
KORELASI *Aspergillus flavus* DENGAN KONSENTRASI AFLATOKSIN B₁ PADA IKAN KAYU

Correlation of Aspergillus flavus with the Concentration of Aflatoxin B₁ in Ikan Kayu**Safika**

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah Banda Aceh

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui kontaminasi *Aspergillus flavus* pada ikan kayu dan konsentrasi AFB₁ (AFB₁) yang dihasilkan serta hubungan populasi *A. flavus* dengan konsentrasi AFB₁. Pengambilan sampel dilakukan di pasar-pasar Banda Aceh dan Lhokseumawe. Sampel diproses untuk isolasi dan identifikasi *A. flavus* serta deteksi AFB₁ dengan menggunakan metode ELISA (*Enzym Linked Immunosorbant Assay*). Hasil penelitian menunjukkan dari 20 sampel ikan kayu yang diperiksa, semuanya (100%) terkontaminasi *A. flavus* dengan jumlah yang bervariasi antara 1×10^2 - 61×10^2 Cf_u/g, dengan konsentrasi AFB₁ antara 0,9-38,7 ppb. Sebanyak 75% sampel yang memenuhi persyaratan pemerintah Indonesia yaitu maksimal 20 ppb dan sebanyak 80,92% AFB₁ pada ikan kayu disebabkan oleh *A. flavus*. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *A. flavus* yang tumbuh pada ikan kayu mempunyai korelasi yang signifikan terhadap AFB₁.

Kata kunci: *Aspergillus*, *A. flavus*, aflatoxin, AFB₁

ABSTRACT

The objective of this research was to know the contamination of *Aspergillus flavus* in ikan kayu and the number of aflatoxin B₁ (AFB₁) produced. Also the correlation the number of *A. flavus* with AFB₁. Samples were taken from traditional markets in Banda Aceh and Lhokseumawe. The sample were used to isolation and identify *A. flavus* also detect the present of AFB₁ by ELISA (*Enzym Linked Immunosorbant Assay*). The result shows that all samples show the present of *A. flavus* with the concentration 1×10^2 - 61×10^2 Cf_u/g and the concentration of AFB₁ between 0.9-38.7 ppb. In conclusion the present *A. flavus* in ikan kayu has a correlation with the production of AFB₁.

Keywords: *Aspergillus*, *A. flavus*, aflatoxin, AFB₁

PENDAHULUAN

Aspergillus flavus merupakan jamur patogen yang sering ditemukan sebagai kontaminan pada komoditi kacang-kacangan dan sereal. Makanan olahan berbahan baku kacang-kacangan, daging, jagung, ikan, gandum, biji-bijian, buah, dan sereal juga sangat rentan terhadap kontaminasi jamur ini. Kontaminasi dapat terjadi mulai dari penyiapan bahan baku, pengolahan, penyimpanan, pemasaran sampai kepada konsumen (Pitt, 2001; Rahmanna dan Taufiq, 2003). Jamur ini menghasilkan mikotoksin sebagai hasil metabolitnya. Mikotoksin pada *A. flavus* yang paling banyak ditemukan dan berbahaya adalah aflatoksin (Supardi dan Sukanto, 1999; Abrunhosa *et al.*, 2001).

Kondisi optimum jamur ini untuk menghasilkan aflatoksin adalah pada suhu 25-35^o C, kelembaban relatif 85% dan kadar air 16%, serta pH 6. Kontaminasi aflatoksin pada bahan pangan terjadi bila strain *aflatoxigenic* berhasil tumbuh dan membentuk koloni serta selanjutnya memproduksi aflatoksin. Jamur *A. flavus* akan menghasilkan 50% strain *aflatoxigenic* (Cotty dan Melon, 2004; Williams *et al.*, 2004). Menurut Rahmanna dan Taufiq (2003) jika makanan terkontaminasi aflatoksin, sulit untuk dihilangkan karena sifatnya yang tahan panas (titik cair 268-269^o C). Pemanasan sampai 150^o C hanya mengurangi konsentrasi aflatoksin 33-75%. Pada proses pengolahan, seperti penyangraian, penggorengan, dan fermentasi hanya dapat mengurangi kandungan aflatoksin 73-87%.

