

Aflatoksin: Cemaran dan Metode Analisisnya dalam Makanan

Nurul Aini

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Litbangkes, Kemenkes RI
email : nurul_a@litbang.depkes.go.id, aini.nurul.21@gmail.com

Abstract

Aflatoxins are a group of natural contaminant produced by Aspergillus fungi. These mycotoxins are abundant in the area with high temperature and humidity, and have been classified as a carcinogenic agent to humans by IARC. Aflatoxin contamination could be found in food such as corn, nuts, rice, and milk. This review article suggests and discusses several methods that can be used to analyze aflatoxins in food and feed. These methods include ELISA, HPLC, and TLC Densitometry. This article was made with prior search of references from the internet and scientific journals. This review is aimed to compare the ability of these methods to analyze aflatoxin in food.

Key words: *Aflatoxin, Carcinogenic, Analysis*

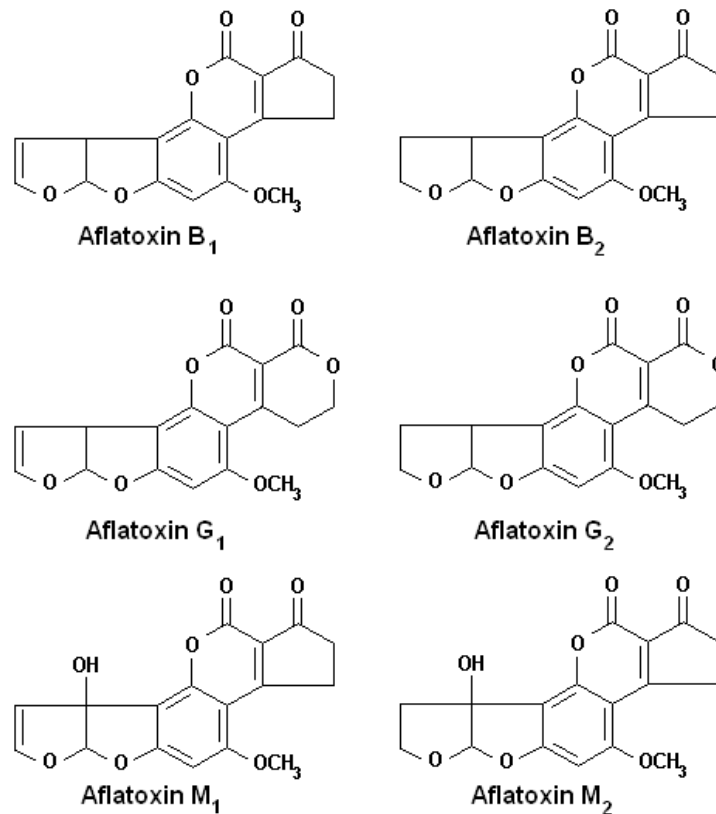
Pendahuluan

Aflatoksin merupakan cemaran alami yang dihasilkan oleh beberapa spesies dari fungi *Aspergillus* yang banyak ditemukan di daerah beriklim panas dan lembap, terutama pada suhu 27-40°C (80-104° F) dan kelembapan relatif 85%.¹ Sebagai mikotoksin, senyawa tersebut lebih stabil dan tahan selama pengolahan makanan.²

Spesies *Aspergillus* yang paling banyak ditemukan adalah *Aspergillus flavus* yang memproduksi aflatoksin B, dan *A. parasiticus* yang menghasilkan aflatoksin B dan G. Sementara itu, aflatoksin M₁ dan M₂ merupakan metabolit hasil hidroksilasi aflatoksin B₁ dan B₂ oleh sitokrom p450 1A2 pada manusia atau hewan yang mengonsumsi makanan yang

tercemar aflatoksin. Aflatoksin M dijumpai dalam air susu dan urine.³ Struktur kimia aflatoksin dapat dilihat dalam Gambar 1.

