

Sintesis reagen imunokimia untuk deteksi okratoksin dengan metode imunokromatografik nanopartikel emas

Synthesis of immunochemical reagent for ochratoxin detection using gold nanoparticle immunochromatographic method

Irma KRESNAWATY^{1*)}, Romsyah MARYAM²⁾, SUHARYANTO¹⁾ & Sumi HUDIYONO³⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16128, Indonesia

²⁾ Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadina No. 30, Bogor 16114, Indonesia

³⁾ Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

Diterima tanggal 12 Maret 2015/disetujui tanggal 9 Juni 2015

Abstract

The quality of Indonesian coffee and cocoa products has been declined due to the contamination of fungi producing ochratoxin, a serious human mycotoxin. Therefore, development of fast, accurate and simple method for early detection of ochratoxin contamination is required. As a part of research attempted to develop early detection technique of ochratoxin in severall commodities, especially agricultural products, the objective of this study was to produce immunochemical reagent for ochratoxin detection using immunoglobulin Y (IgY) based on immunochromatographic method. Results showed that OTA-OVA could be synthesized using active ester method with addition of N-hydroxy-succinimide and dicyclo-carbimide. The intermediate compound produced showed C=O stretching vibrational band at 1600 cm⁻¹ and C-O stretching vibrational band at 1300-1000 cm⁻¹. Antibody-gold nanoparticle conjugate was optimally produced at pH 9 and with antibody dilution of 1:7.5 (v/v). There was 50 nm absorption shift in visible absorption after the antibody was conjugated with gold nanoparticle. Even though the test strip did not show clear visualization, the cut off of ochratoxin concentration is obviously determined at 10 ppb. This results suggest that the technique could be used to detect ochratoxin contamination.

[Keywords: Ochatoxin, early detection, antibody IgY, lateral flow immunoassay]

Abstrak

Komoditas kopi dan kakao Indonesia terkendala masalah mutu produk yang rendah akibat kontaminasi jamur yang menghasilkan okratoksin. Okratoksin merupakan mikotoksin yang membahayakan kesehatan manusia. Oleh karena itu, cara deteksi dini kontaminasi okratoksin yang cepat, akurat dan mudah perlu dikembangkan.

Sebagai bagian dari usaha untuk mengembangkan teknik deteksi dini okratoksin pada berbagai komoditas, khususnya produk pertanian, penelitian ini bertujuan menghasilkan reagen imunokimia yang menggunakan antibodi *immunoglobulin Y* (IgY) berdasarkan metode imunokromatografik untuk deteksi okratoksin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa OTA-OVA dapat disintesis dengan metode ester aktif dengan menambahkan N-hidroksisuksinimida dan disiklokarboimida. Senyawa antara yang dihasilkan memiliki absorpsi pada frekuensi 1600 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya vibrasi ulur ikatan C=O dan adanya banyak absorpsi pada 1300-1000 cm⁻¹ yang mengindikasikan adanya serapan ulur yang kuat ikatan C-O. Konjugat antibodi-nanopartikel emas dihasilkan optimum pada pH 9 dan dengan pengenceran antibodi 1:7,5 (v/v). Hasil pengujian spektrofotometer *visible* menunjukkan adanya pergeseran serapan sebesar 50 nm setelah antibodi dikonjugasikan pada nanopartikel emas. Meskipun secara visual tidak begitu jelas, tetapi hasil pengujian pada *teststrip* menunjukkan bahwa nilai *cut off* konsentrasi okratoksin yang terdeteksi adalah 10 ppb. Hasil ini menunjukkan bahwa teknik yang dikembangkan dapat digunakan untuk deteksi kontaminasi okratoksin.

[Kata Kunci: Okratoksin, deteksi dini, antibodi IgY, immunoasai aliran lateral]

Pendahuluan

Indonesia sebagai daerah tropis dengan fluktuasi kelembaban nisbi udara (RH) cukup tinggi sangat kondusif untuk perkembangbiakan jamur, termasuk jamur toksigenik penghasil mikotoksin (Haliza *et al.*, 2006). Salah satu mikotoksin tersebut adalah okratoksin yang merupakan metabolit sekunder kelompok *Aspergillus* dan *Penicillium*. Okratoksin A (OTA) merupakan jenis okratoksin yang paling toksik dibandingkan beberapa jenis okratoksin yang lain. Kandungan okratoksin merupakan salah satu aspek

*)Penulis korespondensi: irma.kresnawaty@yahoo.com

standar mutu kopi dan kakao yang saat ini dipersyaratkan oleh pasar dunia, terutama Uni Eropa (ICMSF, 1996). Selain pada kopi dan kakao, okratoksin juga ditemukan pada komoditas jagung, anggur, gandum, sorgum, beras, kedelai, kacang-kacangan dan kopra. Selain itu, karena bersifat larut dalam lemak, OTA juga ditemukan pada susu, daging babi, dan ayam (Covarelli et al., 2012).

