

Sintesis Imunogen Oksitetrasiklin-Tolidin-BSA dan Produksi Antibodi Anti-Oksitetrasiklin untuk Pengembangan Deteksi Residu Oksitetrasiklin Secara *Enzym Linked Immunoassay*

Widiastuti R¹, Murdiati TB¹, Riandari D²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata 30, Bogor 1611

²FMIPA, Program Studi Magister Ilmu Kimia Universitas Indonesia

(Diterima 21 April 2013; disetujui 21 Mei 2013)

ABSTRACT

Widiastuti R, Murdiati TB, Riandari D. 2013. Synthesis of an oxytetracycline-tolidin-BSA immunogen and antibodies production of anti-oxytetracycline developed for oxytetracycline residue detection with enzyme-linked immunosorbent assays technique. *JITV* 18(2): 138-145.

An oxytetracycline-tolidin-bovine serum albumin (OTC-tolidin-BSA)-conjugate was synthesized as immunogen for producing specific antibodies in immunized rabbits that would be used as reagent for development of OTC residue detection with enzyme-linked immunoassays technique. The immunogen was prepared through diazotization toolidin and subsequently reacted with OTC. The red purple immunogen of OTC-tolidin-BSA absorbed at wave lengths of 277 nm and 488 nm under UV screening absorbances and confirmation with the high performance liquid chromatography (HPLC) showed the absence of peak at retention time of 3.46 minutes. Characterized result with SDS-PAGE showed the molecular weight of the OTC-tolidin-BSA at 69.79 kDa. Subsequently, the immunogen was immunized into New Zealand rabbits in order to produce the polyclonal antibodies. The antibodies were purified using a protein A sepharose column. The OD optimum responses of 0.92 to 1.20 were obtained from the second fractionation at dilution of 1/1000 by titrating the antibodies and OTC-tolidin-BSA coating antigen at concentration of 10 µg/mL on several bleeding times.

Key Words: Oxytetracycline, OTC-Tolidin-BSA, Immunogen, Immunization, Antibodies

ABSTRAK

Widiastuti R, Murdiati TB, Riandari D. 2013. Sintesis imunogen oksitetrasiklin-tolidin-BSA dan produksi antibodi anti-oksitetrasiklin untuk pengembangan deteksi residu oksitetrasiklin secara *Enzyme Linked Immunoassay*. *JITV* 18(2): 138-145.

Konjugat oksitetrasiklin-tolidin-BSA (OTC-tolidin-BSA) disintesis sebagai imunogen dalam menghasilkan antibodi yang spesifik dari kelinci yang diimunisasi yang akan digunakan sebagai reagen untuk pengembangan deteksi residu OTC secara *enzym-linked immunoassays*. Imunogen disintesis melalui proses diazotisasi toolidin dan direaksikan dengan OTC. Imunogen OTC-tolidin-BSA yang berwarna merah keunguan memiliki absorbansi pada 277 dan 488 nm pada pembacaan UV absorbansi. Konfirmasi secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menunjukkan tidak adanya puncak pada waktu retensi 3,46 menit yang menunjukkan sudah tidak ada OTC bebas. Hasil karakterisasi menggunakan SDS-PAGE memperlihatkan bahwa berat molekul (BM) dari OTC-tolidin-BSA adalah sebesar 69,79 kDa. Selanjutnya imunogen diimunisasikan pada kelinci *New Zealand white* untuk menghasilkan poliklonal antibodi anti OTC. Antibodi kemudian dipurifikasi menggunakan kolom protein A sepharosa. Respon OD optimum pada kisaran 0,92 hingga 1,20 diperoleh dari fraksi 2 dengan pengenceran 1/1000 dari berbagai pengenceran antibodi dan antigen OTC-tolidin-BSA pada konsentrasi 10 µg/mL dari berbagai pengambilan darah.

Kata Kunci: Oksitetrasiklin, OTC-Tolidin-BSA, Imunogen, Imunisasi, Antibodi

PENDAHULUAN

Tetrasiklin (TC) dan derivatnya klortetrasiklin (CTC) dan oksitetrasiklin (OTC) merupakan antibiotika yang banyak digunakan untuk pencegahan dan pengobatan bronkopneumonia, enteritis bakteri, infeksi saluran kencing, mastitis, klamidiosis, anaplasmosis, aktinomikosis, aktinobasilosis, nokardiosis dan masih banyak lagi jenis-jenis penyakit ternak lainnya, karena harganya murah dan mudah diperoleh serta mudah

penggunaannya yaitu dengan pemberian secara oral baik melalui air minum maupun pakan (Kelly et al. 2006).

