

**PENENTUAN KADAR AFLATOXIN B1 DALAM PAKAN BROILER SECARA KROMATOGRAFI
CAIR KINERJA TINGGI DENGAN PEMURNIAN
SECARA IMUNOAFINITAS**

**THE DETERMINATION OF AFLATOXIN B1 ON BROILER FEED BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH IMMUNOAFFINITY CLEAN-UP**

Agustina Dwi Wijayanti¹

**¹Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
Email: tinabdy@yahoo.co.id**

ABSTRACT

The study was conducted to measured the aflatoxin B1 contamination on 10 suspected samples of broiler feed. The aflatoxin concentration was analyzed with reversed phase of a high performance liquid chromatography (HPLC) by the imunoaffinity clean-up procedure using aflatoxin-specific antibody. All samples were divided into two groups after being extracted with NaCl and methanol. The extracted samples in group 1 were not passed through aliquot of imunoaffinity system, and group 2 was passed through the imunoaffinity system. The aflatoxin measurement of both groups was performed with HPLC in the same setting with methanol 70% as mobile phase. The results showed negative detection all samples of group 1 while in the group 2 four aflatoxin positives with a concentration range of range of concentration 0,02-0,1 ppm were detected.

Key words: aflatoxin B1, broiler feed, imunoaffinity, HPLC

ABSTRAK

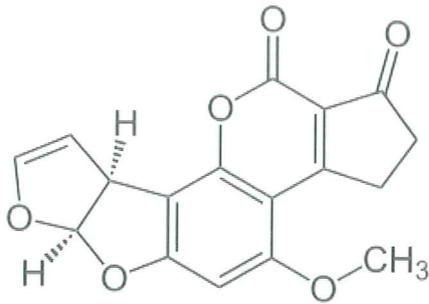
Telah dilakukan penelitian terhadap 10 sampel pakan broiler yang diduga mengandung aflatoksin B1 secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik (*reversed phase*), dengan pemurnian secara imunoafinitas. Prinsip imunoafinitas adalah pengikatan aflatoksin dengan antibodi spesifik yang dilanjutkan dengan pengukuran kadar menggunakan KCKT. Semua sampel dibagi menjadi 2 kelompok dan diekstraksi dengan NaCl dan metanol. Kelompok 1 diekstraksi tanpa dilakukan pemurnian pengikatan antibodi dan kelompok 2 dengan pengikatan antibodi. Pengukuran kadar kedua kelompok perlakuan tersebut dilakukan secara KCKT dengan pengaturan dan fase gerak yang sama yaitu dengan metanol 70%. Hasilnya adalah pada perlakuan 1 semua sampel negatif sedangkan pada perlakuan 2 terdapat 4 sampel dengan hasil positif aflatoksin dengan hasil berkisar antara 0,02-0,1 ppm.

Kata kunci: aflatoksin B1, pakan broiler, imunoafinitas, KCKT.

PENDAHULUAN

Aflatoksin B1 (Gambar 1) merupakan salah satu jenis aflatoxin yang diketahui bersifat toksik dan karsinogenik, serta dapat ditularkan melalui sekresi susu dari hewan yang terinfeksi. Semua spesies hewan domestik peka terhadap aflatoksin. Gejala yang sering terlihat dari infeksi aflatoksin adalah

kerusakan hati dan immunosupresif serta kadang-kadang disertai dengan kerusakan ginjal (Harvey, 1999). *Aspergillus flavus* menghasilkan aflatoksin B1 yang diketahui sangat banyak ditemukan di daerah panas dan lembab, bersifat immunosupresif dan menyebabkan kanker hati pada manusia (Hudler, 1998).



