

Sintesis Antigen AFB1-BSA dan Konjugasi Antibodi Anti AFB1-BSA dengan Nanopartikel Emas sebagai Pereaksi Imunostrip †

Ita Krissanti^{1,2*}, Agustin Indrawati³, Romsyah Maryam⁴

¹ Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung

² Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung

³ Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁴ Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRACT: Aflatoxin B1 (AFB1) often contaminates a great variety of foods and animal feeds that will be dangerous if consumed by humans or animals. Rapid detection techniques that can be used in the field is really needed to monitor AFB1 contamination. The aims of this study were to perform synthesis of AFB1-BSA antigen and conjugation of antibody against AFB1-BSA to gold nanoparticle as immunostrip test reagents. The AFB1-CMO was identified on TLC and AFB1-BSA was characterized using SDS PAGE. The AFB1-CMO formation indicated as a blue spot at 0.45 retention factor (Rf) on TLC and the AFB1-BSA antigen revealed as a single band protein at about 72 kDa molecular weight on the SDS PAGE. Conjugation of antibody against AFB1-BSA to gold nanoparticle resulted in the formation of red-dish purple compound which can be used for the detection of AFB1 on immunostrip. The optimum composition achieved in concentration of AFB1-BSA 1-1.5 mg/ml, IgG anti rabbit 0.1 mg/ml, and antibody against AFB1-BSA-gold nanoparticle conjugate in 0.5x0.5 cm² area characterized by the establishment of two reddish purple lines in the test and control zone.

Keywords:

AFB1, antibody against AFB1, gold nanoparticle, immunostrip.

■ PENDAHULUAN

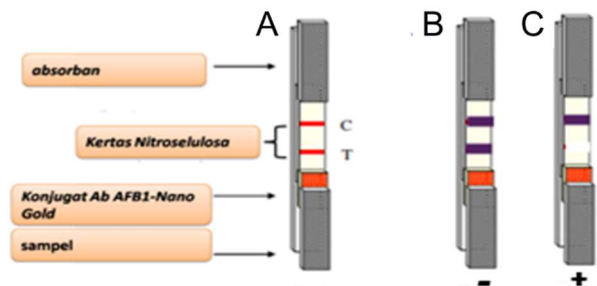
Toksin AFB1 dari kapang *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* sebagai karsinogen grup IA (IARC 2002) merupakan agen teratogen dan immunosupresif bagi manusia dan hewan. Pakan ternak dapat membawa aflatoksin yang beracun sehingga berbahaya bagi hewan dan manusia yang mengkonsumsinya (Maciorowskia *et al.* 2007). Teknik deteksi keamanan bahan pangan dan pakan sangat diperlukan. Saat ini metode uji untuk mendeteksi AFB1 antara lain TLC, HPLC, dan ELISA yang hanya dapat dilakukan di laboratorium, membutuhkan waktu lama dan tenaga berketerampilan khusus (Zheng *et al.* 2006; Saini & Kaur 2012). Pengembangan uji imunostrip dapat digunakan untuk mendeteksi AFB1 secara sensitif, mudah, efisien, serta tanpa peralatan dan keterampilan khusus (Liu *et al.* 2013). Penelitian ini mensintesis antigen AFB1-BSA dan memproduksi konjugat antibodi anti AFB1-BSA dengan nanopartikel emas sebagai bahan pereaksi imunostrip untuk mendeteksi AFB1.

■ BAHAN DAN METODE

Sintesis dan Karakterisasi Antigen AFB1-Bovine Serum Albumine (BSA): Sintesis antigen dilakukan dengan merubah AFB1 menjadi AFB1-*carboxymethyl oxime* (CMO) untuk kemudian dikonjugasikan dengan BSA (Liu *et al.* 2013).

Konjugasi Antibodi Anti AFB1-BSA dengan Nanopartikel Emas:

Antibodi Anti AFB1 diproduksi dan dipurifikasi di Laboratorium Toksikologi Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLitVet) dikonjugasi dengan nanopartikel emas sesuai metode Liu *et al.* (2013). Perakitan imunostrip terdiri dari lapisan komponen disajikan pada Gambar 1. Sistem imunostrip dengan format kompetitif dapat berjalan dengan terbentuk 2 garis berwarna ungu untuk hasil uji negatif yaitu pada daerah uji dan daerah kontrol.



Gambar 1. Susunan imunostrip (A); hasil negatif imunostrip (B); hasil positif imunostrip (C)

Diterima: 21-10-2020 | Direvisi: 12-11-2020 | Disetujui: 21-11-2020

© 2020 CC-BY-SA. Ini adalah artikel *Open Access* yang didistribusikan berdasarkan ketentuan dari *Creative Commons Attribution ShareAlike 4.0 International License* (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

■ HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis dan Karakterisasi Antigen AFB1-BSA