World Health Organization (WHO) dan International Agency for Research on Cancer menggolongkan okratoksin sebagai senyawa toksik yang bersifat hepatotoksik, neurotoksik, teratogenik, imunotoksik, dan genotoksik (IARC, 1997; El-Khoory & Atoui, 2010). Batas kontaminasi maksimum OTA pada produk pangan telah ditentukan oleh Uni Eropa, yaitu 5 ppb untuk sereal, 5 ppb untuk kopi sangrai, 3 ppb untuk produk jadi sereal, 2 ppb untuk anggur dan 0,5 ppb untuk produk makanan bayi (Commission Regulation No 123/2005). Aturan ini diadopsi oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) dalam Keputusan Kepala BPOM tahun 2009. Batasan kontaminasi ini membutuhkan metode deteksi yang akurat dan cepat. Saat ini instrumen yang umum digunakan untuk mendeteksi OTA adalah *high performance liquid chromatography* (HPLC) dengan detektor fluoresens, *gas chromatography mass spectrometry* (GC-MS) dan *enzyme linked immunorbent assay* (ELISA). Metode analisis tersebut menghasilkan data yang akurat, tetapi biaya analisis relatif mahal, menghasilkan limbah pelarut organik, membutuhkan waktu yang relatif lama, membutuhkan preparasi contoh, dan teknisi yang terlatih. Selain itu pengujian ini tidak memungkinkan dilakukan langsung pada lokasi (*on-site detection*) (Olsson et al., 2002; Scoot, 2002).

Teknik imunodeteksi langsung (*on-site detection*) yang dapat dikembangkan adalah metode imunokromatografik (ICG) pada membran nitroselulosa atau sering disebut *lateral flow immunoassay* (LFIA). Metode ini banyak digunakan untuk kontrol klinis dan biasanya digunakan untuk analisis makanan. Teknik ini memiliki beberapa kelebihan, di antaranya penyimpanannya mudah, formatnya mudah digunakan dan hasil mudah diamati. Sehingga tidak memerlukan pelatihan khusus dan waktu analisis yang lama jika dibandingkan dengan metode lainnya (Kaushik et al., 2013). Anfossi et al. (2011) dan Shim et al. (2009) telah mengembangkan metode imunokromatografik atau *lateral flow immunoassay* untuk mengukur kontaminasi okratoksin A menggunakan antibodi kelinci dan kambing (IgG), sedangkan pada penelitian ini dilakukan pengujian metode imunokromatografik menggunakan imunoglobulin Y (IgY) dari telur ayam. Imunoglobulin Y (IgY) adalah antibodi mayoritas yang dihasilkan oleh

ayam (*Gallus domesticus*). Antibodi ayam (IgY) merupakan sumber antibodi yang murah digunakan untuk tujuan diagnostik. IgY memiliki banyak kelebihan dibandingkan IgG. Selain faktor *animal welfare*, IgY dapat diproduksi dalam jumlah yang lebih banyak dibanding IgG. Seekor ayam betina dapat menghasilkan 20 telur ayam/bulan yang sebanding dengan 2 g IgY/bulan ekuivalen dengan 300 mL serum IgG atau total 600 mL total darah. Selain itu antibodi ayam mengenal lebih banyak epitop ketika digunakan protein mamalia (Larsson et al., 1999).

Untuk menghasilkan kit deteksi *on site reaction* diperlukan beberapa reagen imunokimia, diantaranya konjugat okratoksin-ovalbumin dan konjugat antibodi-nanopartikel emas. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis reagen imunokimia konjugat okratoksin-ovalbumin (OTA-OVA) dan konjugat antibodi IgY-nanopartikel emas, yang merupakan komponen utama dari metode/teknik deteksi dini okratoksin yang sedang dikembangkan.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah imunoglobulin Y (IgY) anti OTA yang diisolasi dari telur ayam, okratoksin A (OTA), dimetilfuran (DMF), disiklokarboimida (DCC), N-hidroksisusksimida (NHS), dimetilsulfoksida (DMSO), ovalbumin (OVA), larutan partikel emas berukuran 40 nm, *buffer* karbonat, *phosphate buffer saline* (PBS), NaCl, Na₂CO₃, *bovine serum albumin* (BSA), tween-20, natrium azida, *buffer* borat, dan strip imunokromatografik yang terdiri dari tiga bantalan (sampel, pelepasan konjugat dan bantalan absorben) dan satu membran nitroselulosa.

Sintesis OTA-OVA

Sintesis OTA-OVA dilakukan dengan metode Wang-Xi et al. (2014) yang dimodifikasi. Sebanyak 500 µL OTA dalam DMF ditambah 6 mg disiklokarboimida (DCC) dan 4 mg N-hidroksisusksimida (NHS). Campuran tersebut dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada suhu kamar selama 24 jam. Kemudian campuran disentrifus dengan kecepatan 5.000 rpm selama 25 menit. Untuk memisahkan endapan. Supernatan dilarutkan dalam DMSO kemudian ditambahkan ovalbumin (OVA) 2 mg/mL dalam *buffer* karbonat tetes demi tetes dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama empat jam. Hasil reaksi selanjutnya didialisis menggunakan PBS 0,01 M pH 7,4 selama 72 jam. Hasil reaksi dan senyawa antara dianalisis dengan Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), HPLC dan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen benzen : asam asetat = 3:1.