Indonesia terletak di daerah khatulistiwa yang memiliki iklim tropis dengan suhu udara dan kelembapan yang tinggi sehingga komoditas pangan dan pakan ternak sangat rentan terhadap kontaminasi aflatoksin. Jenis-jenis bahan pangan dan pakan yang rentan terhadap kontaminasi aflatoksin antara lain jagung, kacang-kacangan, beras, dan produk susu.⁴ Sementara itu, sebuah penelitian yang dilakukan di Benin, Afrika Barat mengkonfirmasi beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa aflatoksin tidak terdeteksi pada keripik singkong.⁵



Gambar 1. Struktur kimia aflatoksin

Cemaran *A. flavus* dapat terlihat antara lain dari pertumbuhan fungi yang berbentuk seperti serbuk berwarna hijau-keabuan atau hijau kekuningan.¹Ke racunan aflatoksin akibat mengonsumsi makanan yang tercemar aflatoksin dapat dicegah dengan melakukan beberapa hal, antara lain dengan menggunakan varietas tanaman prapanen yang tahan kapang toksigenik, melakukan pemilihan bahan pangan yang berkualitas baik dan tidak berkapang, serta meningkatkan manajemen bercocok tanam; memberikan pengetahuan kepada petani mengenai penanganan produk pascapanen yang baik, misalnya dengan menyimpan hasil panen pada kondisi kelembaban rendah; melakukan monitoring kadar aflatoksin pada berbagai

tahapan; mendidik petani dan konsumen agar dapat mengenali ciri-ciri produk yang tercemar aflatoksin agar tidak memilih dan mengonsumsi produk yang telah tercemar.⁶

Berdasarkan klasifikasi *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, aflatoksin termasuk dalam senyawa Kelompok 1, yakni senyawa yang bersifat karsinogenik pada manusia, terutama Aflatoxin B₁ merupakan aflatoksin yang paling toksik.⁷ Selain bersifat karsinogenik, aflatoksin juga bersifat genotoksik, hepatotoksik pada manusia, serta nefrotoksik dan immunosupresif pada hewan. Batas cemaran aflatoksin dalam makanan adalah sebesar 20 ppb dan dalam susu sebesar 0,5 ppb.^{8,9}

Metode

Kajian ini disusun dengan melakukan tinjauan pustaka terhadap tiga metode yang umum digunakan untuk menganalisis aflatoksin dalam makanan, yakni Kromatografi Lapis Tipis Densitometri (KLT Densitometri), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), dan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Preparasi sampel aflatoksin bervariasi bergantung pada metode analisisnya. Secara umum, ekstraksi aflatoksin dari sampel dilakukan menggunakan pelarut organik seperti kloroform, metanol, aseton, asetonitril, dan benzen.^{4,10}

Penanganan

Aflatoksin bersifat karsinogenik sehingga preparasi standar dan sampel harus dilakukan secara hati-hati dan dengan menggunakan berbagai perlengkapan perlindungan diri. Beberapa perlindungan yang dianjurkan untuk digunakan antara lain, jas lab atau penutup tubuh sekali pakai yang tahan terhadap bahan kimia, kacamata lab (*googles*), masker sekali pakai atau respirator, dan sarung tangan sekali pakai yang dipakai secara rangkap atau sarung tangan khusus yang tahan terhadap bahan kimia.¹¹

Kromatografi Lapis Tipis Densitometri (KLT Densitometri)

KLT densitometri merupakan metode analisis yang masih dimanfaatkan hingga saat ini. Analisis aflatoksin dilakukan menggunakan fase diam lempeng KLT silica gel 60 F₂₅₄ ukuran 20 × 10 cm dengan fase gerak kloroform-etil asetat (7:3). Deteksi dan kuantitasi dilaksanakan menggunakan alat pemindai KLT densitometri, detektor fluoresensi, pada panjang gelombang eksitasi maksimum 354 nm dan emisi 400 nm.