Gambar 1. Struktur kimia aflatoxin B1

Beberapa metode analisis mikotoksin termasuk aflatoxin dapat dilihat dari sejumlah literatur dan penelitian. Holcomb dkk., (1992) menyebutkan pemakaian *Thin Layer Chromatography* (TLC) untuk analisis aflatoxin cukup efisien karena cepat, mudah dan tidak memakan biaya banyak. Namun sejak tahun 2004, metode analisis aflatoxin banyak menggunakan HPLC dengan detektor fluoresensi, karena dinilai lebih sensitif, dengan kolom yang beresolusi tinggi, dan teknik pengerjaan yang otomatis (Garcia-Villanova dkk, 2004). Menurut Barbas dkk., (2005), analisis HPLC banyak digunakan karena memiliki nilai kuantifikasi lebih baik dan operasional yang mudah. Pada HPLC fase terbalik dan kolom C18, prinsip pemisahan aflatoxin adalah berdasarkan sifat hidrofobiknya (Ferreira dkk., 2004).

Teknik ekstraksi aflatoxin disertai *clean-up* (pemurnian) secara imunoafinitas (*Immunoaffinity column/IAC*) mulai diperkenalkan selama dekade terakhir, misalnya pemurnian aflatoxin B dan G pada jagung dan kacang (Barmark dan Larsson, 1994), mentega (Patey dkk.,1990), makanan bayi (Stroka dkk., 2001), bumbu dan rempah (Garner dkk.,1993) dan pakan hewan (Holcomb dan Thompson, 1991). Beberapa komoditas makanan pada aturan *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) dan Uni Eropa telah menetapkan

penggunaan IAC sebagai teknik dalam validasi metode pengukuran mikotoksin (Castegnaro dkk., 2006). Secara umum ekstraksi aflatoxin dilakukan dengan larutan yang mengandung pelarut organik berkonsentrasi tinggi misalnya asetonitril atau metanol (Uchigashima dkk., 2009). Selanjutnya ekstrak dimurnikan menggunakan kolom kromatografi multifungsional (MFC) atau kolom imunoafinitas (IAC), dimana untuk determinasi aflatoxin dilakukan menggunakan KCKT/HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Akiyama dkk., 2001). Menurut Arranz dkk., (2006), teknik pemurnian aflatoxin menggunakan kolom imunoafinitas memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan kolom kromatografi multifungsional, sehingga IAC merupakan metode yang disarankan dalam analisis aflatoxin.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian adalah 10 sampel pakan broiler yang berasal dari 10 stok pakan yang berbeda dari sebuah perusahaan *breeder* di Malang Jawa Timur, standar aflatoxin B1 (Sigma Co. USA), sistem imunoafinitas Aflatest[®] (Vicom, Watertown-USA), asetonitril dan metanol (*HPLC grade*), aquabides (Ikapharmindo Putramas, Jakarta), dan NaCl. Alat yang digunakan adalah seperangkat KCKT dari Shimadzu versi 6,1 menggunakan piranti lunak Class-VP dengan kolom C18 Shimpack ODS, LC-10Advp, Detektor UV-Vis SPD-10A, *controller system* SCL-10Avp, oven CTO-10Avp dan *degasser* DGU-14, mikrosiring (SGE, Australia), filter serta alat-alat pendukung lainnya.

Metode penelitian terdiri dari beberapa tahap yaitu tahap ekstraksi dengan larutan garam, tahap

validasi pengukuran aflatoxin, dan tahap analisis. Ekstraksi dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 50 g, kemudian dicampur dengan 5 g NaCl. Campuran ditambah dengan metanol : aquabides (80:20) sebanyak 100 mL. Setelah diblender selama 1 menit, campuran disaring dengan kertas saring, Sebanyak 10 mL filtrat dicampur dengan 40 mL aquabides. Filtrat disaring menggunakan filter mikrofiber (diameter 45 µm) dan ditampung dalam siring hingga diperoleh volume 10 mL. Pada kelompok perlakuan 1 filtrat langsung diinjeksikan ke sistem KCKT sedangkan kelompok perlakuan 2 sebanyak 10 mL filtrat dilewatkan dalam sistem imunoafinitas (Aflatest®). Sistem pemurnian (*clean-up*) imunoafinitas dimulai dengan melewati 10 mL filtrat sampai habis (ekuivalen dengan 1 g sampel) melalui kolom dengan kecepatan 1-2 tetes/detik. Pembilasan dilakukan dengan air 10 mL dengan kecepatan 2 tetes/detik. Kolom afinitas selanjutnya dielusi dengan *metanol HPLC grade* 1 mL dengan kecepatan 1-2 tetes/detik. Hasil tampungannya berupa filtrat ditambah air 1 mL dan diinjeksikan ke sistem KCKT.

