

# PENGEMBANGAN METODE ELISA UNTUK ANALISIS CEPAT DAN MUDAH TERHADAP RESIDU ANTIBIOTIK ENROFLOKSASIN DALAM MAKANAN ASAL HEWAN DAN LAUT

MUHAMMAD ZAHID<sup>1,2</sup>, N. ALICE LEE<sup>2</sup>, NARESH KUMAR<sup>3</sup>, GEORGE ISKANDAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor 16340, Indonesia

<sup>2</sup>School of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia

<sup>3</sup>School of Chemistry, Faculty of Science, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia

## ABSTRAK

Penggunaan antibiotik fluoroquinolon (FQ) secara intensif pada peternakan dan akuakultur berdampak pada isu mengenai adanya residu FQ dalam makanan dan terbentuknya resistensi bakteri terhadap FQ pada hewan. Hal ini akan mempengaruhi kesehatan manusia, khususnya pengobatan terhadap penyakit infeksi. Hapten enrofloksasin disintesis dengan mereaksikan suatu linker tert-butyl dengan kelompok asam karboksilat dari enrofloksasin (ENR) dan mengkonjugasikan dengan protein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*). Selanjutnya enrofloksasin-KLH hapten terkonjugasi (imunogen) disuntikkan ke kelinci untuk menghasilkan antibodi poliklonal spesifik yang digunakan untuk mengembangkan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) untuk mendeteksi residu enrofloksasin di hati ayam, udang dan susu. ELISA menunjukkan sensitivitas yang baik dengan nilai  $IC_{50}$  adalah  $11,8 \mu\text{g L}^{-1} \pm 1,7$  dengan nilai limit deteksi (LOD) adalah  $2,4 \mu\text{g L}^{-1} \pm 0,4$ . Metode ELISA ini memiliki spesifisitas yang tinggi terhadap target FQ tanpa secara signifikan menunjukkan reaksi silang (*cross reaction*) terhadap tujuh senyawa FQ struktural terkait (danofloksasin, enofloksasin, sarafloksasin, perfloksasin, asam nalidixat, siprofloksasin dan norfloksasin). Efek dari surfaktan (*Tween20*), pelarut organik (metanol, etanol, aseton dan asetonitril) dan kondisi pH (5,5-9,5) dievaluasi untuk mengoptimalkan kinerja uji. Teknik persiapan untuk sampel susu, hati ayam dan udang juga dioptimalkan dengan menghasilkan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang baik antara  $64 \pm 3\%$  dan  $125 \pm 8\%$ .

**Kata kunci:** residu, enrofloksasin, ELISA, produk hewani dan hasil laut

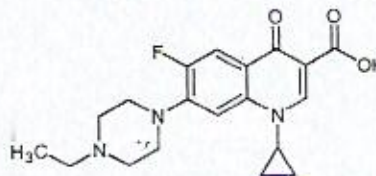
## ABSTRACT

The extensive utilization of fluoroquinolone (FQ) in livestock and aquaculture practices leads to the issue regarding the presence of FQ residues in food and the development of FQ resistant bacteria in animals. This may have an implication to human health, in particular for the treatment of infection. A novel of enrofloxacin hapten (ENR-1) was synthesised by attaching a tert-butyl linker on a carboxylic acid group of enrofloxacin (ENR). A specific polyclonal antibody was produced by immunizing rabbits with enrofloxacin hapten conjugated KLH (immunogen). An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was then developed to detect enrofloxacin in chicken liver, prawn and milk. The optimized ELISA exhibited high sensitivity and displayed an  $IC_{50}$  value of  $11.8 \mu\text{g L}^{-1}$  with a limit of detection (LOD) value of  $2.4 \mu\text{g L}^{-1}$ . The ELISA also was able to generate highly specific assay for the detection of the targeted FQ (fluoroquinolone) without significant cross-reaction to the seven FQs structurally related compounds (e.g. danofloxacin, enofloxacin, sarafloxacin, perfloxacin, nalidixic acid, ciprofloxacin and norfloxacin). The effects of surfactants (*Tween20*), organic solvent (methanol, ethanol, acetonitrile and acetone) and pH conditions (5.5-9.5) were evaluated to optimize assay performance. The sample preparation techniques were also optimized for milk, chicken liver and prawn samples, yielding good recoveries between  $64 \pm 3\%$  and  $125 \pm 8\%$ .

**Keywords:** enrofloxacin residue; ELISA; animal-derived products; seafood.

## PENDAHULUAN

Enrofloksasin (ENR) adalah antibiotik sintetis dari kelompok *fluoroquinolones* (FQs), yang memiliki spektrum mekanisme luas untuk pengobatan berbagai infeksi bakteri pada hewan. Mekanisme kerja antibiotik ini dengan penghambatan enzim bakteri penting (DNA girase), dengan mengganggu reaksi bergabungnya DNA kembali (4). ENR (ditunjukkan dalam Gambar 1) secara luas digunakan dalam obat hewan khususnya di unggas, hewan besar serta hewan kesayangan. Saat ini ada sekitar 76 nama merek dagang dari ENR yang didistribusikan di pasar Indonesia (1).



