

**PENGARUH KEASAMAN MEDIA DAN KONSENTRASI
ANTIBODI TERHADAP STABILITAS KONJUGAT
ANTIBODI-GNPs (*Gold Nanoparticles*)
(Studi Pendahuluan: Pengembangan *Halal Test Kit* Berbasis
Imunokromatografi untuk Deteksi Produk Gelatin Haram)**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai gelar
Sarjana Farmasi (S. Farm)



Oleh :

Adina Yumnita Adani

33101800001

PROGRAM STUDI FARMASI FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2023

SKRIPSI

**PENGARUH KEASAMAN MEDIA DAN KONSENTRASI
ANTIBODI TERHADAP STABILITAS KONJUGAT
ANTIBODI-GNPs (*Gold Nanoparticles*)**

**(Studi Pendahuluan: Pengembangan *Halal Test Kit* Berbasis Imunokromatografi
Untuk Deteksi Produk Gelatin Haram)**

yang dipersiapkan dan disusun oleh

Adina Yumnita Adani

33101800001

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 24 Agustus 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat.

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Anggota Tim Penguji


apt. Hudan Taufiq, M.Sc.


Prof. Dr. apt. Abdul Rohman, S.F., M.Si.

Pembimbing II


Dwi Endah Kusumawati, S.Si., M.Si.


Windi Susmayanti, M.Sc.

Semarang, 24 Agustus 2023

Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp. KF.

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Adina Yumnita Adani

NIM : 33101800001

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

**“PENGARUH KEASAMAN MEDIA DAN KONSENTRASI ANTIBODI
TERHADAP STABILITAS KONJUGAT ANTIBODI-GNPs (*Gold
Nanoparticles*)”**

adalah benar karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil sebagian atau seluruh hasil karya tulis ilmiah orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Apabila di kemudian hari saya terbukti melakukan tindakan plagiat tersebut maka saya siap menerima sanksi apapun termasuk pencabutan gelar sarjana yang telah diberikan.

Semarang, 24 Agustus 2023

Yang menyatakan,



Adina Yumnita Adani

PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Adina Yumnita Adani
NIM : 3310800001
Program Studi : Farmasi
Fakultas : Kedokteran
Alamat : Jalan Merpati Barat IA no. 1, Pedurungan Tengah,
Pedurungan, Semarang
No. Hp/ Email : 0895321239018/ adinayumnitaa@gmail.com

Dengan ini menyatakan karya skripsi yang berjudul:

**“PENGARUH KEASAMAN MEDIA DAN KONSENTRASI ANTIBODI
TERHADAP STABILITAS KONJUGAT ANTIBODI-GNPs (*Gold
Nanoparticles*)”**

dan menyetujui menjadi hak milik Universitas Islam Sultan Agung Semarang, serta memberikan hak bebas royalti non-eksklusif untuk disimpan, dialih-mediakan, dikelola dalam pangkalan data dan dipublikasikan di internet atau media lain untuk kepentingan akademis selama tetap menyantumkan nama penulis sebagai hak cipta. Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh. Apabila di kemudian terbukti ada pelanggaran Hak Cipta/ Plagiarisme dalam karya ilmiah ini maka segala bentuk tuntutan hukum yang timbul akan saya tanggung secara pribadi tanpa melibatkan Universitas Islam Sultan Agung.

Semarang, 24 Agustus 2023

Yang menyatakan,



Adina Yumnita Adani

PRAKATA



Assalamu 'alaikum warrahmatullahi wabarakatuh.

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT. atas segala berkat, rahmat, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini dengan baik. Sholawat dan salam senantiasa kita panjatkan kepada junjungan kita, Nabi Besar Muhammad SAW. beserta keluarga dan para sahabatnya karena berkat risalahnya, umat Islam dapat berhijrah dari zaman Jahiliyah ke zaman Islamiyah seperti sekarang ini.