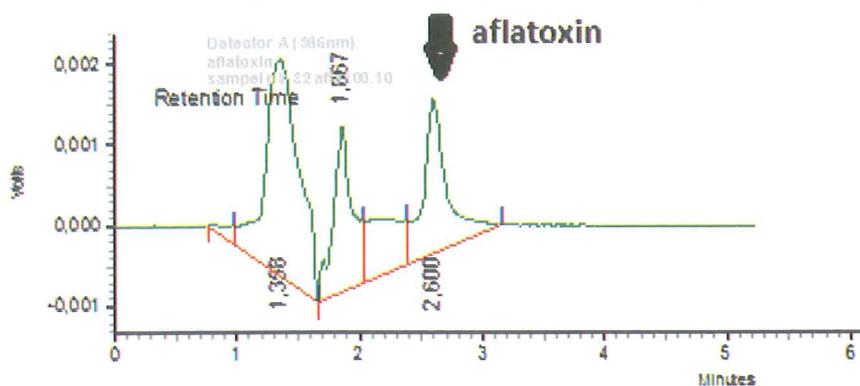
Tahap validasi dilakukan terhadap aflatoxin standar dengan identifikasi aflatoxin standar dalam

spiking pakan dan serangkaian pengenceran (0,1, 0,2 dan 0,5 ppm) untuk membuat kurva baku. Kurva baku dibuat dengan persamaan regresi linier $Y = BX+A$ ($Y =$ rasio *peak area*), $B =$ slope, $X =$ konsentrasi dan $A =$ *intercept*).

Analisis hasil dilakukan secara kualitatif dengan melihat profil puncak dan kuantitatif dengan mengukur kadar dengan kurva baku. Pengaturan sistem KCKT dengan kecepatan alir 1 mL/menit, menggunakan fase gerak metanol:aquabides (70:30), fase diam (kolom) Shimpack ODS C18 diameter 5µm panjang 150 mm, pembacaan gelombang pada detektor spektrofotometer ultraviolet λ 365 nm dan pada suhu kamar (25°C). Data yang didapat dari dua perlakuan dianalisis dengan uji Chi-Square.

HASIL DAN PEMBAHASAN

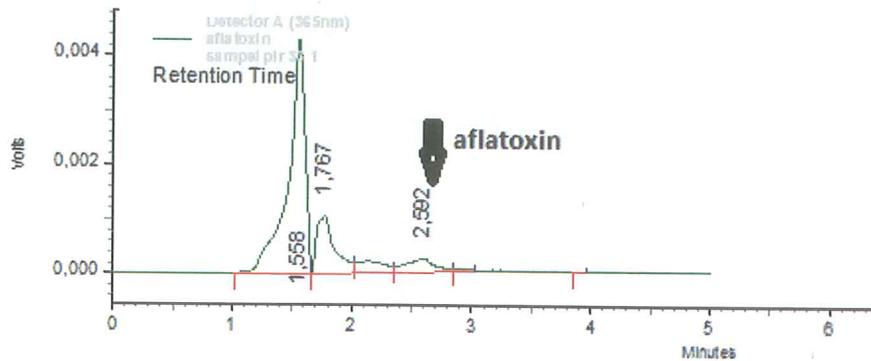
Hasil identifikasi aflatoxin pada kromatogram terlihat sebagai puncak dengan waktu retensi 2,6 menit dalam *spiking* pakan (Gambar 2). Hasil validasi pengukuran serangkaian pengenceran aflatoxin (0,1, 0,2 dan 0,5 ppm) memberikan persamaan $Y=1,02x + 6,0$ dengan koefisien korelasi $r=0,96$.



