

KONJUGASI ANHIDRAT KIORAMFENIKOL-PROTEIN (CAP-BSA DAN CAP-KLH) UNTUK PRODUKSI IgG DARI SERUM KELINCI

Musyirna Rahmah Nst¹⁾ Tri Budhi Murdiati ²⁾

1) Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau (STIFAR) 2)BALITVET BOGOR.

Abstrak

Dalam pengembangan metoda analisis residu antibiotik pada produk pangan hewani secara imunokimia telah dilakukan sintesis imunogen kloramfenikol (CAP) dengan protein *Bovine Serum Albumin* (BSA) dan *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) dengan metoda konjugasi *mixed anhidrad*. Hasil sintesis digunakan untuk produksi antibodi. Antigen dan antibodi yang dihasilkan dijadikan prangkat analisis residu antibiotik dengan *Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA kompetitif). Hasil penelitian menunjukkan bahwa metoda konjugasi *mixed anhidrad* pada preparasi imunogen dengan jumlah CAP yang terkonjugasi ke grup amino bebas dari molekul protein BSA (CAP-BSA) adalah 18 unit dan ke protein KLH (CAP-KLH) adalah 782 unit. Antibodi poliklonal CAP-BSA dan CAP-KLH yang diproduksi dengan rata-rata kandungan IgG CAP-BSA 2,07 mg/ml dan IgG CAP-KLH 2,21 mg/ml.

Kata kunci : CAP, imunogen, antibodi, metoda konjugasi *mixed anhidrad*

1. PENDAHULUAN

Residu antibiotika dalam produk peternakan telah ditemukan dan dilaporkan baik di Indonesia maupun di negara lain (Bahri *et al*, 1990., FAO, 1990., Komar *et al*, 1990., Salysbury *et al*, 1990). Kloramfenikol dilarang pemakaiannya pada ternak di banyak negara karena efek toksik yang ditimbulkannya yaitu aplastik anemia ketika kandungan kloramfenikol meningkat melebihi 25 µg/ml. Pemakaian antibiotika dalam bidang peternakan tidak dapat dihindarkan, karena antibiotika dalam bidang peternakan tidak hanya digunakan untuk pengobatan tetapi juga untuk pemacu pertumbuhan. Dalam usaha mencapai produksi semaksimal mungkin, antibiotika telah digunakan secara tidak tepat baik dalam memilih jenis antibiotika maupun dosis serta lama pemakaiannya (Sudarwanto, 1990., Murdiati dan Bahri, 1991). Tindakan tersebut telah memperluas peluang terdapatnya residu antibiotika dalam produk peternakan.

Walupun efek residu antibiotika tidak akan terlihat langsung akan tetapi konsumsi yang dilakukan secara terus menerus dalam dosis kecil akan membahayakan kesehatan manusia, seperti reaksi alergi, resistensi dan keracunan (Schlatter, 1990).

Analisis residu antibiotik dapat dilakukan secara kimia, mikrobiologi dan imunokimia. Analisis residu antibiotika dengan metoda imunokimia makin banyak mendapatkan perhatian. Umumnya ELISA (*Enzyme Link Immunosorbent Assay*) yang dikembangkan adalah ELISA kompetitif sedangkan teknik ELISA sandwich umumnya tidak digunakan untuk molekul kecil karena faktor halangan sterik (Haagsma and Water, 1992). Dixon dan Deborah pada 1992 telah melakukan pengembangan metoda ELISA untuk analisa antibiotik sulfonamida, β-laktam dan aminoglikosida. Kelebihan metoda ELISA adalah spesifik, sensitif, hemat, cepat dan mudah.

Hal yang perlu diperhatikan dalam pengembangan metoda ELISA untuk deteksi residu antibiotika ataupun cemaran kimia lainnya adalah bahwa umumnya residu antibiotik merupakan senyawa dengan berat molekul kecil yang biasa disebut hapten. Hapten bersifat tidak imunogen artinya tidak dapat menstimulasi terbentuknya antibodi (Szurdoki *et al.*, 1995). Oleh karena itu, antibiotika harus dibuat menjadi immunogenik secara konjugasi dengan enyawa yang mempunyai berat molekul yang besar umumnya protein.

Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan sintesa immunogen yaitu kloramfenikol-protein konjugat yaitu BSA dan KLH dengan metoda *konjugasi mixed anhidrat* dan produksi antibodi poliklonal untuk deteksi kloramfenikol.

2. METODOLOGI PENELITIAN

Sintesis Immunogen CAP-BSA dan CAP KLH dengan Metoda Mixed anhidrat

Immunogen (CAP-protein konjugat) disintesa dari kloramfenikol dan protein membentuk CAP-BSA dan CAP-KLH dengan metoda *mixed anhidrat*. Kloramfenikol suksinat (CAP suksinat) dilarutkan sebanyak 15 gr kedalam 1ml tetra hidro furan (THF) dan diaduk. Lalu ditambahkan 10 µl tributilamin, 6 µl Isobutylkloroformat secara perlahan-lahan pada suhu 4°C sambil terus diaduk secara cepat selama 20 menit (Larutan A). Larutan protein pdisiapkan dengan cara melarutkan 50 mg protein bovine serum albumin (BSA) atau keyhole limpet hemocyanin (KLH) dalam 8,5 ml THF. Larutan protein ditambahkan secara tetes demi letes ke dalam larutan A sambil terus diaduk secara perlahan-lahan hingga larut selama 1 jam. Campuran ini dibiarkan selama 24 jam lalu dimurnikan dengan cara dialisa pada suhu

4°C selama 2-3 hari dengan menggunakan larutan PBS.

Uji Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Larutan imunogen dianalisa kandungan CAP yang tersisa dengan menggunakan metoda KCKT. Larutan standar dan larutan imunogen CAP dibuat dengan konsentrasi 10 ppm dalam metanol 40%. KCKT disiapkan dengan mengatur kecepatan alir fase gerak (metanol 40 %) dan dikondisikan selama 15-30 menit. Sebanyak 20 µl CAP standar disuntikan kedalam injektor dengan menggunakan penyuntik hamilton 25µl, kemudian ditunggu hingga puncak CAP yang terdeteksi muncul seluruhnya pada detektor. Ulangi penyuntikan 2-3 kali untuk mendapatkan waktu retensi yang stabil. Lalu 20 µl larutan imunogen disuntikan ke dalam injektor. CAP yang terdeteksi diamati dengan membandingkan waktu retensi puncak yang terdapat dalam larutan imunogen dengan standar.

Penentuan Grup Amino Bebas dari CAP - Protein dengan Metode Habeeb

Sebanyak 1ml larutan konjugat CAP-Protein (CAP-BSA, CAP-KLH) dengan konsentrasi 0,6 mg/ml dalam bufer sodium asetat 10mM, pH 4,5 ditambahkan ke dalam 1ml sodium hidrogen karbonat 4% (W/V) pH 9, 1ml PSA 0,1% diaduk hingga homogen lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan 1ml SDS (hati-hati jangan sampai terbentuk endapan) dan 0,5ml HCl 1M dan diaduk hingga rata. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 340 nm. Larutan blanko dan standar disiapkan dengan tahapan yang sama seperti diatas. Blanko hanya mengandung sodium asetat 10mM sedangkan standar protein adalah BSA dan KLH (0,6 mg/ml dalam bufer sodium asetat 10mM).

Produksi Antibodi

Hewan percobaan yang digunakan untuk produksi antibodi adalah dua ekor kelinci *New Zealand White* yang diperoleh dari balai penelitian peternakan. Antibodi diproduksi dengan cara mengimmunisasi kelinci dengan immunogen. Kelinci disuntik dengan larutan konjugat CAP-KLH (0,67 mg/ml) atau CAP-BSA (1mg/ml) sebanyak 0,25-1ml secara subkutan. Pengambilan contoh darah untuk pengujian titer antibodi dilakukan 10 hari setelah booster pada intravena telinga sebanyak ± 50 ml. Darah disentrifus pada 3000 rpm selama 15 menit. Serum dikeluarkan dengan pipet pastur lalu disimpan pada suhu -20°C . Purifikasi antibodi dilakukan dengan metoda kromatografi kolom protein A sepharose dan konsentrasi antibodi (IgG) ditentukan dengan metoda spektrofotometri pada panjang gelombang 280 nm.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

