁ > 20ng/g)

Hasil analisis AFB₁ dengan uji *d-ELISA* diatas menunjukkan bahwa metode ini dapat diaplikasikan untuk analisis sampel lapangan, sehingga mempermudah pengguna seperti peternak, petani, dan petugas karantina untuk monitoring kualitas produknya dari residu AFB₁ secara langsung.

Simpulan

Waktu kondisi optimal uji *indirect-d-ELISA* diperoleh, yaitu *coating* antigen AFB₁-BSA (0,4 µg/ml) selama, pencelupan dalam antibodi anti AFB₁(1/800) yang ditambahkan standar AFB₁ selama 15 menit, pencelupan dalam konjugat *goat anti rabbit*-HRPO (1/2500) 10 menit dan substrat 10 menit.

Indirect d-ELISA dapat digunakan untuk menganalisis 22 sampel (pakan dan jagung). Namun, aplikasi metode ini perlu terus dikembangkan dan direvisi mengingat jumlah sampel yang dianalisis

belum mempresentasikan kehandalan dari metode ini.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih perlu disampaikan kepada Kemenristek yang telah mendanai penelitian ini serta Dr. Andria Agusta yang telah memberikan saran dan kritik dalam perbaikan karya ilmiah ini.

Daftar Pustaka

- Asensio, L., Isabel G., Teresa G., Rosario M.2008. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (*ELISA*). *Food Control* 19: 1–8.
- Bahri, S., R. Maryam dan R. Widiastuti. 2005. Cemaran aflatoxin pada pakan dan bahan pakan dari Propinsi Lampung dan Jawa Timur. *J Ilmu Ternak dan Veteriner*. 10(3): 236-241.

- Bahri, S., R. Widiastuti dan Y. Mustikaningsih. 2005. Efek aflatoksin B1 (AFB1) pada embrio ayam. *J Ilmu Ternak dan Veteriner*.10(2): 160-168
- Cast.2003. Council of Agricultural Science and Technology.Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems. CAST,Ames,IA.p.139
- Dewan Standardisasi Nasional. 2000. Standar Nasional Indonesia (SNI), persyaratan kadar aflatoksin pada pangan dan pakan.
- Eraslan,G.khan, D. Epsuz, M. Akdouan, F.Pahundokuyucu, andL.Altintap.2005. The Effects of Aflatoxin and Sodium Bentonite Combined andAlone on Some Blood Electrolyte Levels in Broiler Chickens. *Turk J Vet Anim Sci*. 29:601-605
- Groopman, J.D., and T.W. Kensler. 2005. Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cance. *Toxicol.and Applied Pharmacol*. 206: 131-137.
- IARC. 1993. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Vol. 56. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lione. hal 245-395.
- Isaac, S. and Michael, W.B. 1995. *Handbook in Research and Evaluation* 3rd Edition. SanDiego CA: EdITS
- Mani, K., K. Sundaresan and K. Viswanathan. 2001. Effect of immunomodulators on the performance of petelurs in aflatoxicosis. *Indian. Vet. J*. 78 (12): 1126-1129.
- Muthiah, J., P. Reddy and N.D.J. Chandran. 1998. Effect of graded levels of aflatoksin B1 and the effect of direct fed microbials (DFM) on egg production in egg type breeders. *Indian. Vet. J*. 75 (3): 231-233.
- Demulle, B.S., S. M.D.G. De Saeger., L. Sibanda., I. B. Vetro., and C.H. Van Peteghem. 2005. Development of an immunoassay-based lateral flow *dipstick* for the rapid detectin of aflatoxin B1 in pig feed. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Belgium. p. 1-4.
- Probst, C., H. Njapau and P.J. Cotty. 2007. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. *App. Environ. Mcrobiol*. 73(8): 2762-2764.
- Rachmawati, S. 2005. Aflatoksin dalam pakan ternak di Indonesia: Persyaratan kadar dan penegembangan teknik deteksinya. *Wartazoa* 15: 26-37.
- Rachmawati, S. 2006. Pengembangan metode analisis aflatoksin B1 dalam hati ayam secara Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Pros. Seminar Nasional Peternakan dan Vetriner 2006. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Badan penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian. Bogor 5-6 September 2006. p. 783-789.
- Rachmawati, S., A. Lee, T.B. Murdiati dan I. Kennedy.2004. Pengembangan Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Teknik untuk Analisis Aflatoksin B1pada Pakan Ternak.*Prosiding Seminar Parasitologi dan Toksikologi Veteriner, 2004*.134-148
- Rachmawati,S. dan H. Munawar. 2012. Validation of Analysis of Aflatoxin B1 in Corn using Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Proceeding of National Seminar*

- for Standardization. 2012 p 97 - 108
- Subekti,, D.T. 2007. Laporan akhir penelitian. Balai Besar Penelitian Veteriner. p. 8-13.
- Tangendjaja,B; s. Rachmawati and E. WINA. 2008. Mycotoxin contamination on corn used by feed mills in Indonesia. *Indon. J. Agric. Sci.*9(2): p.68-76
- Widiastuti, R., Darminto,S. Bahri dan R. Firmansyah. 2003. Inokulasi aflatoksin B1 pada telur berembrio dan residunya pada ayam yang menetas. Prosiding Seminar Nasional. Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor 29-30 September 2002, hal. 462-465.
- Zanelli. 2000. Mould, bacteria and solution. *Feed Industry Service (FIS)*. Italy:2.
- Zheng, M.Z., J.L. Richard dan J. Binder. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *J. Mycophatologia* 161: 261-273