Pemakaian antibiotika yang tidak tepat oleh peternak seperti penggunaan yang berlebihan dan tidak mematuhi waktu henti akan memicu terbentuknya residu, dimana waktu henti OTC adalah 15-22 hari (babi dan sapi) serta 5 hari (unggas) dan CTC adalah 10 hari (sapi) dan 1-7 hari (babi) (Merek, 2012). Di Indonesia, Putranti (2003) mendapatkan 16,67%

sampel yang positif CTC yang melebihi batas maksimum residu (BMR) pada susu segar asal Yogyakarta. Rusdi dan Harlia (2004) melaporkan ditemukannya residu OTC dengan rata-rata melebihi BMR pada sampel daging (110,7 ng/g) dan hati ayam pedaging (234,0 ng/g) yang dikumpulkan dari berbagai Rumah Potong Ayam (RPA) Tempat Potong Ayam (TPA) di Jawa Barat. Demikian pula hasil penelitian Widiastuti et al. (2010) pada 30 sampel daging ayam asal Jakarta, Bekasi dan Depok dan mendapatkan adanya residu OTC pada 14 (46,67%) sampel, residu TC pada 2 (5,67%) sampel dan residu CTC pada 29 (96,87%) sampel mengandung residu CTC, 12 (40%) sampel diantaranya mengandung 2 jenis residu TC (OTC dan CTC) dan 2 (5,67%) sampel diantaranya mengandung ketiga jenis residu TC (OTC, TC dan CTC).

Keberadaan residu antibiotika dalam produk pangan asal hewan (daging, susu) perlu diwaspadai karena dapat mempengaruhi komposisi bakteri dan aktivitas metabolisme dari mikroflora dalam usus. Keberadaan residu ini juga akan mengakibatkan reaksi alergi pada individu yang sensitif (Dayan 1993). Residu ini juga mengakibatkan efek kronis seperti nefrotoksistas, hepatotoksistas, hiperpigmentasi kulit di area yang terpapar sinar matahari. Selain itu juga menyebabkan hipourisemia, hipokalemia (Goldfrank et al. 2002). Oleh karenanya Codex (2012) menetapkan batas maksimum residu untuk tetrasiklin adalah 300 ppb (daging sapi), 600 ppb (hati sapi) dan 1200 ppb (ginjal sapi), sedangkan Indonesia (DSN 2000) menetapkan sebesar 100 ppb (daging), 50 ppb (susu), dan 5 ppb (susu) untuk CTC dan tetrasiklin (TC).

Residu tetrasiklin dalam produk ternak (daging dan susu) umumnya dideteksi menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Navratilova et al. 2009, Abbasi et al. 2012) ataupun kromatografi cair spektrometri massa (KC-MS) (Cetinkaya et al. 2012) yang umumnya mahal dan memerlukan waktu analisis yang panjang. Metoda deteksi secara *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yang berdasarkan reaksi spesifik antara antigen dengan antibodi memiliki sensitifitas dan spesifitas yang tinggi karena menggunakan enzim sebagai indikatornya. ELISA juga memiliki keunggulan sebagai metoda yang sederhana, cepat, murah, dapat mendeteksi sampel dalam jumlah banyak. Metoda ini telah diaplikasikan untuk mendeteksi residu tetrasiklin dalam susu dan madu (Zhang et al. 2007; Pastor-Navarro et al. 2007), serta residu OTC dalam pangan dan daging ayam (Wongtangprasert et al. 2011 dan Le et al. 2012).

Oleh karena, molekul OTC kecil (460,49 g/mol, <1000 Da), maka OTC tidak dapat memicu respon

imun pada hewan ketika antibiotika ini masuk ke tubuh hewan dan tidak akan menghasilkan antibodi anti-OTC. Agar bersifat imunogenik OTC harus dikongjugasikan dengan molekul besar, umumnya protein seperti *bovine serum albumin* (BSA) sebelum diimunisasikan (Zhang et al. 2007). Untuk itu dilakukan sintesis hapten OTC dengan mengaktivasi cincin D pada molekul OTC menggunakan reaksi pembentukan garam diazonium.

Sejauh ini, sintesis imunogen OTC dan preparasi dari anti-OTC antibodi masih sangat terbatas, meskipun kit komersial ELISA untuk mendeteksi OTC telah tersedia di pasaran. Penelitian yang bertujuan untuk menghasilkan konjugat OTC-BSA yang digunakan sebagai imunogen dalam metoda deteksi *indirect* ELISA diantaranya telah dipublikasikan oleh Pastor-Navarro et al. (2007) untuk mendeteksi residu berbagai TC dalam madu. Sedangkan penelitian termutakhir yang dilakukan oleh Le et al. 2012 ditujukan untuk mendeteksi OTC dan metabolitnya 4-epi-OTC secara *indirect ELISA* melalui pengembangan antibodi monoklonal yang spesifik. Tujuan dari penelitian ini adalah mensintesis konjugat OTC imunogen yang akan diimunisasikan pada kelinci *New Zealand white* untuk memproduksi antibodi poliklonal anti-OTC (Zhang et al. 2007).