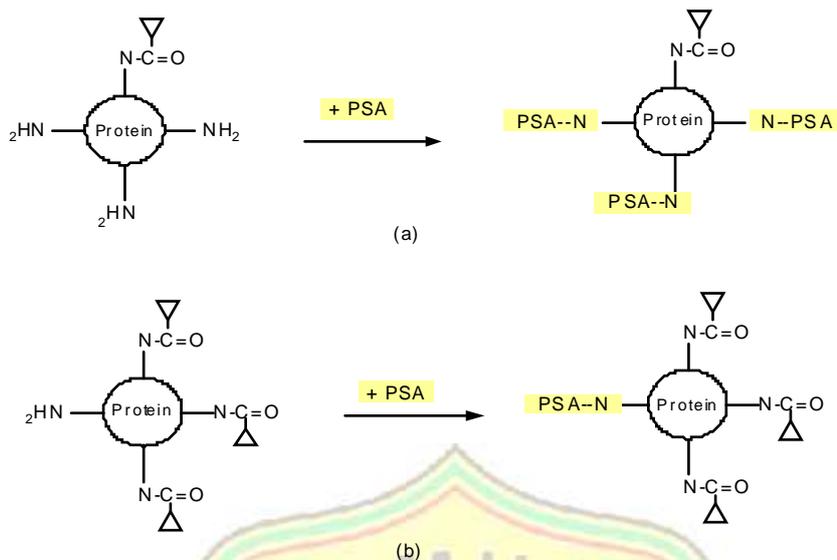
Keberhasilan sintesa immunogen dalam penelitian ini dapat diketahui dari jumlah grup amino bebas pada molekul kloramfenikol-protein. Hasil penentuan grup amino bebas dari konjugat CAP-BSA dan CAP-KLH dengan Metoda Habeeb diperoleh untuk CAP-BSA sebanyak 41 unit grup amino bebas dan untuk CAP-KLH sebanyak 1218 unit. Data ini menunjukkan bahwa sebanyak 18 unit molekul CAP yang terkonjugasi pada 1 molekul BSA yang mempunyai grup amino bebas sebanyak 59 unit. Sedangkan jumlah CAP yang terkonjugasi pada 1 molekul KLH yang mempunyai 2000 grup amino bebas adalah sebanyak 782 unit. Pada Tabel 1 disajikan hasil analisa Metoda Habeeb dan pada Lampiran 2 dapat dilihat contoh perhitungan analisa data Metoda Habeeb.

Tabel 1. Hasil analisa Metoda Habeeb terhadap konjugasi CAP-BSA dan CAP-KLH

No	Immunogen	BM	Jumlah Group Amino Bebas	Jumlah haptensi yang terkonjugasi ke protein
1	BSA	68.000	59	
2	CAP-BSA		41	18
3	KLH	$4,5 \cdot 10^5$	2000	
4	CAP-KLH		1218	782

Sejumlah besar molekul haptensi yang terkonjugasi pada molekul protein belum tentu akan bertindak sebagai immunogen yang baik dalam produksi antibodi. Antibodi dapat juga diproduksi dengan menggunakan immunogen yang hanya mengandung dua molekul haptensi per mol protein. Menurut Chu (1990), jumlah haptensi yang terikat pada protein yang diharapkan akan menghasilkan respon imun yang baik umumnya antara 10-20 mol per mol protein.