Dengan terselesaikannya skripsi ini yang berjudul **“PENGARUH KEASAMAN MEDIA DAN KONSENTRASI ANTIBODI TERHADAP STABILITAS KONJUGAT ANTIBODI-GNPs (*Gold Nanoparticles*)”** untuk memenuhi persyaratan menempuh Program Pendidikan Sarjana Farmasi di Prodi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung Semarang, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam proses pembuatan skripsi ini. Ucapan terima kasih penulis haturkan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Gunarto, S.H., M.H. selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF., S.H., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Ibu apt. Rina Wijayanti, M.Sc., selaku Ketua Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4. Bapak apt. Hudan Taufiq M.Sc., selaku dosen pembimbing I dan Ibu Dwi Endah Kusumawati, S.Si, M.Sc., selaku dosen pembimbing II yang telah sabar membimbing, memberikan motivasi, semangat, dan arahan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Bapak Prof. Dr. apt. Abdul Rohman, S.F., M.Si., dan Ibu Windi Susmayanti, M.Sc., selaku penguji skripsi yang telah meluangkan waktu untuk memberikan kritik serta saran agar skripsi ini menjadi lebih baik.
6. LPPM UNISSULA yang memberikan bantuan berupa dana hibah penelitian.
7. Seluruh dosen Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan ilmu selama menempuh kuliah.
8. Seluruh staf Laboratorium Biologi FK UNISSULA Semarang yang telah bersedia membantu kelancaran penelitian.
9. Kedua orang tua tercinta, Bapak Bomber Joko Setyo Utomo, Ibu Isti Jati, serta adik tersayang yang selalu mendoakan, mendukung, memberikan semangat, dan mendengarkan keluh kesah penulis selama penyusunan skripsi.
10. Keluarga besar yang selalu mendoakan dan mendukung dalam penyusunan skripsi.
11. Keluarga besar “Formicidae” Farmasi 2018 yang telah memberikan semangat, dukungan, dan doanya.
12. Sahabat penulis, Dila, Aldisa, Azka, Desi, Fitria, dan Tiara yang dengan tulus selalu mendoakan, mendukung, menyemangati, dan menyumbangkan ide-ide selama proses penulisan.

13. Serta pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan secara terpisah atas bantuannya dalam penyusunan skripsi ini.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih belum sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak sangat diharapkan. Besar harapan penulis semoga skripsi ini dapat menjadi dokumen informasi yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan di bidang kefarmasian.

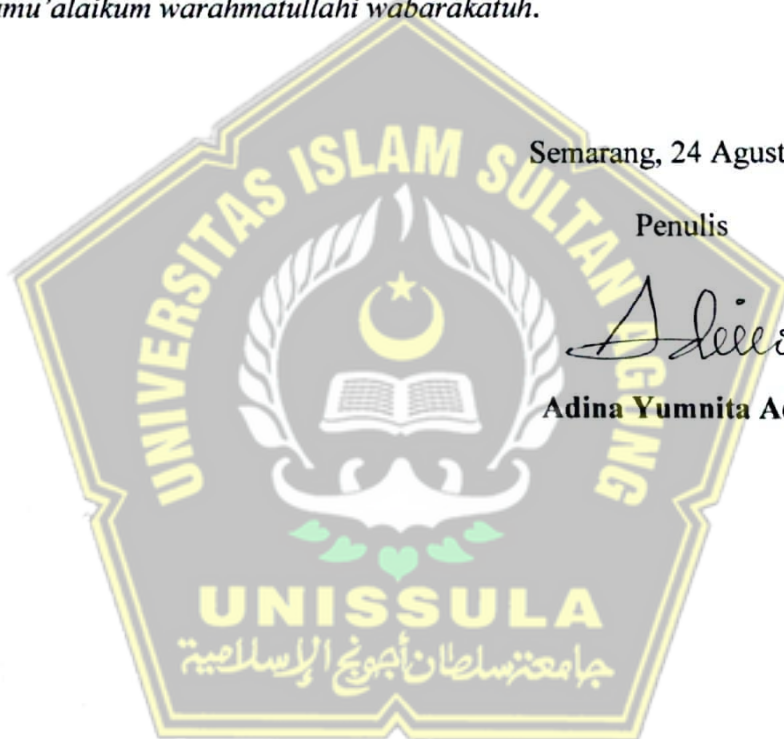
Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Semarang, 24 Agustus 2023

