

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS AFLATOKSIN M₁ SECARA *ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA)

Sri Rachmawati, Adin Priadi dan Henny Yusrini

Balai Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata 30, PO Box 151, Bogor 16114,
Telp. (0251) 331 048, Fax. (0251) 330 425, E-mail: balitvet@indo.net.id

Abstrak

Pengembangan teknik *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk senyawa racun sudah banyak dilakukan beberapa tahun terakhir ini. Aflatoksin M₁ (AFM₁) merupakan salah satu senyawa racun yang ditemukan dalam susu dan produk susu. Suatu pengembangan metode analisis untuk AFM₁ secara ELISA telah dilakukan. Antibodi aflatoksin diproduksi setelah dilakukan penyuntikan terhadap kelinci dengan antigen AFM₁-BSA komersial (Sigma A 6421). Selanjutnya antibodi bersama-sama dengan serum normal digunakan untuk penetapan ELISA. Hasil studi menunjukkan bahwa kondisi pereaksi-pereaksi imunokimia yang digunakan untuk analisis AFM₁ secara *indirect competitive ELISA* masing-masing adalah *coating* antigen AFM₁-BSA dengan pengenceran 1/1600 (0,056 ug/ml), antibodi dengan pengenceran 1/400 dan konjugat *goat anti rabbit* (IgG+*horseradish peroksidase*) dengan pengenceran 1/4000. Kurva kalibrasi memberikan garis lurus pada kisaran 0,1-100 ng/ml dan limit deteksi 0,1 ng/ml. Hasil uji perolehan kembali menunjukkan hasil cukup baik, dimana pada konsentrasi AFM₁ 5, 10, dan 50 ng/ml, konsentrasi AFM₁ yang terkandung dalam sampel susu ditemukan kembali sebanyak rata-rata 100,68%. Terjadi reaksi silang dari antibodi AFM₁ dengan aflatoksin AFB₁ dan AFG₁. Konsentrasi AFM₁ yang terdeteksi pada 3 sampel susu sapi rata-rata adalah 0,133, 0,127 dan 0,137. ng/ml.

Kata Kunci: Aflatoksin M₁, ELISA, antibodi, antigen.

Abstract

Method development of aflatoksin M₁ analysis by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Development of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for toxic compounds have been received a great of interest in the last few years. Aflatoxin M₁ is one of the toxic substances which is found in dairy milk and milk products. In this study, ELISA for detection of aflatoxin M₁ in dairy milk was developed. Antibodies against aflatoxin was produced by injecting rabbit with AFM₁-BSA commercial (Sigma A 6412). This antibody along with normal serum were used for titration of antigen and conjugate goat anti rabbits (IgG+horse raddish peroxides). It was found that the optimum condition of reagent for indirect ELISA was coating antigen AFM₁-BSA, antibodies and conjugate with dilution factor of 1/1600 (0.056 ug/ml), 1/400, 1/4000 respectively. The detection limit was 0.1 ng/ml and the linearity range was 0.1- 100-ng/ml. Recovery study (spike sample) gave the average percentage of 100.68%. There were some cross reaction of antiserum AFM₁-BSA to aflatoxin B1 and G1. The indirect competitive ELISA gave a result of AFM₁ in 3 dairy milk samples with the average concentration of 0.133, 0.127 and 0.137 ng/ml respectively.

Keywords: Aflatoxin M₁, ELISA, antibodi, antigen.

Pendahuluan

Aflatoksin adalah senyawa toksik metabolit sekunder dari kapang *Aspergillus* sp. yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan pada ternak maupun manusia. Pertumbuhan kapang ini sangat dipengaruhi oleh suhu dan kelembaban (Diener & Davis, 1969; Baiton *et al.*, 1980). Aflatoksin M₁ (AFM₁) adalah derivat dari aflatoksin induk B₁. Turunan aflatoksin yang terhidrolisis ini pertama-tama ditemukan pada susu sapi yang diberi ransum tepung kacang tanah yang tercemar aflatoksin dan dikenal dengan nama "toksin susu", sehingga jenis aflatoksin ini diberi nama dengan akhiran M (milk), yaitu aflatoksin

M₁ (Detroy *et al.*, 1971). Perkembangan selanjutnya dari jenis AFM₁ ini ditemukan pula pada urin sapi bahkan pada urin manusia dan susu ibu, yang pakan dan makanannya terkontaminasi aflatoksin (Sabino *et al.*, 1995; Denning *et al.*, 1995; El-Nezami *et al.*, 1995). AFM₁ termasuk senyawa toksik yang bersifat karsinogenik dan bersifat *immunosuppressive* yang dapat menurunkan daya kekebalan (Denning *et al.*, 1995).