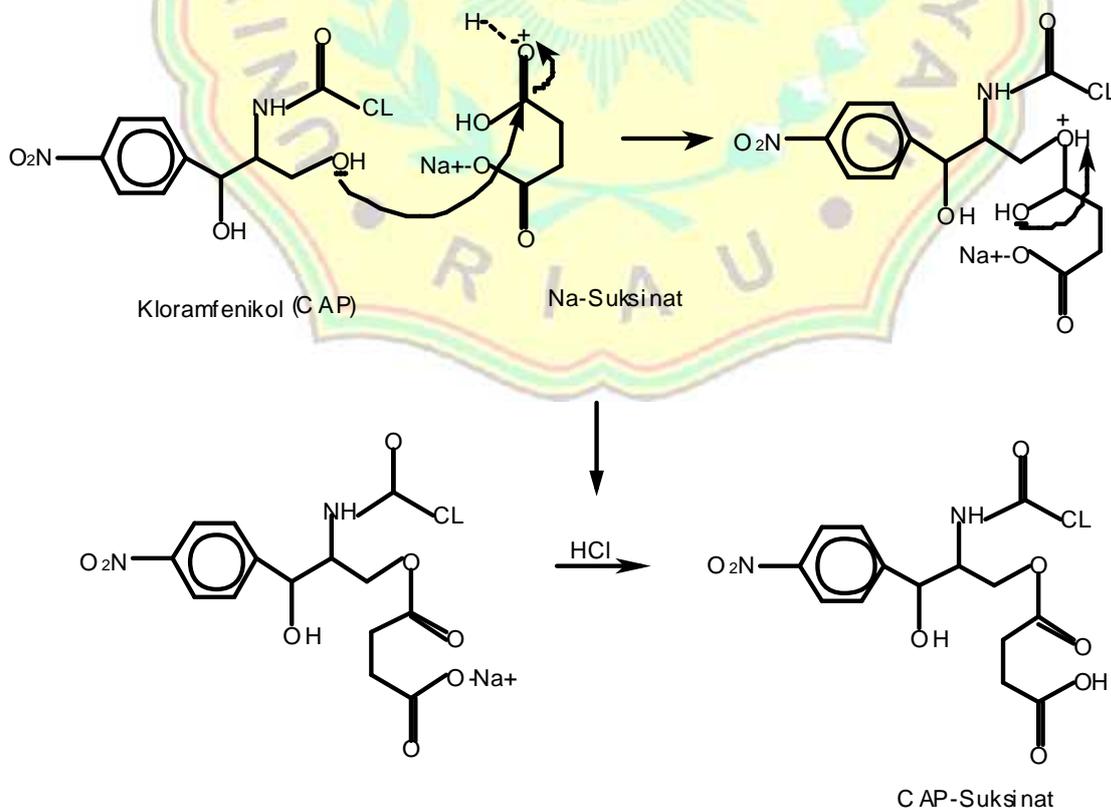
Prinsip reaksi Metoda Habeeb merupakan reaksi Kalorimetri yaitu reaksi antara molekul PSA dengan group amino bebas dari protein sehingga akan memberikan warna kuning dan diukur pada panjang gelombang 340 nm. Semakin sedikit CAP yang terkonjugasi ke molekul protein (BSA dan KLH) maka group amino bebas dari protein yang bereaksi dengan PSA akan semakin banyak sehingga absorbansi semakin besar (lihat gambar 1a). Begitu juga sebaliknya pada gambar 2b menunjukkan semakin banyak CAP terkonjugasi ke molekul protein maka group amino bebas dari protein yang bereaksi dengan PSA akan semakin sedikit sehingga absorbansi yang dihasilkan pun semakin kecil.