Dewasa ini telah dikenal 16 jenis aflatoksin yang telah diketahui susunan kimianya. Tetapi secara alami aflatoksin ini terdiri atas 4 jenis, yaitu B₁ (AFB₁), B₂

(AFB₂), G₁ (AFG₁), dan G₂ (AFG₂), (Horn *et al.*, 2000). Aflatoksin dalam konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan penyakit akut dan kematian, sedangkan konsentrasi rendah dalam jangka panjang dapat menyebabkan nekrosis pada sel hati dan ginjal (Saad, 2001).

Menurut Badan Riset Kanker Internasional (*International Agency for Research on Cancer* = IARC) dan Komite Kerjasama Ahli Makanan Tambahan (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* = JECFA), AFB₁ paling toksik karena bersifat karsinogen yang diklasifikasi dalam kelas 1. Selain paling toksik AFB₁ juga paling sering ditemukan pada bahan pangan dan pakan sehingga seringkali dipakai sebagai ambang batas maksimum aflatoksin dalam bahan pangan dan pakan (Cotty dan Melon, 2004; Williams *et al.*, 2004).

Batas maksimum konsentrasi aflatoksin yang diperbolehkan pada semua produk makanan menurut FAO (*Food and Agriculture Organization*) adalah 30 ppb (*part per billion*). Beberapa negara telah memberikan batasan terhadap konsentrasi aflatoksin yang diperbolehkan yang ada pada komoditi pertanian, pakan ternak, dan makanan. Amerika Serikat memberikan batasan konsentrasi maksimum aflatoksin 20 ppb pada semua makanan, Kanada 15 ppb, India 30 ppb, Filipina 20 ppb, Australia 15 ppb, dan Inggris 4 ppb (FAO, 1997) sedangkan Indonesia menetapkan 20 ppb untuk AFB₁ dan total aflatoksin 35 ppb (Dharmaputra *et al.*, 2003).

Ikan kayu merupakan salah satu makanan tradisional Aceh. Ikan kayu adalah hasil proses pengolahan ikan tongkol secara tradisional dan umumnya melalui tahap-tahap perebusan, pencampuran dengan tepung terigu, dan

pengeringan langsung dengan sinar matahari. Ikan ini dapat bertahan berbulan-bulan. Pada saat dijual di pasar umumnya ikan ini dijual tanpa kemasan, sehingga kontaminasi *A. flavus* yang menghasilkan aflatoksin sangat mungkin terjadi.

Dari uraian di atas, perlu kiranya dilakukan penelitian untuk mengetahui kontaminasi *A. flavus* pada ikan kayu dan konsentrasi AFB₁ yang dihasilkan serta hubungan populasi *A. flavus* dengan konsentrasi AFB₁. Hasil penelitian ini diharapkan sebagai informasi dari kontaminasi jamur *A. flavus* dan konsentrasi AFB₁ pada ikan kayu. Diharapkan setelah mengetahui konsentrasi AFB₁ akan ada upaya perbaikan dalam pengolahan dan penyimpanan dari komoditi ini.

MATERI DAN METODE

Sebanyak 20 sampel ikan kayu diambil dari pasar-pasar Banda Aceh dan Lhokseumawe. Sampel yang diperoleh, selanjutnya dilakukan isolasi dan identifikasi *A. flavus* serta deteksi AFB₁

Isolasi *A. flavus*

Sampel (masing-masing 10 gram) ditimbang dan diblender dengan menambahkan aquades sebanyak 90 ml, kemudian diambil supernatannya. Supernatan ini selanjutnya diencerkan dari 10⁻¹ sampai 10⁻⁵, dan kontrol. Sebanyak 25 µl suspensi dari masing-masing pengenceran dan kontrol dituang pada Sabouraud Dekstrosa Agar (SDA). Biakan ini diinkubasi selama 2-7 hari pada suhu kamar (25-30^o C) dan diamati masing-masing koloni yang tumbuh. Selanjutnya dari koloni *Aspergillus* yang tumbuh dipindahkan pada agar miring hingga didapat koloni yang murni.

