

Produksi imunoglobulin Y (IgY) untuk pengembangan metode deteksi dini kontaminasi okratoksin

Immunoglobulin Y (IgY) production to method develop an early detection for ochratoxin contamination

Irma KRESNAWATY^{1*)}, SUHARYANTO¹⁾, SISWANTO¹⁾ & Sumi HUDIYONO²⁾

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

²⁾ Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia, Kampus UI, Depok 16424

Diterima tgl 12 Juni 2017 / disetujui tgl 18 April 2018

Abstract

Indonesian coffee and cocoa commodities are constrained by low product quality problem due to contamination of fungal metabolites which producing ochratoxin A (OTA). Ochratoxin is nephrotoxic, immunogenic, carcinogenic and teratogenic to the human health. Early detection method on site detection should be developed because of those negative effects. The aim of this study was to produce antibody to develop a method for OTA detection. Antibody was produced by immunization of egg laying hen. Antibody-produced was separated and analyzed using ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and DBIA (dot blot immunoassay), and tested its composition using HPLC and SDS PAGE. The results showed that anti-OTA polyclonal antibodies had been obtained already from chicken eggs in the 4th period (7 weeks after initial immunization). These antibodies showed anti-OTA reactivity by DBIA method and still showed anti-OTA reactivity up to 9th period (12 weeks after initial immunization). The anti-BSA antibodies produced should be removed to increase the sensitivity of antibodies against ochratoxin A. The separation of BSA antibodies can be conducted by the absorption of the protein.

[Keywords: ochratoxin A; early detection; antibody IgY].

Abstrak

Komoditas kopi dan kakao Indonesia terkendala masalah mutu produk yang rendah akibat kontaminasi cendawan penghasil okratoksin A. Okratoksin A (OTA) bersifat nefrotoksik, imunogenik, karsinogenik dan teratogenik yang membahayakan kesehatan manusia. Karena efek negatif yang diakibatkan oleh mikotoksin ini, maka perlu dikembangkan deteksi dini kontaminasi okratoksin langsung di lokasi. Penelitian ini bertujuan menghasilkan antibodi imunoglobulin Y (IgY) untuk mengembangkan metode perakitan perangkat deteksi cepat berbasis imunologi untuk deteksi OTA. Antibodi dihasilkan

menggunakan uji ayam petelur. Antibodi yang dihasilkan dipisahkan dan dianalisis aktivitasnya dengan ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) dan DBIA (*dot blot immunoassay*), serta diuji komposisinya dengan HPLC dan SDS PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi poliklonal anti-OTA sudah diperoleh dari telur ayam pada periode ke-4 (7 minggu setelah imunitasi awal). Antibodi ini menunjukkan reaktivitas anti-OTA dengan metode DBIA dan masih menunjukkan reaktivitas anti-OTA sampai periode 9 (12 minggu setelah imunitasi awal). Komposisi asam amino antibodi anti-OTA menunjukkan perbedaan dengan komposisi asam amino IgY di *database*. Antibodi anti BSA yang dihasilkan harus dihilangkan terlebih dahulu untuk meningkatkan sensitivitas antibodi terhadap okratoksin A dan pemisahan dapat dilakukan dengan penyerapan antibodi BSA.

[Kata Kunci: okratoksin A; deteksi dini; antibodi IgY].

Pendahuluan

Okratoksin A (OTA) merupakan mikotoksin yang dihasilkan oleh *Aspergillus ochraceus* dan *Penicillium verucosum* yang mengkontaminasi berbagai komoditas pangan, seperti biji kopi, 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. Senyawa ini diketahui bersifat nefrotoksik, hepatoksik, teratogenik dan imunotoksik, serta menyebabkan stres oksidatif pada tingkat seluler (Duarte *et al.*, 2010; Covarelli *et al.*, 2012; Amezcua *et al.*, 2009; Majdinasab *et al.*, 2015).

Uni Eropa menetapkan batas kontaminasi maksimum OTA pada produk pangan sebesar 5 ppb untuk sereal, 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 juga diadopsi oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) dalam Keputusan Kepala BPOM tahun 2009. Adanya batasan kontaminasi ini menuntut adanya metode

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

deteksi yang akurat dan cepat. Saat ini, instrumen yang umum digunakan untuk mendeteksi OTA antara lain : *high performance liquid chromatography* (HPLC), *gas chromatography mass spectrometry* (GC-MS) dan *enzyme linked immunorbent assay* (ELISA). Metode-metode ini cukup akurat, tetapi membutuhkan biaya yang tinggi, menghasilkan limbah pelarut organik, membutuhkan waktu yang relatif lama karena membutuhkan pre-treatment, sehingga tidak memungkinkan untuk deteksi langsung di lokasi (*on-site detection*) (Zamfir et al., 2011).