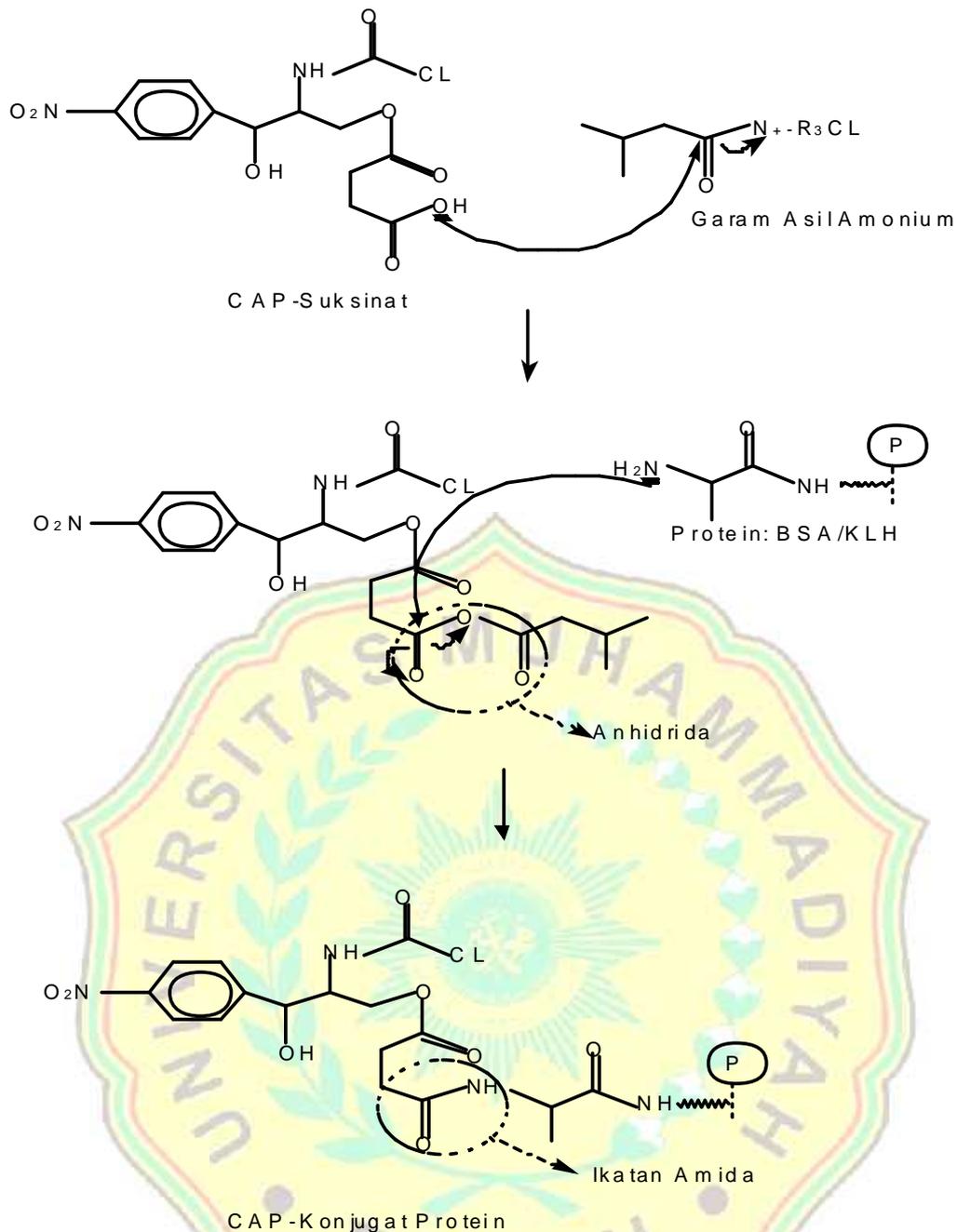
Gambar 1. Prinsip Reaksi Metoda Habeeb

Faktor yang penting dalam menentukan efektivitas reaksi konjugasi pada sintesa imunogen adalah posisi ikatan dan gugus aktif yang dimiliki molekul hapten yang terkonjugasi ke molekul protein. Molekul anhidrida dibentuk dari asam karboksilat

(kloramfenikol natrium suksinat) dengan molekul klorida asam seperti isobutil kloroformat. Pada gambar 2 dan 3 dapat diketahui mekanisme sintesa CAP-suksinat dan mekanisme reaksi konjugasi kloramfenikol terhadap protein.



