

PENGEMBANGAN METODE ELISA SPESIFIK TERHADAP RESIDU ANTIBIOTIK ENROFLOKSASIN DALAM SUSU

MUHAMMAD ZAHID^{1,2}, N. ALICELEE², NARESHKUMAR³, GEORGE ISKANDER³

¹Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur, Bogor 16340, Indonesia,

²School of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia

³School of Chemistry, Faculty of Science, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia

ABSTRAK

Penggunaan antibiotik enrofloksasin (ENR) secara terus menerus, tidak terkendali dan tidak mematuhi waktu henti obat pada peternakan akan berdampak adanya residu ENR dalam produk makanan dan terbentuknya resistensi bakteri terhadap ENR pada hewan dan bahkan pada manusia. Hal ini akan mempengaruhi kesehatan manusia, khususnya pengobatan terhadap penyakit infeksi. Untuk mendeteksi residu ENR di dalam susu, spesifik poliklonal antibodi ENR diproduksi pada kelinci putih *New Zealand* dan digunakan untuk mengembangkan metode ELISA kompetisi tidak langsung (*indirect competitive ELISA*). Hapten ENR disintesis dengan mereaksikan suatu *linker* tert-butyl dengan kelompok asam karboksilat dari ENR dan mengkonjugasinya dengan protein KLH (*keyholelimpethemocyanin*). Metode ELISA menunjukkan sensitifitas 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 fluoroquinolone (FQ) tanpa secara signifikan menunjukkan reaksi silang (*cross reaction*) terhadap tujuh senyawa FQ struktural terkait (danofloksasin, enofloksasin, sarafloksasin, perfloksasin, asam nalidiksik, 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 pengujian. Teknik persiapan untuk sampel susu juga dioptimalkan dengan menghasilkan nilai perolehan kembali (*recovery*) $61 \pm 9\%$ - $125 \pm 8\%$.

Kata kunci: residu, enrofloksasin, ELISA, susu

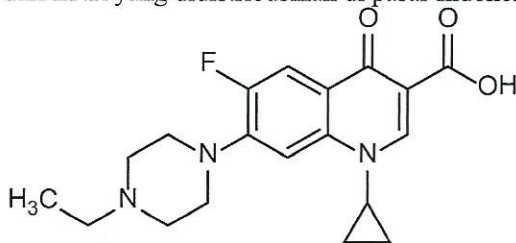
ABSTRACT

*The intensive, uncontrol utilisation and unfollow the withdrawal time of enrofloxacin (ENR) in livestock practices lead to the issue regarding the presence of ENR residues in food products and the development of ENR resistant bacteria in animals and human. This may have an implication to human health, in particular for the treatment of infection. To detect ENR residues in milk, ENR-specific polyclonal antibodies were raised in New Zealand white rabbits and applied to develop an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. A novel of ENR hapten was synthesised by attaching a tert-butyl linker on a carboxylic acid group of ENR and conjugated with KLH. 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 fluoroquinolone (FQ) 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 samples, yielding good recoveries between $61 \pm 9\%$ and $125 \pm 8\%$.*

Keywords: residue, enrofloxacin, ELISA, milk

PENDAHULUAN

Enrofloksasin (ENR) merupakan antibiotik sintetik dari kelompok fluoroquinolones (FQs) yang memiliki mekanisme menghambat enzim bakteri (DNA girase), dengan cara mengganggu reaksi bergabungnya DNA kembali ⁽⁴⁾. Antibiotik ini mempunyai spektrum mekanisme luas untuk pengobatan berbagai infeksi bakteri pada hewan, akan tetapi enrofloksasin tidak digunakan pada manusia. Saat ini ada sekitar 76 nama merek dagang dari ENR yang didistribusikan di pasar Indonesia⁽¹⁾.