Optimasi nanopartikel emas

Nanopartikel emas diuji pH optimum dan konsentrasi optimum dimana nanopartikel emas akan stabil menghasilkan warna merah muda. nanopartikel emas pada berbagai variasi pH(3-12) ditambah antibodi IgY anti okratoksin dan didiamkan selama 15 menit. Ke dalam larutan ditambahkan NaCl 10% sebanyak 20 μ L. Sedangkan pengujian konsentrasi maksimum antibodi dilakukan dengan variasi perbandingan volume nanopartikel emas terhadap antibodi IgY yaitu 1:5;1:7,5;1:10;1:15;1:20 dan 1:25 (v/v). Masing-masing campuran diukur absorbansinya pada 525 nm (Liet *et al.*, 2010)

Pembuatan probe antibodi terlabel nanopartikel emas

Probe antibody terlabel nanopartikel emas dibuat dengan metode Majdinasab *et al.*, (2015) yang dimodifikasi. Sebanyak 5 mL larutan emas nanopartikel berdiameter 40 nm dengan berbagai variasi pH (3 - 12) yang diatur menggunakan Na_2CO_3 ditambahkan 500 μ L antibodi IgY anti OTA tetes demi tetes dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Ke dalam campuran kemudian ditambahkan 1 mL BSA 1% dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Selanjutnya campuran diendapkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dan suhu 28°C selama 10 menit. Endapan dicuci tiga kali dengan 0,01% ovalbumin dalam bufer borat dan disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm dan suhu 28°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet emas disuspensikan kembali dengan penambahan *buffer* borat yang ditambahkan BSA, tween-20 dan natrium azida. Probe antibodi anti okratoksin terlabel nanopartikel emas disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

Penyiapan strip imunokromatografik

Strip imunokromatografik terdiri dari tiga bantalan (sampel, pelepasan konjugat dan bantalan absorben) dan satu membran nitroselulosa dengan zona uji dan kontrol (Gambar 1). Keseluruhan plat yang dirancang dipotong dan dibagi menjadi beberapa strip (5 mm x 75 mm). Membran nitroselulosa dengan *backing plate* dikeringkan di dalam oven suhu 40°C selama dua jam. Membran fiber kaca sebagai bantalan pelepas (*release pad*) direndam dalam antibodi anti OTA-nanopartikel selama dua jam dan kemudian dikeringkan di dalam oven suhu 40°C selama 30 menit. Bantalan sampel juga dilapiskan pada bagian ini dengan *over-crossing* 5 mm dengan bantalan pelepas. Bantalan absorben dilapiskan pada sisi plat yang lain. Zona uji dan kontrol dari membran nitroselulosa dilapisi berturut-turut dengan 0,25 μ L konjugat OTA-OVA (0,1 mg/mL) dan 0,5 μ L antibodi IgY (0,1 mg/mL) (modifikasi Liu *et al.*, 2013).

Pengujian OTA menggunakan strip imunokromatografik

Pengujian dilakukan dengan menambahkan larutan standar okratoksin A dengan pengenceran 0, 5 dan 10 ppb ke dalam sumur mikroplat. Masing-masing sampel ditambahkan ke bagian bantalan sampel test strip masing-masing tiga ulangan. Strip uji dibiarkan selama 10 menit untuk pembentukan warna dan hasil pengujian diamati secara visual.



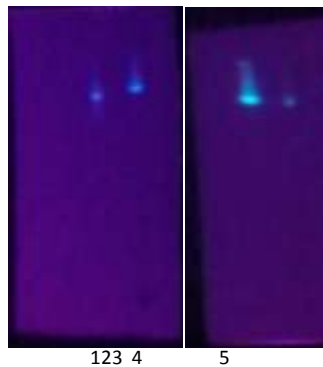
Gambar 1. Perangkat bahan deteksi imunokromatografik yang terdiri dari membran nitroselulosa, bantalan pelepas, bantalan penyerap, bantalan sampel dan *cassete*.

Figure 1. Immunochromatographic detection parts that consist of nitrocellulose membrane, release pad, absorption pad, sample pad and *cassete*.