Residu AFM₁ pada produk susu yaitu 4 dari 10 sampel susu bubuk kering yang diambil dari Amerika positif mengandung residu AFM₁, 21 dari 28 sampel susu kering dari Cina juga positif mengandung residu AFM₁. Kadar residu AFM₁ yang terdeteksi rata-rata 0,96 ng/g dan 1,028 ng/g Kawamura *et al.* (1994). Kandungan aflatoksin M₁ pada sampel susu sapi dari daerah P. Jawa yang diperiksa di Balai Penelitian Veteriner menunjukkan bahwa sebanyak 112 dari 188 sampel susu sapi tersebut positif mengandung AFM₁, dengan kadar yang berkisar antara 0,12-20,75 ng/ml di daerah Jawa Barat, 0,20-9,67 ng/ml di daerah Jawa Tengah dan 0,10-2,00 ng/ml di daerah Jawa Timur (Maryam *et al.*, 1992). Nilai maksimal senyawa AFM₁ di dalam susu sapi untuk dapat dikonsumsi berdasarkan peraturan United State for Food and Drug Administration (US-FDA) adalah 0,5 ng/ml (van Egmond, 1989).

Mengingat senyawa toksik AFM₁ tersebut sangat berbahaya bagi manusia, maka pemantauan produk ternak terutama susu sapi secara berkesinambungan perlu dilakukan. Untuk ini diperlukan suatu metode yang cepat. Teknik ELISA memungkinkan analisis kualitatif dan kuantitatif dilakukan lebih cepat, praktis dengan peralatan sederhana (Tijssen, 1985; Ward *et al.*, 1990) dibandingkan teknik kromatografi lapis tipis - KLT (*thin layer chromatography*-TLC) atau kromatografi cair kinerja tinggi -KCKT (*high performance liquid chromatography*- HPLC) yang umum dilakukan. Kedua teknik kromatografi tersebut memerlukan waktu ekstraksi yang lama, dan bahan serta peralatan yang mahal.

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan antibodi dari kelinci yang dapat digunakan untuk mengembangkan metode analisis AFM₁ secara ELISA.

Bahan dan Cara Kerja

Penyuntikan dan pengumpulan antibodi

Antigen yang digunakan adalah aflatoksin M₁-BSA komersial (Sigma A 6421). Penyuntikan dilakukan terhadap 3 ekor kelinci sebanyak 3 kali masing-masing dengan 200 µl antigen setiap kali penyuntikan. Penyuntikan pertama (D₀) subkutan dan antigen diemulsikan dalam *freund's complete adjuvant*. Penyuntikan kedua (D₃₀) dan ketiga (D₆₀) dilakukan subkutan dan antigen diemulsikan dalam *incomplete adjuvant*. Darah diambil melalui pembuluh arteri dari telinga pada hari ke 0, 14, 30, 45, 60, 75 dan 90. Darah dimasukkan ke dalam tabung, disentrifugasi untuk diambil serumnya, lalu disimpan pada suhu -20°C.

Uji aktivitas antibodi

Pengujian yang dilakukan mengikuti prosedur Ward *et al.*, (1990) dan Truckness & Stack (1994) yang dimodifikasi. AFM₁-BSA dilapis pada plat mikrotiter dengan mengisi 100 µl/lubang larutan AFM₁-BSA dalam bufer karbonat 0,05M pH 9,6 (pengenceran 1: 1000). Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian plat dicuci dengan PBS-T (*Phosphate Buffer Saline* yang mengandung Tween-20 0,05% v/v) pH 7,2 sebanyak 3 kali masing-masing dengan 200 µl/lubang. Kemudian serum yang telah diperoleh ditambahkan ke dalam tiap lubang pada plat. Penambahan serum sebanyak 100 µl dengan pengenceran 1/100 dalam larutan TBS-TC (*Tris Buffer Saline* yang mengandung Tween-20