Gambar1. Struktur kimia enrofloksasin

Pemberian ENR kepada hewan secara terus menerus dan 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 berkaitan dengan kesehatan masyarakat, terutama melalui peningkatan resiko kegagalan pengobatan ⁽⁷⁾. Sebagai contoh, enrofloksasin menyebabkan resistensi spesies *Campylobacter* terhadap FQs yang digunakan unggas maupun manusia ⁽¹¹⁾. Untuk meminimalisir resiko terpaparnya ENR ke manusia melalui makanan yang terkontaminasi residu dan untuk memantau residu ENR dalam produk asal hewan, khususnya produk susu, sangat penting untuk menentukan batas maksimum residu (BMR) atau *maximum residue limits (MRLs)* untuk ENR. Saat ini BMR untuk residu antibiotik golongan 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) adalah beberapa negara yang telah menentukan BMR untuk ENR, 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 ENR, 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 ⁽⁷⁾.

Metode analisis yang umum digunakan untuk mendeteksi residu obat hewan dalam produk makanan, antara lain adalah metode instrumentasi kimia maupun *bioassay*. Metode instrumen berbasis kimia, seperti Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)* telah banyak digunakan untuk skrining residu ENR karena akurasi dan sensitifitas yang baik. ^(2,5,6,10) Namun, metode ini memerlukan waktu yang lama, biaya operasional yang mahal, dan membutuhkan personal yang terlatih. Metode *immunochemical* yang merupakan bagian dari *bioassay* adalah sebuah metode alternatif yang cepat dan sensitif seperti halnya metode kimia berbasis instrumen, untuk skrining rutin terhadap ENR, 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. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas antibodi untuk mendeteksi residu ENR dalam produk hewani (susu) melalui desain dan sintesis hapten terbaru dan mengembangkan metode *immunochemical (ELISA)*. Selain itu, dengan meningkatkan pemantauan rutin terhadap residu ENR 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-hydroxysuccinimide (NHS)*, tert-butyl β -alanin, 4-di-(methylamino) piridin (DMAP),

N, N'-dimetilformamida (DMF) (Sigma Aldrich, Amerika Serikat), 1-etil-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hidroklorida (EDC) (Alfa Aesar, Amerika Serikat), bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OA), Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), dan horseradish peroksidase (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, Jerman), 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-D₆), deuteriokloroform (CD₃Cl) dan oksida deuterium (D₂O) (Cambridge Laboratorium Isotop Inc. Amerika Serikat).

Alat yang digunakan:

Konsentrasi antibodi dan absorbansi diukur dengan ELISA reader (SpectraMax[®] M2), multi-deteksi lempeng (Molecular Devices, Sunnyvale, California, AS). Maxisorp polistiren 96 (Dimittis, Denmark). Nilai Rate of Flow (R_f) mengacu pada KLT pada alumina atau silika gel 60 F₂₅₄ visualisasi di bawah sinar ultra violet (UV). Proton (¹H) dan karbon (¹³C) 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.

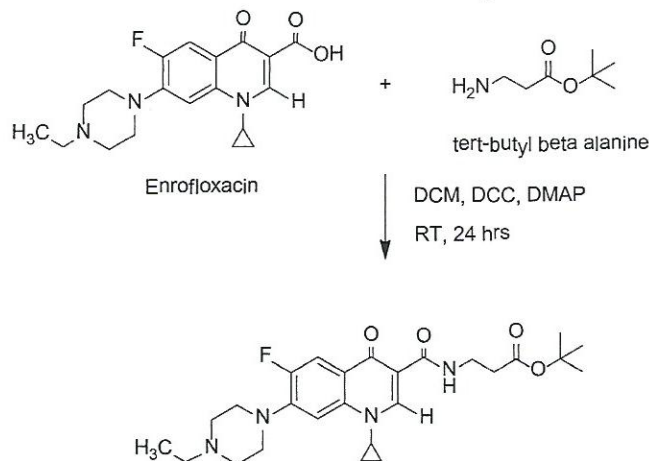
Metodologi

Sintesis Hapten

ENR dikonjugasi dengan sebuah linker dari tert-butyl β-alanin melalui gugus karboksilat dari ENR untuk memberikan hapten ENR tert-butyl (skema 1). Selanjutnya gugus tert-butyl dilepas dengan asam trifluoroasetat (TFA) untuk menghasilkan hapten ENR asam (skema 2) tanpa pemurnian lebih lanjut.

