

Pengembangan strip tes immunokromatografi untuk mendeteksi melamin = Development of an immunochromatographic strip test for the detection of melamine

Bakhadir Rismetov, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20390546&lokasi=lokal>

Abstrak

Strip-tes immunokromatografi dikembangkan dengan menggabungkan metode ini dengan teknik elektrokimia untuk menghasilkan metode alternatif uji melamin secara cepat dan sederhana. Pada dasarnya strip tes immunokromatografi adalah aplikasi teknik immunoassay pada suatu kertas kromatografi untuk menghasilkan deteksi yang mudah, cepat dan selektif. Pada penelitian ini, kombinasi dengan metode elektrokimia dikembangkan untuk menghasilkan deteksi secara kuantitatif sesudah proses immunokromatografi. Mula-mula, antibodi poliklonal melamin (anti melamine) disintesis. Untuk menghasilkan antibodi, suatu antigen harus diimmunisasikan ke dalam kelinci, sehingga antibodi dihasilkan dalam darah. Melamin bukan antigen. Karena itu agar dapat bersifat seperti antigen, melamin harus dimodifikasi sebagai hapten yang kemudian dikonjugasikan dengan BSA. Hapten yang disintesis dari melamin dan anhidrida suksinat memiliki persen hasil 81% dengan titik leleh 362-363°C. Karakterisasi dengan spektroskopi UV-vis menghasilkan serapan maksimum pada 229 nm, sedangkan dengan spektroskopi IR menunjukkan pembentukan C=O ulur dari asam karboksilat pada 1708 cm⁻¹ dan C = O ulur dari amida sekunder pada 1683-1666 cm⁻¹ yang menunjukkan sintesis hapten telah berhasil.

Hasil spektrometri massa menunjukkan kemunculan puncak pada m/z 227 yang menunjukkan hapten terprotonasi. Kemudian, hapten dikonjugasikan dengan BSA dan diimmunisasikan ke kelinci untuk memproduksi antibodi poliklonal melamin. Antibodi yang diperoleh dikonjugasi dengan horseradish peroxidase (HRP) menghasilkan HRP-anti melamin. Konfirmasi anti melamin yang dihasilkan dilakukan dengan uji ELISA. HRP-anti melamin yang dihasilkan digunakan untuk strip-test. Strip-test dibuat dari membran nitroselulosa (NC) dan terdiri dari 4 komponen, yaitu tempat sampel, tempat konjugasi, daerah pengujian, dan lapisan penyerap. Antibodi melamin dibubuhkan pada tempat konjugasi dan daerah pengujian. Ketika sampel ditetaskan di tempat sampel, sampel akan bergerak sepanjang membran NC, melalui tempat konjugat, menuju daerah pengujian. Di tempat konjugat, melamin akan bereaksi secara selektif dengan anti melamin, dan di daerah pengujian akan terbentuk kompleks HRP-anti melamin-melamin-anti melamin. Karena itu jika suatu perangkat elektrokimia ditempatkan di bawah daerah pengujian, HRP yang terkonjugasi pada anti melamin dapat diukur. Dengan asumsi jumlah HRP ekuivalen dengan anti melamin dan juga melamin, konsentrasi melamin dapat diukur.

Perangkat elektrokimia dibuat dari elektroda intan terdoping boron yang dimodifikasi dengan platinum dan polipirol (Pt-BDD) sebagai elektroda kerja, sistem Ag/AgCl sebagai elektroda pembanding, dan kawat platina sebagai elektroda penunjang. Untuk menyiapkan Pt-BDD, elektroda intan terdoping boron (BDD) 1% dengan terminasi O diberi perlakuan voltametri siklik (CV) sebanyak 80 siklik dalam larutan heksa kloro platinat (IV) (H₂PtCl₆) dalam larutan HCl. Strip-tes membutuhkan waktu ~7 menit sejak sampel ditetaskan hingga daerah pengujian. Pengukuran elektrokimia dengan teknik CV dilakukan setelah

melarutkan daerah pengujian dengan 150 µL larutan 1 mM H₂O₂ dalam 50 mM larutan fosfat buffer. Rentang potensial yang digunakan -0,5 V - 1,0 V. Linieritas dalam rentang konsentrasi 5-125 mg/L dapat dicapai dengan limit deteksi 0.694 mg/L melamin, mengindikasikan bahwa metoda ini cukup menjanjikan sebagai pendeteksi melamin.

Immunochromatographic strip-test was developed to combine with an electrochemical technique for an alternative method for a simple and rapid detection of melamine. An immunochromatographic strip-test is basically applies an immunoassay technique using a chromatography paper to provide a simple, fast, and selective detection. In this work, combination with an electrochemical method was developed to provide a quantitative detection after immunochromatographic assay. Initially, a polyclonal antibody against melamine (anti melamine) was produced. In order to produce the antibody, antigen has to be immunized into a living body, such as rabbit. Therefore, antibody was produced in the rabbit's blood. Since melamine is not an antigen, melamine, to act as an antigen, has to be modified as a hapten which conjugated to BSA. The hapten was synthesized from melamine and succinic anhydride. The product yield was 81 % with melting point of 362 - 363 °C. Characterization using a UV-vis spectroscopy showed a maximum absorbance at 229 nm, while IR spectroscopy showed the formation of C=O stretching from carboxylic acid at 1708 cm⁻¹ and C=O stretching from secondary amide at 1683 - 1666 cm⁻¹, indicating to the successful of the synthesis.

The mass spectrometry showed a peak appeared at m/z 227 suggesting the protonated hapten. Then, hapten was conjugated to BSA and immunized to rabbit, to produce a polyclonal antibody against melamine. The obtained antibody was then conjugated to horseradish peroxidase (HRP) to form HRP-anti melamine. Anti-melamine result was confirmed by using ELISA test. The HRP-anti melamine was then used for the developed strip-test. The strip-test was fabricated using nitrocellulose (NC) membrane and consisted of 4 components, including a sample pad, a conjugate pad, a test zone, and an absorbent pad. The melamine antibody was placed at the conjugate pad and test zone. When sample was dropped at the sample pad, the sample moves through the NC to the conjugate pad, respectively, towards the test zone. At the conjugate pad melamine sample selectively reacts to HRP-anti melamine, while at the test zone sandwich of HRP-anti melamine-melamine-anti melamine will formed. Therefore, by placing an electrochemical device under the test zone, HRP, which indirectly conjugated at the melamine can be measured. Assumed that the concentration of HRP was equivalent to antibody as well as melamine, melamine concentration can be determined.

The electrochemical device was fabricated using an overoxidized polypyrrole (OPPy)-platinum modified at boron-doped diamond electrode (Pt-BDD) as the working electrode, an Ag/AgCl system as the reference electrode, and a platinum wire as the counter electrode. To prepare Pt-BDD, an optimum condition of 1 % boron-doped diamond (BDD) with O termination was used with 80 cycles of cyclic voltammetry (CV) in a solution of platinum acid (H₂PtCl₆) in HCl. The immunochromatographic strip-test requires ~7 min from sample dropped to achieve the test zone. The electrochemical measurement was then performed using CV technique by dissolving the test zone using 150 µL of 1 mM H₂O₂ in 50 mM phosphate buffer solution. The potential range of -0.5 V to 1.0 V was applied. Linear concentration range of 5-125 mg/L could be achieved with a limit of detection of 0.694 mg/L melamine, indicating the method was promising for melamine detection.