Cara deteksi langsung di lokasi bisa dilakukan menggunakan antibodi sebagai sensor mikotoksin (Meulenberg, 2012). Teknik yang akan dikembangkan adalah metode imunokromatografik dengan menggunakan imunoglobulin Y (IgY) dari telur ayam (Rusanova et al., 2009; Duan et al., 2012; Kresnawaty et al., 2015). Selain aspek etika pada hewan (*animal welfare*), penggunaan IgY memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan IgG kelinci. Telur ayam yang diimunisasi merupakan penghasil antibodi poliklonal yang ekonomis, melimpah dan kontinyu. Satu telur dapat mengandung antibodi yang sama dengan rata-rata satu kali *bleeding* pada kelinci. Selain itu, ayam memiliki potensi yang lebih tinggi menghasilkan antibodi terhadap antigen mamalia dibandingkan jika menggunakan kelinci atau kambing. IgY tidak bereaksi silang dengan antibodi IgG mamalia dan tidak berikatan dengan bakteri ataupun Fc reseptor mamalia. (Larsson et al., 1999). Penelitian ini bertujuan menghasilkan antibodi imunoglobulin Y (IgY) untuk mengembangkan metode perakitan perangkat deteksi cepat berbasis imunologi untuk deteksi OTA.

Bahan dan Metode

Bahan

Ayam petelur usia 21 minggu yang telah beradaptasi dengan lingkungannya saat itu dan terbukti menghasilkan telur secara normal sebelum disuntik antigen, pakan ayam, stimulan dan vaksin ayam, OTA-BSA (Sigma Aldrich), *Freund's complete adjuvant*, *Freund's complete adjuvant*, *EggStract IgY* (Promega), natrium azida, *phosphate buffer saline* (PBS), buffer karbonat, 3,3'-5,5' tetrametilbenzidin (TMB), susu skim, konjugat IgY-HRP anti chicken, H₂SO₄, Tris HCl, sodium dodesilsulfat (SDS), glisin, gliserol, *coomasie brilliant blue*, CH₃COOH, merkaptoetanol, akrilamid, N-metilen akrilamid, amonium persulfate (APS), Temed, bromfenol blue G250, HCl, Tween-20, H₂SO₄, NaCl, buffer asam borat, buffer karbonat-bikarbonat, tris buffer saline, diaminobenzidine (DAB), buffer fosfat, asam sitrat, natrium sitrat, natrium asetat, β-siklodekstrin, urea, asam asetat, dan standar okratoksin A (Sigma Aldrich).

Produksi antibodi poliklonal anti OTA

Produksi antibodi terhadap okratoksin A diperoleh dari ayam petelur yang diimunisasi OTA-BSA secara *intermuscular* (suntikan di otot). Imunisasi pertama dilakukan dengan dosis 0,625 mg/mL OTA-BSA per ayam yang dicampur dengan *Freund's complete adjuvant* (1:1, v/v). Setelah 2 minggu kemudian dilakukan dua kali suntikan *booster* menggunakan dosis OTA-BSA sebesar 0,25 mg/mL yang dicampur dengan *Freund's complete adjuvant*. Suntikan 2 kali *booster* dilakukan dengan interval waktu 2 minggu (Suharyanto et al., 2012; Clarke et al., 1993).

Ekstraksi antibodi imunoglobulin Y anti OTA

Antibodi kuning telur ayam (IgY) dipisahkan menggunakan *EggStract IgY* (Promega). Telur yang diperoleh dari hewan uji dipisahkan kuning telurnya menggunakan *egg separator*. Kuning telur tersebut dicuci menggunakan akuades dan dikeringkan menggunakan kain kasa. Kuning telur diukur volumenya dan ditambahkan reagen *delipid* sebanyak 5 x volume kuning telur. Larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 5 menit. Kemudian larutan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Selanjutnya larutan dipisahkan endapannya dengan sentrifugasi kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dikumpulkan dan diukur volumenya. Ke dalam supernatan ditambahkan reagent *precipitate* dengan volume yang sama dengan supernatan. Larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Selanjutnya endapan yang mengandung antibodi diendapkan menggunakan sentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Antibodi yang sudah diekstraksi diawetkan dengan penambahan natrium azida kemudian disimpan dalam tabung *eppendorf* di dalam *freezer* untuk jangka waktu lama. Sebagian antibodi yang digunakan untuk pengujian disimpan dalam *refrigerator* (4 °C) (Suharyanto et al., 2012).