sebanyak 0,05% v/v dan kasein sebanyak 0,2% v/v) pH 9,6. Selanjutnya dikocok selama 1 jam pada suhu kamar. Plat dicuci kembali dengan PBS-T tiga kali, masing-masing dengan 200 µl/lubang lalu ditambahkan konjugat IgG *antirabbit* yang dilabel dengan enzim *horseradish peroxidase* dengan pengenceran 1/15000 dalam larutan TBS-TC pH 9,6. Plat dikocok kembali selama 1 jam pada suhu kamar kemudian dicuci dengan PBS-T tiga kali, masing-masing dengan 200 µl/lubang. Sebagai indikator ditambahkan substrat ABTS-H₂O₂ dalam bufer sitrat pH 4,2 dan dikocok kembali selama 1 jam hingga timbul warna hijau kebiruan. Serapan warna atau *optical density* (OD) dibaca pada panjang gelombang 414 nm dengan ELISA *plate reader*. Serum yang mempunyai respon tinggi selanjutnya dikumpulkan, disatukan, dan dimurnikan dengan penambahan larutan amonium sulfat jenuh dan disentrifugasi. Serum diambil secukupnya dan disimpan untuk keperluan selanjutnya.

Respon antibodi terhadap BSA

Untuk mengetahui spesifisitas antibodi terhadap AFM₁, maka dilakukan uji ELISA dengan menggunakan antigen AFM₁-BSA dan BSA. Pengenceran AFM₁-BSA dan BSA dibuat sama dan bervariasi yaitu 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 dan 1/3200 dengan menggunakan antibodi yang sama pada pengenceran 1/100, 1/200 dan 1/400.

Penentuan kondisi optimal, titrasi antigen dan antibodi

Penentuan kondisi optimum dari antibodi, *coating* antigen dan konjugat dilakukan dengan metode seperti di atas dan menggunakan berbagai variasi konsentrasi pereaksi-pereaksi tersebut. Tiga nilai konsentrasi antibodi yang dicoba yaitu pengenceran 1/100, 1/200 dan 1/400, *coating* antigen dilakukan dengan pengenceran 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 dan konsentrasi konjugat dengan pengenceran 1/4000.

Penentuan kurva standar kalibrasi dan limit deteksi

Pengujian dilakukan dengan metode ELISA seperti di atas pada kondisi optimum yang diperoleh dengan 3 kali ulangan, namun pada saat penambahan antibodi, antibodi dicampur dengan standar AFM₁ komersial (Sigma) dengan perbandingan 1:1 dan dimasukkan pada plat mikro. Dengan metode *indirect competitive* ELISA, ditentukan nilai inhibisi dari berbagai variasi konsentrasi standar AFM₁ (0,1-100 ng/ml), berapa konsentrasi AFM₁ terendah yang masih dapat terdeteksi, selanjutnya dibuat kurva kalibrasi standar AFM₁.

Uji perolehan kembali (*recovery*) dan reaksi silang

Uji perolehan kembali dilakukan dengan menambahkan standar AFM₁ ke dalam masing-masing 3 sampel susu sapi, dimana konsentrasi AFM₁ yang dianalisis (pada plat mikro) adalah 5, 10 dan 50 ng/ml. Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Satu ml sampel susu diekstrak dengan 2 ml di klorometan, diuapkan dan akhirnya dilarutkan kembali dalam 1 ml PBS. Selanjutnya disentrifugasi dan larutan jernih digunakan untuk analisis. Penetapan dilakukan dengan metode *indirect competitive* ELISA, kemudian dihitung nilai inhibisinya.