Gambar 1. Struktur kimia enrofloksasin

Pemberian ENR terhadap hewan untuk pengobatan secara intensif dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan akumulasi residu ENR dalam produk hewani. Terakumulasinya residu ENR dalam produk ternak memicu perkembangan resisten *strain* bakteri pada

manusia melalui makanan yang dikonsumsi. Masalah ini akan berkaitan dengan kesehatan masyarakat, terutama melalui peningkatan risiko kegagalan pengobatan (7). Sebagai contoh, enrofloksasin menyebabkan resistensi spesies *Campylobacter* terhadap FQs yang digunakan unggas maupun manusia, oleh karena itu ENR telah dilarang oleh *US Food Drug Administration* (FDA) untuk digunakan dalam pengobatan unggas (11). Untuk meminimalisir risiko terpaparnya FQ ke manusia melalui makanan yang terkontaminasi residu dan untuk memantau residu FQ dalam produk asal hewan dan hasil laut, maka sangatlah penting untuk menentukan batas maksimum residu (BMR) atau *maximum residue limits (MRLs)* untuk FQ. Saat ini BMR untuk residu FQ belum diatur oleh banyak negara. Amerika (FDA, 2005), Eropa (Uni Eropa, 1990), Jepang (Kementerian Pertanian, Kehutanan dan Perikanan, 2000) dan Cina (Departemen Pertanian, 2003) telah menentukan BMR untuk enrofloksasin, siprofloksasin dan metabolit antara 30 dan 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pada produk hasil laut dan asal hewan (3). Sementara itu, Badan Standardisasi Nasional (BSN) Indonesia masih mengacu pada *FAO / WHO Expert Committee on Food Authority (JECFA)* sebagai pedoman untuk menentukan BMR FQ. BMR untuk enrofloksasin, siprofloksasin dan metabolit aktifnya telah ditetapkan pada antara 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  sampai dengan 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pada susu dan daging. Metode instrumen berbasis kimia, seperti Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) telah banyak digunakan untuk skrining residu FQ karena akurasi dan sensitivitas yang baik. (2,5,6,10). Namun, metode ini memerlukan waktu yang lama, biaya operasional yang mahal, dan membutuhkan personil yang terlatih. Metode *immunochemical* adalah sebuah metode alternatif yang cepat dan sensitif seperti halnya metode kimia berbasis instrumen, untuk skrining rutin terhadap FQ, yang memiliki keuntungan biaya operasional yang rendah, sehingga akan bermanfaat bagi laboratorium yang tidak mampu menyediakan instrumen yang mahal, terutama di negara-negara berkembang, seperti Indonesia. Proyek penelitian ini, bertujuan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas antibodi untuk mendeteksi residu FQ dalam produk hewani dan makanan laut melalui desain dan sintesis hapten terbaru dan pengembangan metode *immunochemical* (ELISA). Selain itu, dengan meningkatkan pemantauan rutin terhadap residu FQ pada produk pangan di Indonesia akan memastikan makanan yang aman dan sehat dan membantu untuk meningkatkan kapasitas perdagangan dan pertumbuhan ekonomi Indonesia.

## MATERI DAN METODE

### Alat, Bahan dan Metode

#### Bahan-bahan yang digunakan:

Enrofloksasin (ENR) dan antibiotik fluoroquinolon lain, *dicyclohexylcarbodiimide* (DCC), *N-hydroxy-succinimide* (NHS), tert-butil  $\alpha$ -alanin, 4-di-(methylamino) piridin (DMAP), N, N'-dimetilformamida (DMF) (Sigma Aldrich, Amerika Serikat), 1-etil-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hidroklorida (EDC) (Alfa Aesar), bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OA), *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH), dan horseradish peroxidase (HRP) (Sigma Aldrich, Amerika Serikat), tabung dialisa, Tween 20, *secondary goat anti-rabbit IgG-HRP antibody dan Freund incomplete adjuvant* (Sigma Aldrich, Amerika Serikat).

Lempengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Merck Chemical Ltd), silika gel H (*TLC grade*), alumina netral dan *celite* (Sigma Aldrich, Amerika Serikat). Silika gel H (Merck, Darmstadt, Jerman) dan pelarut untuk *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) seperti dimetilsulfoksida (DMSO- $D_6$ ), deuteriokloroform ( $CD_3Cl$ ) dan oksida deuterium ( $D_2O$ ) (*Cambridge Laboratorium Isotop, Inc USA*).

#### Alat yang digunakan:

Konsentrasi antibodi dan absorbansi diukur oleh pembaca SpectraMax<sup>®</sup> M2, multi-deteksi lempeng (*Molecular Devices, Sunnyvale, California, AS*). Maxisorp polistiren 96 (Dimittis, Denmark). Nilai *Rate of Flow* (Rf) mengacu pada KLT pada alumina atau silika gel 60 F<sub>254</sub> visualisasi di bawah sinar ultra violet (UV). Proton (<sup>1</sup>H) dan karbon (<sup>13</sup>C) dicatat pada Bruker 300 Instrumen DPX (300 MHz). Semua *electrospray ionization* (ESI) spektrometri massa (MS) spektra dilakukan pada *Bioanalytical Mass Spektrometry Facility* (BMSF), UNSW, Sydney, menggunakan Agilent MD-1100 ESI / APCI LC / MS dan Monash University, Melbourne, menggunakan Bruker-FTMS LC-MS/MS 4.7T.