Penetapan konsentrasi antibodi

Konsentrasi antibodi dari hasil ekstraksi dianalisis secara spektrofotometri pada λ=280 nm. Kemudian serapan diukur dan konsentrasinya dihitung dengan rumus (Clarke et al., 1993):

$$\text{Konsentrasi IgY (mg/mL)} = \frac{\text{serapan} \times \text{faktor pengenceran}}{1,4}$$

Pengujian reaktivitas antibodi dengan dot blot immunoassay (DBIA)

Pengujian reaktivitas untuk mengetahui terbentuknya antibodi anti okratoksin dilakukan dengan menggunakan metode DBIA di atas kertas membran nitroselulosa. Kertas membran dipotong

dengan ukuran 0,5 x 3 cm. Sebanyak 2 µL antigen OTA-BSA ditetaskan pada kertas membran nitroselulosa dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Membran direndam dalam *blocking buffer* (tris EDTA NaCL-Tween kasein/TEN-TC) selama 1 jam. Cairan TEN-TC dibuang dan membran nitroselulosa dicuci dengan PBS Tween 0,05% (PBS-T) sebanyak tiga kali selama 1 menit dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Lalu sebanyak 2 µL antibodi ditetaskan pada membran nitroselulosa dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya larutan antibodi dibuang dan kertas membran nitroselulosa dicuci dengan PBS-T tiga kali selama 1 menit. Kemudian membran nitroselulosa ditetaskan larutan konjugat IgY-HRP *antichicken* peroksidase pengenceran 1:10.000 v/v. Lalu larutan konjugat dibuang dan kertas membran dicuci dengan PBS-T tiga kali selama 1 menit. Kertas membran diwarnai dengan direndam pada larutan substrat DAB 6 mg, 100 µL H₂O₂ dan 10 mL buffer fosfat (Suharyanto *et al.*, 2012).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Sebanyak 100 µL antigen OTA-BSA dalam buffer karbonat-bikarbonat ditambahkan ke dalam 96 sumuran ELISA. Larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Sumuran ELISA tersebut dicuci dengan PBS 0,01 M pH 7 sebanyak 3 kali dan ditambahkan skim milk 2,5%. Kemudian sumuran dicuci kembali dengan PBS 0,01 M pH 7 sebanyak 3 kali. Ke dalam sumuran ditambahkan antibodi dengan pengenceran 1:50 v/v sebanyak 100 µL dan diinkubasi selama 1 jam. Sumuran ELISA tersebut kemudian dicuci menggunakan PBS 0,01 M pH 7 sebanyak 3 kali. Setelah dicuci, ke dalam sumuran ditambahkan antibodi IgY-HRP (pengenceran 1:10.000 v/v dalam PBS) *antichicken* sebanyak 100 µL dan lalu dicuci dengan PBS 0,01 M pH 7 sebanyak 3 kali. Kemudian ditambahkan substrat TMB yang terdiri dari subtrat A (natrium asetat 0,1 M; beta-siklodekstrin 0,25%, urea H₂O₂ 0,15 g/L yang diatur pH-nya menjadi 5 dengan CH₃COOH) dan B (3,3-4,4'-tetrametilbenzidin/TMB yang dilarutkan dalam DMSO). Larutan akan membentuk warna biru, kemudian ditambahkan H₂SO₄ sebagai penghenti reaksi (Maryam *et al.*, 2000).

Pengujian profil protein dengan SDS PAGE

Pencetakan *running gel* dilakukan dengan mencampurkan akuades 1,67 mL; Tris HCl 1,5 M pH 8,8 1,25 mL; SDS 10% 50 µL; akrilamid 2 mL; APS 10% 30 µL dan Temed 5 µL. Setelah 30 menit (gel mengeras) ditambahkan isopropanol untuk meratakan gel. Kemudian *stacking gel* dicetak dengan komposisi: akuades 1,475 mL; Tris HCl 0,5 M pH 6,8 sebanyak 0,625 mL; SDS 10% 25 µL; akrilamid 0,35 mL; APS 10% 25 µL dan Temed 4 µL. Di dalam *stacking gel* dibuat sumuran dan setelah 30 menit sampel antibodi dimasukkan

(10 µL dan 20 µL *loading buffer*) dan marker protein (5 µL) yang telah dipanaskan terlebih dahulu di dalam water bath suhu 100 °C selama 5 menit. Protein dirunning dalam SDS PAGE dengan voltase 75 volt selama 3 jam .