Prosedur sintesis hapten enrofloksasin tert-butyl, skema 1

ENR (500 mg) dilarutkan dalam diklorometana, DCM (20 mL) dan didinginkan dalam icebath selama 15 menit. Dicyclohexylcarbodiimide, (DCC, 574 mg) dan dimethylaminopyridine, (DMAP, 20 mg) ditambahkan dan campuran diaduk selama 15 menit. Tert-butyl β-alanine (404 mg) kemudian ditambahkan dalam campuran diaduk semalaman pada suhu kamar. Endapan putih dicyclohexylurea by product disaring melalui celite. Campuran dimurnikan dengan kolom gravitasi



tert-butyl 3-(1-cyclopropyl-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamido)propanoate (enrofloxacin tert-butyl)

Skema 1. Sintesis hapten enrofloksasin tert-butyl

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 ENR tert-butyl.

Prosedur sintesis hapten enrofloksasin asam, skema 2

ENR 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 ENR asam tanpa tahapan pemurnian lebih lanjut. ENR 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 ENR asam.

Prosedur konjugasi enrofloksasin dengan protein

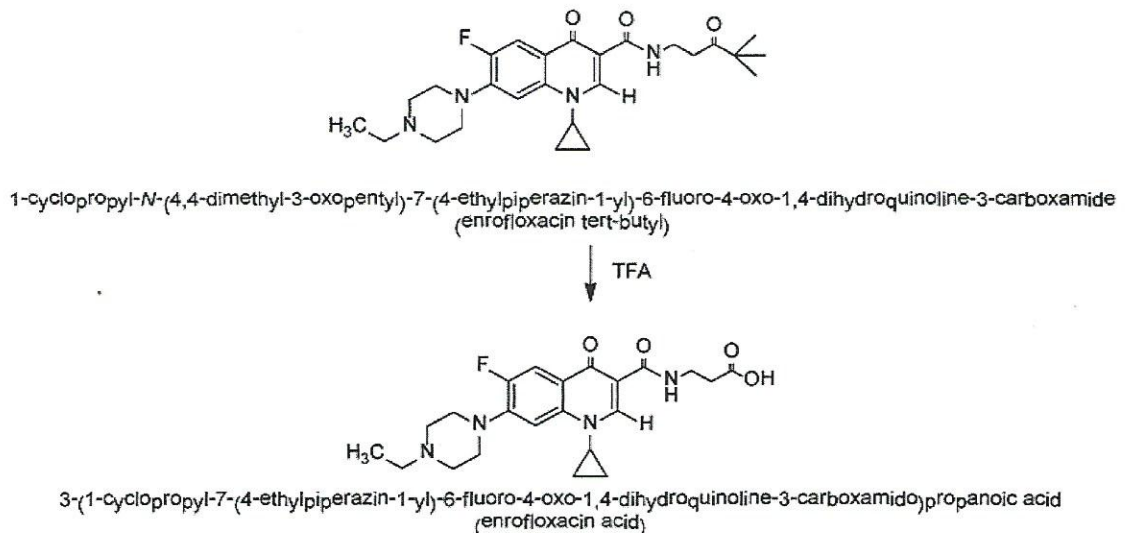
Metode konjugasi yang digunakan adalah metode *carbodiimide* dengan *N-hydroxysuccinimide* (NHS). Caranya ENR dilarutkan dalam DMF, kemudian DCC dan NHS ditambahkan dalam campuran, diaduk dalam suhu kamar selama 24 jam. Larutan campuran ENR selanjutnya diteteskan sedikit demi sedikit di dalam larutan 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 ENR 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 50mm berisi 1% *fish gelatin* / FG). Prosedur untuk pengembangan ELISA sebagai berikut: setiap lubang *plate* dilapisi 100 μL 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 μL larutan susu skim 3% dan dinkubasi selama 2 (dua) jam pada suhu kamar. *Plate* dicuci kembali tiga kali dengan air deionisasi dan dikeringkan. Selanjutnya *plate* diisi dengan 100 μL larutan antiserum (1:10.000) yang telah diencerkan dengan 1% *fish gelatin-PBS*.



Skema 2. Sintesis hapten enrofloksasin asam

Setelah *plate* diinkubasi selama 1 (satu) jam dan dicuci, 100 μL 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 μL larutan substrat (1,25mM 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 μL *stop solution* (1,25M asam sulfat). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dan 650 nm.

