

Pakan buatan – Bagian 3: Ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus*, Lacepede 1803)

Pengguna dari RSNI ini diminta untuk menginformasikan adanya hak paten dalam dokumen ini, bila diketahui, serta memberikan informasi pendukung lainnya (pemilik paten, bagian yang terkena paten, alamat pemberi paten dan lain-lain).

© BSN 2023

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN

Email: dokinfo@bsn.go.id www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
Pendahuluan	iii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Persyaratan mutu	1
5 Metode uji	2
6 Cara pengemasan dan pelabelan	3
Lampiran A (normatif) Metode uji total karotenoid	4
Lampiran B (normatif) Metode uji melamin.....	6
Lampiran C (normatif) Metode uji kestabilan pakan dalam air	9
Lampiran D (normatif) Metode uji total aflatoksin	10
Lampiran E (normatif) Metode uji kadar nitrogen bebas	12
Bibliografi.....	14

Prakata

SNI 9043-3:2024 Pakan buatan – Bagian 3: Ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus*, Lacepede 1803) yang dalam bahasa Inggris berjudul *Artificial feed – Part 3: Koi carp (Cyprinus rubrofuscus, Lacepede 1803)* merupakan revisi dari SNI 9043-3:2022 tentang Pakan buatan untuk ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus* Linnaeus, 1758). Standar ini disusun dengan metode pengembangan sendiri dan ditetapkan oleh BSN Tahun 2024.

Revisi Standar ini meliputi :

1. Perubahan nama latin dari *Cyprinus rubrofuscus* Linnaeus, 1758 menjadi *Cyprinus rubrofuscus* Lacepede, 1803;
2. Penambahan acuan normatif;
3. Perubahan dalam penggunaan istilah definisi;
4. Perubahan persyaratan mutu I, II dan III menjadi hanya satu persyaratan mutu;
5. Perubahan persyaratan mutu pada nilai total karotenoid, menambahkan persyaratan total melamin dan logam berat;
6. persyaratan nilai kadar protein, lemak, serat kasar, abu, dan nitrogen bebas yang sebelumnya adalah persyaratan yang harus dipenuhi menjadi persyaratan yang bersifat rekomendasi;
7. Penambahan metode uji total melamin;
8. Penyempurnaan lampiran normatif sesuai metode uji yang digunakan untuk pengujian pakan.

Standar ini merupakan bagian seri SNI Pakan buatan yang terdiri dari beberapa bagian yaitu:

- SNI 9043-1 Pakan buatan – Bagian 1: Udang windu (*Penaeus monodon*, Fabricius 1978);
- SNI 9043-2 Pakan buatan – Bagian 2: Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931);
- **SNI 9043-3:2024 Pakan buatan – Bagian 3: Ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus* Lacepede, 1803);**
- SNI 9043-4 Pakan buatan – Bagian 4: Ikan lele (*Clarias* spp.);
- SNI 9043-5 Pakan buatan – Bagian 5: Ikan mas (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758);
- SNI 9043-6 Pakan buatan – Bagian 6: Pembesaran ikan kerapu;
- SNI 9043-7 Pakan buatan – Bagian 7: Larva dan pascalarva udang penaeid;
- SNI 9043-8 Pakan buatan – Bagian 8: Ikan gurami (*Osphronemus goramy* Lac.);
- SNI 9043-9 Pakan buatan – Bagian 9: Benih ikan laut;
- SNI 9043-10 Pakan buatan – Bagian 10: Pembesaran ikan laut;
- SNI 9043-11 Pakan buatan – Bagian 11: Ikan nila (*Oreochromis* spp.);
- SNI 9043-12 Pakan buatan – Bagian 12: Ikan patin (*Pangasius* spp.);
- SNI 9043-13 Pakan buatan – Bagian 13: Ikan bandeng (*Chanos chanos* Forsskal, 1775).

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus secara *hybrid* pada tanggal 25 April 2024 di Bogor, yang dihadiri oleh pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen dan pakar. Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 3 Juni 2024 sampai dengan 2 Juli 2024 dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas, dan ruang lingkup dari HAKI tersebut.