### Metodologi

#### Sintesis Hapten

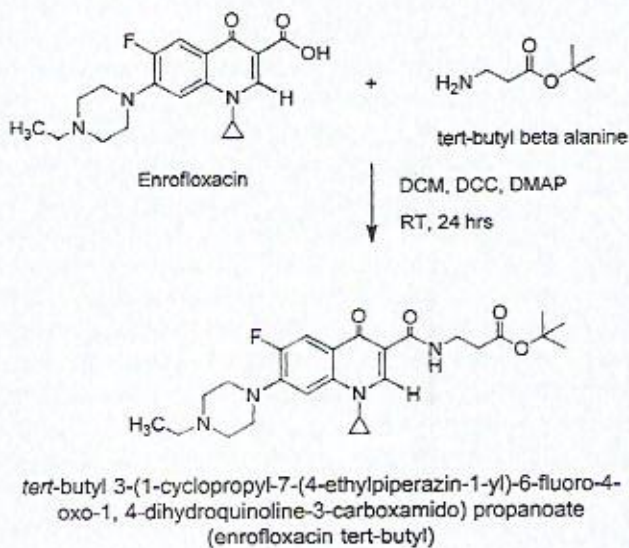
Enrofloksasin dikonjugasi dengan sebuah linker dari tert-butil  $\alpha$ -alanin melalui gugus karboksilat dari enrofloksasin untuk memberikan hapten enrofloksasin tert-butil (skema 1). Selanjutnya gugus tert-butil dilepas dengan asam trifluoroasetat (TFA) untuk menghasilkan hapten enrofloksasin asam (skema 2) tanpa pemurnian lebih lanjut.

### Prosedur sintesis hapten enrofloksasin tert-butyl, skema 1

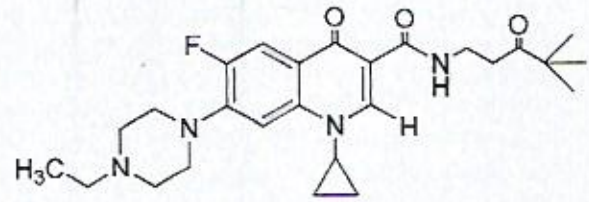
Enrofloksasin (500 mg, 1,39 mmol) dilarutkan dalam diklorometana, DCM (20 mL) dan didinginkan dalam *ice bath* selama 15 menit. *Dicyclohexylcarbodiimide*, (DCC, 574 mg, 2,78 mmol) dan *dimethylaminopyridine*, (DMAP, 20 mg) ditambahkan dan campuran diaduk selama 15 menit. Tert-butyl  $\alpha$ -alanine (404 mg, 2,78 mmol) kemudian ditambahkan dalam campuran diaduk semalaman pada suhu kamar. Endapan putih *dicyclohexylurea by product* disaring melalui *celite*. Campuran dimurnikan dengan kolom gravitasi menggunakan alumina netral dan etil asetat sebagai pelarut dan fraksi elusi diuapkan sampai kering dengan vakum, dan memberikan senyawa putih. Produk (senyawa 1) dikonfirmasi dengan KLT,  $R_f = 0,45$  (etil asetat). Konfirmasi melalui  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  dan LC-MS menunjukkan terbentuknya enrofloksasin tert-butyl.

### Prosedur sintesis hapten enrofloksasin asam, skema 2

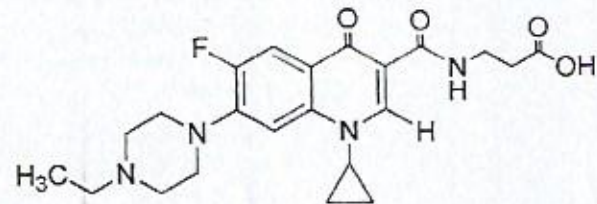
Enrofloksasin tert-butyl ditambahkan asam trifluoroasetat, TFA (1 ml) diaduk pada suhu kamar selama 30 menit. Kelebihan residu TFA kemudian dikeringkan di bawah vakum untuk memberikan enrofloksasin asam tanpa tahapan pemurnian lebih lanjut. Enrofloksasin asam dikonfirmasi dengan KLT dengan nilai  $R_f = 0,13$  menggunakan eluen etil asetat. Konfirmasi lebih lanjut menggunakan  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{H-NMR}$  dan LC-MS menunjukkan keberhasilan sintesis enrofloksasin asam.



Skema 1. Sintesis hapten enrofloksasin tert-butyl



1-cyclopropyl-N-(4,4-dimethyl-3-oxopentyl)-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide (enrofloxacin tert-butyl)



3-(1-cyclopropyl-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamido)propanoic acid (enrofloxacin acid)

Skema 2. Sintesis hapten enrofloksasin asam

### Prosedur konjugasi enrofloksasin dengan protein

Metode konjugasi yang digunakan adalah metode *carbodiimide* dengan *N-hydroxysuccinimide* (NHS). Caranya ENR dilarutkan dalam DMF, kemudian DCC dan NHS ditambahkan dalam campuran, diaduk dalam suhu kamar selama 24 jam. Larutan campuran ENR selanjutnya diteteskan sedikit demi sedikit di dalam larutan protein (ovalbumin dan KLH) dan dibiarkan semalaman pada suhu 4°C. Larutan konjugasi ENR-protein didialisis menggunakan larutan dapar fosfat.

### Produksi antibodi (imunisasi)

Imunogen disiapkan dengan mengemulsikan larutan konjugasi ENR-protein dengan NaCl 0,9 % (*saline*) dan *complete Freund adjuvant*. 1 (satu) ekor kelinci putih strain Selandia Baru diimunisasi dengan menyuntikan 1 mL imunogen secara subkutan. Imunisasi berikutnya (*booster*) dilakukan tiap bulan. Selanjutnya darah diambil (*bleeding*) dari vena telinga marginal 7 sampai 14 hari setelah dilakukannya *booster*. Serum diambil dan dipisahkan dengan cara sentrifugasi.