Pembuatan standar kurva

Kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan larutan standar ENR dengan konsentrasi 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 dan 0,1 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_{max}) dan IC_{50} dari suatu kurva standar dalam media dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu Tween20 (1% FG-PBS + 0,05% Tween20 dan 1% FG-PBS + 0,1% Tween20), pelarut organik (5, 10 dan 20% dari metanol, etanol aseton, dan asetonitril) dan berbagai nilai pH antara 5,5 dan 9,6.

Persiapan sampel susu

Sampel susu diperoleh dari berbagai pasar dan supermarket dengan berbagai macam sediaan, yaitu susu skim bubuk (SKB), susu skim cair (SKC), susu *full cream* bubuk (FCB) dan susu *full cream* cair (FCC). Secara singkat, 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* ENR ke sampel susu dengan konsentrasi 5, 10, 20 dan 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

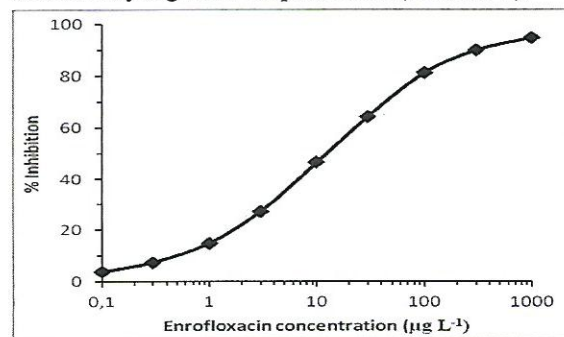
HASIL DAN PEMBAHASAN

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 mampu menghasilkan antibodi anti-ENR maka ENR harus terkonjugasi dengan protein pembawa, seperti BSA, OA atau KLH. Immunogen dan antigen disiapkan dengan mengkonjugasikan gugus karboksilat dari ENR 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 menunjuk 16 bih lanjut dalam metode kompetitif ELISA tidak langsung (*indirect competitive ELISA*). Sensitifitas diperiksa dengan menggunakan kurva standar ENR menggunakan konsentrasi antigen dan antiserum yang telah dioptimalkan (Gambar 2).



Gambar 2. Kurva inhibisi dari *indirect competitive ELISA* terhadap ENR (rata-rata dari 25 analisis) menggunakan optimasi antiserum anti-ENR dan antigen ENR dengan nilai IC_{50} adalah 11,8 $\mu\text{g L}^{-1} \pm 1,7$ dan batas deteksi (LOD) adalah 2,4 $\mu\text{g L}^{-1} \pm 0,4$. \pm menyatakan *standard deviation* (SD)

Untuk menentukan spesifisitas antibodi, studi *cross reactivity* dilakukan dengan menambahkan berbagai jenis pesaing bebas (*free competitor*) 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 ENR (Tabel 1). Seperti terlihat pada Tabel 1, reaksi silang memiliki nilai yang sangat kecil dari setiap senyawa FQ terhadap ENR, ini menunjukkan bahwa anti-ENR antibodi sangat spesifik untuk target analit (ENR). Nilai *cross reactivity* yang sangat kecil ini disebabkan karena enrofloksasin memiliki struktur kimia yang sangat berbeda dari beberapa kompetitornya seperti danofloksasin, 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 (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 sensitivitas antibodi maupun pembentukan warna (A_{max}). Ketika PBS digunakan sendiri sebagai diluen tanpa menambahkan 1% FG dan Tween20, 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 Tween20 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 absorbansi maksimum menggunakan PBS sebagai control. Nilai-nilai tersebut diperoleh dari tiga kali pengulangan (triplikat, n=3), dengan standar deviasi (SD)