Metode ini mempunyai batas deteksi (*limit of detection*, LOD) untuk aflatoksin B₁ sebesar 9,62 pg dan untuk aflatoksin G₁ sebesar 10,9 pg. Sementara itu, batas kuantitasi (*limit of quantitation*, LOQ) untuk aflatoksin B₁ dan G₁ masing-masing sebesar 32,08 pg dan 36,41 pg.¹²

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Analisis aflatoksin dengan KCKT dilakukan dengan menggunakan sistem KCKT fase terbalik dengan kondisi sebagai berikut: kolom silika yang terikat dengan C-18 panjang 15 cm, fase gerak air-metanol-asetonitril (50:40:10), kecepatan alir 0,8 ml/menit, suhu ruang, volume injeksi 10 µl pada konsentrasi 0,044 mg/ml, dan detektor fluoresensi. Panjang gelombang eksitasi maksimum dan panjang gelombang emisi untuk detektor fluoresensi adalah 365 nm dan 455 nm.^{2,13}

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Prinsip dasar ELISA adalah analisis interaksi antara antigen dan antibodi yang teradsorpsi secara pasif pada permukaan padat dengan menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang dilabel enzim. Hasil dari ELISA adalah suatu warna sebagai hasil reaksi antara enzim dan substrat. Warna yang dihasilkan dapat diidentifikasi secara kasat mata dan dibaca secara kuantitatif menggunakan ELISA *plate reader* atau spektrofotometer kanal ganda. Pembacaan ini memungkinkan data diperoleh dengan cepat, dapat disimpan dan dianalisis secara statistik. Reaksi spesifik antara antigen dan antibodi, waktu analisis yang cepat, dan dapat digunakan untuk mendeteksi sampel tunggal maupun banyak sekaligus merupakan keunggulan penggunaan ELISA sebagai teknik analisis.^{14,15}

Metode ELISA umumnya digunakan untuk mendeteksi aflatoksin M_1 dalam ASI, susu cair, atau produk susu. Akan tetapi, metode ELISA juga dapat digunakan untuk menganalisis aflatoksin B_1 . Saat ini telah tersedia kit ELISA (AFM1, Neogen, RIDASCREEN) yang dapat langsung digunakan untuk identifikasi dan kuantitasi cemaran aflatoksin.^{14,16,17}

Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) telah mengembangkan perangkat analisis aflatoksin berupa kit yang terdiri atas pereaksi analisis dan program pengolahan data. Kit yang dinamakan Aflavet ini terdiri atas serangkaian standar aflatoksin B_1 , plat pencampur, plat berlapis antibodi, konjugat AFB1 HRPO pekat, pengencer konjugat larutan BSA/PBS, substrat A (dapar asetat), substrat B (tetrametilbenzidin/DMSO), dan larutan penghenti H_2SO_4 1,25 M. Kit ini telah diuji dan divalidasi penggunaannya untuk menganalisis aflatoksin pada pakan berupa kacang tanah dan jagung.^{18,19}

Selain itu, Balitvet juga telah mengembangkan metode analisis aflatoksin dalam hati ayam. Metode ini menggunakan pereaksi campuran metanol dan fosfat buffer salin (MeOH: PBS = 1 : 1). Batas deteksi metode ini adalah $0,19 + 0,03$ ppb. Metode ini menggunakan cara *spike* untuk menguji perolehan kembali. Hasil uji perolehan kembali untuk metode ini adalah sebesar 100,8%. Hal ini menunjukkan bahwa metode ini memiliki akurasi yang baik.²⁰

Hasil dan Pembahasan

Aflatoksin berfluoresensi di bawah sinar UV jauh. Aflatoksin B berfluoresensi biru sementara aflatoksin G berfluoresensi hijau. Kuantitasi aflatoksin menggunakan detektor UV tidak cukup sensitif untuk

mencapai satuan ppb sebagai batas aman dalam makanan. Oleh karena itu, digunakan detektor fluoresensi yang lebih sensitif untuk mendeteksi aflatoksin.⁹

Kromatografi Lapis Tipis Densitometri (KLT Densitometri)

Beberapa hal dapat mempengaruhi hasil analisis aflatoksin menggunakan KLT antara lain adalah plat KLT. Plat KLT berbahan silika yang digunakan biasanya memiliki ketebalan 0,25-2 mm dan harus diaktifkan terlebih dahulu pada suhu 80-120°C selama 1 jam. Bila belum digunakan, sebaiknya plat disimpan dalam desikator untuk menghindari kontaminasi lembap dan polutan.