### Pengembangan metode ELISA

Konsentrasi optimal antigen enrofloksasin terkonjugasi ovalbumin (ENR-OA) dan antiserum dipilih melalui uji titrasi *checkboxboard*, yang dilakukan dengan menggunakan antigen yang diencerkan dengan *coating buffer* (larutan dapar karbonat, pH 9,6) pada pengenceran yang bervariasi dan antiserum diencerkan dengan larutan dapar fosfat (PBS 50 mm berisi 1% *fish gelatin* / FG). Prosedur untuk pengembangan ELISA sebagai berikut: setiap lubang *plate* dilapisi 100  $\mu\text{L}$  larutan 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  antigen ENR-OA dalam larutan dapar karbonat (pH 9.6) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar 25°C. *Plate* dicuci 3 (tiga) kali dengan air deionisasi dan dikeringkan pada handuk atau kertas penyerap. Kemudian setiap lubang *plate* diblok dengan 200  $\mu\text{L}$  larutan susu skim 3% dan diinkubasi selama 2 (dua) jam pada suhu kamar. *Plate* dicuci kembali tiga kali dengan air deionisasi dan dikeringkan. Selanjutnya *plate* diisi dengan 100  $\mu\text{L}$  larutan antiserum (1:10.000) yang telah diencerkan dengan 1% *fish gelatin*-PBS. Setelah *plate* diinkubasi selama 1 (satu) jam dan dicuci, 100  $\mu\text{L}$  larutan *anti-rabbit IgG-HRP conjugate* (1:2000 dalam 1% FG/PBS-0.05% Tween) ditambahkan ke dalam tiap lubang *plate*. *Plate* diinkubasi selama 1 (satu) jam pada suhu kamar dan dicuci. Selanjutnya 100  $\mu\text{L}$  larutan substrat (1.25 mM 3,3',5',5'-*tetramethylbenzidine* [TMB] dalam buffer asetat pH 5,0 yang mengandung peroksida hidrogen urea) diisikan ke dalam *plate* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 50  $\mu\text{L}$  *stop solution* (1.25 M asam sulfat). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dan 650 nm.

### Pembuatan standar kurva

Kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan larutan standar enrofloksasin dengan konsentrasi 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 dan 0,1  $\text{ng L}^{-1}$  dalam *buffer assay* (50 mM NaOH 0,5% dalam PBS pH 7,4) dan dilakukan dengan metoda ELISA seperti yang telah dijelaskan sebelumnya.

### Efek senyawa kimia terhadap kinerja ELISA

Kinerja ELISA dapat dipengaruhi oleh surfaktan, pelarut organik, pH, matriks sampel atau larutan garam (11). Efek dari variabel tersebut diuji dengan menganalisis perubahan dalam absorbansi maksimum ( $A_{\text{max}}$ ) dan  $IC_{50}$  dari suatu kurva standar dalam media dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu Tween 20 (1% FG-PBS + 0,05% Tween 20 dan 1% FG-PBS + 0,1% Tween 20), pelarut organik (5, 10 dan 20% dari metanol, etanol aseton, dan asetonitril) dan berbagai nilai pH antara 5,5 dan 9,6.

### Persiapan sampel hati ayam, susu dan udang

Sampel hati ayam, udang dan susu sampel diperoleh dari berbagai pasar dan supermarket. Secara singkat, hati ayam dan sampel udang yang diekstraksi dalam 20 ml larutan dapar pengestraksi (10% NaOH 50 mm dalam PBS, pH 7,4) dalam *shaker water-bath* pada 40°C selama 15 menit dan diikuti dengan setrifugasi pada 4.500 rpm selama 10 menit. Supernatan dikumpulkan dan pelet diekstraksi kembali. Supernatant dan blanko dikontaminasikan (*spiked*) dengan enrofloksasin untuk analisis efek matriks pengganggu. Sedangkan sampel susu dipanaskan pada suhu 80° C selama 5 (lima) menit dan diencerkan sebanyak 5, 10 dan 20 kali dengan PBS, kemudian disentrifugasi pada 4500 rpm selama 10 menit.

### Spiking dan perolehan kembali (*recovery*)

Perolehan kembali ditentukan oleh *spiking* enrofloksasin ke sampel hati ayam, udang dan susu dengan konsentrasi 5, 10, 20 dan 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

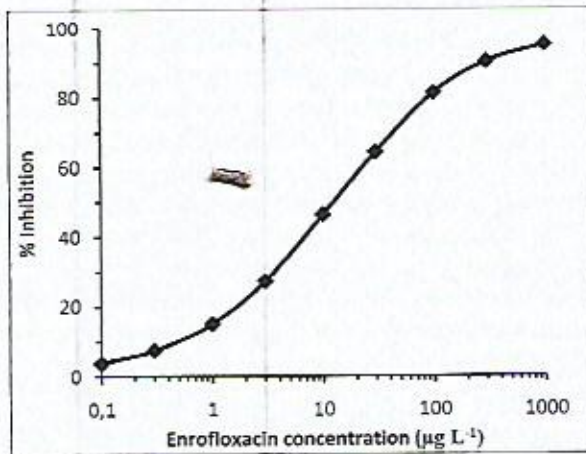
### Sintesis hapten

Senyawa dengan berat molekul (BM) kurang dari 5.000 (5 kDa) tidak dapat menimbulkan respon imun terhadap hewan. Untuk merangsang respon imun hewan agar dapat menghasilkan antibodi anti-enrofloksasin maka enrofloksasin harus terkonjugasi dengan protein pembawa, seperti BSA, OA atau KLH.

