

Analisis aflatoksin pada pakan ayam buras dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Dhea Nanda Zainuddin¹, Hadi Purnama Wirawan², Rusmadi Rukmana¹, Hafsan^{1*}

¹Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

²Balai Besar Veteriner Maros

*Corresponding author: Jl. HM. Yasin Limpo 36 Gowa, Sulawesi Selatan, Indonesia. 92113
E-mail addresses: hafsan.bio@uin-alauddin.ac.id

Kata kunci

Aflatoksin
Aspergillus
Ayam buras
Pakan
ELISA

Keywords

Aflatoxin
Aspergillus
Local chicken
Feed
ELISA

Diajukan: 24 Juni 2022
Ditinjau: 18 Januari 2023
Diterima: 5 Maret 2024
Diterbitkan: 30 April 2024

Cara Sitasi:
D. N. Zainuddin, H. P. Wirawan, R. Rukmana, H. Hafsan, "Analisis aflatoksin pada pakan ayam buras dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)", *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, vol. 4, no. 1, pp. 1-6, 2024.

Abstrak

Aflatoksin, senyawa toksin yang umumnya dihasilkan oleh jamur *Aspergillus*, dapat membahayakan kesehatan hewan dan manusia melalui produk-produk hewani terkontaminasi. Penelitian ini mengevaluasi tingkat kontaminasi aflatoksin pada pakan ayam buras menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Mini riset dilaksanakan di Laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner Maros, Sulawesi Selatan. Pendekatan analitik kuantitatif dengan metode deskriptif digunakan untuk menyelidiki konsentrasi aflatoksin dalam sampel. Hasilnya menunjukkan nilai absorbansi sampel dan konsentrasi aflatoksin ketiga sampel pakan ayam buras menunjukkan kandungan aflatoksin berbeda, namun semuanya berada di bawah batas maksimum 20 ppb sesuai Standar Nasional Indonesia (SNI) 3144:2015. Metode ELISA terbukti efektif dan dapat diandalkan dalam mendeteksi aflatoksin dengan tingkat sensitivitas tinggi. Kesimpulan penelitian ini menegaskan bahwa ELISA adalah alat yang efektif untuk memantau kontaminasi aflatoksin dalam pakan ayam buras. Meskipun hasil saat ini memenuhi standar keamanan, pendekatan preventif dan pemantauan terus-menerus tetap penting untuk menjaga kesehatan ternak dan keamanan hasil ternak. Pengembangan metode analisis yang lebih inovatif di masa depan akan memperkuat upaya deteksi dini dan pencegahan optimal dalam penyediaan pakan yang aman dan berkualitas tinggi.

Abstract

Aflatoxin, a toxin commonly produced by *Aspergillus* fungi, poses a threat to the health of both animals and humans through contaminated animal products. This study evaluated the aflatoxin contamination levels in native chicken feed using the *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) method. Mini-research was conducted at the Pathology Laboratory of the Maros Veterinary Center, South Sulawesi. A quantitative analytical approach with a descriptive method was employed to investigate aflatoxin concentrations in the samples. The results indicated that the absorbance values of the chicken feed samples and the aflatoxin concentrations in the three samples varied, but all remained below the maximum limit of 20 ppb, as stipulated by the Indonesian National Standard 3144:2015. The ELISA method proved to be effective and reliable in detecting aflatoxin with high sensitivity. The conclusion of this research reaffirms that ELISA is an efficient tool for monitoring aflatoxin contamination in native chicken feed. While the current results meet safety standards, a preventive approach and continuous monitoring remain crucial to safeguard the health of livestock and the safety of livestock products. The development of more innovative analytical methods in the future will strengthen efforts for early

detection and optimal prevention in providing safe and high-quality feed.

Copyright © 2024. The authors. This is an open access article under the CC BY-SA license

1. Pendahuluan

Aflatoksin merupakan senyawa toksin yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur, terutama *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*. Toksin ini dapat merusak kesehatan hewan, termasuk ayam buras, dan secara tidak langsung berpotensi merugikan kesehatan manusia melalui produk-produk hewani yang terkontaminasi [1]. Ayam buras (*Gallus gallus domesticus*) merupakan salah satu sumber protein hewani penting bagi masyarakat di berbagai negara, termasuk Indonesia. Oleh karena itu, pengawasan terhadap aflatoksin pada pakan ayam buras sangat penting untuk menjaga kesehatan ternak dan mencegah risiko kontaminasi pada produk-produk hewani [2] - [4].

