

## **APLIKASI METODE ELISA UNTUK PENDETEKSIAN OCHRATOXIN A PADA BIJI-BIJIAN**

**Silvi Leila Rahmi**

*Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jambi  
Kampus Pinang Masak, Mendalo Darat, Jambi 36361*

### **Abstrak**

**Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aplikasi metode ELISA untuk pendeteksian ochratoxin A pada biji-bijian. Biji-bijian yang diuji meliputi gandum, sorghum, dan barley. Masing-masing bahan diuji dalam bentuk utuh dan bahan yang telah dihancurkan. Tahap pertama adalah penentuan kurva standar ochratoxin A. Tahapan selanjutnya adalah penentuan kurva % inhibition dan absorbansi untuk masing-masing sampel, baik dalam bentuk utuh dan telah dihancurkan.**

***Kata kunci: ELISA, ochratoxin A, biji-bijian.***

### **PENDAHULUAN**

Kontaminasi bahan hasil pertanian oleh mycotoxin adalah salah satu masalah penting berkaitan dengan keamanan pangan. Hal ini disebabkan oleh beberapa hal: pertama, kontaminasi mycotoxin terjadi pada bahan-bahan hasil pertanian yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Sebagai contoh, kontaminasi dapat terjadi pada bahan pangan pokok seperti biji-bijian. Sebagai bahan pangan pokok, biji-bijian dikonsumsi secara rutin oleh sebagian besar penduduk di banyak negara. Oleh sebab itu, kontaminasi yang terjadi akan memberikan dampak yang besar, bukan hanya pada kesehatan masyarakat, tetapi juga pada kondisi ekonomi dan perdagangan negara.

Kedua, berkaitan dengan tingkat paparan kontaminasi. Kontaminasi mycotoxin dapat terjadi bukan hanya saat bahan hasil pertanian dipanen, tetapi juga pada saat penyimpanan dan pengolahan bahan hasil pertanian. Setiap tahap persiapan pengolahan pangan dapat menjadi sumber kontaminasi. Kondisi ini dapat menjadi lebih buruk pada negara-negara berkembang yang belum memiliki regulasi keamanan pangan yang memadai.

Ketiga, kontaminasi mycotoxin mempengaruhi kesehatan tubuh manusia dengan mekanisme yang bervariasi. Tipe

mycotoxin yang berbeda akan menyebabkan masalah kesehatan yang berbeda pula. Sebagai contoh, aflatoxin adalah jenis mycotoxin yang paling berbahaya dan diduga bersifat karsinogen (Eaton and Gallagher, 1994). Fumonisin dianggap memiliki korelasi dengan kanker esophagus pada manusia (Zinedine et al., 2006). Sementara ochratoxin A diduga menjadi penyebab penyakit ginjal, seperti nephrotoxicity dan Balkan Endemic Nephropathy (Pena et al, 2006).

Keempat, kontaminasi mycotoxin juga dapat terjadi melalui produk-produk peternakan. Dabrowski and Sikorski (2005) menyatakan bahwa meski pun jalur utama paparan mycotoxin adalah melalui tanaman dan bahan hasil pertanian, pakan ternak juga dapat terkontaminasi oleh mycotoxin. Mycotoxin ini kemudian akan masuk ke tubuh hewan dan mengendap pada susu, daging, dan telur hewan tersebut.

Berdasarkan penjelasan di atas, perlu dikembangkan suatu metode analisis kontaminasi mycotoxin. Metode-metode yang dibutuhkan meliputi metode pendeteksian, identifikasi, dan pengukuran tingkat kontaminasi pada bahan pangan dan hasil pertanian. Hal ini penting dilakukan karena dengan adanya metode yang tepat maka kontaminasi mycotoxin yang terjadi

dapat diketahui lebih dini. Kemudian jika ditemukan adanya kontaminasi, metode yang tepat dapat diaplikasikan untuk mengukur jumlah mycotoxin yang terdapat dalam produk.

Dengan penerapan metode yang tepat pula maka kontaminasi mycotoxin dapat ditangani dengan lebih baik. Sebagai hasilnya, akan diperoleh data-data yang lebih akurat dan efektif mengenai kontaminasi mycotoxin. Data-data tersebut akan menjadi faktor penting dalam sistem manajemen keamanan pangan karena menjadi dasar bagi penentuan regulasi keamanan pangan. Sebagai contoh, Maximum Residue Limit (MRL) dan ADI (Acceptable Daily Intake). Selain itu, data-data tersebut akan berguna dalam penanganan mycotoxin di masa yang akan datang. Hal ini meliputi jenis-jenis produk pangan dan bahan hasil pertanian yang rentan terhadap kontaminasi mycotoxin, bagaimana terjadinya kontaminasi, berapa jumlah mycotoxin yang ditemukan pada produk-produk tertentu, dan bagaimana pencegahan kontaminasi.