MATERI DAN METODE

Pembuatan imunogen OTC-tolidin-BSA

Pembuatan imunogen OTC-tolidin-BSA menggunakan metoda yang diadopsi dari penelitian Zhang et al. (2007). Sebanyak 25 mg toolidin (118 μ mol) dilarutkan dalam 4,5 mL HCl 0,2 N, kemudian ditambahkan secara perlahan 254 μ mol larutan natrium nitrit (17,5 mg NaNO₂ dalam 0,5 mL akuabides) dalam keadaan gelap pada suhu 4°C dengan pengadukan yang konstan. Campuran dibiarkan bereaksi selama 30 menit. Setelah itu, larutan toolidin-bisdiazotasi ditambahkan secara perlahan ke dalam 2 mL Na₂BO₃ 0,5 M (pH 8,5, mengandung 0,15 M NaCl) yang di dalamnya terdapat 20 mg BSA (0,15 μ mol) dan oksitetrasiklin (OTC) dengan perbandingan molar 1:75. Campuran larutan dengan segera akan berwarna ungu. Campuran reaksi diinkubasi selama 2 jam pada 4°C dalam keadaan gelap. Campuran reaksi yang berwarna ungu kemudian didialisis dengan PBS (0,01 M, pH 7.4) sambil dilakukan pengadukan selama 3 hari, dengan 3 kali penggantian PBS untuk menghilangkan hapten bebas. Endapan dihilangkan dengan sentrifugasi pada 3000 rpm dan supernatan (konjugat OTC-tolidin-BSA) disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan.

Konfirmasi pembentukan OTC-tolidin-BSA

Imunogen OTC-tolidin BSA yang terbentuk kemudian dikonfirmasi untuk mengetahui tingkat keberhasilan sintesis dengan mengukur asam amino bebas yang tersisa dalam hapten secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Shimadzu SPD-M20A) menggunakan kolom C₁₈ RP dengan fasa gerak campuran asetonitril dan asam oksalat (0,05 M) dengan perbandingan 1:3, dan dideteksi dengan PDA detektor pada panjang gelombang 353 nm dan dibaca serapannya menggunakan spektrofotometri UV/Vis (Specord 200, AnalytikJena) pada panjang gelombang 250-600 nm serta memperkirakan berat molekul (BM)-nya menggunakan *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lst/literature/Bulletin_3133.pdf) menggunakan standar protein dengan berat molekul rendah yaitu bovine serum albumin (66,0 kDa).

Jadwal imunisasi

Imunogen OTC-tolidin-BSA yang telah disintesis dan dikarakterisasi kemudian diimunisasikan secara subkutan pada 2 ekor kelinci *New Zealand White* berumur 8 bulan untuk memproduksi antibodi. Konsentrasi imunogen yang diimunisasikan dihitung berdasarkan konsentrasi protein pembawa (BSA), dalam tiap perbandingan konsentrasi OTC-tolidin-BSA dipergunakan 20 mg BSA dan volume imunogen yang diperoleh 3 mL atau setara dengan 6,67 mg/mL. Sehingga untuk memperoleh 0,5 mL imunogen dengan konsentrasi 1 mg/mL diperlukan $1 \times 0,5/6,67 = 0,075$ mL (75 μ L) imunogen yang harus dilarutkan menjadi 0,5 mL dengan NaCl 0,9%.

Imunisasi pertama dilakukan dengan menyuntikkan imunogen (konsentrasi 1 mg/mL) dalam 0,5 mL NaCl (0,9%) dan 0,5 mL *Freund's complete adjuvant*. *Booster* selanjutnya (konsentrasi 0,5 mg/mL) konjugat dalam 0,5 mL NaCl (0,9%) dan 0,5 mL *Freund's incomplete adjuvant* (IFA) diimunisasikan 15 hari kemudian. *Booster* diulang setiap 14 hari dan 10 hari sesudahnya secara intravena pada telinga dilakukan pengambilan darah (*bleeding*) sebanyak 40-50 mL, tahapan ini diulang hingga *bleeding* ke-7. Darah yang dikumpulkan kemudian dibiarkan terkoagulasi selama 3 jam. Selanjutnya serum dipisahkan dari darah dengan cara disentrifus pada 3000 rpm selama 15 menit dan disimpan pada -20°C untuk dimurnikan dan diukur konsentrasi IgG-nya. Pengukuran antibodi dilakukan mulai dari pengambilan darah (*bleeding*) ke-3 hingga ke-7.