Faktor lain yang mempengaruhi hasil analisis adalah kombinasi fase gerak. Lembap yang terkandung dalam plat KLT memiliki pengaruh yang lebih kecil pada sistem yang menggunakan fase gerak air dibandingkan pada sistem yang tidak menggunakan air.²¹

Keunggulan metode KLT Densitometri adalah preparasinya cepat, dapat digunakan untuk identifikasi maupun kuantitasi, dan biaya operasionalnya relatif murah. Sementara itu, metode KLT Densitometri hanya dapat digunakan sebatas semi kuantitatif dan waktu analisis lebih lama karena dikerjakan dua kali, yaitu elusi lempeng dan pemindaian lempeng.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Intensitas fluoresensi aflatoksin G_1 dan B_1 dapat ditingkatkan dengan memanfaatkan reaksinya dengan sejumlah reagen, seperti asam kuat dan senyawa oksidatif. Salah satu yang telah banyak digunakan adalah derivatisasi *postcolumn* dengan bromin yang diperoleh secara elektrokimia. Bromin bebas diperoleh dari KBr yang ditambahkan dalam fase gerak.

Jumlah bromin yang dihasilkan dapat dikendalikan dengan mengalirkan arus. Metode ini menggunakan kolom silika, eluen A (air yang mengandung 216 mg KBr dan 159,1 µl HNO₃) dan B (metanol) 55:45, kecepatan alir 1,0 ml/menit, arus 100 µA, suhu 40°C, dan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 360 nm dan emisi 425 nm.²² Waktu elusi dapat dipersingkat menggunakan kolom yang lebih pendek dengan ukuran partikel yang lebih kecil karena partikel yang lebih kecil dapat meningkatkan efisiensi pemisahan sampel, meningkatkan efisiensi transfer massa, serta meningkatkan plat teoritis. Dengan menggunakan metode KCKT fase terbalik, afltoksin terelusi dengan urutan aflatoksin G₂, G₁, B₂, dan terakhir B₁.^{13,22}

Penelitian lain menggunakan KCKT fase normal dengan kondisi kolom Supelcosil LC-Si, panjang 25 cm, partikel 5µm, suhu 30°C, fase gerak toluen-etil asetat-asam format-metanol (90:6:2:2), kecepatan alir 1,5 ml/menit, detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 365 nm dan emisi 425 nm.¹⁰ Urutan munculnya puncak aflatoksin pada kromatogram KCKT fase normal bertolak belakang dengan urutan pada kromatogram fase terbalik. Hal ini terjadi karena kolom yang digunakan bersifat polar sementara fase geraknya bersifat nonpolar sehingga senyawa yang lebih bersifat nonpolar akan keluar terlebih dahulu.

Walaupun analisis aflatoksin menggunakan KLT masih dilakukan hingga sekarang, analisis menggunakan KCKT lebih disukai karena waktu analisisnya yang lebih cepat, pengoperasian alat yang mudah, serta dapat dimanfaatkan dengan

baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Kekurangan dari metode KCKT adalah reagensinya yang relatif mahal karena memerlukan reagen dengan *grade* khusus untuk KCKT.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Metode ELISA memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan KCKT untuk menganalisis aflatoksin dalam kacang pistachio.²³ Akan tetapi, metode KCKT menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan metode ELISA untuk menganalisis aflatoksin dalam beberapa sampel lainnya. Dalam hal ini, HPLC memiliki kemampuan spesifik untuk membedakan jenis-jenis aflatoksin yang dianalisis, sementara ELISA hanya dapat mendeteksi aflatoksin total. Prosedur ELISA yang digunakan dalam perbandingan ini adalah dengan mempersiapkan sampel susu dan bahan makanan/pakan yang ditambahkan 100 ml larutan standar aflatoksin M₁ (0, 5, 10, 20, 40, dan 80 ppb) dan larutan standar aflatoksin total (0; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; dan 40 ppb) ke dalam *microwell holder* dengan *sampler* 10 ml dan kemudian segera diinkubasi selama 60 menit di tempat gelap pada temperatur ruangan. Sementara itu, untuk metode KCKT, sampel dilewatkan melalui sebuah kolom imunoafinitas dengan kecepatan alir satu tetes per detik. Hasil dari penelitian ini ditampilkan pada Tabel 1.²⁴

Secara singkat, perbandingan pemanfaatan metode analisis aflatoksin dalam makanan dapat dilihat dalam Tabel 2 berikut ini:

Tabel 1. Perbandingan hasil analisis aflatoksin pada berbagai sampel menggunakan metode ELISA dan KCKT

Bahan Makanan/Pakan	Aflatoksin Total menggunakan ELISA (ppb)	Aflatoksin Total menggunakan KCKT (ppb)	Selisih (ppb)
Alfalfa	0,58	0,69	-0,11
Straw (batang padi)	0,41	0,39	+0,02
Rapeseed	8,05	9,21	-1,16
Cottonseed	73,22	45,56	+27,66
Silage jagung	9,81	0,45	+9,36
Kacang kedelai	0,82	0,96	-0,14
North fish meal	1,33	2,45	-1,12
Bubur bit	0,46	0,55	-0,09
Produk susu sapi konsentrat (<i>high milk</i>)	13,16	17,2	-4,04
Produk susu sapi konsentrat (<i>mid milk</i>)	0,62	0,54	+0,08

Tabel 2. Perbandingan metode analisis aflatoksin dalam makanan

Faktor Pemanding	KLT Densitometri	KCKT	ELISA
Sensitivitas	Hingga satuan ppb	Hingga satuan ppb	Hingga satuan ppb
Spesifisitas	Mampu membedakan jenis-jenis aflatoksin	Mampu membedakan jenis-jenis aflatoksin	Aflatoksin total
Pemanfaatan	Kualitatif, semikuantitatif	Kualitatif, kuantitatif	Kualitatif, kuantitatif
Waktu analisis	Lebih lama	Cepat	Cepat
Kemampuan analisis banyak sampel sekaligus	Terbatas	Ya	Ya
Biaya analisis	Lebih murah	Lebih mahal	Lebih murah

Kesimpulan

Aflatoksin merupakan cemaran alami yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan hewan karena bersifat karsinogenik. Ada beberapa metode analisis aflatoksin dalam makanan yang dapat digunakan

sesuai dengan kemampuan laboratorium. Metode analisis tersebut adalah KLT Densitometri, KCKT, dan ELISA. Secara umum, metode KCKT memiliki kemampuan yang paling baik untuk menganalisis aflatoksin dalam makanan.

Pemilihan metode analisis dapat disesuaikan dengan ketelitian yang dibutuhkan dan kemampuan laboratorium yang dimiliki.