Pemurnian protein antibodi IgY anti okratoksin

Pemurnian dilakukan dengan 3 cara, yaitu penggunaan protein A sepharosa, kromatografi gel permeasi, absorpsi menggunakan dip stick NunC. Pemurnian antibodi menggunakan kolom protein A dimulai dengan mencuci kolom HiTrap™ dengan buffer natrium fosfat pH 7,2 sebanyak 3 x 10 mL. Sebanyak 0,5 mL antibodi dilarutkan dalam 2 mL natrium fosfat ditempatkan dalam *syringe* 10 mL yang telah dilengkapi oleh *glass wool* untuk menyaring pengotor. Larutan antibodi kemudian dialirkan ke dalam kolom. Setelah itu ke dalam kolom ditambahkan larutan natrium fosfat pH 7,2 sebanyak 5 mL. Kemudian kolom elusi menggunakan asam sitrat 0,1 M pH 4. Hasil elusi ditampung dalam 20 fraksi masing-masing 1 mL yang telah ditambahkan Tris HCl 200 µL. Masing-masing fraksi diukur serapan pada λ 280 nm menggunakan spektrofotometer UV dianalisis profil proteinnya dengan SDS PAGE (Modifikasi Maryam, 2007).

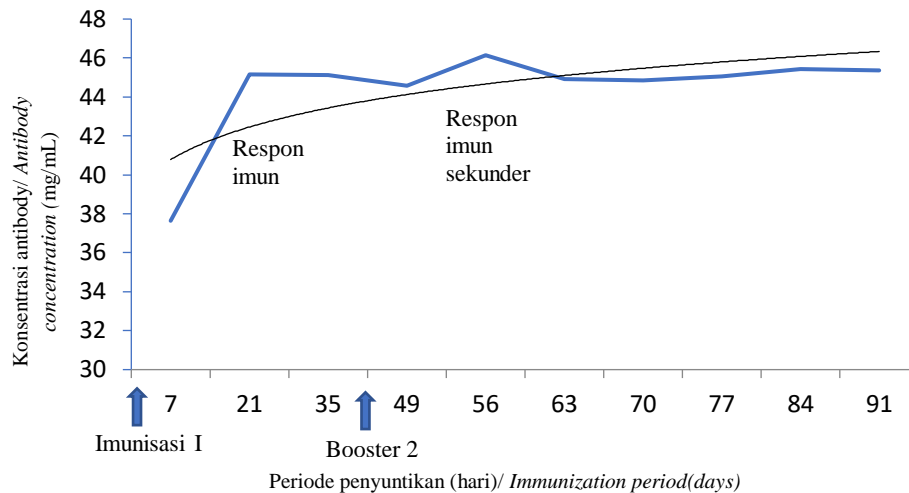
Pemurnian menggunakan kromatografi gel permeasi menggunakan fasa diam sephadex dan eluen buffer fosfat. Sephadex yang digunakan 10 g/ 300 mL buffer fosfat. Adapun tinggi fasa diam 20 cm dengan kecepatan alir 0,75 mL/menit dan masing-masing fraksi ditampung sebanyak 10 mL. Hasil elusi ditampung dalam 20 fraksi masing-masing 2 mL. Masing-masing fraksi diukur serapan pada λ 280 nm menggunakan spektrofotometer UV dianalisis profil proteinnya dengan SDS PAGE.

Absorpsi antibodi anti BSA dilakukan dengan menggunakan BSA sebagai penjerap antibodi anti BSA. Sebanyak 2 mL BSA 0,05% direndam dalam dipstick NunC selama 24 jam pada suhu 4 °C. Kemudian, BSA dibuang dan dipstick dicuci dengan PBS. Ke dalam dipstick NunC kemudian ditambahkan larutan antibodi dalam PBS. Larutan diukur kadar proteinnya menggunakan Bradford dan dianalisis profil proteinnya dengan SDS PAGE.

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi antibodi imunoglobulin Y anti OTA

Konsentrasi antibodi IgY relatif mengalami peningkatan konsentrasi seiring semakin lamanya hewan uji ayam terpapar dengan okratoksin. Gambar 1 menunjukkan peningkatan produksi antibodi dihasilkan setelah *booster* II (lebih dari 28 hari setelah imunisasi pertama). Pola yang sama diperlihatkan oleh produksi antibodi IgG dimana pada 14 hari setelah injeksi I dihasilkan IgM dalam dosis kecil kemudian dihasilkan IgG pada 14 hari setelah *booster* I (Tizard, 2013).