Pemurnian dan karakterisasi antibodi

Pemurnian dilakukan menggunakan kolom Protein A Sepharosa (HiTrap Protein A HP, Pharmacia) (Heytman, 1988). Serum dilarutkan dalam dapar diluen dengan perbandingan volume 1:1. Sebanyak 30 mL dapar kolom (dapar fosfat-NaCl, pH 8,0) dimasukkan ke dalam kolom Protein A sepharosa dan dikeluarkan tetes demi tetes. Antibodi yang melekat pada kolom dielusi dengan dapar elusi dan eluatnya ditampung dalam vial masing-masing sebanyak 2 mL (fraksi kolom) serta dengan segera dinetralkan dengan Tris 1 M pH 11 sebanyak 340 μ L untuk setiap 2 mL larutan antibodi. Kolom dicuci dengan 10 mL dapar pencucii (asam sitrat 0,1M, pH 2,0) diikuti dengan dapar kolom (dapar fosfat-NaCl) hingga pH 2 dan terakhir dengan etanol 20% hingga selanjutnya kolom disimpan pada suhu 4°C dan dapat digunakan kembali. Konsentrasi antibodi (IgG) yang telah dimurnikan dari tiap-tiap fraksi diukur secara spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm dan dihitung menggunakan rumus $A/1,35 \times fp$. Konsentrasi IgG berbanding lurus dengan absorbansinya.

Penentuan kondisi optimum

Pengukuran titer antibodi dilakukan secara *indirect-competitive* ELISA untuk mendapatkan kondisi optimum antibodi. Antigen OTC-tolidin-BSA diencerkan dengan dapar pelapis (PBS 0,01 M pH 7,4) hingga konsentrasi menjadi 10 μ g/mL (100 μ L/sumur). Setelah itu, larutan antigen dilapiskan pada mikroplat 96 sumur sebanyak 100 μ L/sumur. Mikroplat diinkubasi pada 4°C selama semalam, dicuci dengan akuabides sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Larutan pemblok (3 g susu skim dalam 100 mL dapar garam fosfat dan 200 μ L Na₃N₃ 10%) sebanyak 200 μ L/sumur ditambahkan dan didiamkan selama 1 jam. Kemudian mikroplat dicuci kembali dengan akuabides. Antibodi dari serum pada pengambilan darah ketiga hingga ketujuh diencerkan dengan dapar garam fosfat (13,78 g Na₂HPO₄ 12 H₂O; 1,59 g NaH₂PO₄ H₂O; 9 g NaCl dengan akuabides hingga volumenya 1000 mL) hingga konsentrasi 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000. Setelah itu larutan antibodi (100 μ L/sumur) dimasukkan pada mikroplat dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian mikroplat dicuci dengan akuabides sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Selanjutnya IgG-HRP *goat anti rabbit* (1 : 20000, 100 μ L/sumur) ditambahkan, diikuti dengan inkubasi selama 45 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan akuabides sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Tahap berikutnya adalah penambahan substrat

o-phenyldiamine (OPD) (100 μ L/sumur), lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan larutan penghenti reaksi (H_2SO_4 1,25 M) sebanyak 50 μ L/sumur untuk menghentikan reaksi pewarnaan. Absorbansi masing-masing larutan dibaca menggunakan alat ELISA *plate reader* (Labsystem Multiskan Ascent) pada panjang gelombang 450 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis dan konfirmasi pembentukan OTC-tolidin-BSA

Hapten OTC yang spesifik diperlukan karena sebagai hapten OTC tidak memiliki gugus fungsional (-COOH, $-NH_2$, -SH) yang diperlukan untuk reaksi konjugasi pada protein pembawa. Dengan metode sintesis ini hapten tetap mempertahankan inti tetrasiklik dan memiliki gugus aromatik yang dapat meningkatkan sensitifitas ELISA (Pastor-Navarro et al. 2007). Senyawa azo OTC-tolidin dikonjugasikan dengan BSA juga melalui reaksi kopling azo dengan rantai samping residu tirosin dari BSA pada posisi orto. Tolidin adalah suatu agen homobifungsional *cross-linking* yang digunakan untuk mensintesis imunogen OTC dan berfungsi sebagai jembatan yang menghubungkan OTC dengan BSA. Pada metode sintesis ini tolidin diazotasi pada kedua gugus aminanya membentuk garam bis-diazoniumnya, yang kemudian direaksikan dengan OTC melalui reaksi kopling azo. Reaksi kopling azo terjadi melalui substitusi elektrofilik dari gugus tolidinbis-diazonium terhadap titik yang kaya elektron pada molekul OTC yaitu pada cincin fenolnya. Kopling azo $-N=N-$ menyukai penggabungan pada posisi para, tetapi jika kedudukan para telah diisi oleh substituen lain, penggabungan orto dapat terjadi. Temperatur sintesis reaksi dipertahankan antara 0° hingga $10^\circ C$ untuk mempertahankan stabilitas garam diazoniumnya. Kopling antara tolidin bis-diazonium dan OTC dilakukan pada pH 8,5, karena kopling pada lingkungan

yang cukup basa akan berlangsung paling cepat (Solomon dan Fryhle 2004).