Immunogen dan antigen disiapkan dengan mengkonjugasikan gugus karboksilat dari enrofloksasin dengan kelompok amino dari protein pembawa menggunakan metode *carbodiimide*. Metode ini membantu agar antibodi memiliki pengenalan yang lebih baik terhadap target molekul tertentu yang berguna untuk meningkatkan spesifisitas antibodi.

### Karakterisasi antibodi

Antiserum pada *bleeding* pertama menunjukkan titer yang lebih tinggi (10.000) dan menghasilkan antibodi lebih spesifik daripada *bleeding* selanjutnya dan kemudian dipilih untuk karakterisasi lebih lanjut dalam metode kompetitif ELISA tidak langsung (*indirect competitive ELISA*). Sensitivitas diperiksa dengan membuat kurva standar enrofloksasin menggunakan konsentrasi antigen dan antiserum yang telah dioptimalkan (Gambar 2).



Gambar 2. Kurva inhibisi standar dari *indirect competitive* ELISA terhadap enrofloksasin (rata-rata dari 25 analisis) menggunakan optimasi antiserum anti-enrofloksasin dan antigen enrofloksasin dengan nilai  $IC_{50}$  adalah  $11.8 \mu\text{g L}^{-1} \pm 1.7$  dan batas deteksi (LOD) adalah  $2.4 \mu\text{g L}^{-1} \pm 0.4$ , ± menyatakan *standard deviation* (SD)

Untuk menentukan spesifisitas antibodi, studi *cross reactivity* dilakukan dengan menambahkan berbagai pesaing (*competitor*) bebas atau tujuh FQ lainnya pada konsentrasi yang berbeda  $0,1-1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Reaktivitas silang (*cross reactivity*) diukur dengan perbandingan  $IC_{50}$  dari tiap kompetitor (tujuh FQ lainnya) dengan enrofloksasin (Tabel 1). Seperti ditunjukkan pada Tabel 1, nilai reaksi silang sangat kecil yang diamati untuk senyawa uji menunjukkan anti-enrofloksasin antibodi sangat spesifik untuk enrofloksasin (target analit). Nilai *cross reactivity* yang sangat kecil ini disebabkan karena enrofloksasin memiliki struktur kimia yang sangat berbeda dari beberapa kompetitornya seperti danafloksasin, sarafloksasin dan asam nalidiksik.

Tabel 1.  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dan reaksi silang (% CR) enrofloksasin terhadap senyawa FQ lainnya

Senyawa-senyawa FQ	Struktur Kimia FQ	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Reaksi Silang (%)
Enrofloksasin (ENR)		27.13	100
Danofloksasin (DAN)		>1000	0.1
Enoksasin (ENO)		>1000	<0.1
Sarafloksasin (SAR)		>1000	<0.1
Pefloksasin (PEF)		>1000	1.3
Asam nalidiksik Nalidixic Acid (NAL)		>1000	<0.1
Siprofloksasin (CIP)		>1000	<0.1
Norfloksasin (NOR)		>1000	<0.1

**Efek kimia terhadap kinerja ELISA**

**Efek diluen**

Tween20 adalah surfaktan non-ionik yang biasanya ditambahkan ke *assay buffer* untuk meminimalkan *non-specific binding* dalam ELISA (9). Seperti dapat dilihat pada Tabel 2, diluen tidak berdampak signifikan pada kinerja pengujian baik sensitifitas antibodi maupun pembentukan warna ( $A_{max}$ ). Ketika PBS digunakan sendiri sebagai diluen tanpa menambahkan 1% FG dan Tween 20,

nilai  $IC_{50}$  meningkat sekitar dua kali lipat dan nilai  $A_{max}$  berkurang hampir 50% dibandingkan dengan diluen lainnya (1% FG-PBS + 0.05% Tween 20, 1% FG-PBS + 0.1% Tween 20 dan control (1% FG-PBS) . Ditemukan bahwa Tween 20 sangat mempengaruhi pembentukan warna, dengan berkurangnya 0,2 hingga 0,3 unit absorbansi (AU) terhadap nilai  $A_{max}$ . Namun, tidak ada perbedaan pada nilai  $IC_{50}$  dari diluen dengan dan tanpa Tween20.

**Tabel 2. Efek diluen terhadap sensitivitas antibodi dan absorban maksimum menggunakan PBS sebagai kontrol. Nilai-nilai tersebut diperoleh dari tiga kali pengulangan (triplikate, n=3), dengan standar deviasi (SD)**

Diluen Uji	PBS ± SD (n = 3)	1% FG-PBS ± SD (n = 3)	1% FG-PBS + 0.05% Tween20 ± SD (n = 3)	1% FG-PBS + 0.1% Tween20 ± SD (n = 3)
$A_{max}$	0.8 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.2
$IC_{50}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	20.7 ± 1.5	10.2 ± 1.7	11.5 ± 1.8	13.5 ± 1.5

**Pengaruh pelarut organik**

Efek dari pelarut organik (metanol, etanol, aseton dan asetonitril) antara 0% dan 20% dalam PBS pada ELISA ditunjukkan pada Tabel 3. Metanol dan asetonitril menunjukkan efek yang minimal terhadap kinerja pengujian dibanding dengan etanol dan asetonitril. Nilai  $IC_{50}$  bertambah dari 13,1 menjadi 22,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  jika konsentrasi metanol meningkat dari 5% sampai 20%.