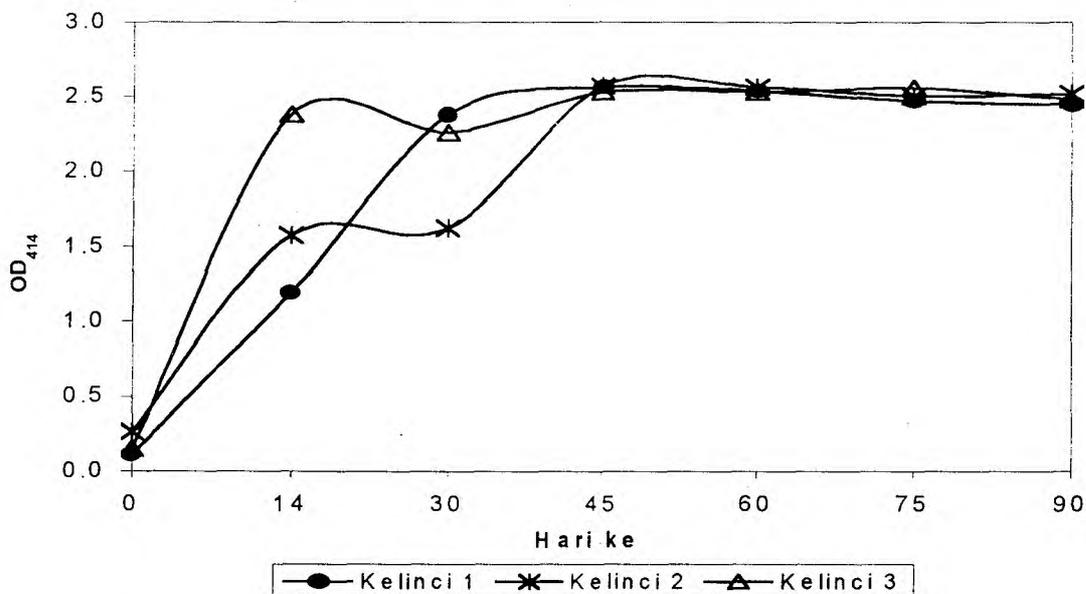
Cara menghitung persentase *recovery* dan kadar AFM₁ pada sampel

Dari hasil pengukuran sampel dengan penambahan standar dan sampel tanpa penambahan standar, dapat dihitung dan diketahui nilai inhibisinya. Kemudian nilai

inhibisi ini dimasukkan ke persamaan garis yang ditemukan pada kalibrasi standar sebagai nilai Y, maka kadar AFM₁ (X) diketahui. Persen recovery adalah kadar AFM₁ yang ditemukan (nilai X) dibagi dengan kadar AFM₁ yang di analisis (*spike sample*) dikalikan 100. Dari data serapan antibodi dan serapan sampel tanpa penambahan standar dapat dihitung persen inhibisinya. Selanjutnya nilai inhibisi ini dimasukkan ke persamaan garis, maka dapat diketahui kadar AFM₁ pada sampel tersebut (X). Untuk melihat adanya reaksi silang, antibodi, antisera AFM₁-BSA diuji terhadap aflatoxin B₁ dan G₁. Kedua jenis aflatoxin tersebut dibuat bervariasi konsentrasinya (0,1-100 ng/ml), kemudian ditentukan nilai inhibisi pada kondisi optimum dan respon dibandingkan dengan standar AFM₁.

Hasil dan Pembahasan

Uji aktivitas antibodi yang dilakukan terhadap serum yang dihasilkan oleh kelinci 1, 2 dan 3 menunjukkan bahwa serum tersebut memberikan respon terhadap antigen AFM₁-BSA yang dilapis pada plat mikrotiter. Aktivitas antibodi sebanding dengan intensitas warna yang timbul dari reaksi antara enzim dan substrat. Pada Gambar 1 terlihat respon antibodi yang dihasilkan ketiga kelinci pada berbagai hari pengamatan.