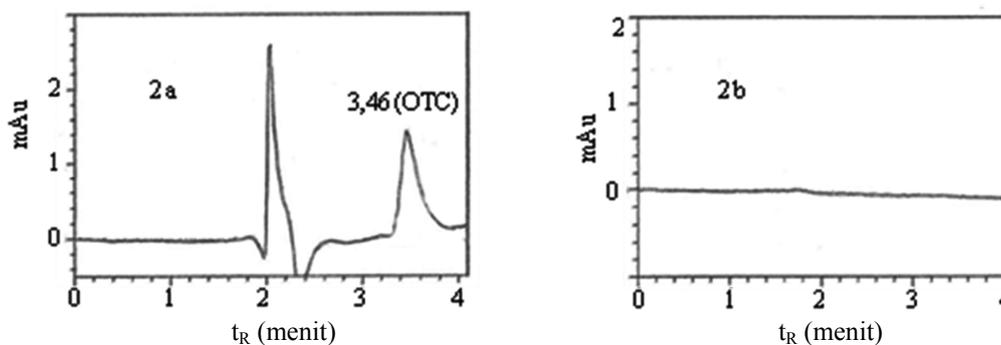
Terjadinya kopling azo antara tolidin bis-diazonium dengan OTC dapat diketahui dari terbentuknya larutan konjugat berwarna merah keunguan (Gambar 1) yang sejalan dengan hasil penelitian Zhang et al. (2007) yang mengkonjugasikan tetrasiklin (TC) dengan tolidin dan BSA menjadi TC-tolidin-BSA yang berwarna merah keunguan.



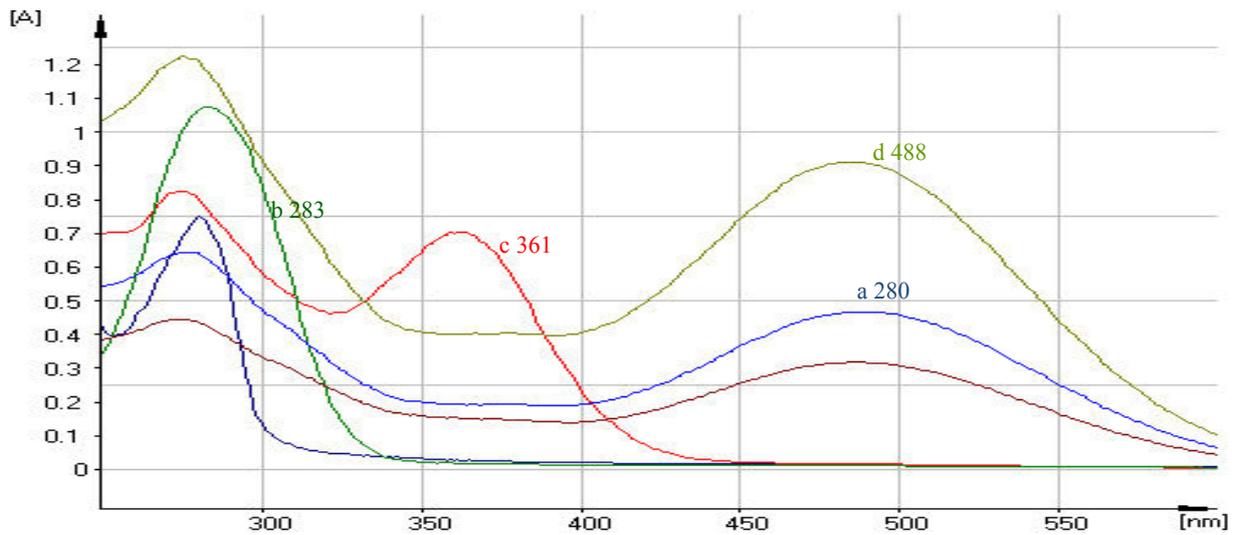
Gambar 1. Konjugat OTC-Tolidin-BSA

Hasil konfirmasi terbentuknya konjugat OTC-tolidin-BSA dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat dilihat pada Gambar 2 dimana larutan konjugat (Gambar 2b) sudah tidak mengandung OTC bebas yang terlihat dari tidak adanya puncak (*peak*) OTC pada waktu retensi (t_R) 3,46 menit (Gambar 2a).