Identifikasi *A. flavus*

Isolat hasil pemurnian diamati secara makroskopis. Isolat koloni berwarna hijau kekuningan. Isolat ini kemudian dibiakkan kembali pada media agar *Zeapec Dox* untuk melihat bentuk-bentuk *A. flavus* seperti bentuk vesikel, ukuran, dan bentuk permukaan spora pada pembesaran 40x dan 100x.

Penentuan Konsentrasi AFB₁

Penentuan konsentrasi AFB₁ pada sampel dilakukan dengan metode *Enzym Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) dengan menggunakan kit ELISA yang dikembangkan di Balai Penelitian Veteriner Bogor.

Sampel sebanyak 25 g dimasukkan ke dalam blender serta ditambahkan 50 ml metanol:air (60:40). Sampel diblender selama 3 menit. Setelah itu, sampel disentrifus pada 3000 rpm selama 15 menit. Lalu filtratnya disaring dan ditampung sebanyak 1 ml dan ditambahkan 1 ml aquades dan siap dilakukan uji ELISA.

Larutan standar AFB₁ yaitu 0 ppb, 5 ppb, 15 ppb, dan 45 ppb, dimasukkan *plate*. Sampel dipipet sebanyak 100 µl, dimasukkan ke tiap lubang. Kemudian masing-masing lubang ini ditambahkan konjugat (*aflatoksin conjugate peroksidase*) 100 µl. Dari campuran sampel dan konjugat ini diambil 75 µl dan dipindahkan ke *plate* lain yang berisi antibodi antiaflatoksin (*rabbit polyclonal*) untuk setiap lubang dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25^o C. Cairan selanjutnya dibuang dan dicuci dengan aquades, lalu dikeringkan. Sebanyak 100 µl substrat (*chromogen*) ditambahkan ke dalam lubang dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25^o C. Kemudian 50 µl larutan *stop reagent* ditambahkan pada masing-masing lubang. Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi

dengan ELISA reader pada panjang gelombang (λ) 450 nm.

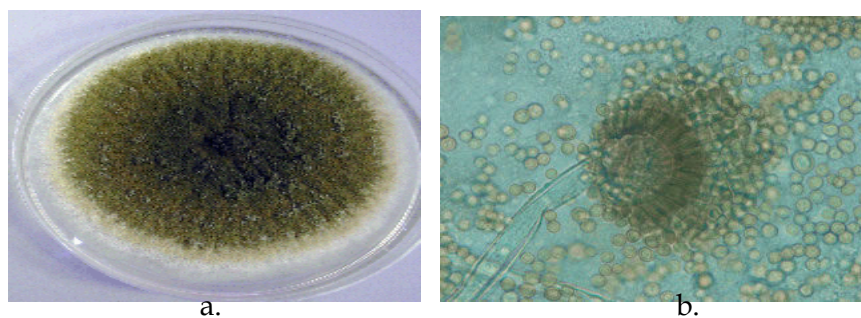
Analisis Data

Jumlah koloni *A. flavus* dan konsentrasi AFB₁ pada ikan kayu dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel sehingga didapatkan proporsinya. Untuk melihat hubungan antara tingkat populasi jamur *A. flavus* dengan konsentrasi AFB₁ digunakan analisis jalur (*Path Analysis*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik *A. flavus*

Setelah hari ke-5, sampel ikan kayu yang ditanam pada cawan petri berisi media Sabouraud Dekstrosa Agar (SDA) tumbuh jamur. Secara makroskopis jamur yang tumbuh terlihat warna koloni hijau kekuningan yang merupakan indikator adanya jamur *A. flavus*. Selain itu, juga terdapat pertumbuhan jamur *A. parasiticus*, *A. niger*, *Mucor*, dan *Penicillium*. Secara mikroskopis pada *A. flavus* tampak vesikel agak lonjong dengan dinding konidia lebih halus dan tidak bergerigi (Gambar 1). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 20 sampel ikan kayu yang diambil di pasar-pasar Lhokseumawe dan Banda Aceh, semuanya (100%) terkontaminasi jamur *A. flavus*, dengan populasi 1×10^2 - 61×10^2 Cfu/g.