Pendahuluan

Standar ini dirumuskan agar dapat dipergunakan oleh pembudidaya, pelaku usaha dan instansi lainnya yang memerlukan untuk pembinaan mutu dalam rangka pendaftaran pakan ikan.

Standar ini dirumuskan sebagai upaya meningkatkan jaminan mutu, mengingat pakan buatan untuk ikan koi tersebut banyak diperdagangkan serta sangat berpengaruh terhadap kegiatan budidaya, sehingga diperlukan persyaratan teknis tertentu. Untuk itu, perlu disusun revisi SNI pakan buatan untuk ikan koi sebagai suatu standar yang berlaku nasional.

Standar ini disusun dengan memperhatikan peraturan sebagai berikut:

1. Undang-Undang Nomor 6 Tahun 2023 tentang Penetapan Peraturan Pemerintah Pengganti Undang-Undang Nomor 2 Tahun 2022 tentang Cipta Kerja menjadi Undang-Undang;
2. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2017 tentang Pembudidayaan Ikan;
3. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 2024 tentang Pengendalian Pelaksanaan Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Kelautan dan Perikanan;
4. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 4 Tahun 2023 tentang Pakan Ikan;
5. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 10/PERMEN-KP/2021 tentang Standar Kegiatan Usaha dan Produk pada Penyelenggaraan Perizinan Berusaha Berbasis Risiko Sektor Kelautan dan Perikanan;
6. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 6/PERMEN-KP/2020 tentang Penyelenggaraan Kesejahteraan Ikan pada Ikan Budidaya;
7. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 37/PERMEN-KP/2019 tentang Pengendalian Residu pada Kegiatan Pembudidayaan Ikan Konsumsi;
8. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 1/PERMEN-KP/2019 tentang Obat Ikan;
9. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 57/ PERMEN-KP/2018 tentang Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan;
10. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 35 Tahun 2016 tentang Cara Pembenihan Ikan yang Baik;
11. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor 2 Tahun 2007 tentang Cara Budidaya Ikan yang Baik.

Pakan buatan – Bagian 3: Ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus* Lacepede, 1803)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan persyaratan mutu, metode uji, cara pengemasan dan pelabelan pakan buatan ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus* Lacepede, 1803).

2 Acuan normatif

Dokumen acuan berikut sangat diperlukan untuk penerapan Standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggal, berlaku edisi terakhir dari dokumen acuan tersebut (termasuk seluruh perubahan/amendemennya)

SNI 9091-1 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 1: Kadar air

SNI 9091-2 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 2: Kadar abu

SNI 9091-3 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 3: Kadar lemak kasar metode *Soxhlet*

SNI 9091-4 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 4: Kadar protein kasar dengan metode *Kjeldahl*

SNI 9091-5 Cara uji pakan dan bahan baku pakan ikan – Bagian 5: Kadar serat kasar

SNI ISO 16634-1 Produk pangan – Penentuan kandungan nitrogen total dengan pembakaran menurut prinsip Dumas dan perhitungan kandungan protein kasar - Bagian 1: Biji-bijian dan bahan baku pakan

AOAC 975.36. *Official Methods of Analysis of AOAC International sub chapter 2 Aflatoxins in food and feed*

AOAC 977.15. *Official Methods of Analysis of AOAC International chapter 9: Mercury in fish, Alternative Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*

AOAC 999.11. *Official Methods of Analysis of AOAC International chapter 9: Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc by Atomic Absorption Spectrophotometer*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini berlaku.

3.1

pakan ikan buatan

kombinasi beberapa bahan baku pakan yang dibuat melalui suatu proses sehingga dapat dikonsumsi oleh ikan

4 Persyaratan mutu

Persyaratan mutu pakan ikan koi sesuai Tabel 1.