Penentuan konsentrasi aflatoksin dalam pakan dapat dilakukan dengan berbagai metode, dan salah satu metode yang umum digunakan adalah *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Metode ini telah terbukti efektif dalam mendeteksi aflatoksin dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Penggunaan ELISA dalam penentuan kandungan aflatoksin pada pakan ayam buras akan memberikan keunggulan dalam hal kecepatan, keakuratan, dan efisiensi biaya. Beberapa penelitian sebelumnya telah mendukung penggunaan ELISA dalam deteksi aflatoksin pada pakan ternak. Menurut Tan dkk. [5], ELISA telah berhasil digunakan untuk mengidentifikasi aflatoksin dalam sampel pakan dengan batas deteksi yang rendah. Hasil penelitian yang serupa juga ditemukan oleh Li dkk. [6], yang menunjukkan bahwa ELISA dapat menghasilkan hasil yang konsisten dan dapat diandalkan dalam penentuan kandungan aflatoksin pada pakan. Temuan ini konsisten dengan penelitian oleh Wang dkk. [7], yang menunjukkan bahwa ELISA memiliki akurasi tinggi dalam mendeteksi aflatoksin dalam berbagai jenis pakan.

Metode lain seperti kromatografi cair-kromatografi gas (HPLC-GC) juga umum digunakan untuk analisis aflatoksin, namun ELISA memberikan keuntungan dalam hal sederhana, kecepatan, dan dapat diotomatisasi. Menurut Mahato dkk. [8], ELISA dapat diandalkan sebagai metode cepat dan efisien untuk pemantauan aflatoksin dalam pakan ternak. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menerapkan metode ELISA dalam penentuan kandungan aflatoksin pada pakan ayam buras, dengan harapan dapat memberikan kontribusi pada pemantauan dan pengendalian kualitas pakan ternak, serta menjaga keamanan pangan dari potensi kontaminasi aflatoksin.

Pentingnya penelitian ini tidak hanya terletak pada keamanan pangan dan kesehatan ternak, tetapi juga pada kontribusinya terhadap pemenuhan kebutuhan protein masyarakat melalui sumber daya hewani yang sehat dan aman. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan untuk pengembangan kebijakan dan praktik pertanian yang berkelanjutan dalam menjaga kesehatan dan keamanan pangan.

2. Metode Penelitian

Mini riset ini dilaksanakan selama bulan Februari tahun 2022 di Laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner Sulawesi selatan yang berkedudukan di Kabupaten Maros. Penelitian ini merupakan penelitian analitik kuantitatif dengan pendekatan deskriptif untuk menyelidiki tingkat kontaminasi aflatoksin pada pakan ayam buras menggunakan metode ELISA. Pendekatan ini memungkinkan untuk analisis yang mendalam dan memberikan informasi yang konkret terkait konsentrasi aflatoksin dalam sampel pakan yang diuji.

Instrumentasi. Alat dan bahan yang digunakan yaitu timbangan, mortar, wadah sampel, gelas ukur 200 mL, *multichannel pipette*, corong, tabung Erlenmeyer, pH meter, *shaker*, *reservoir*, *timer*, tabung RX/ venoject dan ELISA *reader*, akuades steril, spesimen pakan ayam buras, metanol 70%, tisu, microtip, Kit ROMER AgraQuant Total, Aflatoxin Assay 4/40 serta kertas saring Whatman No.1.

Preparasi sampel. Preparasi sampel dilakukan dengan mengambil dan menimbang sebanyak 20 gram sampel pakan ayam buras dengan dihaluskan terlebih dahulu. Sampel pakan dituang ke dalam wadah yang dapat ditutup rapat dan dicampurkan dengan 100 mL methanol 70% (perbandingan sampel dengan larutan pengestrak 1:5) hingga homogen dengan cara dikocok agar tercampur selama 3 menit. Sampel tersebut lalu didiamkan hingga menghasilkan endapan di dasar wadah. Supernatan yang dihasilkan disaring dengan kertas Whatman No. 1, hasil filtrasinya ditampung dan diukur pH nya hingga berkisar 6-8. Hasil filtrasi siap diuji lanjut selanjutnya diencerkan dua kali menggunakan metanol 70%.