Penulis



Adina Yumnita Adani



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	iv
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN/ ISTILAH.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Imunokromatografi	6
2.1.1. Definisi Imunokromatografi.....	6
2.1.2. Prinsip Imunokromatografi.....	6
2.1.3. Komponen Imunokromatografi	8
2.1.4. Keuntungan Penggunaan Imunokromatografi.....	12
2.1.5. Faktor yang Dapat Mempengaruhi Kinerja Imunokromatografi.....	12
2.2. Antibodi Poliklonal	15
2.2.1. Definisi Antibodi Poliklonal.....	15
2.2.2. Produksi Antibodi Poliklonal	15
2.2.3. Karakteristik Antibodi Poliklonal.....	18

2.2.4. Keuntungan Penggunaan Antibodi Poliklonal	19
2.2.5. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Antibodi Poliklonal.....	19
2.3. Antigen	22
2.4. Gelatin	22
2.4.1. Definisi Gelatin.....	22
2.4.2. Sumber Gelatin	22
2.4.3. Macam Gelatin	23
2.4.4. Karakteristik Gelatin.....	24
2.4.5. Produksi Gelatin	25
2.4.6. Pemanfaatan Gelatin.....	25
2.5. Validasi Metode	26
2.6. Spesifisitas Metode	28
2.7. Konsep Halal dan Haram	28
2.8. Hubungan antara Keasaman Media dan Konsentrasi Antibodi yang Digunakan dengan Stabilitas Konjugat Antibodi-Nanopartikel Emas...	29
2.9. Kerangka Teori.....	33
2.10. Kerangka Konsep.....	34
2.11. Hipotesis.....	34
BAB III METODE PENELITIAN.....	35
3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	35
3.2. Variabel dan Definisi Operasional	35
3.3. Populasi dan Sampel Penelitian	37
3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian.....	37
3.5. Cara Penelitian	39
3.6. Alur Penelitian	48

3.7. Tempat dan Waktu	49
3.8. Analisis Hasil	49
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	50
4.1. Hasil Penelitian	50
4.1.1. Perhitungan Kadar Antibodi dengan Metode ELISA.....	50
4.1.2. Penentuan pH dan Konsentrasi Antibodi Optimum saat Konjugasi.....	51
4.1.3. Validasi <i>Halal Test Kit</i>	53
4.1.4. Aplikasi Pengujian Sampel Menggunakan <i>Halal Test Kit</i>	55
4.2. Pembahasan Penelitian.....	57
4.2.1. Perhitungan Kadar Antibodi dengan Metode ELISA.....	57
4.2.2. Penentuan pH Optimum saat Konjugasi.....	57
4.2.3. Penentuan Konsentrasi Antibodi Optimum saat Konjugasi	61
4.2.4. Validasi <i>Halal Test Kit</i>	63
4.2.5. Aplikasi Pengujian Sampel Menggunakan <i>Halal Test Kit</i>	64
4.2.6. Keterbatasan Penelitian	66
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	67
5.1. Kesimpulan	67
5.2. Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	74

DAFTAR SINGKATAN/ ISTILAH

µg : mikrogram

µL : mikroliter

BPJPH: Badan Penyelenggara Jaminan Produk Halal

BSA : *Bovine Serum Albumin*

cm : sentimeter

DNA : *Deoxyribonucleic acid*

EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FCA : *Freund Complete Adjuvant*

FTIR : *Fourier Transform Infrared*

GNP : *Gold nanoparticle(s)*

HRP : *Horseradish peroxidase*

ICH : *International Conference of Harmonization*

IFA : *Incomplete Freund Adjuvant*

IgG : *Imunoglobulin G*

kDa : kilodalton

LOD : *Limit of Detection* (Batas deteksi)

LOQ : *Limit of Quantification* (Batas kuantifikasi)