Hasil dan Pembahasan

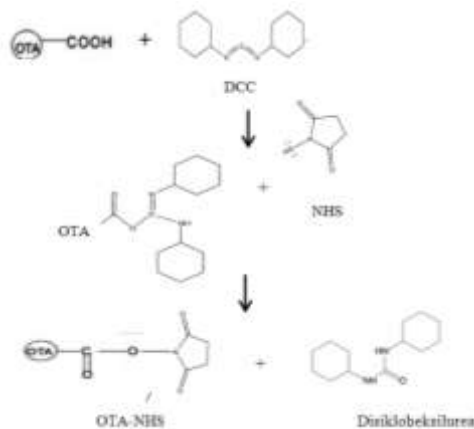
Sintesis konjugat OTA-OVA

Hasil pengujian kromatografi lapis tipis (KLT) dari tahapan proses sintesis ini menunjukkan bahwa pada tahap reaksi antara terbentuk endapan disikloheksilurea dengan ukuran molekul lebih kecil dibandingkan dengan OTA yang ditandai dengan nilai Rf lebih besar daripada OTA (Gambar 2). Hasil reaksi OTA-NHS memiliki ukuran molekul yang lebih besar dibanding OTA, sehingga nilai Rf lebih kecil dibandingkan Rf OTA (Gambar 2). OTA dikonjugasikan dengan ovalbumin (OVA) sebagai reagent pada garis T pada test trip. OTA merupakan ikatan cincin yang terbuka, sehingga bersifat reaktif. OTA biasanya direaksikan dengan *carrier protein* atau enzim dengan bantuan karbodiimida. Tetapi reaksi ini tidak dapat terjadi secara langsung karena sifat lipofilik OTA yang tidak memungkinkannya bercampur dengan *carrier protein* yang bersifat hidrofilik. Oleh karena itu, sifat lipofilik OTA harus diubah menjadi hidrofilik dengan penambahan reagen NHS (N-hidroksisuksinimida). Gugus asam karboksilat pada OTA diaktivasi terlebih dahulu oleh NHS dengan keberadaan disiklokarboimida (DCC) membentuk ester aktif. DCC biasa digunakan untuk mereaksikan gugus amina untuk membentuk peptida secara *in vitro*. Reaksi aktivasi ini berlangsung semalaman dengan



Gambar 2. Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) senyawa antara pada reaksi sintesis OTA-OVA dengan fasa gerak benzen : asam asetat = 3:1. Lajur 1=OVA; 2& 4= OTA; 3= endapan dan 5 = hasil reaksi.

Figure 2. Thin layer chromatography result of intermediate compound formed during synthesis of OTA-OVA with eluent benzene : acetic acid = 3:1. Lane 1=OVA; 2& 4= OTA; 3= precipitate, and 5 = reaction product.



Gambar 3. Reaksi OTA dan NHS membentuk OTA-NHS, serta membentuk hasil samping berupa disikloheksilurea.

Figure 3. Reaction of OTA and NHS formed OTA-NHS and produced dicyclohexyl urea as reaction byproduct.

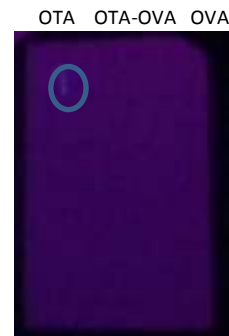
bantuan *stirrer*. Larutan disentrifus untuk memisahkan endapan hasil samping reaksi yaitu senyawa disikloheksilurea (Gambar 3).

Pada reaksi konjugasi ini terjadi penyerangan oleh gugus amina pada protein OVA terhadap gugus ester aktif OTA-NHS. Gambar 4 menunjukkan reaksi OTA-NHS dengan OVA kemudian membentuk konjugat OTA-OVA. Nitrogen pada gugus amina protein ovalbumin menyerang karbonil pada OTA-NHS membentuk ikatan amina OTA-OVA.

Hasil reaksi yang diuji dengan KLT menunjukkan tidak ada OTA dan senyawa antara yang tersisa. Molekul OVA tidak terlarut dalam fasa gerak KLT karena molekul yang besar dan bersifat larut dalam air, sehingga konjugat OTA-OVA tidak muncul pada plat KLT (Gambar 5). Protein konjugat diukur konsentrasinya dan diperoleh konsentrasi OTA-OVA 2,056 mg/mL.

Dialisis merupakan salah satu metode pemurnian yang bertujuan untuk menghilangkan pengotor dalam hal ini OTA dan reagen yang tidak bereaksi. Adanya perbedaan konsentrasi antara larutan konjugat di dalam membran dialisis dengan larutan PBS mengakibatkan zat-zat sisa reaksi berdifusi keluar melalui pori-pori kecil membran. Sedangkan konjugat-protein OTA-OVA yang memiliki ukuran besar akan tetap berada di dalam membran selofan. Membran dialisis memiliki ukuran pori 17 kDa sehingga molekul konjugat protein OVA yang memiliki massa molekul 45 kDa akan tertahan dalam membran.

Hasil karakterisasi FTIR OTA menunjukkan adanya spektra gugus O-H karboksilat pada daerah 3202 cm^{-1} , serapan C=O pada 1633 cm^{-1} dan spektra C-Cl pada 1016 cm^{-1} yang merupakan karakteristik OTA (Gambar 6a). Sementara hasil reaksi dengan NHS menghasilkan senyawa OTA-NHS yang memiliki absorpsi ikatan N-H dari



Gambar 5. Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) proses sintesis OTA-OVA dengan fasa gerak benzen : asam asetat = 3:1.

Figure 5. Thin layer chromatography result of OTA-OVA synthesis with eluent benzene : acetic acid = 3:1.