Tabel 1 – Persyaratan mutu pakan ikan koi

No	Jenis	Satuan	Persyaratan Mutu
1	Total karotenoid ^{a)}	mg/kg	minimal 10,0
2	Melamin ^{a)}	mg/kg	ttd
3	Logam berat:		
	- Timbal (Pb) ^{a)}	mg/kg	maksimal 5,0
	- Merkuri (Hg) ^{a)}	mg/kg	maksimal 0,5
	- Kadmium (Cd) ^{a)}	mg/kg	maksimal 1,0
4	Kestabilan pakan dalam air (15 menit) ^{a)}	%	minimal 80
5	Total aflatoksin ^{a)}	µg/kg	maksimal 20
6	Kadar air ^{a)}	%	maksimal 12
7	Protein ^{b)}	%	minimal 30
8	Lemak ^{b)}	%	minimal 5
9	Serat kasar ^{b)}	%	maksimal 5
10	Abu ^{b)}	%	maksimal 12
11	Nitrogen bebas ^{b)}	%	maksimal 0,2
^{a)} persyaratan yang harus dipenuhi ^{b)} nilai pada persyaratan ini bersifat rekomendasi, namun nilai yang tercantum pada label harus sesuai dengan nilai hasil uji			
CATATAN ttd adalah tidak terdeteksi. Melamin dinyatakan tidak terdeteksi jika hasil uji yang diperoleh di bawah nilai CC _β (< 0,5 dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 2,5 mg/kg).			

5 Metode uji

5.1 Total karotenoid

Pengujian sesuai dengan Lampiran A.

5.2 Kadar melamin

Pengujian sesuai Lampiran B.

5.3 Logam berat

Pengujian kandungan Pb dan Cd sesuai AOAC 999.11, pengujian kandungan Hg sesuai AOAC 977.15.

5.4 Kestabilan pakan dalam air

Pengujian sesuai dengan Lampiran C.

5.5 Total aflatoksin

Pengujian sesuai dengan Lampiran D dan/atau dikonfirmasi dengan AOAC 975.36.

5.6 Kadar air

Pengujian kadar air sesuai SNI 9091-1.

5.7 Kandungan nutrisi

- a) Pengujian kadar protein sesuai SNI ISO 16634-1 atau SNI 9091-4.
- b) Pengujian kadar lemak sesuai SNI 9091-3.
- c) Pengujian kadar serat kasar sesuai SNI 9091-5.
- d) Pengujian kadar abu sesuai SNI 9091-2.

5.8 Kadar nitrogen bebas

Pengujian sesuai dengan Lampiran E.

6 Cara pengemasan dan pelabelan

Pakan ikan dikemas dalam wadah tertutup rapat yang kedap air, tidak mudah rusak, tidak beracun dan tidak mengontaminasi pakan ikan, serta menjamin stabilitas dan keamanan mutu pakan ikan selama penyimpanan dan pengangkutan.

Kemasan pakan ikan harus diberi label berbahasa Indonesia dengan mencantumkan informasi paling sedikit memuat sebagai berikut:

- a) nomor sertifikat pendaftaran pakan ikan;
- b) nama perusahaan/produsen;
- c) alamat perusahaan;
- d) merek pakan ikan;
- e) jenis pakan ikan (sifat, bentuk dan tahapan budidaya);
- f) peruntukan pakan ikan;
- g) bobot bersih (neto);
- h) kandungan bahan baku pakan ikan;
- i) persentase kandungan nutrisi (protein, air, lemak, serat kasar, abu);
- j) cara penyimpanan;
- k) cara penggunaan;
- l) tanggal kedaluwarsa, dan
- m) kode produksi.

Lampiran A
(normatif)
Metode uji total karotenoid

A.1 Prinsip

Mengekstrak pigmen contoh menggunakan petroleum eter dan aseton sehingga kandungan pigmen dapat terbaca dalam spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

A.2 Peralatan

- a) blender (*homogenizer*);
- b) botol contoh;
- c) corong kaca;
- d) evaporator;
- e) labu;
- f) mortar;
- g) *round bottom flask*;
- h) spatula;
- i) spektrofotometer;
- j) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg.

A.3 Pereaksi

- a) aseton;
- b) akuades;
- c) natrium sulfat anhidrat;
- d) petroleum eter (larutan sejenis lainnya).