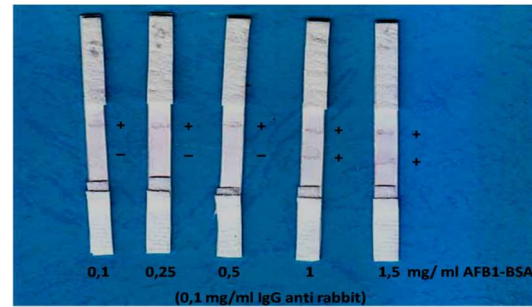
Toksin AFB1 memiliki ciri penampakan fluoresensi berwarna biru dibawah sinar ultraviolet (UV) panjang gelombang 365 nm. Bercak AFB1-CMO memiliki Rf = 0,45, sedangkan AFB1 baku memiliki Rf = 0,9. Nilai Rf AFB1 bervariasi tergantung pada jenis pelat dan sistem pelarut yang digunakan. Pada sistem pelarut kloroform dan aseton (9:1), nilai Rf dari AFB1-CMO berkisar 0,4–0,7 (AOAC 1995). Toksin AFB1 dikonjugasikan dengan protein pembawa yaitu BSA karena toksin ini memiliki bobot molekul yang terlalu kecil untuk digunakan sebagai imunogen. Toksin ini tidak memiliki gugus reaktif untuk berikatan dengan BSA. Tahapan sintesis antigen AFB1-BSA diawali dengan sintesis hapten AFB1-CMO terlebih dahulu seperti dilaporkan oleh Chu *et al.* (1977) dan Liu *et al.* (2013).

Berdasarkan perhitungan, hasil SDS PAGE antigen AFB1-BSA yang disintesis menunjukkan pita protein tunggal dengan bobot molekul sekitar 72 kDa, sedangkan BSA menunjukkan pita protein tunggal berukuran sekitar 66,9 kDa. Analisis antigen AFB1-BSA diperoleh migrasi protein penanda dari awal *resolving gel* sampai *tracking dye* berjarak 6,6 cm (Rf). Ukuran molekul pita protein dihitung berdasarkan rumus regresi dari nilai logaritma berat molekul pita protein penanda (sumbu y) terhadap mobilitas relatif atau Rf (sumbu x) (Hames 1998). Kurva regresi linear diperoleh dengan persamaan $y = -1,023x + 2,276$; $R^2 = 0,949$. Hasil SDS PAGE menunjukkan antigen AFB1-BSA yang disintesis lebih besar bobot molekulnya dibandingkan dengan BSA. Hal ini terjadi karena penambahan AFB1-CMO berikatan dengan BSA.

Konjugasi Antibodi Anti AFB1-BSA dengan Nanopartikel Emas

Terdapat perbedaan warna nanopartikel emas sebelum dikonjugasi yang berwarna merah sedangkan sesudah dikonjugasi dengan antibodi anti AFB1-BSA menjadi warna merah keunguan. Pengujian sistem imunostrip diperoleh konsentrasi optimum dari antigen AFB1-BSA yaitu 1,5 mg/ml sebanyak 1 μ L dan IgG *anti rabbit* dengan konsentrasi 0,1 mg/ml sebanyak 1 μ L dari terbentuknya garis merah keunguan pada daerah uji dan daerah kontrol (Gambar 2). Jumlah antigen AFB1-BSA pada membran nitroselulosa serta jumlah konjugat antibodi anti AFB1-BSA dengan nanopartikel emas pada lapisan konjugat akan menentukan limit deteksi visual dari imunostrip (Li *et al.* 2009).

Imunostrip dengan menggunakan antibodi yang dilabel oleh nanopartikel emas lebih menjanjikan karena ukuran partikelnya yang kecil. Menurut Chiao *et al.* (2004), penggunaan nanopartikel emas sebagai reagen detektor pada uji imunokromatografi cepat memiliki kelebihan yaitu mempunyai mobilitas yang baik pada membran berpori, dan kecenderungan rendah untuk beragregasi selama preparasi imunostrip sehingga akan mempunyai sensitivitas yang tinggi untuk digunakan sebagai komponen reagen.



Gambar 2. Komposisi optimum antigen AFB1-BSA dan IgG anti rabbit pada pengujian sistem imunostrip

■ SIMPULAN

Sistem imunostrip yang dikembangkan dapat digunakan untuk mendeteksi AFB1 pada sampel.

■ INFORMASI PENDUKUNG

† Preparasi sistem imunostrip yang dikembangkan untuk mendeteksi AFB1 tersedia sebagai informasi pendukung.

■ INFORMASI PENULIS

Penulis Korespondensi

*IK: itakrissanti@gmail.com

Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung

■ UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diucapkan kepada Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor (BBLitVet) yang telah mendukung dan membantu hingga terselesaikannya penelitian ini.

■ PUSTAKA ACUAN

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. Maryland: AOAC International.
- Chiao DJ, Shyu RH, Hu Cs, Chiang HY, Tang SS. 2004. Colloidal gold based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. *Journal of Chromatography B*. 809(1): 37-41.
- Chu FS, Hsia SMT, Sun PS. 1977. Preparation and characterization of AFB1-oxime. *Association Official Analytical Chemistry*. 60:791-794.
- Hames BD. 1998. *Gel Electrophoresis of Protein 3rd ed.* New York. Oxford University Press.
- [IARC] International Agency of Research on Cancer. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 82: 1-556.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- Li P, Zhang Q, Zhang W. 2009. Immunoassays for aflatoxins. *Trends in Analytical Chemistry*. 28(9): 1115-1126.
- Liu BH, Yu-Tien Hsu, Chuan-Chen Lu, Feng-Yih Yu. 2013. Detecting AFB1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*. 30(1):184-189.
- Maciorowskia KG, Herreraa P, Jonesb FT, Pillaia SD, Rickeca SC. 2007. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology*. 133 (1-2): 109-136.
- Saini SS, Kaur A. 2012. Aflatoxin B1: Toxicity, characteristics and analysis: Mini review. *Global Advanced Research Journal of Chemistry and Material Science*. 1(4): 63-70.
- Zheng MZ, Richard JL, Binder J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161(5): 261-273.