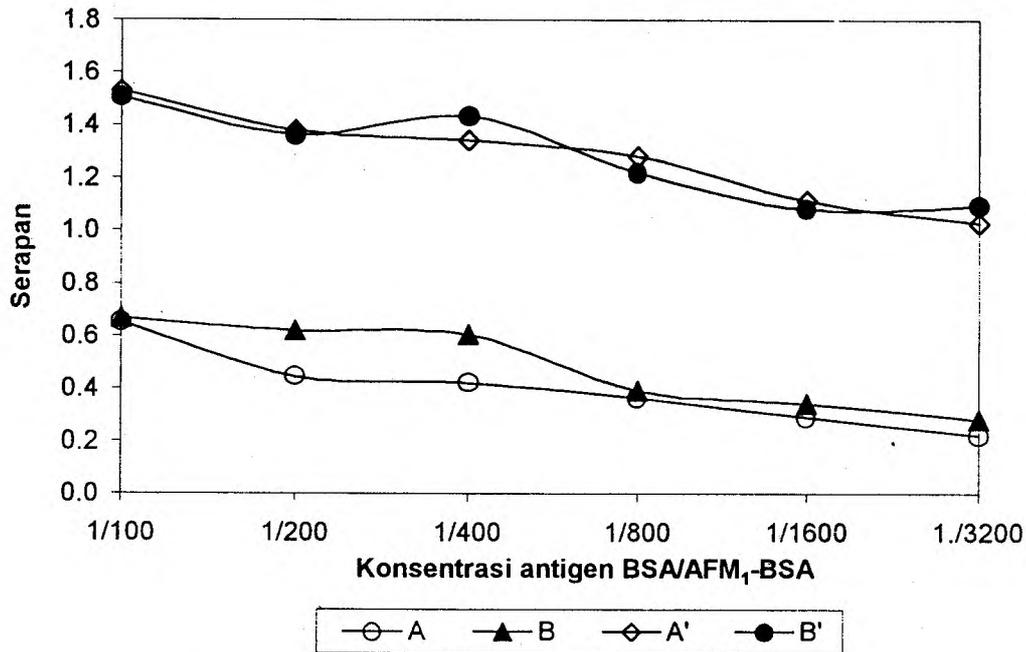


Gambar 1. Respon antibodi pada berbagai hari pengamatan

Respon serum darah pada pengambilan hari 0 (sebelum kelinci diimunisasi) menunjukkan nilai OD yang rendah yang bahwa belum terbentuknya antibodi terhadap AFM₁-BSA. Pada hari ke 14 setelah imunisasi pertama, produksi dan aktivitas antibodi naik tajam dan agak menurun sampai hari ke 30, pada saat dilakukan imunisasi ke 2, kecuali untuk kelinci 1. Pada akhirnya naik kembali dan aktivitas antibodi dari ketiga kelinci stabil dan hampir sama setelah imunisasi ke 3 yaitu setelah hari ke 60 - 90. Menurut Gaur *et al.*, (1980) imunisasi yang dilakukan berjangka dan secara terus menerus dalam jumlah sedikit-sedikit (200 µl) akan memberikan antibodi dengan aktivitas dan spesifikasi yang tinggi. Apabila imunisasi dihentikan maka dalam jangka waktu tertentu aktivitas antibodi akan menurun terhadap antigen tersebut. Pemberian *Freund complete adjuvant* pada penyuntikan pertama menyebabkan kenaikan aktivitas antibodi yang tajam pada hari

METODE ANALISIS AFLATOKSIN M₁

ke 14, dan setelah penyuntikan kedua dan ketiga dengan campuran antigen AFM₁ dan larutan *incomplete adjuvant* respon antibodi menjadi stabil (Liddel & Cryer, 1991).



Keterangan : A = respon antibodi , pengenceran 1/400, terhadap BSA
 B = respon antibodi , pengenceran 1/200 terhadap BSA
 A' = respon antibodi , pengenceran 1/400, terhadap AFM₁-BSA
 B' = respon antibodi , pengenceran 1/200 terhadap AFM₁-BSA

Gambar 2. Respon antibodi terhadap terhadap AFM₁-BSA dan BSA

Aflatoksin M₁ berstruktur hampir sama dengan aflatoksin B₁ dan merupakan senyawa dengan berat molekul kecil yang disebut hapten serta tidak bersifat imunogenik atau sifat imunogeniknya lemah. Agar dapat bersifat imunogenik perlu dikongjugasi secara kimiawi dengan senyawa bermolekul besar berupa protein seperti *bovine serum albumin* (BSA) (Chu *et al.*, 1987). Oleh karenanya AFM₁-BSA yang digunakan disuntikkan sebagai antigen. Pada Gambar 2 terlihat bahwa respon antibodi cukup tinggi terhadap antigen AFM₁-BSA dibandingkan terhadap BSA pada berbagai konsentrasi AFM₁-BSA dan BSA yang sama. Respon antibodi yang cukup tinggi terhadap antigen AFM₁-BSA dibandingkan BSA menunjukkan bahwa antibodi yang dihasilkan kelinci adalah antibodi aflatoksin (Pestka *et al.*, 1980).