A.4 Prosedur kerja

- a) timbang contoh yang telah dihaluskan sebanyak 15 g, tambahkan Na_2SO_4 , gerus hingga menjadi tepung di dalam mortar;
- b) tambahkan aseton 25 mL, aduk hingga terjadi perubahan warna;
- c) pindahkan larutan aseton ke dalam *round bottom flask* menggunakan corong yang dilapisi kertas saring dan Na_2SO_4 ;
- d) prosedur tersebut diulangi hingga tidak ada pigmen yang keluar atau larutan aseton menjadi tidak berwarna;
- e) aseton dihilangkan dengan cara dievaporasi pada suhu rendah dibawah $40\text{ }^\circ\text{C}$;
- f) ekstrak yang dihasilkan dilarutkan dengan petroleum eter, kemudian dipindahkan ke labu pemisah;
- g) tambahkan akuades 40 mL secara perlahan ke dalam labu pemisah, kemudian diaduk secara perlahan selama 1 menit;
- h) lapisan eter didehidrasi dengan Na_2SO_4 ke dalam *round bottom flask*, sedangkan lapisan air ditambah 40 mL petroleum eter, kemudian diaduk perlahan selama 1 menit;
- i) lapisan eter didehidrasi lagi dengan Na_2SO_4 ke dalam *round bottom flask* pada butir h;
- j) *round bottom flask* pada butir i dievaporasi dengan suhu rendah dibawah $40\text{ }^\circ\text{C}$;
- k) hasil ekstraksi dipindahkan ke dalam labu menggunakan corong yang dilapisi kertas saring dan Na_2SO_4 , lalu ditambah petroleum eter sesuai dengan kepekatan warna karotenoid yang dihasilkan;
- l) contoh yang terdiri dari petroleum eter dibaca pada panjang gelombang 450 nm.

A.5 Perhitungan

Perhitungan total karotenoid menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total karotenoid } (\mu\text{g/g}) = \frac{A \times V \times 10^4}{A_{1 \text{ cm}}^{1\%} \times P} \quad (1)$$

Keterangan:

A adalah absorbans

V adalah total volume ekstrak (mL)

P adalah berat contoh (g)

$A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$ adalah konstanta (koefisien β -carotene Extinction dalam petroleum eter) 2592

Lampiran B (normatif) Metode uji melamin

B.1 Prinsip

Metode ini berdasarkan deteksi metabolit melamin dengan prinsip *enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*. Melamin yang terdapat dalam contoh akan berikatan dengan antibodi setelah penambahan enzim konjugat. Aktivitas ikatan enzim akan terlihat secara jelas setelah penambahan sejumlah substrat kromogenik. Nilai absorbans berbanding terbalik dengan konsentrasi melamin di dalam contoh.

B.2 Peralatan

- a) blender (*homogenizer*);
- b) *centrifuge*;
- c) labu *Erlenmeyer*;
- d) labu ukur;
- e) *microtiter plate reader* (450 nm);
- f) mikropipet (volume : 100 μL , 200 μL , dan 1.000 μL);
- g) *multi channel* pipet;
- h) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- i) tabung sentrifus polistirena 50 mL;
- j) *vortex*.

B.3 Pereaksi

B.3.1 Bahan kimia

- a) air distilasi;
- b) metanol (CH_3OH).

B.3.2 Bahan *ELISA* kit

- a) *20x wash solution*;
- b) *2x concentrated extraction solution*;
- c) enzim konjugat;
- d) larutan antibodi;
- e) larutan penghenti reaksi (*stop solution*);
- f) larutan standar sesuai dengan kit yang digunakan;
- g) *microtiter plate*;
- h) *spiking* standar;
- i) *substrate solution (solution A dan solution B)*.