Gambar 2. Aflatoxin muncul sebagai puncak dengan waktu retensi 2,6 menit dalam *spiking* pakan (konsentrasi 0,2 ppm).

Hasil analisis dan pengukuran kandungan aflatoxin B1 dalam sampel pakan dengan kurva baku menunjukkan hasil seperti dalam Tabel 1.

Kromatogram (Gambar 3) memperlihatkan puncak aflatoxin dengan waktu retensi berkisar 2,6 menit, dan terpisah jelas dengan puncak-puncak lain.



Gambar 3. Aflatoxin B1 dalam sampel pakan n1 (konsentrasi 0,109 ppm)

Proses ekstraksi dan *clean-up* sangat penting untuk mendapatkan hasil analisis pengukuran yang tepat. Dalam analisis KCKT sampel diekstraksi untuk memperoleh analit yang diinginkan yang bebas dari senyawa atau bahan pengotor (*impurities*). Pengukuran residu aflatoxin dalam pakan dapat dilakukan secara KCKT dengan ekstraksi sesuai metode AOAC (*Association of Official Analytical Chemistry*) dengan kloroform, hexane, benzene dan beberapa senyawa lain namun memerlukan biaya yang mahal. Dalam sistem kolom imunoafinitas (IAC) dapat diperoleh analit yang secara kuantitas lebih banyak karena adanya ikatan antibodi dengan aflatoxin. Proses ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini lebih sederhana, menggunakan sedikit bahan kimia (NaCl, aquabides dan metanol) dan tidak memakan waktu lama sehingga lebih efisien dan tidak memakan biaya mahal. Sebanyak 4 sampel dari perlakuan 2

menunjukkan hasil positif dengan kadar berkisar antara 0,02-0,1 ppm. Menurut *Food and Drug Administration* (FDA) batas toleransi adanya AFB1 dalam pakan hewan adalah 20 ppb (*part per billion*) kecuali susu 0,5 ppb (Harvey, 1999). Pemisahan senyawa aflatoxin dalam sampel dilakukan dengan kolom C18 dengan diameter 5 μ m dan panjang 150 mm. Hasil uji dua perlakuan yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1, dan setelah diuji dengan Chi-Square menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Langkah pemurnian aflatoxin menggunakan imunoafinitas ternyata menunjukkan hasil positif dan lebih sensitif serta disarankan dilakukan dalam ekstraksi sampel pakan yang diduga mengandung aflatoxin. Aflatoxin yang terdeteksi lebih dini dalam pakan tentunya berguna untuk kontrol pakan dalam manajemen kesehatan broiler.

Tabel 1. Hasil uji aflatoksin B1 dalam pakan broiler (n=10) dengan pemurnian secara imunoafinitas.

Kode sampel	Hasil uji	
	Perlakuan 1 (tanpa kolom imunoafinitas)	Perlakuan 2 (dengan kolom imunoafinitas)
n1	negatif	negatif
n2	negatif	positif (0,109 ppm)
n3	negatif	negatif
n4	negatif	negatif
n5	negatif	positif (0,099 ppm)
n6	negatif	negatif
	negatif	negatif
	negatif	positif (0,02 ppm)
n10	negatif	positif (0,035 ppm)

Menurut Scott dan Trucksess (1997), beberapa prosedur dalam sistem IAC memiliki kelemahan karena selama ekstraksi sampel banyak mengandung pelarut organik seperti metanol, asetonitril atau aseton, yang memiliki toleransi rendah terhadap ikatan antibodi dalam sistem, sehingga memperkecil rekoverti aflatoksin dan memerlukan pembilasan. Pelarut yang digunakan dalam penelitian untuk ekstraksi adalah metanol karena memiliki sifat toleransi lebih baik dibandingkan asetonitril (Patey dkk,1991) dan pelarutan dengan aquabides beberapa kali untuk memperkecil konsentrasi metanol. Pembilasan dilakukan untuk menghilangkan ikatan pelarut pada antibodi sehingga diperoleh gambaran kualitatif aflatoksin yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column cleanup. *J. Chromatogr. A* 932: 153–157.