Analisis kadar aflatoksin. Analisis kadar aflatoksin dengan metode ELISA dilakukan dengan mempersiapkan terlebih dahulu *well* yang hendak dipakai sebagai sampel (sebanyak 5 standar yang akan digunakan, yaitu: 0; 4; 10; 20; dan 40 ppb). *Well* tersebut dimasukkan pada *holden* dan ditambahkan sebanyak 200 μ L *conjugate* (bertutup hijau) ke dalam *well* pengencer. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 100 μ L standar/ sampel ke *well* pengencer, lalu dikocok hingga benar-benar homogen. Sebanyak 100 μ L campuran yang dihasilkan dipindahkan ke *well* ELISA dan diinkubasi hingga 15 menit pada suhu ruangan dalam kondisi didiamkan untuk memberikan waktu terhadap reaksi antara aflatoksin dalam sampel dengan antibodi yang terdapat dalam reagen. *Well* selanjutnya dibilas untuk menghilangkan bahan-bahan yang tidak terikat dan meningkatkan spesifisitas reaksi dengan air deionisasi atau destilat setelah membuang isi *well* hingga 5x. Air bilasan terakhir kemudian dibuang dan pengeringan dilakukan dengan tisu. 100 μ L substrat kemudian ditambahkan dan diinkubasi lagi pada suhu ruangan selama 5 menit. Selanjutnya penambahan larutan *stop solution* 100 μ L. Pengukuran absorbansi pada ELISA *Reader* dilakukan dengan panjang gelombang 630 nm. Absorbansi yang diukur akan berkorelasi dengan konsentrasi aflatoksin dalam sampel pakan yang diuji. Kurva kalibrasi kemudian dibuat untuk mengkonversi pembacaan absorbansi menjadi konsentrasi aflatoksin dalam sampel pakan.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil Penelitian

Pengukuran kadar aflatoksin dalam pakan ayam buras dilakukan dengan penentuan absorbansi yang diukur pada panjang gelombang 630 nm, dan hasilnya dicocokkan dengan nilai absorbansi standar untuk menentukan konsentrasi aflatoksin dalam sampel. Pengukuran kadar aflatoksin ini penting untuk memastikan keamanan pangan dan kesehatan ternak. Hasil yang diperoleh dari metode ELISA memberikan informasi yang dapat digunakan untuk evaluasi risiko kontaminasi aflatoksin dalam produksi pakan ayam buras.

Tabel 1. Nilai absorbansi sampel pakan ayam buras dengan metode ELISA

No	Sampel	Absorbansi	Total Aflatoksin (ppb)	ELISA Aflatoksin
1.	0 ppb std	1,347	0,00	-
2.	4 ppb std	1,175	3,64	-
3.	10 ppb std	0,574	11,18	-
4.	20 ppb std	0,209	21,83	-
5.	40 ppb std	0,087	35,99	-
6.	1	0,709	8,76 × 2	17,52
7.	2	0,890	6,62 × 2	13,24
8.	3	0,765	8,98 × 2	17,96

3.2 Pembahasan

Data pada Tabel 1 menunjukkan hasil pengukuran kadar aflatoksin dalam sampel pakan ayam buras menggunakan metode ELISA. Pengukuran dilakukan dengan mengukur absorbansi pada berbagai konsentrasi standar (0 ppb, 4 ppb, 10 ppb, 20 ppb, dan 40 ppb) serta sampel pakan ayam buras yang diidentifikasi sebagai Sampel 1, Sampel 2, dan Sampel 3. Standar yang digunakan sebagai pembanding memberikan nilai absorbansi yang berkorelasi dengan konsentrasi aflatoksin tertentu (0 ppb, 4 ppb, 10 ppb, 20 ppb, dan 40 ppb). Hasilnya menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi aflatoksin dalam sampel, semakin rendah nilai absorbansi yang tercatat.

Sampel 1, Sampel 2, dan Sampel 3 memberikan hasil absorbansi masing-masing pada panjang gelombang yang sama. Dengan memanfaatkan kurva kalibrasi yang dibentuk oleh standar, nilai absorbansi sampel dapat dihubungkan dengan konsentrasi aflatoksin yang setara. Hasil ini menunjukkan bahwa ketiga sampel pakan ayam buras tersebut memiliki kandungan aflatoksin yang berbeda, dengan Sampel 1 memiliki konsentrasi sekitar 17,52 ppb dan Sampel 2 memiliki konsentrasi sekitar 13,24 ppb dan sampel 3 dengan kadar 17,96 ppb.