B.4 Prosedur kerja

B.4.1 Ekstraksi contoh

- a) timbang 1,0 g \pm 0,01 g contoh yang sudah dihaluskan lalu masukkan ke dalam tabung sentrifus dan tambahkan 10 mL metanol, kemudian kocok selama 5 menit sampai homogen;
- b) sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 $\times g$, selama 10 menit;
- c) pindahkan 100 μL larutan di lapisan bagian atas ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian

- tambahkan 900 μL *extraction solution* dan dikocok selama 1 menit sampai homogen.
Ambil 50 μL larutan untuk analisis *ELISA*;
- d) faktor pengenceran: 100

B.5 Proses pengujian *ELISA*

- siapkan *microtiter plate* sesuai jumlah standar dan contoh yang akan diuji;
- masukkan 50 μL masing-masing larutan standar melamin ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi;
- masukkan 50 μL masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula;
- tambahkan 50 μL enzim konjugat dan 50 μL *antibody solution* ke dalam setiap *well*;
- inkubasikan *microtiter plate* selama 30 menit pada suhu ruang (20 °C sampai dengan 25 °C);
- buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu;
- bilas *microtiter plate* dengan 250 μL *washing buffer* sebanyak empat kali sampai lima kali;
- tambahkan 50 μL *solution A* dan 50 μL *solution B* ke dalam masing-masing *well*, lakukan inkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- tambahkan 50 μL *stop solution* ke dalam setiap *well*;
- homogenkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual;
- baca absorbans setiap *well* dengan *microtiter plate reader (ELISA reader)* pada panjang gelombang 450 nm dengan segera.

CATATAN Prosedur kerja disesuaikan dengan kit yang digunakan.

B.6 Perhitungan

- a) kurva kalibrasi standar melamin dapat dibuat dari pembacaan % absorbans setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/mL pada kurva logaritma;

$$\text{Absorbans (\%)} = \frac{\text{absorbans standar atau contoh}}{\text{absorbans standar 0 (B0)}} \times 100 \quad (2)$$

- masukkan hasil pembacaan % absorbans contoh ke dalam kurva kalibrasi standar;
- nilai konsentrasi melamin pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam $\mu\text{g/kg}$ setelah dikalikan faktor pengenceran 100.

B.7 Penulisan hasil uji

- hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35
15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- c) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

15,365 dibulatkan menjadi 15,36
15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- d) hasil tidak terdeteksi (tt), jika hasil uji yang diperoleh dibawah nilai $CC\beta$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 2,5 mg/kg).

Lampiran C
(normatif)
Metode uji kestabilan pakan dalam air

C.1 Prinsip

Kehilangan bobot pada perendaman dalam air dengan kondisi tertentu dianggap sebagai kadar kestabilan dalam air.

C.2 Peralatan

- a) aerator;
- b) akuarium;
- c) cawan porselen;
- d) keranjang kawat (*wire basket*), *mesh size* 1 mm;
- e) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) oven.

C.3 Cara kerja

- a) keringkan cawan dalam oven pada suhu 105 °C kemudian timbang hingga bobot konstan;
- b) timbang contoh yang telah diketahui kadar airnya dan masukkan ke dalam keranjang kawat;
- c) rendam keranjang kawat yang telah berisi contoh ke dalam akuarium yang berisi air, berikan aerasi dengan batu aerator diletakkan pada dasar akuarium;
- d) lakukan perendaman selama 15 menit untuk pakan apung dan 5 menit untuk pakan tenggelam;
- e) angkat keranjang kawat lalu pindahkan contoh ke dalam cawan yang telah dikeringkan sesuai poin a);
- f) keringkan cawan pada suhu 105 °C, kemudian timbang hingga bobot konstan;
- g) lakukan pengujian minimal duplo.

C.4 Perhitungan

$$\text{Nilai kestabilan pakan dalam air (\%)} = \frac{B}{(A \times (1 - C))} \times 100 \quad (3)$$

Keterangan:

A adalah bobot contoh awal (g)

B adalah bobot contoh setelah perendaman (g)

C adalah kadar air

Nilai kestabilan pakan dalam air merupakan rata-rata dari duplo.

**Lampiran D
(normatif)
Metode uji total aflatoksin**

D.1 Prinsip

Metode ini berdasarkan deteksi metabolit total aflatoksin dengan prinsip *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Aflatoksin bebas dalam contoh akan berikatan dengan antibodi setelah penambahan enzim konjugat. Aktivitas ikatan enzim akan terlihat secara jelas setelah penambahan sejumlah substrat kromogenik. Nilai absorbans berbanding terbalik dengan konsentrasi aflatoksin di dalam contoh.