Arranz, I., Sizoo, E., van Egmond, H., Kroeger, K., Legarda, T. M., Burdaspal, P., Reif, K., Stroka, J. 2006. Determination of aflatoxin B1 in medical herbs: Interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 89: 595–605.

Barbas, C., Dams, A., Majors, R.E. 2005. *Separation of Aflatoxin by HPLC*. Application. Agilent Tech. Inc. USA.

Barmark, A. L., Larsson, K. 1994. Immunoaffinity column cleanup/liquid chromatographic determination of aflatoxins: an interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 77: 46–53.

Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinie, A., Silla, A., Pfohl-Leskowicz, A. 2006. Advantages and drawbacks of immunoaffinity column in analysis of micotoxin in food. *Mol. Nutr. Food Res.* 50(6): 480-487.

Ferreira, I., Mendes, E., Oliveira, M. 2004. Aflatoxin determination principle by HPLC. *J. Liquid Chromatog.* 27(2): 352-334.

Garcia-Villanova, R.J., Cordon, C., Paramas, A.M.G., Aparicio, P., Rosales, M.E.G. 2004. Simultaneous Immunoaffinity Column Cleanup and HPLC analysis of Aflatoxin and Ochratoxin A in Spanish Bee Pollen. *J. of Agric. & Food Chemist.* 52(24): 7235-7239.

- Garner, R. C., Whattam, M. W., Taylor, P. J. L., Stow, M. W. 1993. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column cleanup procedure followed by high-performance liquid chromatography analysis and postcolumn derivatisation with pyridinium bromide perbromide. *J. Chromatogr., A*. 648: 485-490.
- Harvey, R.B. 1991. Aflatoxin:in Current Veterinay Therapy.ed. Howard,J.L and Smith, R.A. WB Saunders Co. Philadelphia. 254.
- Holcomb, M., Thompson, H. C. 1991. Analysis of aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) in rodent feed by HPLC using postcolumn derivatization and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 39: 137-140.
- Holcomb, M., Wilson, D. M., Truckess, M. W., Thompson, H. C. 1992. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *J. Chromatogr. A*, 624 :341-352.
- Hudler, G. 1998. *Magical Musrroom,mischievous molds*. Princeton Univ. Press.
- Patey, A. L., Sharman, M., Gilbert, J. 1990. Determination of aflatoxin B₁ levels in peanut butter using an immunoaffinity column cleanup procedure: interlaboratory study. *Food Addit. Contam.* 7: 515-520.
- Patey, A. L., Sharman, M., Gilbert, J.1991. Liquid chromatographic determination of aflatoxin levels in peanut butters using an immunoaffinity column cleanup method: International collaborative trial. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 76-81.
- Scott, P. M., Trucksess, M. W.1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J. AOAC Int.* 80: 941-949.
- Stroka, J. S., Anklan, E., Jörissen, U., Gilbert, J. 2001.Determination of aflatoxin B₁ in baby food (infant formula) by immunoaffinity column cleanup liquid chromatography with postcolumn bromination: collaborative study. *J. AOAC Int.* . 84: 1116-1123.
- Uchigashima,M.,Saigusa M., Yamashita H., Miyake S., Fujita K., Nakajima M., Nishijima,M. 2006. Development of Novel Immunoaffinity Column for Aflatoxin Analysis Using an Organic Solvent-Tolerant Monoclonal Antibody.*J.Agric.Food Chem.*57: 8728-8734.