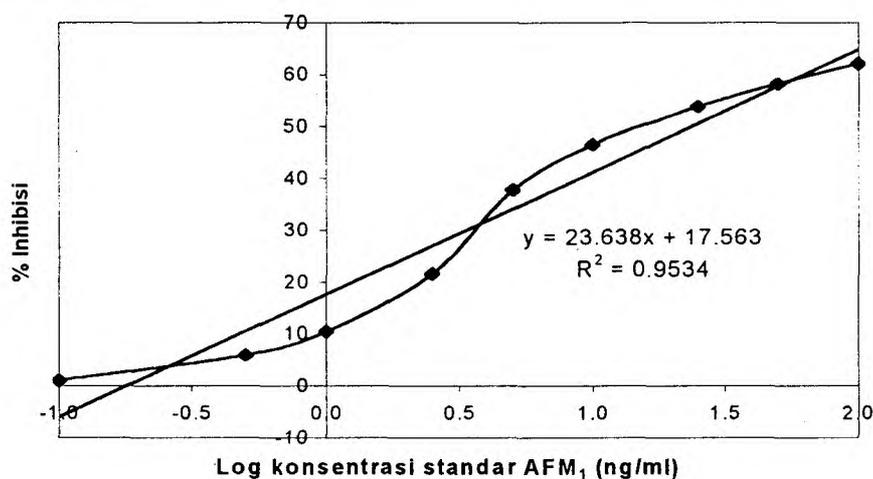
Studi selanjutnya dilakukan untuk menentukan kondisi optimum antigen, antibodi dan konjugat yang digunakan pada uji ELISA AFM₁. Variasi pengenceran antigen (1/100-1/3200), pengenceran antibodi (1/100-1/400) dan pengenceran konjugat IgG *antirabbit* 1/4000, penggunaan pereaksi imunokimia di atas, bufer dan kondisi penetapan adalah cukup sensitif dan efisien untuk diterapkan pada pengujian AFM₁ secara ELISA (Tabel 1).

Tabel 1. Kondisi dan penggunaan pereaksi untuk uji ELISA AFM₁.

Pereaksi	Bufer	Pengenceran	Waktu inkubasi (jam)
Antigen AFM ₁ -BSA	Bikarbonat pH 9,6	1/1600	24
Antibodi, antisera	Tris Bufer Salin Tween 20 kasein	1/400	1
Goat anti rabbit, IgG+horseradish peroxide	Tris Bufer Salin Tween 20 kasein	1/4000	1
Substrat ABTS*	Bufer sitrat pH 4,2		1

Keterangan * ABTS= 2,2 Azino-bis (3-Ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) + bufer sitrat +H₂O₂

Dengan menggunakan kondisi seperti pada Tabel 1, pengujian *linierity* atau pembuatan kurva kalibrasi standar AFM₁ dilakukan dengan metode *indirect competitive ELISA* dimana antigen standar AFM₁ dicampurkan dengan antibodi pada konsentrasi tertentu sebelum ditambahkan pada plat mikro. Ternyata pada kisaran konsentrasi 0,1- 100 ng/ml memberikan kurva linier seperti pada Gambar 3. Respon terendah yaitu pada konsentrasi AFM₁ 0,1 ng/ml, dengan nilai inhibisi sebesar 0,98% merupakan limit deteksi dari penetapan ini. Limit deteksi 0,1 ng/ml juga dilaporkan Lawellin *et al.* (1977) pada uji ELISA aflatoksin B₁.

Gambar 3. Kurva kalibrasi standar AFM₁.