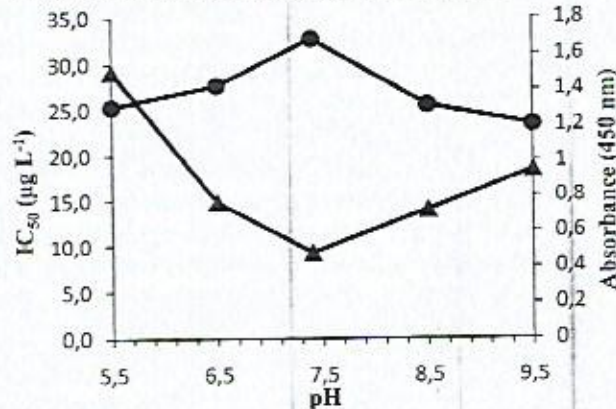
Sebaliknya, nilai  $IC_{50}$  menurun secara bertahap 26,3-18,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  apabila konsentrasi asetonitril meningkat dari 5% sampai 20%. Sementara itu, nilai  $IC_{50}$  meningkat secara dramatis lebih dari sepuluh kali ketika etanol atau aseton digunakan sebagai larutan uji. Efek pada pembentukan warna diamati ketika metanol lebih besar dari 5%. Metanol dan asetonitril tidak mempengaruhi kinerja uji secara nyata dan masih mampu mempertahankan sensitifitas pengujian.

**Tabel 3. Efek pelarut organik terhadap sensitifitas dan absorban maksimum ( $A_{max}$ ) menggunakan PBS sebagai kontrol. Nilai diperoleh dari tiga kali pengulangan (triplikate, n = 3) dengan standar deviasi (SD)**

Kons. pelarut (%v/v)	Methanol ± SD (n = 3)		Acetonitrile ± SD (n = 3)		Acetone ± SD (n = 3)		Ethanol ± SD (n = 3)	
	$A_{max}$	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$A_{max}$	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$A_{max}$	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$A_{max}$	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
0% (PBS)	1.4 ± 0.1	12.7 ± 1.8	1.5 ± 0.2	11.0 ± 1.5	1.5 ± 0.2	11.1 ± 1.7	1.4 ± 0.2	14.7 ± 2.0
5%	1.6 ± 0.2	13.1 ± 1.9	0.9 ± 0.1	26.3 ± 2.0	1.0 ± 0.1	107.8 ± 1.9	0.9 ± 0.2	79.7 ± 2.2
10%	1.6 ± 0.1	16.5 ± 2.1	1.0 ± 0.1	19.2 ± 1.7	1.1 ± 0.2	126.5 ± 2.1	1.0 ± 0.2	104.7 ± 1.9
20%	1.9 ± 0.1	22.4 ± 1.8	1.1 ± 0.1	18.9 ± 1.8	1.3 ± 0.2	157.1 ± 1.7	1.2 ± 0.1	128.9 ± 1.7

### Efek pH

Gambar 3. memperlihatkan efek pH terhadap kinerja uji. Tidak ada perubahan yang signifikan terhadap nilai  $IC_{50}$  pada pH 6,5 sampai 8,5. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian stabil dalam kisaran pH tersebut. Pada pH 5,5 dan 9,5, nilai  $IC_{50}$  meningkat masing 3 dan 2 kali lipat. Pada pembentukan warna ( $A_{max}$ ) menurun pada pH di atas dan di bawah 7,5. pH optimum untuk pengujian ini adalah 7,5 dan digunakan untuk pengujian selanjutnya.



Gambar 3. Efek pH pada kinerja ELISA. Garis dengan titik lingkaran menunjukkan absorbansi dan garis dengan segitiga menunjukkan  $IC_{50}$  terhadap pH. Nilai-nilai tersebut diperoleh dari tiga kali pengulangan (triplikat,  $n = 3$ ) dengan standar deviasi (SD)

### Matriks pengganggu

#### Efek matriks dalam susu

Efek matriks dalam sampel dapat mempengaruhi sensitivitas uji serta pembentukan warna. Sampel susu (cairan) diencerkan dengan PBS dalam faktor pengenceran yang berbeda (1:5, 1:10, dan 1:20), diikuti dengan pemanasan dalam *water-bath* pada suhu 80°C selama 5 (lima) menit. Sementara itu, sampel ayam hati dan udang (padatan) diekstraksi tiga kali (50 mL Volume total) dengan pelarut ekstraksi (5 mM NaOH: metanol: PBS = 1:9:90) dalam *shaker water-bath* pada suhu 40°C selama 15 menit.

Efek matriks diuji dengan menggunakan seri pengenceran enrofloksasin pada semua sampel yang diekstraksi atau diencerkan dan membandingkan hasilnya dengan yang diperoleh dalam pendapar PBS sebagai kontrol. Matriks pengganggu dievaluasi dengan membandingkan absorbansi maksimum ( $A_{max}$ ) dan sensitivitas ( $IC_{50}$ ) sebagai indikator ikatan antara antigen-antibodi.