D.2 Peralatan

- a) blender (*homogenizer*);
- b) *centrifuge*;
- c) labu *Erlenmeyer*;
- d) labu ukur;
- e) *microtiter plate reader* (450 nm);
- f) mikropipet (volume: 100 μ L, 200 μ L dan 1.000 μ L);
- g) *multi channel* pipet;
- h) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- i) tabung sentrifus polistirena 50 mL;
- j) *vortex*.

D.3 Preaksi**D.3.1 Bahan kimia**

- a) air distilasi;
- b) metanol 70 %.

D.3.2 Bahan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) kit

- a) enzim konjugat;
- b) larutan penghenti reaksi (*stop solution*);
- c) larutan standar aflatoksin sesuai dengan jenis kit yang digunakan;
- d) substrat kromogen.

D.4 Prosedur kerja**D.4.1 Ekstraksi contoh**

- a) timbang 5 g \pm 0,01 g contoh yang sudah dihaluskan lalu masukkan ke dalam tabung sentrifus dan tambahkan 25 mL metanol 70 % kemudian kocok selama 3 menit sampai dengan homogen;
- b) sentrifugasi dengan kecepatan 4.500 *r/min* (3.000 $\times g$, $r=10$ cm) selama 5 menit pada suhu 20 $^{\circ}$ C sampai dengan suhu 25 $^{\circ}$ C;
- c) ambil 100 μ L larutan untuk analisis *ELISA*;
- d) faktor pengenceran: 1,0.

D.4.2 Proses pengujian *ELISA*

- a) siapkan *microtiter plate* sesuai jumlah standar dan contoh yang akan uji;
- b) masukkan 200 μL konjugat ke dalam beberapa *well* sesuai jumlah standar dan contoh;
- c) masukkan 100 μL masing-masing larutan standar aflatoksin ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi;
- d) masukkan 100 μL masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula;
- e) pindahkan 100 μL larutan konjugat beserta standar dan contoh yang telah dihomogenkan sebelumnya ke dalam *microtiter plate* yang baru;
- f) inkubasikan *microtiter plate* selama 15 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- g) buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu;
- h) bilas *microtiter plate* dengan 250 μL air distilasi sebanyak tiga kali;
- i) tambahkan 100 μL *substrate solution* dan inkubasikan kembali selama 5 menit pada suhu 20 °C sampai dengan suhu 25 °C;
- j) tambahkan 100 μL *stop solution* ke dalam setiap *well*;
- k) homogenkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual;
- l) baca absorbans setiap *well* dengan *microtiter plate reader (ELISA reader)* pada panjang gelombang 450 nm dengan segera.

CATATAN Prosedur kerja disesuaikan dengan kit yang digunakan.

D.5 Perhitungan

- a) kurva kalibrasi standar aflatoksin dapat dibuat dari pembacaan % absorbans setiap standar dengan konsentrasi standar dalam $\mu\text{g}/\text{kg}$ pada kurva logaritma;

$$\text{Absorbans (\%)} = \frac{\text{absorbans standar atau contoh}}{\text{absorbans standar 0 (B0)}} \times 100 \quad (4)$$

- b) masukkan hasil pembacaan % absorbans contoh ke dalam kurva kalibrasi standar;
- c) nilai konsentrasi aflatoksin pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai $\mu\text{g}/\text{kg}$ setelah dikalikan faktor pengenceran 1,0.

D.6 Penulisan hasil uji

- a) hasil perhitungan dinyatakan sebagai angka desimal dengan dua angka penting di belakang koma;
- b) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi jika lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas;

CONTOH

15,352 dibulatkan menjadi 15,35
15,367 dibulatkan menjadi 15,37

- c) jika hasil perhitungan diperoleh angka desimal dari 5 (lima) yang akan dibulatkan dari angka genap yang ada didepannya, maka angka lima tersebut menjadi hilang, tetapi jika angka di depannya ganjil maka pembulatan akan ke atas;

CONTOH

15,365 dibulatkan menjadi 15,36
15,375 dibulatkan menjadi 15,38

- d) nilai tidak terdeteksi (ttd), jika hasil uji yang diperoleh di bawah nilai $\text{CC}\beta$ ($< 0,5$ dari nilai batas kandungan maksimum, sebesar 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Lampiran E
(normatif)
Metode uji kadar nitrogen bebas

E.1 Prinsip

Senyawa nitrogen yang terdapat dalam contoh diuraikan oleh NaOH, kemudian amonia yang dibebaskan diikat dengan asam borat dan dititar dengan larutan asam standar.