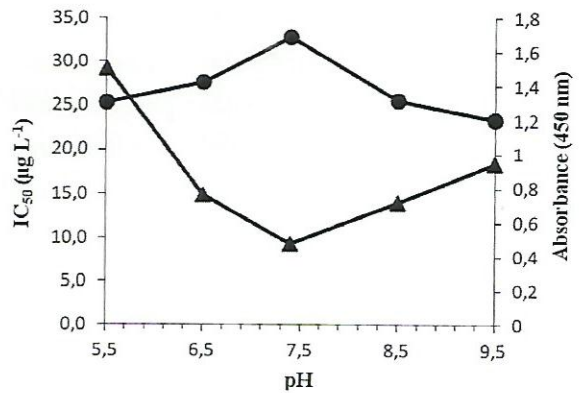
| Diluen Uji | PBS \pm SD (n = 3) | 1% FG-PBS \pm SD (n = 3) | 1% FG-PBS + 0.05% Tween20 \pm SD (n = 3) | 1% FG-PBS + 0.1% Tween20 \pm SD (n = 3) |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|--|---|
| A_{max} | 0.8 \pm 0.2 | 1.3 \pm 0.1 | 1.6 \pm 0.1 | 1.6 \pm 0.2 |
| IC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 20.7 \pm 1.5 | 10.2 \pm 1.7 | 11.5 \pm 1.8 | 13.5 \pm 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 aseton. Nilai IC_{50} bertambah dari 13,1 menjadi 22,4 $\mu g L^{-1}$ jika konsentrasi metanol meningkat dari 5% sampai 20%. Sebaliknya, nilai IC_{50} menurun secara bertahap 26,3 – 18,9 $\mu g L^{-1}$ apabila konsentrasi asetonitril meningkat dari 5% sampai 20%. Sementara itu, nilai IC_{50} meningkat secara nyata 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.

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 sensitifitas uji serta pembentukan warna. Sampel susu 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. Efek matriks diuji dengan menggunakan seri pengenceran ENR pada semua sampel yang diencerkan dan dibandingkan 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 3. Efek pelarut organik terhadap sensitifitas dan absorbansi maksimum (A_{max}) menggunakan PBS sebagai kontrol. Nilai diperoleh dari tiga kali pengulangan (triplikat, 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} ($\mu g L^{-1}$) | A_{max} | IC_{50} ($\mu g L^{-1}$) | A_{max} | IC_{50} ($\mu g L^{-1}$) | A_{max} | IC_{50} ($\mu g L^{-1}$) |
| 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 |

Tabel 4. Efek matrik di dalam sampel susu dengan pengenceran yang berbeda terhadap sensitifitas (IC_{50}) dan pembentukan warna (A_{max}). Nilai-nilai tersebut diperoleh dari tiga kali pengulangan (triplikat, $n = 3$) dengan standar deviasi (SD)

| Faktor Pengenceran (dalam PBS) | SKC | | SKB | | FCC | | FCB | |
|--------------------------------|------------------------|---------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| | $A_{max} \pm SD (n=3)$ | $IC_{50} (\mu g L^{-1}) \pm SD (n=3)$ | $A_{max} \pm SD (n=3)$ | $IC_{50} (\mu g L^{-1}) \pm SD (n=3)$ | $A_{max} \pm SD (n=3)$ | $IC_{50} (\mu g L^{-1}) \pm SD (n=3)$ | $A_{max} \pm SD (n=3)$ | $IC_{50} (\mu g L^{-1}) \pm SD (n=3)$ |
| 1:5 | 1.4± 0.04 | 19.3± 1.7 | 1.3± 0.04 | 14.2± 1.6 | 1.2± 0.04 | 19.3± 1.7 | 1.1± 0.04 | 18.8± 1.2 |
| 1:10 | 1.5± 0.01 | 12.6± 1.2 | 1.4± 0.01 | 12.4± 1.2 | 1.4± 0.01 | 13.9± 1.2 | 1.4± 0.01 | 12.9± 0.9 |
| 1:20 | 1.6± 0.04 | 12.7± 0.6 | 1.5± 0.04 | 9.0± 1.5 | 1.4± 0.04 | 12.7± 0.6 | 1.4± 0.04 | 12.4± 1.3 |
| PBS | 1.6± 0.01 | 11.7± 0.8 | 1.5± 0.01 | 10.3± 0.7 | 1.4± 0.01 | 11.7± 0.8 | 1.5± 0.01 | 10.7± 1.1 |