Gambar 2. Mekanisme Sintesa CAP-suksinat



Gambar 3. Mekanisme Reaksi Sintesa Kloramfenikol Protein Konjugat

Pereaksi tributil amin merupakan suatu amina tersier. Pereaksi ini tidak dapat membentuk amida dengan klorida asam akan tetapi membentuk molekul antara reaktif yaitu “garam asil amonium” yang bersifat tidak stabil. Molekul ini tidak mengganggu pembentukan amida antara klorida asam dengan NH_2 , RNH_2 , R_2NH atau molekul protein. Konjugasi hapten-protein pada metoda mixed anhidrad, ikatan peptida terjadi

pada gugus amin terminal residu lysine atau pada gugus karboksil (asam glutamat dan asam aspartat pada sisi protein) juga pada terminal residu sistein yaitu grup sulfhidril ($-\text{SH}$) bebas (Tijsen,1990)

Hasil analisa metoda KCKT dari 10 ppm larutan immunogen (CAP-BSA dan CAP-KLH) diketahui bahwa kedua larutan immunogen tidak mengandung CAP bebas karena puncak CAP tidak terlihat pada menit

ke 9,2. Tinggi puncak CAP standar pada konsentrasi 10 ppm adalah 22 mm dengan waktu retensi 9,2 menit. Pada Lampiran 3 disajikan kromatogram KCKT larutan CAP-BSA dan CAP-KLH. Analisa ini dilakukan untuk memastikan bahwa molekul CAP telah terpisah dari larutan imunogen setelah dilakukan pemurnian dengan cara Dialisa. Imunogen ini akan digunakan untuk penyuntikan kelinci dan analisa ELISA kompetitif.

Hasil uji kesesuaian sistem berdasarkan penyuntikan CAP standar sebanyak 20 µl pada konsentrasi 10 ppm yang dilakukan Senta (2003) diperoleh waktu retensi CAP selama 11,6 menit. KCKT merupakan salah satu metoda yang digunakan untuk memisahkan campuran senyawa-senyawa kimia menjadi komponen-komponennya. Pada KCKT, fase gerak mengalir ke kolom dengan cara dipompa. Larutan contoh disuntikan melalui katup penyuntik akan terbawa oleh fase gerak dan masuk ke dalam kolom, dan dengan fase gerak akan berjalan melewati detektor. Detektor akan mendeteksi secara terpisah senyawa-senyawa yang ada dalam contoh dan disajikan oleh rekorder berupa kurva dan puncaknya. Pemilihan pelarut pada KCKT dapat dilakukan berdasarkan sifat kepolaran dari contoh dan fase gerak yang dipakai (CCM, 2002).

Imunogen hasil sintesis disuntikan ke kelinci *New Zealand White* secara subkutan. Pengambilan darah untuk pengujian titer dan penentuan kandungan IgG dilakukan 10 hari setelah booster pada intravena telinga sebanyak 50 ml. Darah yang diperoleh kemudian di sentrifus pada 3000 rpm selama 15 menit sehingga diperoleh serum. Serum kemudian di dialisis dengan buffer fosfat dan dipurifikasi dengan kromatografi kolom protein A sepharose. Kondisi buffer sangat mempengaruhi kesuksesan purifikasi antibodi

karena kondisi buffer dapat memperbaiki afinitas pengikatan kolom dan mempertahankan aktivitas pengikatan antibodi. Antibodi spesifik diperoleh dari hasil elusi kolom protein A sepharose dengan buffer sitrat dengan pH 4. pH fraksi antibodi yang diperoleh harus dijadikan netral untuk memaksimalkan integritas antibodi (Burgess, 1995). Antibodi yang telah dipurifikasi kemudian ditentukan konsentrasi antibodi secara spektrofotometri pada panjang gelombang 280 nm.

Pada tabel 2 disajikan data konsentrasi IgG dari hasil purifikasi serum darah kelinci yang diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Kandungan IgG dalam serum ditentukan untuk menghitung konsentrasi pelapisan antibodi pada lempeng mikro dan perhitungan konsentrasi penambahan antibodi pada saat pengujian ELISA. Metoda purifikasi bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa lipid dan protein-protein lainnya sehingga preparasi IgG akan lebih murni 85%.