E.2 Peralatan

- a) buret 25 mL;
- b) gelas piala;
- c) labu *Erlenmeyer* 250 mL;
- d) labu takar;
- e) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) unit distilasi.

E.3 Pereaksi

- a) air distilasi;
- b) alkohol 95%;
- c) asam borat (H_3BO_3) 2%;
- d) asam klorida (HCl) 0,1 N;
- e) indikator bromokresol 0,1%;
- f) indikator fenolftalein;
- g) indikator metil merah 0,1%;
- h) larutan asam borat indikator (500 mL asam borat 2% dicampur dengan 5 mL larutan indikator);
- i) larutan indikator (10 mL bromokresol 0,1% dicampur dengan 2 mL metil merah 0,1%) dalam alkohol 95%;
- j) natrium hidroksida (NaOH) 30%.

E.4 Cara kerja**E.4.1 Distilasi**

- a) timbang contoh sebanyak $5\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ dan masukkan ke dalam labu didih 250 mL;
- b) tambahkan 100 mL air distilasi dan 10 mL NaOH 30%;
- c) lakukan distilasi selama 5 menit;
- d) siapkan penampung labu *Erlenmeyer* yang berisi 10 mL larutan H_3BO_3 2% yang telah dicampur larutan indikator.

E.4.2 Titrasi

- a) lakukan titrasi terhadap distilat contoh dan dengan menggunakan larutan HCl 0,1 N;
- b) titik akhir titrasi ditandai dengan adanya perubahan warna pertama kali.

E.4.3 Perhitungan

$$\text{Nitrogen bebas (\%)} = \frac{(V_c - V_b) \times N \times 0,014}{W} \times 100 \quad (5)$$

Keterangan:

- V_c adalah volume larutan HCl pada titrasi contoh (mL)
V_b adalah volume larutan HCl pada titrasi blanko (mL)
N adalah normalitas larutan HCl (mol/L)
W adalah bobot contoh (g)
0,014 adalah nilai konstanta dari bobot atom nitrogen (g/mol)

Bibliografi

- [1] [AOAC] *Association of Official Analytical Chemists*. 2019. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 21th edition. Maryland (US): *Association Analytical Communities*.
- [2] *Commision Directive 2002/32/EC. On undesirable substance in animal feed. The European Parliament and The Council*.
- [3] *Commission Regulation (EU) 2017/2229 4 December 2017 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for lead, mercury, melamine and decoquinate*.

Informasi perumus SNI 9043-3:2024

[1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua : Ir. Nono Hartanto, M.Aq.
Sekretaris : Lutfi Hardian Murtiono, S.Pi, M.Si
Anggota : Nana Sarip Sumarna Udi Putra, S.Hut., M.Si.
Anggota : Iman Indrawarman Barizi, M.Si
Anggota : Prof. Dr. Alimuddin, S.Pi.,M.Sc.
Anggota : Dr. Ir. Tatag Budiardi, M.Si.
Anggota : Prof. Dr. Dedi Jusadi
Anggota : Dr. Ir. Heny Budi Utari, M.Kes.
Anggota : Ir. Iskandar Ismanadji
Anggota : Deni Rusmawan, A.Md.
Anggota : Ir. Alfida Ahda, M.M.
Anggota : Dr. Ir. Azam B. Zaidy, M.S.
Anggota : Ir. Denny D. Indradjaja, MSIE., M.Sc.
Anggota : Ir. Hardi Pitoyo
Anggota : Deny Mulyono

[3] Konseptor Rancangan SNI

- Susi Rosellia, S.Pi., Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi
- Iis Sumartini, S.Pi, M.Si., Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi

[4] Sekretariat Pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

Direktorat Perbenihan, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Kementerian Kelautan dan Perikanan