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

| Sampel Susu | Konsentrasi <i>Spiking</i> ($\mu g L^{-1}$) | Konsentrasi terdeteksi ($\mu g L^{-1} \pm SD (n=3)$) | | <i>Recovery</i> (%) $\pm SD (n=3)$ | |
|-----------------------------|---|--|------------------------|------------------------------------|------------------------|
| | | dalam PBS | sampel yang diencerkan | dalam PBS | Sampel yang diencerkan |
| Susu Skim Cair (SKC) | 50 | 54.4 ± 4.2 | 59.7 ± 4.2 | 109 ± 8 | 119 ± 8 |
| | 100 | 122.9 ± 8.2 | 125.1 ± 8.3 | 123 ± 8 | 125 ± 8 |
| | 200 | 201.8 ± 8.8 | 204.5 ± 8.8 | 101 ± 4 | 102 ± 4 |
| | 500 | 445.1 ± 30.6 | 462.7 ± 33.9 | 89 ± 6 | 93 ± 7 |
| Susu Skim Bubuk (SKB) | 50 | 55.9 ± 3.5 | 52.9 ± 2.9 | 112 ± 7 | 106 ± 6 |
| | 100 | 130.4 ± 7.3 | 124.0 ± 7.2 | 130 ± 7 | 124 ± 7 |
| | 200 | 225.6 ± 9.4 | 219.0 ± 9.5 | 113 ± 5 | 110 ± 5 |
| | 500 | 439.6 ± 26.7 | 494.8 ± 41.2 | 88 ± 5 | 99 ± 8 |
| Susu Full cream Cair (FCC) | 50 | 32.7 ± 2.0 | 34.0 ± 1.8 | 65 ± 4 | 68 ± 4 |
| | 100 | 79.8 ± 10.2 | 71.4 ± 7.6 | 80 ± 10 | 71 ± 8 |
| | 200 | 143.0 ± 8.0 | 137.7 ± 8.6 | 72 ± 4 | 69 ± 4 |
| | 500 | 541.2 ± 26.0 | 559.6 ± 25.4 | 108 ± 5 | 112 ± 5 |
| Susu Full cream Bubuk (FCB) | 50 | 39.7 ± 4.3 | 35.3 ± 3.6 | 79 ± 9 | 71 ± 7 |
| | 100 | 71.0 ± 5.2 | 60.7 ± 4.2 | 71 ± 11 | 61 ± 9 |
| | 200 | 140.4 ± 3.6 | 130.8 ± 3.4 | 70 ± 5 | 65 ± 4 |
| | 500 | 594.9 ± 20.5 | 577.4 ± 20.5 | 119 ± 8 | 116 ± 8 |

Seperti ditunjukkan pada Tabel 4, ketika faktor pengenceran pada sampel susu meningkat dari 1:5 ke 1:20, absorbansi dan sensitifitas 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.

Analisis perolehan kembali (*recovery study*)

ENR ditambahkan (*spiked*) ke dalam dapar PBS, sampel susu, masing-masing dengan konsentrasi 50, 100, 200 dan 500 $\mu g L^{-1}$ seperti yang terlihat pada Tabel 5, batas maksimum residu (BMR) FQ dalam pangan adalah dikisaran antara 50 dan 1000 $\mu g kg^{-1}$ (6). Khusus untuk enrofloxasin dan metabolitnya, BMR antara 100 dan 300 $\mu g kg^{-1}$ pada bagian hewan yang dapat dimakan (*animal*)

edible tissues), *seafood*, dan susu. Konsentrasi akhir ENR dalam sampel setelah pengenceran (10 kali lipat dalam susu) 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 susu.

KESIMPULAN

Metode kompetitif ELISA tidak langsung (*indirect competitive ELISA*) dikembangkan untuk mendeteksi ENR dalam sampel susu, dengan nilai IC_{50} sebesar $11,8 \pm 1,7 \mu\text{gL}^{-1}$ dan nilai LOD dari $2,4 \pm 0,4 \mu\text{gL}^{-1}$. Metode ELISA yang dikembangkan ini sangat spesifik untuk mendeteksi ENR tanpa menyebabkan *cross reaction* secara nyata terhadap senyawa FQ lainnya. Tween20 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, menghasilkan nilai perolehan kembali (% *Recovery*) yang baik antara $61 \pm 9\%$ dan $125 \pm 8\%$. Metode ELISA ini dapat diadopsi untuk skrining rutin residu ENR pada produk susu. 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 *AusAID* melalui *Australian Development Scholarships (ADS)* 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-Arteseros, 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.