Tabel 4. Efek matriks di dalam sampel susu, hati ayam dan udang dalam pengenceran yang berbeda terhadap sensitivitas dan pembentukan warna ( $A_{max}$ ). Nilai-nilai tersebut diperoleh dari tiga kali pengulangan (triplikat,  $n = 3$ ) dengan standar deviasi (SD)

Faktor pengenceran (in PBS)	Susu ± SD (n=3)		Faktor pengenceran (in PBS)	Hati ayam ± SD (n=3)		Udang ± SD (n=3)	
	$A_{max}$	$IC_{50}$ (µg L <sup>-1</sup> )		$A_{max}$	$IC_{50}$ (µg L <sup>-1</sup> )	$A_{max}$	$IC_{50}$ (µg L <sup>-1</sup> )
1:5	1.40 ± 0.1	19 ± 2.1	1:20	1.8 ± 0.1	23 ± 1.8	2.2 ± 0.2	27 ± 2.1
1:10	1.53 ± 0.2	16 ± 2.8	1:50	1.2 ± 0.2	13 ± 1.9	1.9 ± 0.1	14 ± 2.0
1:20	1.64 ± 0.1	11 ± 2.5	Larutan pengestraksi	1.5 ± 0.1	14 ± 1.9	1.9 ± 0.1	14 ± 2.2
PBS	1.62 ± 0.1	10 ± 1.2	PBS	1.5 ± 0.1	11 ± 2.0	1.8 ± 0.1	12 ± 1.9

Seperti ditunjukkan pada Tabel 4, ketika faktor pengenceran pada sampel susu meningkat dari 1:5 ke 1:20, absorbansi dan sensitivitas secara bertahap mendekati absorbansi PBS, ini menunjukkan bahwa semakin besar faktor pengenceran semakin kecil matriks pengganggu. Oleh karena itu pengenceran 1:20 merupakan faktor pengenceran yang ideal untuk melakukan tahap analisis matriks pengganggu lebih lanjut.

#### Efek matriks dalam hati ayam dan udang

Pada Tabel 4, sampel yang dilarutkan dalam 20 kali terhadap PBS menghambat interaksi ikatan antara antigen-antibodi, sehingga mempengaruhi nilai  $IC_{50}$  (sensitivitas) menurun menjadi sekitar dua kali lipat dibandingkan dengan PBS. Sementara itu, pengenceran 50 kali terlihat jelas menghilangkan efek matriks pengganggu di dalam sampel hati ayam dan udang, menghasilkan sensitivitas uji yang lebih baik yaitu 13 dan 14  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Pada pembentukan warna ditemukan bahwa pengenceran 50 kali lipat tidak mengubah  $A_{max}$  secara nyata. Ini menunjukkan bahwa pengenceran 50 kali sudah cukup untuk menghilangkan gangguan dalam matriks. Campuran 50 mm natrium hidroksida, metanol, PBS (1:9:90) digunakan sebagai larutan pengestraksi dan pengenceran 50 kali lipat kemudian digunakan untuk analisis perolehan kembali.

#### Analisis perolehan kembali (*recovery study*)

Enrofloksasin dikontaminasikan (*spiked*) ke dalam dapar PBS, larutan pengestraksi dan sampel susu, masing-masing dengan konsentrasi 50, 100, 200 dan 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , dan juga pada sampel hati ayam dan udang dengan konsentrasi 250, 500, 1000 dan 2500  $\mu\text{g L}^{-1}$  seperti yang terlihat pada Tabel 5, batas maksimum residu (BMR) FQ dalam pangan adalah dikisaran antara 50 dan 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

<sup>1</sup> (6). Khusus untuk enrofloksasin dan metabolitnya, BMR antara 100 dan 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pada bagian hewan yang dapat dimakan (*animal edible tissues*), *seafood*, dan susu. Konsentrasi akhir enrofloksasin dalam sampel setelah pengenceran (10 kali lipat dalam susu dan 50 kali lipat dalam hati ayam dan sampel udang) adalah 5, 10, 20 dan 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabel 5 menggambarkan persen perolehan kembali (% *Recovery*) dengan nilai berkisar antara  $64 \pm 3\%$  dan  $125 \pm 8\%$ . Secara keseluruhan, % perolehan kembali adalah baik terhadap semua sampel. Memperpanjang proses pemanasan dan sentrifugasi sampel sebelum analisis lebih lanjut membantu mengurangi gangguan matriks dalam sampel.

**Tabel 5. % Perolehan kembali (% *Recovery*) enrofloksasin yang di *spiked* dalam sampel dan PBS sebagai kontrol. Nilai-nilai tersebut diperoleh tiga kali pengulangan (triplikat,  $n = 3$ ) dengan standar deviasi (SD)**

Sampel	Konsentrasi <i>Spiking</i> enrofloksasin ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Konsentrasi yang terdeteksi ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) $\pm$ SD ( $n=3$ )		<i>Recovery</i> (%) $\pm$ SD ( $n=3$ )	
		Dalam PBS	Dalam sampel yang diencerkan	Dalam PBS	Dalam sampel yang diencerkan
Susu	50	54.4 $\pm$ 4.2	59.7 $\pm$ 4.2	109 $\pm$ 8	119 $\pm$ 8
	100	122.9 $\pm$ 8.2	125.1 $\pm$ 8.3	123 $\pm$ 8	125 $\pm$ 8
	250	201.8 $\pm$ 8.8	204.5 $\pm$ 8.8	101 $\pm$ 4	102 $\pm$ 4
	500	445.1 $\pm$ 30.6	462.7 $\pm$ 33.9	89 $\pm$ 6	93 $\pm$ 7
Hati ayam	250	288.2 $\pm$ 14.6	216.4 $\pm$ 17.9	115 $\pm$ 9	87 $\pm$ 10
	500	370.3 $\pm$ 27.6	321.9 $\pm$ 36.3	74 $\pm$ 9	64 $\pm$ 12
	1000	1173.6 $\pm$ 107.8	1057.8 $\pm$ 77.1	117 $\pm$ 9	106 $\pm$ 7
	2500	1847.5 $\pm$ 154.3	1521.0 $\pm$ 245.4	74 $\pm$ 6	61 $\pm$ 5
Udang	250	166.7 $\pm$ 15.4	185.1 $\pm$ 20.2	67 $\pm$ 6	74 $\pm$ 8
	500	330.8 $\pm$ 12.9	416.9 $\pm$ 19.4	66 $\pm$ 3	83 $\pm$ 4
	1000	643.7 $\pm$ 30.1	812.2 $\pm$ 33.9	64 $\pm$ 3	81 $\pm$ 3
	2500	1693.5 $\pm$ 158.0	2106.3 $\pm$ 189.9	68 $\pm$ 6	84 $\pm$ 8