mg : miligram

mL : mililiter

mm : milimeter

ng : nanogram

nm : nanometer

PBS : *Phosphat Buffer Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

pH : *Potential of Hydrogen*

RAL : Rancangan Acak Lengkap

rpm : *Revolution per menit*

TMB : *3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine*

USP : *United States Pharmacopeia*



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil Konsentrasi Pengenceran Antibodi dengan Metode ELISA	50
Tabel 4.2. Data Absorbansi pada Panjang Gelombang 580 nm.....	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Prinsip strip imunokromatografi tipe lateral flow	7
Gambar 2.2.	Skema komponen strip imunokromatografi.....	8
Gambar 2.3.	Tahapan produksi antibodi poliklonal.....	16
Gambar 2.4.	Interaksi protein dan partikel emas	31
Gambar 2.5.	Kerangka teori	33
Gambar 2.6.	Kerangka konsep	34
Gambar 3.1.	Ilustrasi pengenceran antibodi	42
Gambar 3.2.	Ilustrasi penentuan kondisi optimum saat konjugasi	44
Gambar 3.3.	Skema strip uji	46
Gambar 3.4.	Interpretasi hasil warna strip imunokromatografi	47
Gambar 3.5.	Alur penelitian.....	48
Gambar 4.1.	Sebelum penambahan NaCl 10%.....	51
Gambar 4.2.	Sesudah penambahan NaCl 10% (A).....	51
Gambar 4.3.	Sesudah penambahan NaCl 10% (B).....	52
Gambar 4.4.	Hasil Uji Kontrol Gelatin Sapi Murni.....	54
Gambar 4.5.	Hasil Uji Kontrol Gelatin Babi Murni	54
Gambar 4.6.	Hasil Uji Sampel A	55
Gambar 4.7.	Hasil Uji Sampel B	56
Gambar 4.8.	Hasil Uji Sampel C	56
Gambar 4.9.	Hasil Uji Sampel D	56
Gambar 4.10.	Ilustrasi agregasi dan konjugasi pada nanopartikel emas dan antibodi.....	61

Gambar 4.11. Ilustrasi proses perubahan warna pada strip..... 64



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i> Penelitian	74
Lampiran 2. <i>Certificate of Analysis</i> ELISA Kit	75
Lampiran 3. <i>Certificate of Analysis</i> Antibodi Poliklonal Goat anti-Rabbit IgG... 76	
Lampiran 4. <i>Certificate of Analysis</i> untuk <i>Gold Nanoparticles</i> (GNPs) 40 nm ... 77	
Lampiran 5. <i>Certificate of Analysis</i> untuk <i>Material Conjugate Pad</i> 78	
Lampiran 6. <i>Certificate of Analysis</i> untuk <i>Material Sample-Adsorbent Pad</i> 79	
Lampiran 7. <i>Certificate of Analysis</i> untuk Gelatin Babi	80
Lampiran 8. <i>Certificate of Analysis</i> untuk Gelatin Sapi	81
Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian	82
Lampiran 10. Surat Keterangan Selesai Penelitian	87



INTISARI

Produk gelatin sering menjadi perhatian karena status kehalalannya sehingga diperlukan metode yang praktis dan akurat untuk mengurangi kekhawatiran masyarakat terhadap penggunaan bahan dasar babi pada gelatin. Salah satu metode deteksi gelatin babi yang dapat dikembangkan adalah metode imunokromatografi yang menggabungkan prinsip imunologi dengan teori kromatografi dalam tes sederhana secara kualitatif. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh parameter keasaman media (pH) saat konjugasi dan konsentrasi antibodi yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas terhadap stabilitas konjugat antibodi-nanopartikel emas.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap 2 faktorial, yaitu kombinasi antara kondisi pH saat konjugasi dan konsentrasi antibodi poliklonal yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas pada strip uji. Larutan nanopartikel emas pada kondisi pH 6; pH 7; pH 8 dikonjugasikan dengan antibodi poliklonal yang didapatkan dari imunisasi gelatin babi ke kelinci. Kondisi optimal larutan konjugat diidentifikasi secara visual dengan melihat perubahan warna pada larutan konjugat setelah penambahan NaCl 10%. Pengujian strip uji pada larutan gelatin dan sampel juga diidentifikasi dengan melihat adanya bercak merah pada titik kontrol dan/atau titik uji pada strip secara visual.

Berdasarkan hasil penelitian dengan melihat perubahan warna pada larutan konjugat secara visual, kondisi optimum yang digunakan saat konjugasi antibodi-nanopartikel emas adalah pada pH 8 dan konsentrasi antibodi 75,31 ng/mL yang menunjukkan tidak ada perubahan warna akibat agregasi. Namun hasil pengujian strip uji pada kontrol maupun sampel belum menunjukkan hasil yang valid.

Kesimpulan penelitian ini adalah pada kondisi optimum yang dipilih tersebut ternyata belum mampu mengidentifikasi antigen babi pada gelatin dan produk berbahan gelatin dengan baik.