Daftar Rujukan

- Robertson A. Risk of Aflatoxin Contamination Increases With Hot And Dry Growing Conditions. *Integrated Crop Management IC-494* 2005; 23: 185-186.
- Huang J, Elmashni D. Analysis of Aflatoxins Using Fluorescence Detection. *Thermo Scientific Application Note 381* 2007.
- Gürbay A, Aydın S, Girgin G, Engin AB, Şahin G. Assessment of Aflatoxin M1 Levels in Milk in Ankara, Turkey. *Food Control* 2006; 17 (1): 1-4. 59
- Nguyen MT, Tozlovanu M, Tran TL, Pfohl-Leszkowicz A. Occurrence of Aflatoxin B₁, Citrinin and Ochratoxin A in Rice in Five Provinces of The Central Region of Vietnam. *Food Chemistry* 2007; 105: 42-47.
- Gnonlonfin GJB, Adjovi CSY, Katerere DR, Shephard GS, Sanni A, Brimer L. Mycoflora and Absence of Aflatoxin Contamination of Commercialized Cassava Chips in Benin, West Africa. *Food Control* 2012; 23: 333-337.
- Badan POM RI. Aflatoxin. *Food Watch: Sistem keamanan pangan Terpadu* 2007; 7.
- International Agency for Research on Cancer. Aflatoxin. *IARC Monographs* 2002; 82: 171.
- Wu F. Mycotoxin Risk Assessment for the Purpose of Setting International Regulatory Standards. *Environmental Science and Technology* 2004; 38 (15): 4049-4055.
- Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed 2000. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm077969.htm#afla>
- Supelco. Separation and Quantitation of Aflatoxins B and G Using HPLC. *Bulletin* 800 1998. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4500/4493.pdf>.
- Fischer Sci. Material Safety Data Sheet Aflatoxin B₁. Fischer MSDS ACC# 99137 2007. <https://fscimage.fishersci.com/msds/99137.htm>
- Yohanes A. Optimasi dan Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri untuk Penetapan Kadar Aflatoxin pada Makanan yang Mengandung Kacang Tanah. Depok: Universitas Indonesia; 2005.
- Barbas C, Dams A, Majors RE. Separation of Aflatoxins by HPLC: Application. *Agilent Technologies* 2005. www.agilent.com/chem
- Yusrini H. Teknik Analisis Kandungan Aflatoxin B₁ secara ELISA pada Pakan Ternak dan Bahan Dasarnya. *Buletin Teknik Pertanian* 2005; 10 (1): 16-19.
- Crowther JR. *Elisa: Theory and Practice*. New Jersey: Humana Press Inc; 1995.
- Yusrini H. Teknik Pengujian Kadar Aflatoxin B₁ pada Jagung Menggunakan Kit ELISA. *Buletin Teknik Pertanian* 2010; 15 (1): 28-32.
- Pennington JA. Aflatoxin M₁ in Milk. University of Arkansas publication FSA4018. <http://www.uaex.edu>.
- Rachmawati S. Uji Banding Antar laboratorium, Pengujian ELISA Kit Aflatoxin. Laporan Hasil Kerjasama Antara Balai Penelitian Veteriner dengan PT Sinta Prima Feedmill, PT Sierad Tbk, Balai Pengujian Mutu Pakan Ternak, dan Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional IV 2005: 2-9.
- Rachmawati S. Kit ELISA (Aflavet) untuk Deteksi Aflatoxin pada Produk Pertanian. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner* 2005.
- Rachmawati S. Pengembangan Metoda Analisis Residu Aflatoxin B₁ dalam Hati Ayam secara Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Seminar Nasional teknologi Peternakan dan Veteriner* 2006.
- Karunyavanij S. Factors affecting the TLC of aflatoxins analysis. *Mycotoxin Prevention and Control in Foodgrains* 1989. <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E0j.htm>
- Yuan L, Hamada N. Analysis of Aflatoxins by High Performance Liquid Chromatography

- with Post-coloumn Bromination. Shimadzu Asia Pacific Application Report 2004.
23. Ozaslan M, Caliskan I, Kilic IH, Karagoz ID. Application of the ELISA and HPLC Test for Detection of Aflatoxin in Pistachio. *Scientific Research and Essays* 2011; 6 (14): 2913-2917. <http://www.academicjournals.org/SRE>
 24. Pirestani A, Tabatabaei SN, Fazeli MH, Antikchi M, Baabaei M. Comparison of HPLC and ELISA for Determination of Aflatoxin Concentration in the Milk and feeds of Dairy Cattle. *Journal of Research in Agricultural Science* 2011; 7 (1): 71-78.