Uji perolehan kembali dilakukan dengan cara "*spike sample*" yaitu menambahkan standar AFM₁ pada sampel susu dengan konsentrasi tertentu. Hasil yang diperoleh disajikan pada Tabel 2, ternyata persen *recovery* mencapai rata-rata 100,68%. Berdasarkan *Applied of Analytical Chemistry* (AOAC) (1994), persen *recovery* yang baik dan dapat diterima berkisar antara 80-110%. *Recovery* melebihi 100%, dapat disebabkan oleh kurang bersihnya peralatan gelas, plat mikrotiter, dan kemurnian bahan kimia. Pada penetapan dengan pengukuran serapan warna, hal-hal tersebut sangat berpengaruh.

Tabel 2. Hasil uji perolehan kembali (*recovery*).

AFM ₁ spike sample (ng/ml)	Rata-rata <i>recovery</i> (n = 3)
5	97,42
10	107,25
50	97,37
Rata-rata <i>recovery</i>	100,68

Hasil pengujian selanjutnya adalah reaksi silang yang dilakukan untuk mengetahui terjadinya reaksi, ikatan antara antibodi dengan jenis aflatoksin lainnya. Hasil uji reaksi silang yang diperoleh menunjukkan bahwa antibodi aflatoksin juga memberikan respon terhadap AFB₁ dan AFG₁. Hal ini sangat mungkin terjadi mengingat struktur dan sifat AFM₁ dan aflatoksin induk lainnya seperti AFB₁ dan AFG₁ hampir sama. (Chu & Ueno, 1977). Namun demikian, adanya reaksi silang tidak berpengaruh besar mengingat jenis AFG₁ ini tidak ditemukan pada sampel susu atau produk ternak, sedangkan jenis AFB₁ ditemukan dalam jumlah yang sangat kecil karena sudah terhidrolisis menjadi bentuk AFM₁.

Hasil pengukuran terhadap 3 sampel susu sapi yang digunakan untuk uji perolehan kembali menunjukkan bahwa kadar AFM₁ rata-rata pada masing-masing sampel adalah 0,133, 0,127 dan 0,137 ng/ml. Teknik ELISA ini perlu dipelajari lebih lanjut dengan mencoba sampel yang lebih banyak dan dibandingkan dengan metode kromatografi. Untuk metode skrining teknik ini dapat diterapkan dengan menggunakan satu konsentrasi standar AFM₁, yaitu konsentrasi maksimum diperbolehkan berdasarkan US-FDA (0,5 ng/ml).

Kesimpulan dan Saran

Antibodi yang dihasilkan dari ketiga kelinci mempunyai aktifitas yang cukup tinggi terhadap AFM₁, dan sangat bermanfaat untuk digunakan dalam menganalisis AFM₁ secara ELISA terutama untuk metode *skrining*, mengingat penetapan dapat dilakukan dalam jumlah yang banyak (\pm 96 lubang), dalam waktu yang singkat dengan metode ekstraksi yang sederhana. Analisis kuantitatif dapat pula dilakukan dengan lebih cepat dan sederhana. Kondisi penetapan AFM₁ secara *indirect competitive* ELISA dapat dilakukan dengan menggunakan *coating* antigen, antibodi dan konjugat *anti rabbit* pada pengenceran 1/1600, 1/400 dan 1/4000. Teknik ELISA ini merupakan hasil awal yang masih perlu dikembangkan lebih lanjut.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Agriculture Research Management Project (ARMP II), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian atas biaya yang diberikan melalui kontrak No. PL.420.707.1193/P2KP3 tahun anggaran 1997/1998, sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

Daftar Pustaka

- Applied Of Analytical Chemistry (AOAC). 1994. Validation of analytical method. Dalam: A Hidayat & Sahlur (Eds.), Validasi dan unjuk metode analisis tanaman. Balitbio. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan.
- Baiton, S.J., R.D. Coler, B.D. Jones, E.M. Marley, M.J. Nagler & R.L. Torner. 1980. Mycotoxin Training Manual. Tropical Product Institute, London: 20-65
- Chu, F.S. & I. Ueno. 1977. Production of antibodies against aflatoxin B₁. Applied Environmental Microbiology 33: 1125-1128
- Chu, F.S., T.S.L. Fan, G.S. Zhang, Y.C. Xu, S. Faust & P.L. Mc Mahan. 1987. Improve enzyme linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ in agricultural commodities. Journal of Association of Analytical Chemistry 70: 854-857.
- Denning, D.W., S.C. Quipe, D.G. Altman & K. Makarananda. 1995. Aflatoxin and outcome from acute lower respiratory infection in children in Philipines. Annals of Tropical Paediatrics 15 (3): 209-216.
- Detroy, R.W., E.B. Lillehoy & A. Ciegler. 1971. Aflatoxins and Related Coumpounds. Dalam: A. Ciegler, S. Kadis & S.J. Aji (Eds.), Mycobial Toxins. Academic Press, New York, USA. pp 117-126