Kata kunci: Imunokromatografi, babi, gelatin, konjugasi antibodi-nanopartikel emas.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan penduduk muslim terbesar di dunia. Pada akhir tahun 2021, tercatat ada sekitar 237,53 juta penduduk muslim di Indonesia dan akan terus meningkat setiap tahun (Bayu, 2022). Besarnya populasi umat muslim inilah yang menyebabkan permintaan produk halal pun juga tergolong besar. Hal tersebut juga yang mendorong pemerintah mengeluarkan UU No. 34 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal yang berfungsi untuk melindungi masyarakat dalam menggunakan produk-produk yang sesuai syariat Islam. Berdasarkan data dari BPJPH (Badan Penyelenggara Jaminan Produk Halal) melalui Sistem Informasi Halal (SiHALAL), disebutkan bahwa terdapat 749.971 produk yang telah tersertifikasi halal pada periode tahun 2019-2022 (BPJPH, 2022). Pada 5 tahun terakhir, total produk yang telah mendapatkan izin edar dari BPOM adalah 804.646 produk sehingga berdasarkan data tersebut, sekitar 93% produk telah mendapatkan sertifikat halal dan akan terus meningkat setiap tahun (BPOM, 2023).

Salah satu produk yang sering menjadi perhatian terkait dengan status kehalalannya adalah gelatin. Gelatin merupakan produk hasil hidrolisis kolagen dari tulang, kulit, atau jaringan ikat hewan seperti sapi dan babi yang banyak digunakan sebagai *thickener*, pengemulsi, pembentuk busa, *edible film*, *stabilizer* dalam pembuatan es krim, permen, dan mayones. Gelatin juga digunakan dalam industri farmasi sebagai bahan pembuat kapsul (Fasya *et al.*,

2018). Berdasarkan data Badan Pusat Statistik, impor gelatin pada tahun 2020-2021 berturut-turut sebesar 1.290.306 kg dan 1.891.100 kg yang berasal dari beberapa negara seperti Australia, Brazil, Cina, Jerman, India, dan Amerika Serikat. Angka tersebut akan meningkat setiap tahunnya untuk memenuhi kebutuhan gelatin dalam negeri (Badan Pusat Statistik, 2022).

Sekitar 46% gelatin di luar negeri diproduksi dari bahan baku babi dan sisanya menggunakan bahan baku sapi atau bahan lainnya (Khirzin *et al.*, 2019). Hal inilah yang menjadi masalah bagi masyarakat muslim khususnya di Indonesia karena angka impor gelatin dari luar negeri yang masih tinggi dan keraguan akan sumber jenis hewan yang digunakan dalam produksi gelatin. Proses produksi di luar negeri juga belum sepenuhnya menerapkan konsep halal yang sesuai dengan syariat Islam. Hal tersebut yang menjadikan pemerintah Indonesia lebih peduli terhadap kehalalan produk yang beredar di pasaran. Namun dalam proses sertifikasi halal di Indonesia, proses telusur dokumen administrasi masih sangat mendominasi dibandingkan dengan pemeriksaan sampel secara langsung seperti pemeriksaan laboratorium yang hanya dilakukan jika terdapat bahan tertentu yang diragukan kehalalannya, padahal pemeriksaan laboratorium tentunya harus selalu dilakukan pada tiap proses produksi dalam rangka menjamin produk tersebut halal dari awal proses produksi hingga menjadi barang siap jual (Karimah, 2018).

Metode deteksi yang cepat, mudah, dan praktis akan membantu masyarakat dalam mengurangi kekhawatiran terhadap produk pangan yang terkontaminasi hal-hal haram, khususnya cecair babi. Salah satu metode

deteksi yang dapat dikembangkan untuk mempersingkat waktu uji dan mengurangi biaya pengujian adalah metode imunokromatografi. Aplikasi metode deteksi imunokromatografi murah dan cepat, serta terbukti sama atau bahkan lebih sensitif dibandingkan dengan metode deteksi lainnya (Masiri *et al.*, 2016). Imunokromatografi merupakan metode analisis kualitatif berbasis ikatan antigen-antibodi berbentuk *lateral flow test* yang dapat mendeteksi adanya target dalam sampel tanpa menggunakan alat khusus, sehingga metode ini juga sangat *user friendly* (Kuswandi *et al.*, 2017).