Gambar 1. (a) Koloni jamur *A. flavus*. (b) Konidia *A. flavus* pada pembesaran 100x

Konsentrasi AFB₁

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 20 sampel ikan kayu dari 20 sampel yang diperiksa semuanya (100%) mengandung AFB₁ dengan konsentrasi yang bervariasi antara 0,9-38,7 ppb. Konsentrasi AFB₁ dapat dibagi menjadi 4 kelompok yaitu 0,0-10,0; 10,1-20,0; 20,1-30; dan >30,1 ppb. Pembagian kelompok ini berdasarkan batasan maksimum beberapa negara, dan batasan maksimum yang diperbolehkan oleh FAO. Berdasarkan Tabel 1, konsentrasi AFB₁ pada ikan kayu ada 15 sampel (75%) konsentrasi AFB₁ yang memenuhi persyaratan Pemerintah.

Tabel 1. Proporsi ikan kayu berdasarkan konsentrasi AFB₁

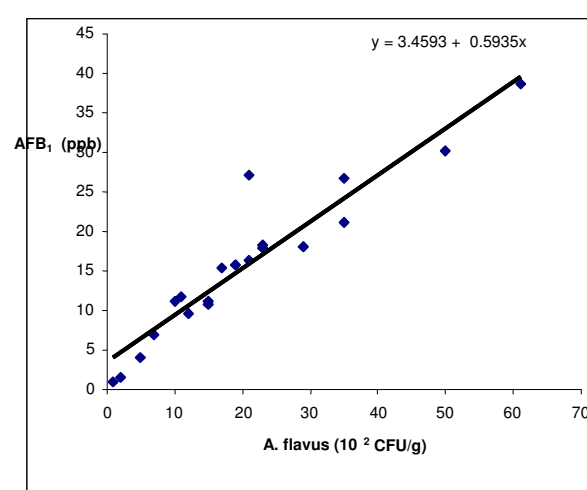
Konsentrasi AFB ₁	Proporsi (%)
0,0-10,0	5 (25%)
10,1- 20,0	10 (50%)
20,1- 30	3 (15%)
>30	2 (10%)
Jumlah	20 (100%)

Hubungan *A. flavus* dengan Konsentrasi AFB₁

Pada ikan kayu didapat nilai koefisien sebesar 0,437. Hasil pengujian koefisien jalur dengan uji *t student* didapat H₀ ditolak pada *A. flavus*, atau koefisien jalur $P_{x_3x_1}$ berpengaruh nyata, (konsentrasi AFB₁ pada ikan kayu dipengaruhi oleh *A. flavus*). Dari analisis matriks, hubungan antara populasi *A. flavus* dengan konsentrasi AFB₁ ikan kayu, didapat nilai

determinan (R^2) 0,809 atau 80,9% konsentrasi aflatoxin disebabkan oleh *A. flavus*.

Terdapat hubungan yang erat antara populasi *A. flavus* dengan konsentrasi AFB₁ seperti yang terlihat pada Gambar 2. Dari gambar tersebut dapat dilihat hubungan populasi *A. flavus* dengan AFB₁. Ini berarti, setiap peningkatan $0,5935 \times 10^2$ CfU/g *A. flavus* maka dapat meningkatkan 1 ppb AFB₁. Hal ini sesuai dengan sebagian besar penelitian yang menyatakan bahwa *A. flavus* merupakan penghasil aflatoxin khususnya AFB₁ yang utama pada makanan dan olahannya. Selain itu *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. niger*, *A. tamaraii strains*, dan *A. pseudotamarii* juga menghasilkan aflatoxin dalam jumlah yang sedikit (Mishra dan Das, 2003).



Gambar 2. Grafik hubungan *A. flavus* dengan AFB₁ pada ikan kayu

Kontaminasi jamur *A. flavus* pada ikan kayu, kemungkinan terjadi pada proses pengolahan dan penyimpanan. Kemungkinan kontaminasi berasal dari bahan baku sangat kecil terjadi. Hal ini karena bahan baku ikan kayu biasanya ikan tongkol yang segar. Kontaminasi *A. flavus* pada ikan kayu juga dapat terjadi pada saat pemasaran karena dijual tanpa kemasan.