Hasil analisis kadar aflatoksin pada sampel pakan ayam buras menggunakan metode ELISA menggambarkan tingkat kontaminasi yang bervariasi. Tabel 1 menunjukkan nilai absorbansi yang kemudian dikonversi menjadi konsentrasi aflatoksin dalam ppb. Hasil yang signifikan adalah bahwa ketiga sampel pakan ayam buras tersebut berada di bawah batas maksimum yang ditetapkan oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) 3144:2015, yaitu 20 ppb [9]. Sampel ayam buras ke-1 menunjukkan kandungan aflatoksin sebesar 17,52 ppb, sementara sampel ayam buras ke-2 dan ke-3 memiliki kandungan masing-masing sebesar 13,24 ppb dan 17,96 ppb. Kesemua nilai ini masih berada dalam ambang batas yang dianggap aman untuk konsumsi ternak.

Penting untuk mengaitkan kehandalan metode ELISA dalam analisis ini. ELISA adalah metode yang sangat sensitif dan spesifik dalam mendeteksi senyawa tertentu, seperti aflatoksin [10]. Hal ini terjadi karena reaksi antigen-antibodi yang terjadi secara spesifik dan dapat diukur dengan deteksi enzim. Kelebihan utama ELISA adalah kemampuannya untuk mendeteksi kandungan senyawa dalam rentang konsentrasi yang luas dengan tingkat sensitivitas yang tinggi [11].

Pentingnya validasi metode, seperti yang disebutkan dalam SNI, juga dapat dilihat dari ketepatan hasil yang diperoleh. Kurva kalibrasi yang dibuat dengan menggunakan standar aflatoksin dengan konsentrasi yang diketahui memungkinkan konversi nilai absorbansi menjadi konsentrasi aflatoksin yang akurat. Dengan menggunakan ELISA, hasil analisis dapat diperoleh dengan cepat dan efisien, memungkinkan pemantauan kontaminasi aflatoksin dalam pakan ayam buras secara reguler. Kesimpulan dari hasil ini memperkuat kehandalan metode ELISA sebagai alat yang efektif dalam upaya menjaga kualitas pakan ternak dan keamanan hasil produksi ternak [12] [13]. Tetapi, penting untuk terus

memperbarui dan memastikan metode analisis tetap valid dan sesuai dengan perkembangan terbaru dalam bidang ini.

Sampel-sampel pakan ayam buras yang diuji memiliki kandungan aflatoksin yang kurang dari 20 ppb. Meskipun ketiga sampel tersebut berada di bawah batas maksimum SNI, perlu dicatat bahwa keberadaan aflatoksin bahkan dalam konsentrasi rendah dapat memiliki dampak jangka panjang yang merugikan pada kesehatan ternak, produksi, dan produk hasil ternak. Pentingnya kehandalan metode ELISA terlihat dari ketepatan hasil yang diperoleh, dan ini mencerminkan kapabilitas metode tersebut dalam mendeteksi aflatoksin dalam rentang konsentrasi yang relevan dengan keamanan pangan. Keunggulan ELISA terletak pada tingkat sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi, memungkinkan identifikasi senyawa target bahkan dalam jumlah yang sangat kecil.

Sementara metode analisis seperti ELISA memberikan keunggulan dalam deteksi, kualitas hasil juga sangat dipengaruhi oleh ketepatan dan validitas kurva kalibrasi yang digunakan. Oleh karena itu, validasi metode seperti yang disarankan oleh SNI 3144:2015 adalah langkah kritis untuk memastikan hasil yang akurat dan dapat diandalkan [9] [10]. Hasil mini riset ini membawa kita pada pemahaman tentang pentingnya pemantauan kontaminasi aflatoksin dalam pakan ayam buras. Meskipun sampel saat ini memenuhi standar keamanan pangan, pendekatan preventif dan pemantauan terus-menerus tetaplah kunci dalam menjaga kesehatan ternak dan keamanan hasil ternak. Seiring dengan itu, pengembangan metode analisis yang lebih canggih dan inovatif akan terus menjadi fokus untuk memastikan deteksi dini dan pencegahan optimal dalam rangka menyediakan pakan yang berkualitas tinggi dan aman bagi ternak dan konsumen [14] [15].