Pemilihan parameter dalam penggunaan suatu metode sangat penting untuk meningkatkan kualitas kinerja metode. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Safenkova *et al.* (2012), metode imunokromatografi *sandwich* telah digunakan untuk mendeteksi virus PVX (*potato virus X*). Penelitian tersebut menjelaskan bahwa terdapat beberapa parameter atau faktor yang dapat mempengaruhi batas deteksi dari strip imunokromatografi diantaranya adalah ukuran nanopartikel emas, konsentrasi antibodi, pH konjugasi, dan karakteristik membran yang digunakan. Pada penelitian tersebut didapatkan pemilihan pH pada saat konjugasi dapat mempengaruhi kekuatan pengikatan antibodi dengan nanopartikel emas. Penelitian tersebut melakukan konjugasi antibodi yang dihasilkan dari hewan uji tikus ke dalam 6 kondisi pH yang berbeda dan melihat kestabilan konjugat tanpa adanya presipitasi atau flokulasi. Pada perubahan pH 7,5 ke pH 10, terjadi penurunan konsentrasi antibodi pada kurva flokulasi dari 11 g/mL menjadi 6 g/mL, sehingga pada penelitian tersebut disimpulkan bahwa penggunaan pH yang tinggi pada saat

konjugasi akan menghasilkan konjugat antibodi-nanopartikel emas yang lebih stabil dalam jangka waktu yang lebih lama. Konsentrasi antibodi yang dikonjugasikan juga dapat mempengaruhi batas deteksi dari strip imunokromatografi. Pada penelitian tersebut didapatkan bahwa jika tingkat cakupan nanopartikel emas terhadap antibodi meningkat, maka situs pengikatan antigen dengan nanopartikel juga akan meningkat sehingga dapat menurunkan batas deteksi. Berdasarkan penjelasan tersebut, pemilihan pH saat konjugasi dan penggunaan konsentrasi sangat penting dalam pembuatan konjugat antibodi-nanopartikel emas dan dapat mempengaruhi batas deteksi pada strip uji. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh kondisi keasaman media (pH) saat konjugasi dan konsentrasi antibodi poliklonal kelinci terhadap stabilitas konjugat antibodi-nanopartikel emas yang akan diaplikasikan pada strip uji imunokromatografi (*Halal Test Kit*).

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, didapatkan rumusan masalah sebagai berikut: “Bagaimana pengaruh keasaman media dan konsentrasi antibodi terhadap stabilitas konjugat antibodi-nanopartikel emas (GNPs)?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Mengetahui pengaruh parameter keasaman media (pH) saat konjugasi dan konsentrasi antibodi yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas terhadap stabilitas konjugat antibodi-nanopartikel emas.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Mengetahui parameter keasaman atau nilai pH yang tepat dan sesuai pada saat konjugasi serta mengetahui parameter konsentrasi optimal antibodi poliklonal hasil induksi ke kelinci yang dapat dikonjugasikan dengan nanopartikel emas terhadap stabilitas konjugat antibodi-nanopartikel emas yang diaplikasikan pada strip imunokromatografi (*Halal Test Kit*).
2. Mengetahui kemampuan strip imunokromatografi (*Halal Test Kit*) untuk mendeteksi cemaran babi pada larutan kontrol gelatin dan larutan sampel secara spesifik.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Penulisan ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh berbagai kondisi keasaman media saat konjugasi dan konsentrasi antibodi yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas untuk melihat stabilitas konjugat antibodi-nanopartikel emas.

1.4.2. Manfaat Praktisi

Hasil penulisan ini dapat dijadikan sebagai acuan dalam menggunakan strip imunokromatografi pada saat pengujian, serta diharapkan juga dapat meningkatkan perhatian dan kewaspadaan masyarakat terhadap kehalalan produk-produk yang digunakan dalam kehidupan sehari-hari, terutama gelatin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Imunokromatografi

2.1.1. Definisi Imunokromatografi

Imunokromatografi adalah metode deteksi antigen atau antibodi spesifik pada sampel yang memanfaatkan prinsip reaksi imunologis, yaitu adanya ikatan antigen dan antibodi. Prinsip ini sama seperti ELISA *sandwich*, hanya saja reaksi imunologis terjadi sepanjang membran kapiler dengan bergantung pada migrasi mikro/nano partikel sepanjang membran kapiler sehingga dapat diaplikasikan dalam bentuk *strip test* (Jayalie *et al.*, 2016). Imunokromatografi biasa digunakan sebagai perangkat pengujian berdasarkan reaksi imunologi (interaksi antigen-antibodi) dan kromatografi (aksi kapiler) dari analit berlabel (nanopartikel emas) melalui beberapa membran, termasuk bantalan sampel, bantalan konjugat, bantalan deteksi dan bantalan penyerap (Srisrattakarn *et al.*, 2020).