Tabel 2. Data konsentrasi IgG dari hasil purifikasi serum darah kelinci

Pengambilan Darah	Kandungan IgG mg/ml	
	CAP – BSA	CAP – KLH
2	2,75	2,63
3	2,65	2,82
4	1,28	2,77
5	1,56	2,82
6	2,11	5,36
Rata-rata	2,07	2,21

Faktor yang menentukan dalam produksi antibodi diantaranya adalah sifat imunogen, adjuvan, pemilihan hewan, rute injeksi, dan dosis. Efektivitas imunogen dapat ditingkatkan dengan adjuvan. Adjuvan dapat memodifikasi imunogen dengan menyebabkan perubahan struktural atau elektrostatis sehingga meningkatkan imunogenisitas. Adjuvan juga bekerja pada

tingkat sel dari sistim imun inang dengan membentuk depot imunogen sehingga memperlambat pelepasannya dari lokasi inokulasi, menarik sel-sel mononuklear ke lokasi inokulasi, meningkatkan sirkulasi limfosit dan merangsang fagositosis oleh makrofag.

Dalam penelitian ini digunakan adjuvan freund yaitu terdiri atas campuran minyak mineral dan pengemulsi, baik dengan mikobakteria (adjuvan lengkap freund: FCA, Freund's Complete Adjuvan) ataupun tanpa mikobakteria (adjuvan tak lengkap freund : FIA, Freund's Incomplete adjuvant). FCA masih dianggap sebagai salah satu dari adjuvan paling kuat (Dalsgaard, 1987). FCA merangsang respon antibodi yang kuat untuk waktu yang lama dengan jalan memperlambat pelepasan emulsi. Beberapa peneliti menganjurkan bahwa jika dosis pertama diberikan dalam FCA, maka booster harus diberikan dalam FIA untuk menghindari reaksi hipersensitivitas yang hebat (Goding, 1986).

Menurut Lelliot dan Stead (1987), antibodi dapat diproduksi dengan baik pada kelinci. Hal ini didukung oleh pendapat Ball et all (1990) bahwa kelinci paling sering digunakan, karena hewan ini mudah diperlihara, mudah penanganannya dan juga tidak mahal. Selain itu Klement (1990) mengemukakan bahwa kelinci dapat menghasilkan antibodi dengan presipitasi yang sangat baik, sangat stabil dalam penyimpananya, fraksi immunoglobulin mudah dimurnikan, aviditas dan affinitas tinggi untuk menguji antigen spesifiknya.

Teknik injeksi imunogen ke dalam tubuh kelinci yang digunakan adalah secara subkutan. Teknik ini bertujuan untuk memperlambat pelepasan immunogen ke dalam aliran darah (Lelliot dan Stead 1987). Jalur secara subkutan adalah jalur yang paling sering digunakan oleh karena teknik ini lebih

mudah, dapat dilakukan dengan volume yang lebih banyak per satu tempat injeksi. Kecepatan absorpsi tergantung pada aliran darah pada area injeksi, aktivitas otot dan kontak area (Bratawidjaja, 2002).

Antibodi yang diproduksi pada penelitian ini adalah antibodi poliklonal karena serum yang dikumpulkan dari hewan yang diimunisasi mengandung antibodi terhadap antigen yang dipakai untuk imunisasi tetapi juga antibodi terhadap antigen lingkungan lainnya yang mungkin telah masuk ke tubuh hewan. Antibodi ini mempunyai isotype yang berbeda-beda dan afinitas berbeda-beda. Sifat antibodi poliklonal ini kurang spesifik akan tetapi dapat mempertahankan sensitivitasnya serta relatif stabil.

4. KESIMPULAN

Metoda konjugasi andhidrad dapat digunakan pada preparasi immunogen, dan jumlah kloramfenikol yang terkonjugasi ke asam amino bebas dari molekul protein untuk antigen CAP-BSA adalah 18,38 dan untuk CAP-KLH adalah 781,82. Antibodi poliklonal CAP-BSA dan CAP-KLH yang diproduksi dengan rata-rata kandungan IgG CAP-BSA 2,07 mg/ml dan IgG CAP-KLH 2,21 mg/ml.