Gambar 1. Konsentrasi IgY yang dihasilkan pada tiap periode perlakuan
 Figure 1. IgY concentration in each period of treatments

Skrining antibodi menggunakan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Pengujian ini bertujuan untuk menskrining antibodi yang memberikan respon imun tertinggi. Pada penelitian ini, coating antigen yang digunakan adalah OTA-BSA komersial dengan konsentrasi 0;0,5; 1; 2,5 dan 5 µg/mL. Hasil pengujian menunjukkan pada awal-awal periode pengambilan telur belum terlihat adanya konsistensi serapan seiring dengan semakin tingginya konsentrasi antigen (Gambar 2). Pada periode 2, 3 dan 4 memiliki serapan yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan sensitivitas IgY terhadap okratoksin dan nilai sensitivitas yang tinggi diperoleh pada periode ke-4 (minggu ke-7 setelah imunisasi pertama). Pada minggu ke-7 juga mulai terlihat adanya peningkatan konsentrasi antibodi (Gambar 1). Hal yang menarik adalah kontrol memiliki serapan yang besar, hal ini diduga bahwa ayam uji tersebut kemungkinan telah terpapar oleh okratoksin pada produk pakannya.

Pengujian reaktivitas antibodi dengan dot blot immunoassay DBIA

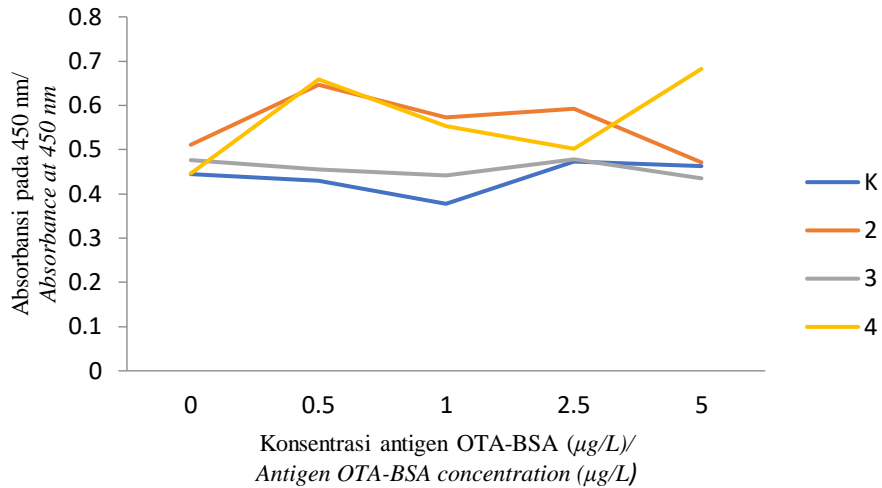
Dari hasil yang diperoleh reaktivitas IgY yang dihasilkan baru tampak pada periode ke-4 (Gambar 3), sedangkan pada kontrol dan awal-awal perlakuan (periode ke-2 dan 3) belum terlihat reaktivitas IgY. Pada sampel kontrol dan sampel antibodi periode 2 dan 3 diasumsikan belum terbentuk antibodi spesifik okratoksin sehingga antibodi tidak terikat pada antigen OTA-BSA dan enzim HRP yang terkonjugasi dengan IgY tidak terikat pada antibodi dan tidak menimbulkan warna coklat pada kertas membran. Pada periode ke-6 s/d ke-9 dihasilkan noda yang lebih jelas yang mengindikasikan reaktivitas antibodi yang lebih tinggi (Gambar 3). Antibodi periode 6 digunakan

pada pengujian selanjutnya karena jumlah antibodi yang dihasilkan paling banyak.

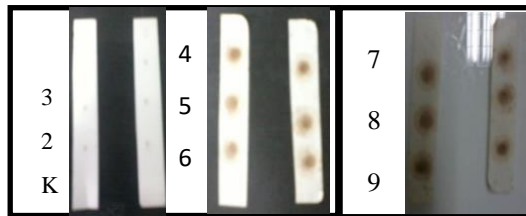
Pengujian profil protein dengan SDS PAGE