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengukuran kadar aflatoksin pada sampel pakan ayam buras menggunakan metode ELISA, ditemukan bahwa ketiga sampel memiliki kandungan aflatoksin yang berbeda-beda dan berada di bawah batas maksimum yang ditetapkan oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) 3144:2015, yaitu 20 ppb. Penggunaan metode ELISA dalam analisis ini menunjukkan kehandalan dalam mendeteksi aflatoksin dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi, sehingga menegaskan bahwa penerapan metode ELISA adalah pendekatan yang efektif dalam pemantauan kontaminasi aflatoksin dalam pakan ayam buras.

Daftar Pustaka

- [1] M. Tajkarimi, F. Aliabadi-Sh, A. S. Nejad, H. Poursoltani, A. A. Motallebi, and H. Mahdavi, "Aflatoxin M1 contamination in winter and summer milk in central part of Iran," *Food Control*, vol. 22, no. 9, pp. 1653-1656, 2008, doi: 10.1016/j.foodcont.2007.10.011.
- [2] A. Raiola, G. C. Tenore, L. Manyes, G. Meca, A. Ritieni, and M. Daglia, "Bioaccessibility and degradation of aflatoxin B1 during in vitro digestion of hazelnuts," *Food Chemistry*, vol. 177, pp. 266-272, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.062.
- [3] Z. Zhao, Y. Wang, X. Chu, and X. Su, "A fluorescence aptasensor based on DNA-scaffolded silver-nanoclusters for the detection of aflatoxin B1," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 77, pp. 724-730, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.10.023.
- [4] X. Hu, X. Liu, Z. Han, and J. Wang, "Development of an immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin M1 in milk," *Journal of Dairy Science*, vol. 102, no. 4, pp. 3025-3031, 2019, doi: 10.3168/jds.2018-15960.
- [5] H. Tan, Y. Zhang, Y. Wang, X. Sun, and S. Zhang, "Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of aflatoxin B1 in wheat," *Toxins*, vol. 10, no. 12, p. 494, 2018.
- [6] P. Li, Q. Zhang, Q. P. Zhang, W. Zhang, and Z. Zhang, "Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of aflatoxin M1 in milk based on covalent organic framework-immobilized cellulose acetate microsphere," *Food Control*, vol. 73, pp. 450-456, 2017, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.08.033.
- [7] Y. Wang, Y. Zhang, S. Zhang, H. Tan, and X. Sun, "A sensitive and rapid enzyme-linked immunosorbent

- assay (ELISA) for the determination of aflatoxin B1 in peanut oil,” *Food Chemistry*, vol. 278, pp. 332-337, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.065.
- [8] D. K. Mahato, K. E. Lee, M. Kamle, S. Devi, K. N. Dewangan, P. Kumar, and S. G. Kang, “Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and control strategies,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, pp. 1-10, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02266.
- [9] Standar Nasional Indonesia, “SNI 3144:2015 tentang Batasan Maksimum Cemaran Mikotoksin dalam Pangan,” 2015.
- [10] F. Toldrá, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), in *Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products*, pp. 349-356, United States: CRC Press, 2014.
- [11] S. Rawal, J. E. Kim, and R. A. Coulombe Jr, “Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention,” *Research in veterinary science*, vol. 89, no. 3, pp. 325-331, 2010.
- [12] CAST (Council for Agricultural Science and Technology), “*Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*,” Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003.
- [13] M. W. Trucksess, and G. E. Wood, “Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for aflatoxins, in Trucksess, M. W., & Wood, G. E. (Eds.), *Mycotoxins in Agricultural Commodities: Analytical Methods*, pp. 13-28, Washington: ACS Publications, 1998.
- [14] R. Krska, and P. Schubert-Ullrich, “Proficiency testing of mycotoxin analytical methods: Recent advances and challenges,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 407, no. 20, pp. 6073–6085, 2015, doi: 10.1007/s00216-015-8682-3.
- [15] F. Wu, and P. Khlangwiset, “Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: case studies in biocontrol and post-harvest interventions,” *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 27, no. 4, pp. 496–509, 2010, doi: 10.1080/19440040903510967.