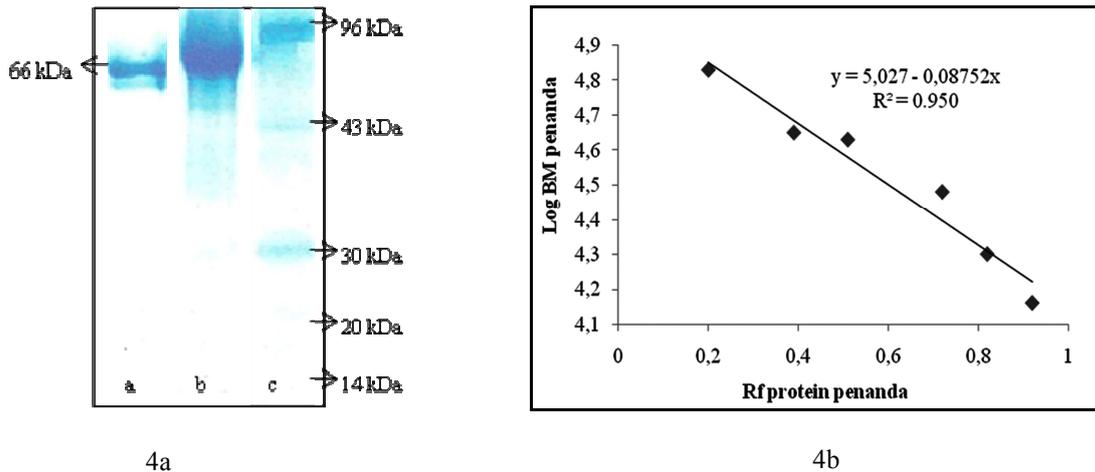
Karakterisasi imunogen OTC-tolidin-BSA juga dilakukan dengan membaca serapannya menggunakan UV-Vis spektrometer (Gambar 3) sebagaimana yang dilakukan Zhang et al. (2007) maupun Norani dan Azura (2011). Terlihat bahwa OTC-tolidin-BSA mempunyai serapan pada panjang gelombang maksimum 277 dan 488 nm, berbeda dengan serapan OTC, BSA dan tolidin yang masing-masing menunjukkan serapan pada panjang gelombang 277 dan 351 nm (OTC), 280 nm (BSA) dan 283 nm (tolidin). Konjugasi antara OTC dan BSA melalui jembatan tolidin ini membuat sedikit pergeseran serapan UV spektra yang sejalan dengan pendapat Jaeger et al. (1998) yang menyatakan bahwa serapan UV dari hapten dapat bergeser (berubah) sewaktu berkonjugasi dengan protein dan menunjukkan keberhasilan dari konjugasi.



Gambar 2. Kromatogram standar OTC (2a) dan OTC-tolidin-BSA (2b)



Gambar 3. Spektra puncak (dengan UV-VIS) : a (biru) = BSA pada 280 nm, b (hijau tua) = tolidin pada 283 nm, c (merah) = OTC pada 274 dan 361 nm, d (hijau muda) = OTC-tolidin-BSA pada 277 dan 488 nm



Gambar 4. Pita-pita hasil elektroforesis gel (SDS-PAGE) BSA (lajur SDS-PAGE: a. BSA; b. Konjugat OTC-tolidin-BSA; c. Protein penanda) (4a) dan persamaan garis lurus antara Rf protein penanda dan log BM protein penanda (4b)

Penentuan kondisi optimum antibodi

Hasil karakterisasi dengan SDS-PAGE yang bertujuan untuk mengkonfirmasi terbentuknya imunogen OTC menunjukkan adanya posisi pita OTC-tolidin-BSA yang berbeda jika dibandingkan dengan posisi pita BSA sebelum bereaksi (Gambar 4a). Hal ini terjadi karena adanya penambahan bobot molekul yang disebabkan terikatnya hapten pada molekul BSA. Bobot molekul (BM) imunogen dapat diperkirakan dengan membuat persamaan garis lurus (Gambar 4b).

$$y = 5,027 - 0,08752x$$

Keterangan:

y = logaritma dari BM marker protein dan

x = nilai Rf (mobilitas pergerakan protein dari titik awal) dari protein penanda.

Dengan memasukkan nilai Rf maka diperkirakan BM OTC-tolidin-BSA adalah 69,79 kDa. Metode konfirmasi menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) juga dilakukan oleh Wongtangprasert et al. (2011).

Produksi dan purifikasi antibodi

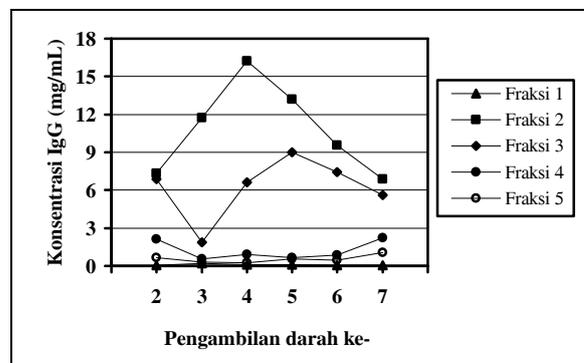
Imunogen OTC-tolidin BSA yang terbentuk kemudian diimunisasikan pada kelinci *New Zealand white* untuk menghasilkan antibodi anti OTC. Terbentuknya antibodi juga dijadikan sebagai ukuran keberhasilan sintesis imunogen. Purifikasi antibodi menggunakan kolom protein A sepharosa dilakukan untuk meningkatkan kemurnian antibodi. Kemurnian antibodi ditingkatkan dengan menghilangkan lipid dan protein serum yang tidak diinginkan sehingga diperoleh IgG yang spesifik terhadap antigen OTC-tolidin-BSA.