- Diener, U.L. & N. Davis. 1969. Aflatoxins Formation by *Aspergillus flavus* Dalam: L. A Goldblatt (Ed.), Aflatoxins. Academic Press, New York. USA. pp 77-105
- El-Nezami H.S., G.Nicoletting, G.E. Neal, D.C. Donohue & J.T. Ahukas. 1995. Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia dan Thailand. Food and Chemical Toxicology 3 (3): 173-179.
- Gaur, P.K., O. El-Nakib & F.S. Chu. 1980. Comparison of antibodies production against aflatoxins B₁ in goats and rabbits. Applied Environmental Microbiology 40: 678-680
- Kawamura, O., D.S. Wang, Y.X. Liang, A. Hasegawa, C. Saga, A. Visconti & I. Ueno. 1994. Further survey of aflatoxin M₁ in milk powders by ELISA. Food and Agricultural Immunology.6 (4):465-467.
- Lawellin, D.W., D.W. Grant & B.K. Joyce. 1977. Enzyme linked immunosorbent analysis for aflatoxin B₁. Applied Environmental Microbiology 34: 94-96.
- Liddel J.E., & A. Cryer. 1991. A practical guide to monoclonal antibodies. John Wiley & Sons Ltd. England. 127-129.
- Pestka, J.J., P.K. Gaur, & F.S. Chu. 1980. Quantitation of aflatoxin B₁ antibody by an Enzyme linked immunosorbent microassay. Applied Environmental Microbiology 40: 1027-1031.
- Maryam, R., S. Juariah & Rachmat. 1992. Residu aflatoksin M₁ pada susu sapi. Laporan teknis penelitian T.A. 1991/1992. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- Sabino, M., A. Purchio & T.V. Milanez. 1995. Aflatoxins B₁, M₁ and aflatoxicol in tissue and urine of calves receiving aflatoxin. Food Additive and Contaminants 12 (3): 467-472.
- Tijssen, P. 1985. Practice and theory of Enzyme linked immunoassay. Elsvier Sci. Publ. Amsterdam. 78-79.
- Truckness M.W. & M.E. Stack, 1994. Enzyme linked immunosorbent assay for B₁, B₂, G₁ and G₂ in corn follow up collaborative study. Journal of Association of Analytical Chemistry 7 (3): 655-658.
- Van Egmond, H.P. 1989. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard method of sampling and analysis. Food Additives and Contaminants 6 (2): 142-144.
- Ward, C.M., A.P. Wilkinson, S. Bramham, H.A. Lee, H.W.S. Chan, G.W. Butcher, A. Hutchings & M.R.A. Morgen. 1990. Production and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against aflatoxin B₁ oxime-BSA in an enzyme linked immunosorbent assay. Mycotoxin Assay 6: 73-82.

Diskusi

- T:** ELISA dapat mendeteksi substrat target sampai dengan konsentrasi 0,1 ppb, sedangkan batas tertinggi 0,5 ppb. Bagaimana sampel alfa-toksin itu terdeteksi?
- J:** Adanya perbedaan gugus OH (hidroksil) antara kacang tanah (yang diberi makan untuk sapi) dan susu. Batas B₁ untuk kacang tanah adalah 0,5 ppb sedangkan M₁ pada susu adalah 1/10 dari B₁ kacang tanah akan menjadi M₁.
- T:** Apakah ada alternatif pengganti protein lain selain BSA yang mahal itu untuk mengkonjugasi?
- J:** Ada, yaitu BSA fraksi 6 yang tidak terlalu mahal.