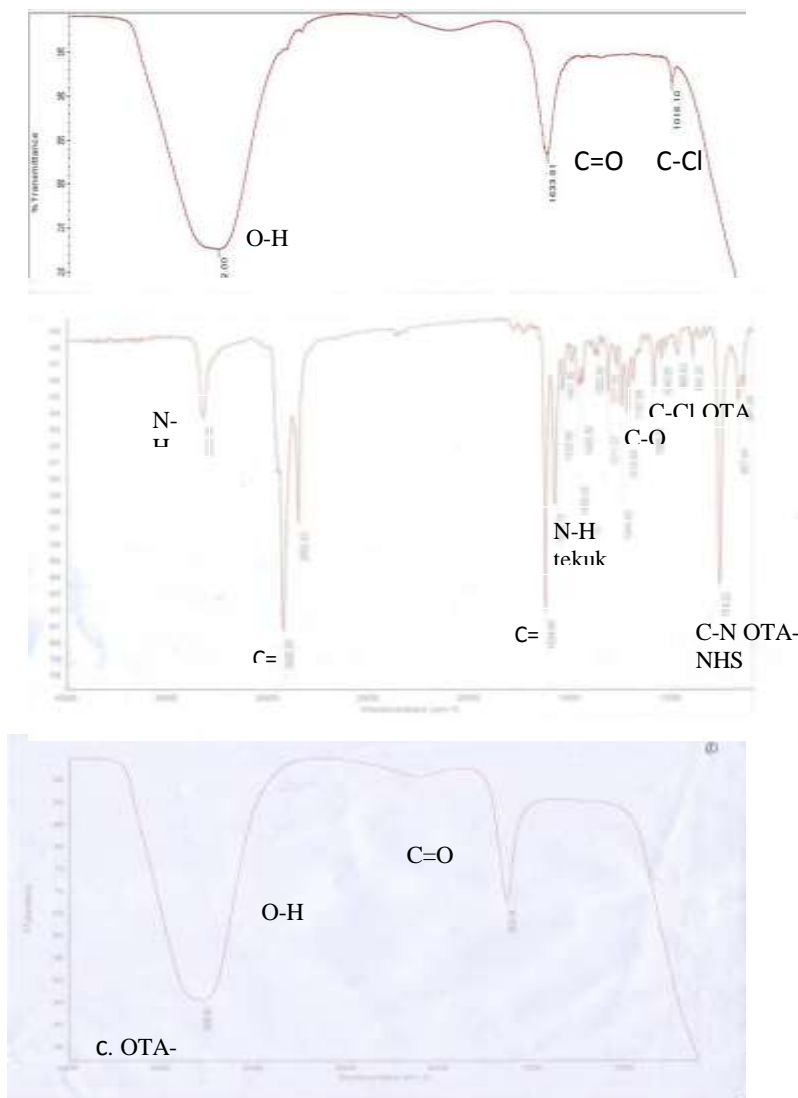
Gambar 4. Reaksi pembentukan konjugat OTA-OVA.

Figure 4. Reaction of OTA-OVA conjugate formation.

gugus amina sekunder OTA (NH) 3400-3250 cm^{-1} . Berbeda dengan absorpsi O-H, absorpsi N-H lebih tajam dan lemah dibanding O-H yang memberikan spektra yang lebar terutama untuk gugus karboksilat yang biasanya membentuk dimer. Pada frekuensi sekitar 2900 cm^{-1} terdapat serapan ulur yang kuat dari ikatan C-H alifatik. Selain itu, terdapat juga absorpsi pada frekuensi 1600 cm^{-1} yang menunjukkan adanya vibrasi ulur ikatan C=O. Adanya senyawa ester terkonjugasi mengakibatkan serapan C=O bergeser dari 1800-1700 cm^{-1} ke daerah 1600 cm^{-1} (Fessenden & Fessenden, 1986). Pada spektra juga diamati adanya banyak absorpsi pada 1300-1000 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya serapan ulur yang kuat dari ikatan C-N dan C-O (Gambar 6b). Dari spektra OTA-OVA diamati bahwa adanya absorpsi ulur O-H di daerah 3400-

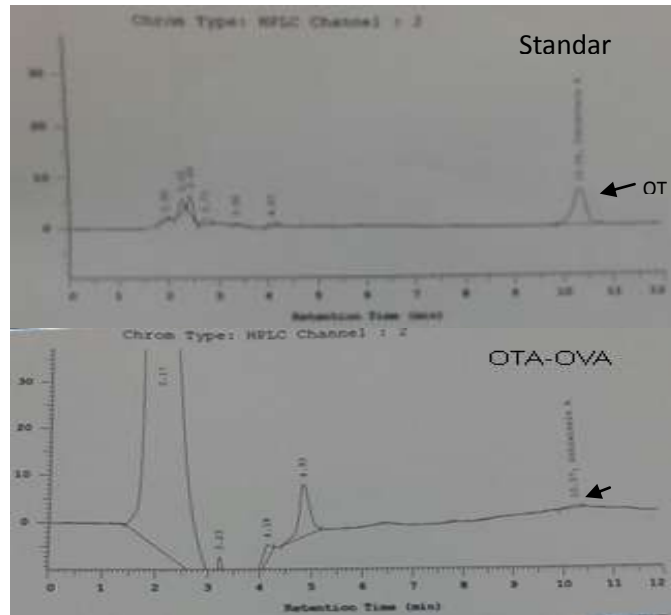
3200 cm^{-1} (Gambar 6c). Selain itu diamati adanya absorpsi pada 1635 cm^{-1} yang diduga merupakan gugus C=O amida. Gugus karbonil amida biasanya memiliki pita khusus pada 1650 cm^{-1} . Karakteristik spektra tersebut diasumsikan merupakan ciri senyawa konjugasi yang terbentuk antara ovalbumin dan OTA.

Pengujian hasil reaksi OTA-OVA untuk melihat sisa OTA dilakukan menggunakan HPLC. Kromatogram menunjukkan sisa OTA hanya 0,12 ppb. Jika dibandingkan dengan jumlah OTA yang digunakan pada awal reaksi yaitu sebesar 5000 ppb. Jumlah 0,12 ppb dapat dianggap hanya sisa OTA yang tidak bereaksi dan mengindikasikan hampir semua OTA sudah berikatan dengan OVA membentuk OTA-OVA (Gambar 7).