5. SARAN

Antigen dan Antibodi hasil sintesa dapat digunakan sebagai prangkat analisa pengembangan metoda ELISA kompetitif pada pemeriksaan residu kloramfenikol.

DAFTAR PUSTAKA

Bahri, S. Murdiati, T.B., Maryam, R dan Yuningsih. 1990. Senyawa Golongan Tetrasiklin pada Susu Sapi Rakyat di Beberapa Desa di Kabupaten

- Pasuruan, Jawa Timur. Laporan Intern Balitvet.
- Beyzari, K., Hampton, S., Kwasowski, P., Fickling, S. 1987. Comparison of horseradish peroxidase and alkaline phosphatase-labelled antibodies in enzyme-immunoassay. *J. Immunoassay*. 187-4.
- Chu, F.S. 1990. Immunoassay; Principles and General considerations. Department of Food Microbiology and Toxicology University of Wisconsin, Madison, USA
- Crowther, J.R. 1995. Methods in Molecular Biology. ELISA Theory and Practice. Humana Press. 42:34-99.
- Dalsgaard, K. 1987. Adjuvants. *Immunopath*. 17:145-152.
- Dixon-Holland D.E and Deborah. 1992. ELISA and its Application for Residue Analysis of Antibiotics and Drugs in Products of Animal origin.
- FAO. 1990. Residue of Some Veterinary Drugs in Animals and Foods. FAO, Food and Nutrition paper no 41/2. Monograph prepared by the 34th meeting on the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Geneva.
- Haagsma, N., Water der Water, C. 1992. Immunochemical Methods in the Analysis of Veterinary Drugs Residues. Plenum Press. 81-93.
- Klement, Z.K., and Rudolph, D.C. 1990. Methods in Phytobacteriology. Academic Kiado. 518.
- Komar, M., Marinsch, J., Marinsch, J., Somogk-Gaemol, K., Ivanic, S. and Milohnoja, M. 1990. Survey Of Sulphonamide Residues in Urine Samples, Animal Tissues and Food of Animal Origin in Solvenia In 1986, 1987 and 1988. In Residues of Veterinary Drugs in Food. Proceedings of Euro Residue Conference, Noordwijkerhout. The Netherlands. 246-7.
- Lelliot, R. A and Stead, D.E. 1987. Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. *Plant Pathology*. Melbourne. 216
- Murdiati, T.B and Bahri, S. 1991. Pola Penggunaan Antibiotika dalam Peternakan Ayam di Jawa Barat, Kemungkinan Hubungan dengan Masalah Residu. Proceedings Kongres ilmiah ke-8 ISFI, Jakarta. 445-8.
- Seameo Biotrop, 2002. ELISA Workshop: Analysis of Aflatoxin B1 in Peanuts. Organised by University of Sydney. Bogor.
- Salybury, C.D.C., Chan, W., Peterson, J.R., Macneil, J.D and Krenendonk, C.A. 1990. Case Report: An Investigation of Chlortetracycline and Oxytetracycline Residues in Suspect Swine Slaughtered in Manitoba, Canada. 1988. *Food Additive and Contaminants*. 7:363-373.
- Schlatter, C. 1990. Toxicological Assesment of Xenobiotics in Foods of Animal Origin. In Residues of Veterinary Drugs in Food. Proceedings of the Euro Residue Conferece Noordwijkerhout, The Netherlands. 65-75.
- Sudarwanto, M. 1990. Residu Antibiotika di dalam Air Susu Ditinjau dari Kesehatan Masyarakat Veteriner dalam Kumpulan Makalah Seminar Nasional. Penggunaan Antibiotika

dalam Bidang Kedokteran Hewan.
Jakarta.

Szurdoki, F., Bekheit, K.M., Marco, M.P.,
Goodrow, M.H and Hammock, D.

1995. Important Factor in Hapten
Design and Enzyme Linked
Immunsorbent Assay Development.
In New Frontier in Agr chem
Immunoassays. 39-64.