Salah satu metode identifikasi mycotoxin pada pangan dan bahan hasil pertanian yang dikembangkan saat ini adalah ELISA ((Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Metode ini sangat potensial untuk dikembangkan karena keunggulan-keunggulannya. Beberapa keunggulan dari metode ini antara lain: merupakan metode yang cukup sederhana, dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah besar, hasil dapat diketahui dengan cepat, dan dapat digunakan sebagai metode analisis rutin (Kawamura et al., 1989; Solti et al., 1997; Thirumala-Devi et al., 2000).

## METODA PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga jenis biji-bijian, yaitu gandum, sorghum, dan barley. Setiap jenis biji-bijian tersebut dianalisa dalam dua bentuk, biji utuh dan biji yang telah dihancurkan.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, Spectramax® M2, *microwell plates*, dan *shaker*.

### Pelaksanaan Penelitian

#### Persiapan Bahan

Persiapan bahan meliputi prosedur pemurnian Rabbit IgG, penentuan konsentrasi antibodi, kalibrasi ochratoxin A, persiapan larutan standar, dan *checkerboard titration*.

#### Prosedur Direct Competitive ELISA

Microwell plates dilapisi dengan 100 µL anti-ochratoxin A polyclonal antibody dan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam. Kemudian dibasuh sebanyak 3 kali menggunakan larutan 0,05% Tween-20. Selanjutnya, 200 µL larutan gelatin 1% dalam PBS dipipet ke dalam microwell plates dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Setelah dibasuh 3 kali, 100 µL standar ochratoxin atau sampel yang digunakan dipipet ke dalam microwell plates dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Prosedur ini diikuti dengan inkubasi 100 µL ochratoxin A-HRP yang dilarutkan dalam 0,2% gelatin dalam PBS selama 30 menit. Setelah 5 tahap pembasuhan, inkubasi dilakukan untuk larutan (TMB)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µL selama 20 menit. Reaksi pewarnaan dihentikan dengan menambahkan 50 µL larutan asam sulfat 1,25 M. Tingkat absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dengan menggunakan Spectramax® M2.

#### **Perhitungan Data (Soetanto, 2005)**

Kurva ochratoxin A diperoleh dengan menempatkan x-axis (konsentrasi log<sub>10</sub>) dan y-axis (% inhibition). % inhibition untuk setiap standard dan sampel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{A - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100\%$$

Keterangan:

A = rata-rata absorbansi untuk setiap standard an sampel

A blank = rata-rata absorbansi untuk blanko

A control = rata-rata absorbansi untuk kontrol

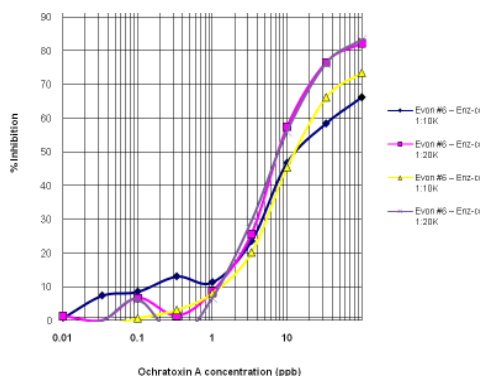
Setelah penentuan kurva kalibrasi, dilakukan penentuan assay sensitivity dan

LOD (lower limit of detection). Assay sensitivity dinyatakan sebagai  $IC_{50}$ , yaitu jumlah konsentrasi ochratoxin A yang diperlukan untuk menghasilkan 50% inhibition dari pewarnaan. LOD ditujukan pada konsentrasi yang menghasilkan 20% inhibition dari pewarnaan.

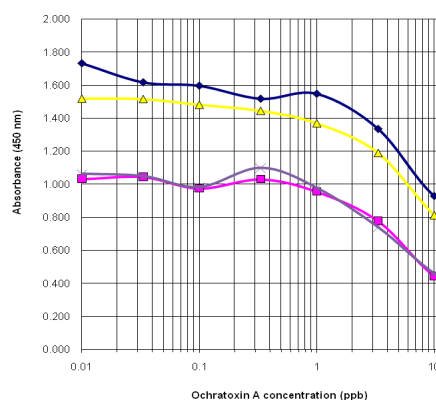
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kurva Standar

Kurva standar ELISA dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2. Gambar 1 menunjukkan perbandingan % inhibition dari enzyme conjugate, sementara Gambar 2 memperlihatkan perbandingan absorbansi dari enzyme conjugate.



Gambar 1. Perbandingan % inhibition dari enzyme conjugate pada 1:10000 dan 1:20000 menggunakan ELISA.

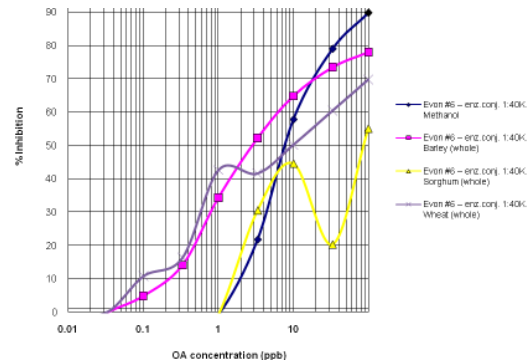


Gambar 2. Perbandingan absorbansi pada 1:10000 dan 1:20000 menggunakan ELISA.