Gambar 6. Spektra FT-IR senyawa OTA (a), OTA-NHS (b) dan OTA-OVA (c).

Figure 6. FT-IR Spectra of OTA (a), OTA-NHS(b) and OTA-OVA (c)



Gambar 7. Kromatogram HPLC OTA-OVA dibandingkan dengan OTA standar.

Figure 7. HPLC chromatogram OTA-OVA compared with OTA standar.

Optimasi nanopartikel emas

Nanopartikel emas digunakan sebagai penanda (*marker*) karena memiliki warna yang cerah, kestabilan tinggi, mudah dikonjugasikan dengan antibodi dan pembacaan hasil dapat diamati langsung secara visual (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). Partikel yang berukuran kecil cenderung membentuk aglomerat jika : 1) berada dalam konsentrasi tinggi, 2) terjadi netralisasi pada gugus bermuatan pada permukaan, dan 3) konsentrasi elektrolit yang tinggi. Sehingga untuk menjaga nanopartikel emas tetap dalam kondisi terdispersi harus dilakukan optimasi pH dan konsentrasi (Majdinasab *et al.*, 2015). Dalam hal ini pH optimum merupakan pH dimana konjugat akan stabil dan menghasilkan absorbansi tertinggi pada panjang gelombang maksimum. Optimasi pH dilakukan pada rentang pH 3-9 dan dari hasil pengujian diperoleh rentang pengujian optimum pada pH 9 (Gambar 9). Se-Hwan *et al.* (2000) juga menyimpulkan pH 9 sebagai pH optimum untuk pembuatan probe antibodi dip stik imunokromatografik.

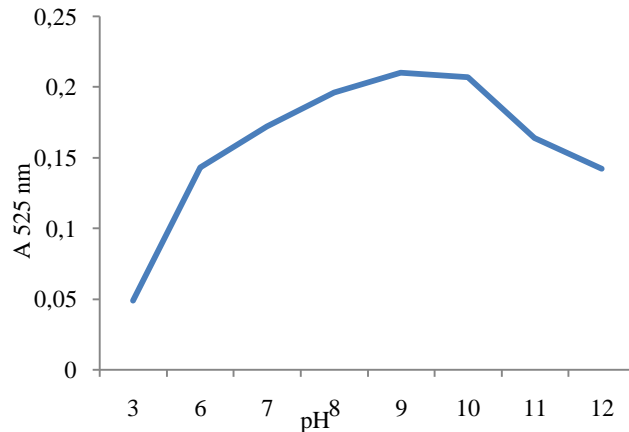
Sedangkan konsentrasi optimum adalah konsentrasi antibodi yang memberikan visibilitas yang dibutuhkan dengan sensitivitas terbaik. Hasil ini diperoleh jika warna konjugat tetap berwarna merah selama 15 menit. Tetapi konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi terendah dimana warna tetap stabil (Majdinasab *et al.*, 2015). Untuk mengoptimalkan hasil pembacaan imunokromatografik nanopartikel emas dan kestabilan warna yang konsisten dan konsentrasi maksimum antibodi dengan konsentrasi 1:5 (Gambar 8).

Pembuatan probe antibodi berlabel nanopartikel emas

Antibodi diberi label dengan nanopartikel emas sebagai *marker*. Antibodi akan terabsorpsi pada permukaan nanopartikel emas (Fernandez *et al.*, 2012) dan membentuk probe sebagai reagen yang digunakan pada tes trip imunokromatografik. Dalam proses sintesisnya ditambahkan BSA untuk menghasilkan konjugat yang lebih stabil dan mencegah ikatan non-spesifik akibat interaksi hidrofobik dan dalam beberapa kasus disebabkan oleh interaksi muatan (Majdinasab *et al.*, 2015). Hasil reaksi dipisahkan dengan sentrifugasi, dan dicuci dengan OVA untuk menghilangkan protein yang tidak terkonjugasi. Saat nanopartikel emas berikatan dengan antibodi, ukuran molekul nanopartikel emas meningkat dan puncak absorbansi bergeser dari $\lambda 525$ nm menjadi $\lambda 575$ nm (Gambar 10). Pergeseran absorbansi ini mengindikasikan adanya interaksi antara antibodi dan nanopartikel emas (Zhao *et al.*, 2010) yang terbentuk karena pembentukan amida di antara gugus amina antibodi dengan gugus karboksilat asam sitrat pada larutan nanopartikel (Pissuwan *et al.*, 2011).

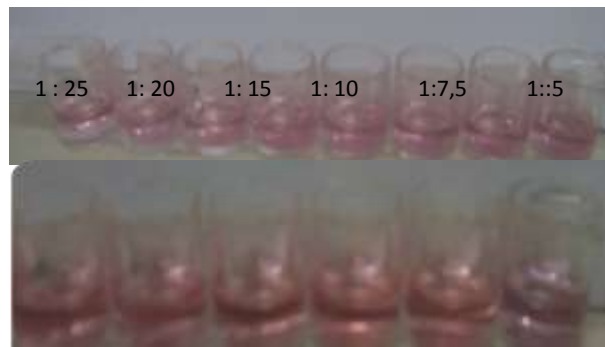
Penyiapan strip imunokromatografik dan pengujian OTA

Setelah diperoleh konjugat antibodi-nanopartikel emas dan konjugat OTA-OVA dilakukan perakitan test trip. Test trip terdiri dari bantalan sampel, bantalan pelepas yang ditambahkan konjugat antibodi-nanopartikel emas, membran nitroselulosa, bantalan penyerap, serta *cassete*.