Hasil pengujian profil protein menggunakan SDS PAGE menunjukkan bahwa masih terdapat 3 pita pada tiap antibodi pada periode pengambilan sampel 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 (Gambar 4). Pada gel dengan densitas yang seragam, jarak migrasi relatif proporsional dengan log massa molekul protein. Sehingga protein dapat diketahui massanya dengan menghitung jarak migrasi relatif (Rf/ukuran gel). Massa molekul dari masing-masing pita adalah 118,65 kDa (pita 1), 64,45 kDa (pita 2) dan 42,04 kDa (pita 3). Pita 1 diduga merupakan 2 pita rantai berat (HC) yang masing-masing berukuran 65,105 kDa dan pita 3 merupakan rantai ringan (LC) yang masing-masing berukuran 18,660 kDa (da Silva & Tambourgi, 2010). Adanya pita no.2 menimbulkan asumsi bahwa antibodi tersebut belum murni sehingga perlu dilakukan langkah pemurnian. Antibodi periode 1 sampai 6 menunjukkan lebih dari 2 pita, sehingga menimbulkan asumsi bahwa antibodi belum murni dan membutuhkan langkah pemurnian lanjutan.

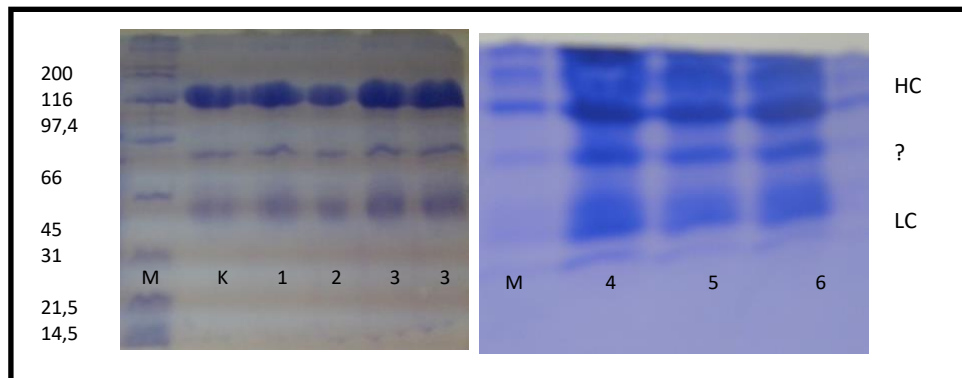
Untuk karakterisasi antibodi kemudian dilakukan analisa profil asam amino. Hasil analisa menunjukkan komposisi utama antibodi IgY memiliki komposisi tertinggi glutamat 12,07%, serin 10,58%, dan leusin 9,04%. Tingginya komposisi glutamat dan serin menjadikan antibodi ini bersifat polar dan bermuatan negatif (Tabel 1). Jika dibandingkan dengan komposisi asam amino antibodi IgY (website.www.ncbi.nlm.gov), antibodi database mengandung asam amino glisin 22%, serin 13,84% dan treonin 9,96%, Perbedaan ini dapat disebabkan karena sample IgY masih terkontaminasi dengan protein lain yang didukung oleh data sekuensing protein (data tidak ditampilkan) (Kresnawaty et al., 2017).



Gambar 2. Hasil pengujian ELISA antibodi yang dihasilkan pada periode 2, 3 dan 4, K sebagai kontrol
 Figure 2. ELISA result of antibody produced in 2, 3 and 4 periods, K as control.



Gambar 3. Pengujian dot blot immunoassay IgY anti OTA periode 2, 3, 4, 5, 6 dan 7, dibandingkan dengan kontrol.
 Figure 3. Dot blot immunoassay of IgY anti OTA in period 2, 3, 4, 5, 6 and 7, compared with control.



Gambar 4. Profil protein antibodi anti OTA pada periode minggu ke-1 s/d 6 menggunakan SDS PAGE.
 Figure 4. Protein profile of anti OTA antibody in the 1st until 6th weeks using SDS PAGE.