Proses pengolahan yang dilakukan dengan menggunakan peralatan sederhana dan tergantung pada cuaca untuk mengeringkan ikan kayu menyebabkan rentan tumbuhnya jamur *A. flavus*. Pada musim hujan tumbuhnya jamur disebabkan karena pengeringan yang tidak sempurna yang menyebabkan kadar air dan kelembabannya masih tinggi. Kondisi optimum untuk menghasilkan aflatoxin adalah kelembaban relatif 85% dan kadar air 16%. Akibatnya terjadi kontaminasi jamur *A. flavus*, strain *aflatoxigenic* berhasil membentuk koloni dan menghasilkan AFB₁ (Cotty dan Melon, 2004; Williams *et al.*, 2004). Selain itu, kontaminasi terjadi karena kemungkinan lain yaitu pada ikan kayu dilumuri tepung terigu. Adapun tujuan pemakaian tepung agar penyimpanan dapat bertahan lama. Tetapi penggunaan tepung terigu dapat sebagai media tumbuhnya jamur *A. flavus* (Rahmanna dan Taufiq, 2003).

Aflatoxin B₁ jika dikonsumsi dalam konsentrasi yang rendah dan terus menerus akan menyebabkan turunnya respon imunitas dan dalam jangka panjang dapat menyebabkan meningkatnya risiko kanker hati. Risiko kanker hati yang disebabkan oleh AFB₁ tergantung pada daya tahan tubuh, detoksikasi, umur, gizi, nutrisi, dan tingkat serta lamanya terekspos aflatoxin serta agen penyebab lain seperti virus hepatitis (HBV) atau parasit (Pitt, 2001; Saad, 2001). Menurut penelitian Smela (2001) terdapat korelasi positif antara AFB₁ dengan virus penyebab hepatitis. Risiko kanker pada seseorang yang terinfeksi HBV meningkat sampai 60% ketika orang tersebut terkontaminasi AFB₁.

KESIMPULAN

Jamur *A. flavus* yang terkandung pada ikan kayu mempunyai korelasi yang signifikan terhadap AFB1.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrunhosa, L., R.R.M. Paterson, Z. Kozakiewicz, N. Lima, and A. Venancio. 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**. 32:240-242.
- Cotty, P.J. and J.E. Melon. 2004. **The Use of Atoxigenic Strains of *A. flavus* to Prevent Aflatoxin Contamination**. Food and Feed Safety Unit, SRRC, New Orleans, LA.
- Dharmaputra, O.S., A.S.R. Putri, I. Retnowati, and S. Ambarwati. 2003. *Aspergillus flavus* and aflatoxin in peanuts at various stages of delivery chains in Pati Regency, Central Java. **Report of ACIAR Project PHT 1997/017**.
- FAO. 1997. Worldwide regulations for mycotoxins 1995 - a compendium. **FAO Food and Nutrition Paper** No. 64. Rome.
- Horn, B.W., R.L. Greene, R.B. Sorensen, P.D. Blankenship, and J.W. Dorner. 2000. Conidial movement of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in peanut fields following application to soil. **Mycopathologia**. 151:81-92.
- Mishra, H.N. and C. Das. 2003. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. Critical review in food science and nutrition. **Boca Raton**. Vol 43. Proquest Medical Library.
- Pitt, J.I. 2001. Toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Mycotoxin prevention and control in foodgrains**.
- Rahmanna dan A. Taufiq. 2003. Aflatoksin: senyawa racun pada biji kacang tanah. **Bulletin Tani Tanaman Pangan dan Hortikultura**.
- Saad, N. 2001. **Aflatoxin Occurrence and Health Risk**. An undergraduate student Cornell University for The AS625 Class. Animal Science at Cornell University. USA.
- Smela, 2001. Molecular Epidemiology: Aflatoxin, p53 mutations, and liver cancer as a paradigm. www.aspcancerconference.amc.org/3m2001groopman.htm.
- Supardi, I. dan Sukamto. 1999. **Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan**. Penerbit Alumni. Bandung.
- Williams, J.H., T.D. Phillips, P.E. Jolly, J.K. Stiles, C.M. Jolly, and D. Aggarwal, 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **Am. J. Clin. Nutr.** 80:1106-1122.