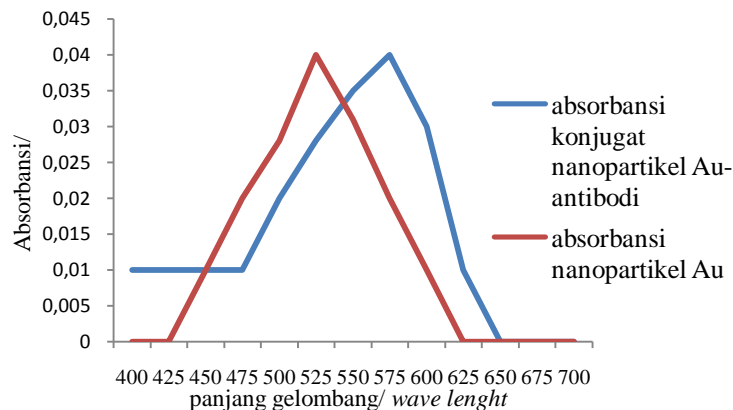
Gambar 8. Optimasi variable pH untuk perakitan konjugat antibodi nanopartikel emas.

Figure 8. Optimatization of variable pH for conjugating antibody-gold nanoparticle.



Gambar 9. Optimasi pH dan konsentrasi antibodi dan diperoleh pada pengenceran 1: 5 warna merah berubah menjadi ungu.

Figure 9. Optimazation of pH and antibody's concentration which resulted the change of red colour into purple in 1: 5 dilution.



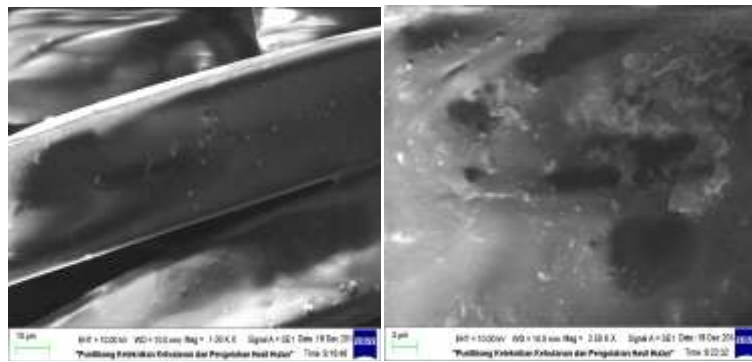
Gambar 10. Spektra nanopartikel emas sebelum dan setelah dikonjugasikan dengan antibodi IgY.

Figure 10. Spectra of gold nanoparticle before and after conjugated with antibody IgY.

Pada membran nitroselulosa ditambahkan OTA-OVA pada *test line* (T-line) dan IgY pada *control line* (C-Line). Konjugat antibodi nanopartikel emas diimobilisasi pada *fiber glass* (Gambar 11). Probe antibodi-nanopartikel ditempatkan pada bantalan pelepas (*release pad*) dimana antibodi dari molekul ini akan ber-

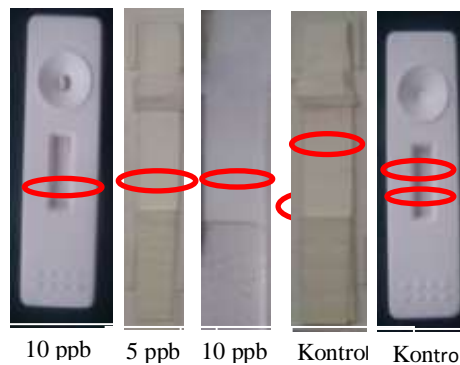
interaksi langsung dengan sampel membentuk kompleks yang mengalir secara lateral sampai menemukan molekul konjugat OTA-OVA dan menghasilkan warna merah pada membran.

Jika sampel mengandung okratoksin, maka antibodi-nanopartikel emas yang akan bereaksi dengan OVA-OTA pada T-line dan tidak ada



Gambar 11. Hasil *scanning electron microscope* (SEM) konjugat antibody nanopartikel emas yang diimmobilisasi pada *fiber glass*.

Figure 11. *Scanning electron microscope* (SEM) images of antibody-gold nanoparticle conjugate immobilized in *fiber glass*.



Gambar 13. Visualisasi strip pengujian imunokromatografik : 1) kontrol PBS, 2) okratoksin 5 ppb, dan 3) okratoksin 10 ppb.

Figure 13. *Visualization of immunochromatographic test strip* : 1) control PBS, 2) ochratoxin 5 ppb, and 3) ochratoxin 10 ppb

antigen yang dapat bereaksi dengan IgY pada *C-line*, sehingga hanya akan membentuk 1 garis. Begitu sebaliknya, kontrol (larutan PBS) akan terbentuk garis dua karena antibodi-nanopartikel emas bereaksi dengan reagen T dan *C-line*. Visualisasi hasil tes trip imunokromatografik belum menunjukkan hasil yang memuaskan (masih “smear”) (Gambar12). Hal ini dapat dikarenakan konjugat antibodi-nanopartikel emas belum optimum. Sehingga perlu dilakukan optimasi sintesis antibodi-nanopartikel emas dengan melakukan variasi pada konsentrasi antibodi, waktu inkubasi, suhu inkubasi, dan proses sentrifugasi. Selain itu perlu dilakukan variasi pelarut sampel. Kaur *et al.* (2007) menyimpulkan penambahan sedikit senyawa organik seperti metanol dan agen ko-presipitasi dapat meningkatkan *coating* antibodi pada membran.