Konsentrasi IgG dari berbagai fraksi yang berasal dari berbagai waktu pengambilan darah memperlihatkan bahwa hewan coba memproduksi antibodi, dengan konsentrasi tertinggi diperoleh dari fraksi 2 dan fraksi 3 (Gambar 5). Antibodi tersebut akan digunakan untuk penentuan konsentrasi pengenceran optimum.

Konsentrasi optimum antibodi anti OTC ditentukan dari hasil titrasi antara antibodi anti OTC dan antigen OTC-tolidin-BSA dengan ELISA kompetitif tidak langsung (*indirect-competitive* ELISA). Kondisi optimal diperoleh dengan antigen OTC-tolidin-BSA pada fraksi 2 dengan konsentrasi 10 µg/mL pada pengenceran antibodi 1/1000 dengan nilai OD 0,92-1,20 (Tabel 1), sedangkan OD pada fraksi 3 adalah 0,70-1,09 (lihat Tabel 2). Hasil antibodi fraksi 2 yang lebih baik dari fraksi 3 tersebut dapat digunakan untuk

pengembangan metoda deteksi OTC dalam produk peternakan secara ELISA.

Respon optimal pada pengenceran 1/1000 dengan nilai OD 0,92-1,20, sebenarnya merupakan respon yang tidak terlalu kuat (lemah) namun masih mengartikan adanya potensi keberhasilan dari sintesa tersebut. Sebagai pembanding adalah hasil penelitian Noraini dan Azura (2011) yang mendapatkan poliklonal antibodi tetrasiklin (TC) tertinggi pada pengambilan darah keempat mencapai nilai OD 1,2 dengan konsentrasi 1 mg/mL. Hal ini terjadi kemungkinan karena pembentukan imunogen yang kurang optimum. Sebagaimana diketahui bahwa sifat antibiotik golongan tetrasiklin (TC) secara umum tidak stabil terhadap kondisi asam maupun basa dan membentuk epimer yang reversibel (bolak-balik). Di samping itu, TC bersifat mudah rusak oleh adanya cahaya (fotodekomposisi) dan berubah menjadi berbagai produk samping. Untuk berbagai alasan tersebut, sintesis dan purifikasi hapten dari TC cukup sulit (Pastor-Navarro et al. 2007). Hasil yang lebih baik kemungkinan dapat diharapkan apabila BSA yang digunakan diubah menjadi BSA terkationisasi (*c*-BSA) yaitu dengan mereaksikan BSA dengan etilenediamin (EDA) berlebih sehingga akan lebih banyak gugus amino yang mudah berkonjugasi dengan gugus fungsional (karboksilat) pada hapten (Zhang et al. 2007).



Gambar 5. Konsentrasi antibodi anti OTC hasil purifikasi pada berbagai waktu pengambilan darah

Tabel 1. Hasil titrasi antibodi anti OTC fraksi 2 terhadap antigen OTC pada berbagai waktu pengambilan darah

Waktu pengambilan darah	Pengenceran antibodi					
	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000
Ke-4	1,198	0,761	0,589	0,413	0,297	0.161
Ke-5	1,143	0,679	0,461	0,229	0,176	0,125
Ke-6	0,985	0,546	0,378	0,225	0,156	0,092
Ke-7	0,917	0,424	0,224	0,115	0,089	0,079

Tabel 2. Hasil titrasi antibodi anti OTC fraksi 3 terhadap antigen OTC pada berbagai waktu pengambilan darah

Waktu pengambilan darah	Pengenceran antibodi					
	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000
Ke-4	0,932	0,663	0,557	0,416	0,245	0,163
Ke-5	1,031	0,511	0,307	0,175	0,131	0,107
Ke-6	0,944	0,512	0,327	0,175	0,114	0,098
Ke-7	0,696	0,340	0,094	0,081	0,071	0,072

KESIMPULAN

OTC-tolidin BSA yang akan digunakan sebagai imunogen dapat disintesis menggunakan metode konjugasi dengan tolidin membentuk OTC-tolidin-BSA. Konfirmasi terbentuknya imunogen dapat dilihat dengan terbentuknya larutan konjugat berwarna merah keunguan serta serapan pada panjang gelombang maksimum 277 dan 488 nm pada pembacaan oleh spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan hasil karakterisasi menggunakan SDS-PAGE memperlihatkan bahwa berat molekul (BM) dari OTC-tolidin-BSA adalah sebesar 69,79 kDa.