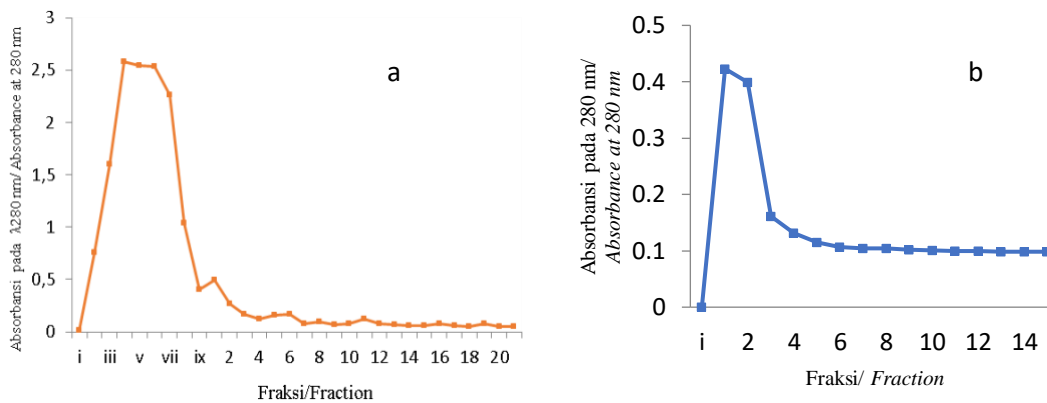
Pemurnian protein antibodi IgY anti OTA

Pemurnian awal dilakukan menggunakan protein A sepharosa. Gambar 5 menunjukkan bahwa pada tahap awal sebelum antibodi dielusi oleh buffer elusi (fraksi 1-20), absorbansi eluen mencapai konsentrasi tertinggi. Pada pemisahan menggunakan sephadex, antibodi langsung ditampung di awal pemisahan dan pengujian SDS PAGE menunjukkan belum menunjukkan dua pita (Gambar 6). Selanjutnya dilakukan pemurnian menggunakan metode absorpsi BSA. BSA sebagai molekul lain juga dikenali oleh antibodi anti okratoksin, digunakan sebagai reagen yang

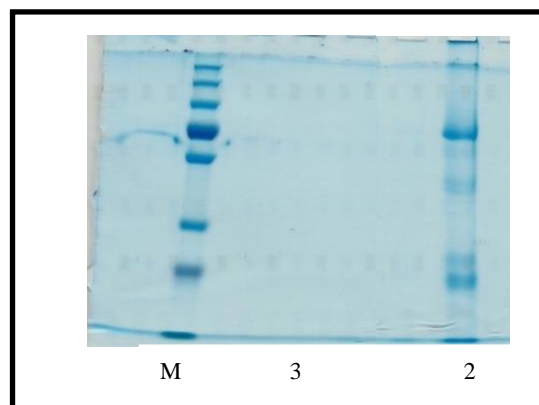
direndam pada dip stick berbahan polipropilen. Pada pengujian ini diharapkan antibodi anti BSA akan terikat pada dip stick dan menyisakan antibodi anti BSA pada larutan, sehingga sensitivitas antibodi terhadap OTA akan meningkat. Pengujian dengan metode Bradford menunjukkan protein yang telah diabsorpsi oleh BSA mengalami penurunan konsentrasi sebesar 74,43%. Profil protein hasil pemurnian dengan BSA (Gambar 7) menunjukkan bahwa pita yang dimiliki antibodi tersebut hanya 2 pita (line 2) dan tidak ada protein yang terdeteksi di fraksi 3 (Gambar 7). Hal ini memberikan indikasi positif pemisahan protein telah berhasil dilakukan.

Tabel 1. Komposisi asam amino antibodi IgY anti OTA
 Tabel 1. Amino acid composition of IgY antibody anti OTA

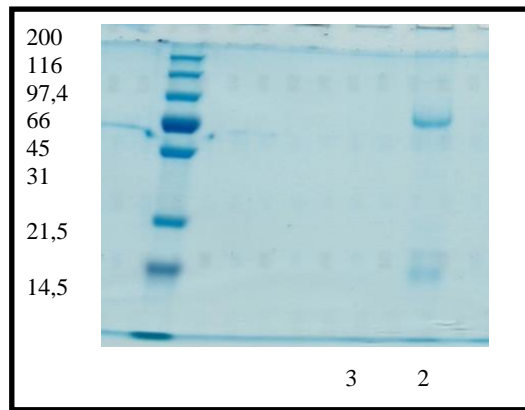
No.	Asam amino/ Amino acid	Persentase/Percentage (%)	
		Hasil analisis / Analysis result	Data dari database ncbi/ NCBI database data
1	Aspartat	8,06	4,61
2	Glutamat	12,07	4,47
3	Serin	10,58	13,84
4	Histidin	2,37	1,02
5	Glysin	5,69	22,22
6	Treonin	7,59	9,96
7	Arginin	7,59	4,11
8	Alanin	6,00	9,54
9	Tirosin	5,16	4,38
10	Metionin	1,06	0,88
11	Valin	8,57	7,81
12	Fenilalanin	7,28	3,28
13	Ileusin	3,57	3,78
14	Leusin	9,04	7,23
15	Lisin	5,37	2,87



Gambar 5. Hasil pemisahan protein IgY anti OTA dengan buffer elusi (a) kromatografi gel permeasi(b).
 Figure 5. Separation of protein IgY anti OTA with elution buffer (a) and permation gel chromatography (b)



Gambar 6. Profil protein IgY anti OTA menggunakan SDS PAGE setelah pemisahan dengan kromatografi gel permeasi
 Figure 6. Protein profile of IgY protein anti OTA using SDS PAGE after permeation gel chromatography separation



Gambar 7. Profil protein IgY anti OTA menggunakan SDS PAGE setelah pemisahan dengan absorpsi BSA.
Figure 7. Protein profile of IgY protein anti OTA using SDS PAGE after BSA absorption separation.