Kesimpulan

OTA-OVA dapat disintesis dengan metode ester aktif dengan menambahkan N-hidroksi-

suksiimidadan disiklokarboimida. Nanopartikel emas memiliki pH optimum 9, sedangkan konsentrasi antibodi maksimum diperoleh pada pengenceran 1: 5 v/v. Probe antibodi-nanopartikel emas telah berhasil disintesis yang ditunjukkan pergeseran puncak absorbansi dari $\lambda 525$ nm menjadi $\lambda 575$ nm. Hasil pengujian pada test trip imunokromatografik masih belum terlihat jelas dan memiliki *cut off* konsentrasi okratoksin 10 ppb, tetapi mengindikasikan teknik ini dapat digunakan untuk deteksi kontaminasi okratoksin.

Daftar Pustaka

- Anfossi L, D Gilda, B Claudio, G Cristina & G Gianfranco (2011). A lateral flow immunoassay for measuring ochratoxin A: Development of a single system for maize, wheat and durum wheat. *Food Control* 22, 1965-1970.
- Covarelli L, G Beccari, A Marini & L Tosi (2012) A Review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin a in dehydrated grapes, non-

- fortified dessert wines and dried vine fruit in the mediterranean area. *Food Control*, 26(2), 347-356.
- El Khoury A & A Atoui (2010). Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins* 2, 461
- Haliza W, JS Munarso & Miskiyah (2006). Keragaan kontaminan mikotoksin pada jagung. Diunduh dari: <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/42213>
- Fernández F, Sánchez-Baeza & M Pilar (2012). Nanogold probe enhanced Surface Plasmon Resonance immunosensor for improved detection of antibiotic residues. *Biosensors and Bioelectr* 34, 151– 158
- Fessenden & Fessenden (1986). *Kimia Organik II*. Jakarta, Penerbit Erlangga
- International Commission On Microbiological Specification For Foods (ICMSF) (1996). *Microorganisms in Food. Blackie Academic and Professional*. London.
- International Agency for Research on Cancer (IARC)(1997). The evaluation of carcinogenic risks to human. IARC Monogr. 1997 No. 56.
- Kaushik A, KS Arya, A Vasudev & S Bhansali (2013). Recent advances in detection of ochratoxin-a. *Open J Appl Biosensor* 2, 1-11.
- Kaur J, K Vikassingh, KR Thamp, Manojraje, Grosch Varshney & C Ramansury (2007). *Immunochromatographic Dipstick Assay Format Using Gold Nanoparticles Labeled Protein-Hapten Conjugate for the Detection of Atrazine*.
- Larsson A, PE Wejaker & PO Forsberg (1999). Peroxidase labeling of chicken antibodies. *Food Agric Immunol* 11, 43–49.
- Li J, H Gao, Z Chen, X Wei & CF Yang (2010). An electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen enhanced by self-assembled nanogold coatings on magnetic particles. *Analyt Chim Acta* 665(1), 98–104.
- Liu BH, YT Hsu, CC Lu & FY Yu (2013). Detecting aflatoxin b1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*, 30, 184-189.
- Majdinasab, M Sheikh-Zeinoddin, S Soleimani-ZadPeiwu, Q Zhang, X Li, X Tang & J Li (2015). A reliable and sensitive time-resolved fluorescent immunochromatographic assay (TRFICA) for ochratoxin A in agro-products. *Food Control*, 47, 126-134
- Olsson J, T Borjesson, T Lundstedt & J Schnurer (2002). Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Internat J Food Microbiol* 72, 203–214.
- Pissuwan D, T Niidome, B Michael & Cortie (2011). The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Controll Rel* 149, 65–71.
- Posthuma-Trumpie GA, J Korf & van Amerongen A (2009). Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analyt and Bioanalyt Chem* 393, 569-582.
- Scott PM (2002). Methods of analysis for ochratoxin A. *Mycotoxins and Food Safety*, 504, 117–134
- Se-Hwan Paek, L Seung-Hwa, C Joung-Hwan Cho & K Young-Sang. (2000). Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods*, 22, 53-60
- Shim WB, BB Dzantiev, SA Eremin & DH Chung (2009). One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multi analysis of ochratoxin A and zearale-none. *J Microbiol and Biotechnol* 19, 83-92.
- Wang-Xi C, B Ming, W Jin-jie, LYing, MA Liang-you, W Ying, Z Aihua, H Cheng-hua & Z Hai-bin (2014). Characterization and Comparison of ochratoxin a-ovalbumin (ota-ova) conjugation by three methods. *J Integrative Agricult* 13(5), 1130-1136
- Zhao X, X He, W Li, Y Liu, L Yang & J Wang, (2010). Development and evaluation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157. *African J Microbiol Res* 4(9), 663-670.