## KESIMPULAN

Metode kompetitif ELISA tidak langsung (*indirect competitive ELISA*) dikembangkan untuk mendeteksi enrofloksasin dalam sampel susu, hati ayam dan udang dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $11,8 \pm 1,7 \mu\text{g L}^{-1}$  dan nilai LOD dari  $2,4 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ . Metode ELISA yang dikembangkan ini sangat spesifik untuk mendeteksi enrofloksasin tanpa menyebabkan *cross reaction* yang bermakna terhadap senyawa FQ lainnya. Tween 20 mempengaruhi pembentukan warna cukup nyata, namun tidak mempengaruhi sensitifitas pengujian, 5% metanol dapat digunakan tanpa mempengaruhi sensitifitas uji. Tidak ada perubahan signifikan terhadap nilai-nilai  $IC_{50}$  yang diamati

pada pH 6,5-8,5 dan pH optimum pengujian adalah netral (pH 7,4). Teknik persiapan sampel dioptimasi untuk susu, hati ayam dan udang, menghasilkan nilai perolehan kembali (% *Recovery*) yang baik antara  $64 \pm 3\%$  dan  $125 \pm 8\%$ . Metode ELISA ini dapat diadopsi untuk skrining rutin residu enrofloksasin pada produk hewani dan makanan hasil laut. Studi ini juga membantu untuk memastikan makanan yang aman dan sehat bagi publik dan meningkatkan kapasitas perdagangan dan pertumbuhan ekonomi Indonesia.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada *Australian Development Scholarships (ADS)-AusAID* untuk beasiswa dan pendanaan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim, 2010. Indeks Obat Hewan Indonesia (IOHI), Edisi VI, Direktorat Jenderal Peternakan – Departemen Pertanian RI dengan Asosiasi Obat Hewan Indonesia. ASOHI. Jakarta.
2. Bogialli, S., D'ascenzo, G., Corcia, A. D., Lagana, A. & Nicolardi, S. 2008. A Simple and Rapid Assay Based on Hot Water Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Monitoring Quinolone Residue in Bovine Milk. *Food Chemistry* 180, 354-360.
3. Brás Gomes, F. B. M., Riedstra, S. & Ferreira, J. P. M. 2010. Development Of an Immunoassay for Ciprofloxacin Based on Phage-Displayed Antibody Fragments. *Journal of Immunological Methods*, 358, 17-22.
4. Brown, S. A. 1996. Fluoroquinolones in Animal Health. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*, 19.
5. Dufresne, G., Fouquet, A., Forsyth, D. & Tittlemier, S. A. 2007. Multiresidue Determination of Quinolone and Fluoroquinolone Antibiotics in Fish and Shrimp by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal Of Aoac International*, 90, 604-612.

6. **Espinosa-Mansilla, A., De La Pena, A. M., Gomez, D. G. & Lopez, F. S.** 2006. Determination of Fluoroquinolones in Urine and Serum by Using High Performance Liquid Chromatography and Multiemission Scan Fluorimetric Detection. *Journal Of Talanta* 68, 1215-1221.
7. **Hernandez-Artaseros, J. A., Barbosa, J., Compano, R. & Prat, M. D.** 2002. Analysis of Quinolone Residues in Edible Animal Products, *Journal Of Chromatography*, 945, 1-24.
8. **Huet, A. C., Charlier, C., Tittlemier, S., Singh, G., Benrejeb, S. & Delahaut, P.** 2006. Simultaneous Determination of (Fluoro)Quinolone Antibiotics In Kidney, Marine Products, Eggs, and Muscle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa). *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 54, 2822-2827
9. **Hung, S.** 2007. New Detection Technique for Fluoroquinolone-Conjugated Proteins by High Performance Liquid Chromatography with UV/Fluorescence Detectors. *Journal of Food And Drug Analysis*, 15, 71-74.
10. **Lee, N. A. & Kennedy, I. R.** 2007. *Immunoassay, Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Development.* Elsevier, Valencia, Spain.
11. **Pena, A., Silva, L. J. G., Pereira, A., Meisel, L. & Lino, C. M.** 2010. Determination of Fluoroquinolone Residues In Poultry Muscle In Portugal. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 397, 2615-2621.
12. **Sheng, W., Xua, T., Maa, H., Wanga, X., Li, Q. & Li, J.** 2009. Development of An Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Danofloxacin Residues in Beef, Chicken and Pork Meats. *Journal of Food And Agricultural Immunology*, 20, 35-47.
13. **Zhao, S., Li, X., Ra, Y., Li, C., Jiang, H., Li, J., Qu, Z., Zhang, S., He, F., Wan, Y., Feng, C., Zheng, Z. & Shen, J.** 2009. Developing and Optimizing An Immunoaffinity Cleanup Technique for Determination of Quinolones from Chicken Muscle. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 57, 365-371.