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi poliklonal anti OTA diperoleh dari telur ayam pada periode 7 minggu setelah imunisasi awal. Antibodi ini menunjukkan reaktivitas anti OTA dengan metode *dot blot immunoassay* dan masih menunjukkan reaktivitas anti OTA 12 minggu setelah imunisasi awal. Antibodi anti BSA yang dihasilkan harus dihilangkan terlebih dahulu untuk meningkatkan sensitivitas antibodi terhadap okratoksin A dan pemisahan dapat dilakukan dengan penyerapan antibodi BSA. Saran penelitian lanjutan untuk menggunakan antibodi monoklonal sehingga bias menghasilkan antibodi yang lebih *reliable*.

Daftar Pustaka

Amezqueta S, E Gonzalez-Penas, M Murillo-Arbizu & Al De Cerain (2009). Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 20(4), 326-333

Clarke JR, RR Marquardt, A Oosterveld, AA Frohlich, FJ Madrid & M Dawoodll (1993). Development of a quantitative and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A using antibodies from the yolk of the laying hen. *J Agric Food Chem* 41, 1784-1789

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.

Duan N, S Wu, X Ma, X Chen, Y Huang & Z Wang (2012). Gold nanoparticle-based fluorescence resonance energy transfer aptasensor for ochratoxin A detection. *Analytical Letters* 45(7), 714-723.

Duarte SC, A Pena & CM Lino (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food microbiology* 27(2), 187-198.

Kresnawaty I, Kholis Audah, Hasim Munawar & Happy Widiastuti (2017). Karakteristik antibodi anti *Ganoderma* sp. yang dihasilkan dengan menggunakan jenis dan sumber antigen yang berbeda. *Menara Perkebunan* 85 (1), 70-75

Kresnawaty I, Suharyanto, Romsyah Maryam & Sumi Hudiyo (2015). Sintesis reagen imunokimia untuk deteksi okratoksin dengan metode imunokromagrafi nanopartikel emas. *Menara Perkebunan* 83(1), 10-18

Larsson A, PE Wejaker & PO Forsberg (1999). Peroxidase labeling of chicken antibodies. *Food Agric Immunol* 11, 43-49.

Majdinasab M, M Sheikh-Zeinoddin, S Soleimani-Zad, P Li, Q Zhang & X Li (2015). Ultrasensitive and quantitative gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection of ochratoxin A in agro-products. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 974, 147-154.

Maryam R, S Bahri, S Rachmawati & R Widiastuti (2000). Evaluation of methods for aflatoxin and fumonisin determination in foods and feeds in Indonesia. Paper presented in *The 2nd Research Coordinated Meeting (RCM) of the FAO/IAEA Coordinated research Programme (CRP) on Evaluation Methods of Analysis for Determining Mycotoxin Contamination of Food and Feed, Vienna-austria*, 4-8 December 2000.

Meulenberg EP (2012). Immunochemical methods for ochratoxin A detection: a review. *Toxins* 4(4), 244-266.

Rusanova TY, NV Beloglazova, IY Goryacheva, M Lobeau, C Van Peteghem & S De Saeger (2009). Non-instrumental immunochemical tests for rapid ochratoxin A detection in red wine. *Analytica chimica acta* 653(1), 97-102.

da Silva D W & DV Tambourgi (2010). IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostik and in immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135(3-4), 173-180.

Suharyanto, TW Darmono, AH Saragih, HT Prakoso & DD Eris (2012). Perangkat deteksi dini infeksi *Ganoderma sp.* pada kelapa sawit

dengan teknik serologi. *Menara Perkebunan* 80(1), 8-16.

Tizard IR (2013). *Veterinary Immunology, Ninth Edition*. New York : Elsevier

Zamfir LG, I Gean, S Bouriguac, L Rotariu, Camelia Bala, A Errachidc & N Jaffrezic-Renault (2011). Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection. *Sensors and Actuators B* 159, 178– 184.