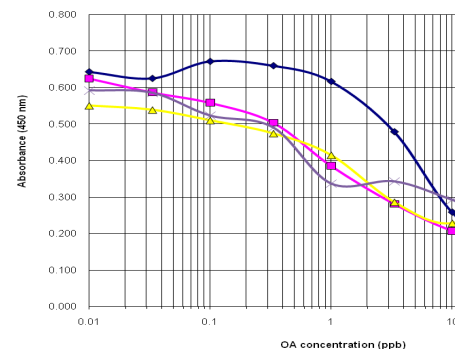
### Kurva Sampel

Konsentrasi ochratoxin A pada biji-bijian yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3

dan Gambar 4. Gambar 3 adalah perbandingan % inhibition gandum, sorghum, dan barley utuh. Sementara Gambar 4 adalah perbandingan absorbansi dari gandum, sorghum, dan barley utuh.

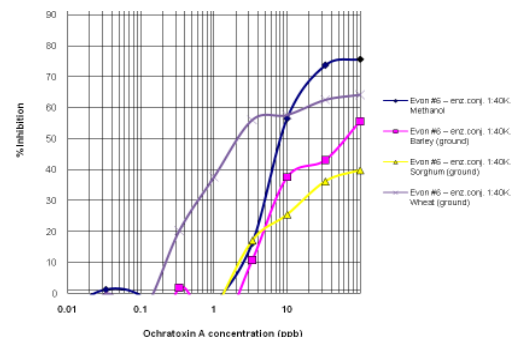


Gambar 3. Perbandingan % inhibition dari gandum, sorghum, dan barley utuh.

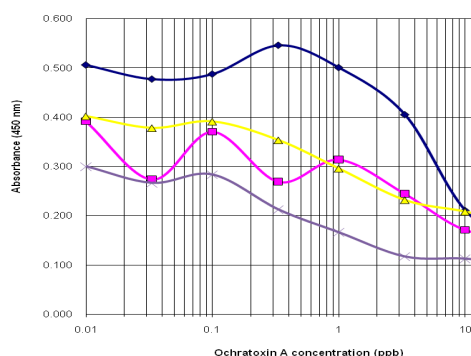


Gambar 4. Perbandingan absorbansi dari gandum, sorghum, dan barley utuh.

Untuk biji-bijian yang telah dihancurkan ditunjukkan pada Gambar 5 dan Gambar 6.



Gambar 5. Perbandingan % inhibition dari gandum, sorghum, dan barley yang telah dihancurkan.



Gambar 6. Perbandingan absorbansi dari gandum, sorghum, dan barley yang telah dihancurkan.

Perbandingan % inhibition gandum, sorghum, dan barley yang telah dihancurkan dapat dilihat pada Gambar 5. Perbandingan absorbansi dari gandum, sorghum, dan barley yang telah dihancurkan dapat dilihat pada Gambar 6.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

ELISA dapat digunakan sebagai salah satu metode pendeteksian kontaminasi ochratoxin A pada bahan pangan dan hasil pertanian.

### Saran

Berkaitan dengan penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan mengenai aplikasi metode ELISA pada produk pangan dan bahan hasil pertanian lokal, seperti beras, jagung, dan umbi-umbian.

## DAFTAR PUSTAKA

Dabrowski, W.M., and Sikorski, Z.E., 2005, 'Toxins in Food', CRC Press, Florida.  
 Eaton, D.L. and Gallagher, E.P., 1994, 'Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol.34, pp.135-172.

Kawamura, O., Sato, S., Kajii, H.A., Nagayama, S., Ohtani, K., and Chiba, J., 1989, 'A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies', *Toxicon*, vol.8, pp.887-897.  
 Pena, A., Seifrtova, M., Lino, C., Silveira, I., and Solich, P., 2006, 'Estimation of ochratoxin A in portuguese population: New data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection', *Food and Chemical Toxicology*, vol.44, pp.1449-1454.  
 Soetanto, S., 2005, 'Development of simple ELISA test and IAC for detection of ochratoxin A in coffee with confirmation by HPLC', The University of New South Wales, Sydney.  
 Solti, L., Salamon, F., Barna-Vetro, I., Gyongyosi, A., Szabo, E., and WolXing, A., 1997, 'Ochratoxin A content of human sera determined by a sensitive ELISA', *Journal of Analytical Toxicology*, vol.1, pp.44-48.  
 Thirumala-Devi, K., Mayo, M.A., Reddy, G., Reddy, S.V., Delfosse, P., and Reddy, D.V., 2000, 'Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.10, pp.5079-5082.  
 Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V., Miraglia, M., 2006, 'Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco', *Food Control*, vol.17, pp.868-874.