Imunogen yang diimunitisasikan pada kelinci *New Zealand white* menghasilkan antibodi anti OTC. Respon OD yang optimal dari antigen OTC-tolidin-BSA diperoleh pada kisaran 0,92 hingga 1,20 diperoleh dari fraksi 2 dengan konsentrasi 10 µg/mL dari berbagai waktu pengambilan darah dengan pengenceran 1/1000 dari titrasi berbagai serial pengenceran antibodi. Imunogen tersebut akan digunakan untuk pengembangan metoda deteksi OTC dalam produk peternakan secara *enzym linked immunoassay* (ELISA) karena sudah menunjukkan adanya potensi untuk digunakan sebagai reagen. Hasil tersebut sebaiknya ditingkatkan dengan pembuatan imunogen yang lebih baik untuk mendapatkan hasil yang lebih optimum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdri. Heny Yusrini, STP (Bbalitvet) dan Lia Oktateria (Universitas Pancasila) yang telah membantu menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Abbasi, MM, Nemati M, Babaei H, Ansarin M, Nourdadgar AOS. 2012. Solid-phase extraction and simultaneous determination of tetracycline residues in edible cattle tissues using an HPLC-FL method. *Iranian J. Pharmaceutical Research*, 11(3):781-787.

Cetinkaya F, Yibar A, Soyutemiz GE, Okutan B, Ozcan A, Karaca MY. 2012. Determination of tetracycline residues in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam (Part B)*: 1-5. www.bursagida.gov.tr/YAYINLAR%20CV/A.OZCAN/a4.PDF.

Codex 2012. Codex Alimentarius Commission maximum residue limits for veterinary drugs in foods updated as at the 35th session of the Codex Alimentarius Commission (July 2012). CAC/MRL 2-2012. p. 7.

Dayan AD. 1993. Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. *Vet Microbiol*. 35:213-226.

DSN. 2000. Batas maksimum cemaran mikroba dan batas maksimum residu dalam bahan makanan asal hewan. Jakarta (Indones): Dewan Standarisasi Nasional, Direktorat Kesehatan Masyarakat Veteriner, Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan, Departemen Pertanian.

Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, Howland MA, Hoffman RS, Nelson LS. 2002. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. New York NY (USA): The McGrawHill Companies.

Heytman, MJ. 1988. Purification of immunoglobulins. In : *ELISA technology in diagnosis and research*. Ed. Burgess, GW. Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland, Townsville.

Kelly M, Tarbin JA, Ashwin H, Sharman M. 2006. Verification of compliance with organic meat production standards by detection of permitted and nonpermitted uses of veterinary medicines (tetracyclines antibiotics). *J. Agric. Food Chem*. 54:1523-1529.

Le T, Yu H, Zhao Z, Wei W. 2012. Development of a monoclonal antibody-based ELISA for the detection of oxytetracycline and 4-epi-oxytetracycline residues in chicken tissues. *Anal Lett*. 45:386-394.

Jaeger LL, Jones AD, Hammock BD. 1998. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine mercapturic acid in human urine. *Chem Res Toxicol*. 11:342-352.

- Navratilova P, Borkovcová I, Dračková M, Janštová B, Vorlová L. 2009. Occurrence of tetracycline, chlortetracyclin, and oxytetracycline residues in raw cow's milk. *Czech J Food Sci.* 27:379-385.
- Noraini S, Azura N. 2011. Production of polyclonal antibody against tetracycline using KLH as a carrier protein. *Mal J Anim Sci.* 14:61-66.
- Pastor-Navarro N, Morais S, Maquieira A, Puchades R. 2007. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples. *Anal Chim Acta.* 594:211-218.
- Putranti D. 2003. Residu antibiotika penisilin dan tetrasiklin dalam susu segar dan hasil olahannya: Studi kasus pada kelompok peternak di Daerah Istimewa Yogyakarta (tesis S2). [Yogyakarta (Indones)]: Universitas Gajah Mada.
- Rusdi UD, Harlia E. 2004. Cemaran bakteri dan residu antibiotika dan sulfã produk rumah pematongan ayam di Jawa Barat. *J Indon Trop Anim Agric.* 29:1-9.
- Solomon TWG, Fryhle CB. 2004. *Organic Chemistry.* 8th edition. New York NY (USA): John Wiley and Sons, Inc.
- Widiastuti R, Murdiati TB, Anastasia Y. 2010. Residu tetrasiklin pada daging ayam pedaging dari wilayah Jakarta, Depok dan Bekasi yang dideteksi secara kromatografi cair kinerja tinggi. Prasetyo LH, Nathalia L, Iskandar S, Puastuti W, Herawati T, Nurhayati, Anggraeni A, Damayanti R, Darmayanti NLPI, Estuningsih SE, penyunting. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.* Bogor, 3-4 Agustus 2010. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor (Indones): hlm. 780-785.
- Wongtangprasert T, Palaga T, Komolpis K, Khongchareon porn N. 2011. Development of oxytetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. 2011 International Conference on Asia Agriculture and Animal IPCBEE. Vol.13. Singapore: IACSIT Press. p. 6-10.
- Zhang Y, Lu S, Liu W, Zhao C, Xi R. 2007. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. *J Agric. Food Chem.* 55:211-218.