2.1.2. Prinsip Imunokromatografi

Prinsip imunokromatografi didasarkan pada reaksi antigen-antibodi pada membran nitroselulosa yang ditunjukkan oleh perubahan pita warna yang terpasang pada nanopartikel emas. Antibodi akan digabungkan dengan nanopartikel emas melalui proses adsorpsi elektrostatik untuk membentuk konjugat antibodi-nanopartikel emas atau antibodi berlabel emas. Antigen akan disemprotkan pada garis uji

dan antibodi akan disemprotkan pada garis kontrol. Ketika antigen berikatan dengan antibodi, maka garis uji akan menjadi berwarna. Sebagaimana pada Gambar 2.1, larutan sampel ditambahkan ke bantalan sampel, mengalir ke arah bantalan penyerap, dan melewati bantalan konjugat yang mengandung antibodi berlabel nanopartikel emas. Jika larutan sampel mengandung zat yang akan diuji, maka antibodi berlabel emas akan bereaksi dengan antigen pada garis uji dan garis uji menjadi berwarna merah (Jiang *et al.*, 2018).

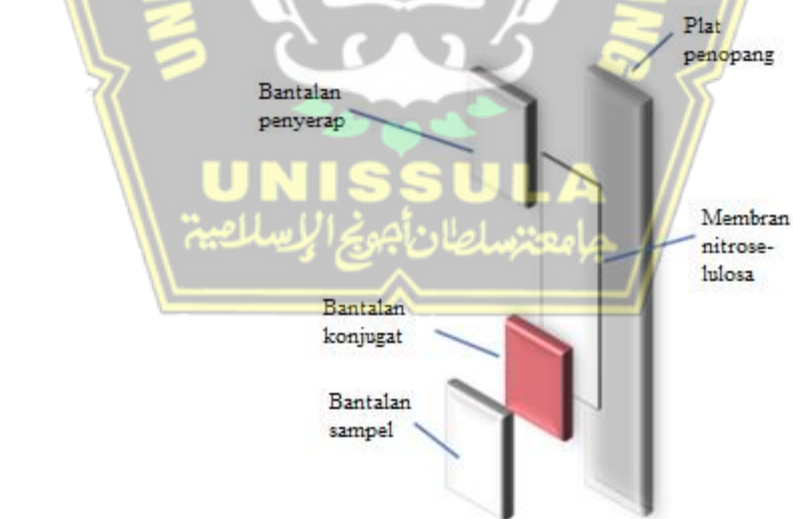


Secara umum, terdapat dua format dasar dalam imunokromatografi yaitu format *sandwich* dan format kompetitif, tergantung dari ukuran dan sifat molekul yang ditargetkan. Pada format *sandwich* biasa digunakan untuk menguji analit yang berukuran besar dan memiliki beberapa situs antigenik, sedangkan format kompetitif digunakan untuk menguji analit yang lebih kecil dan hanya memiliki satu situs antigenik saja, sehingga tidak dapat mengikat dua antibodi

secara bersamaan (Kuswandi *et al.*, 2017). Dalam imunokromatografi terdapat beberapa tahapan yang dilakukan untuk mendeteksi zat uji/analit pada sampel, yaitu (i) persiapan antibodi terhadap analit target, (ii) persiapan label, (iii) pelabelan molekul antibodi, (iv) perakitan semua komponen ke plat penopang, (v) aplikasi sampel dan mendapatkan hasil (Sajid *et al.*, 2015).

2.1.3. Komponen Imunokromatografi

Secara umum, imunokromatografi memiliki membran nitroselulosa sebagai membran kapiler, antibodi/antigen spesifik yang difiksasi pada garis uji T (*test line*), protein rekombinan/antibodi lain yang difiksasi di garis kontrol C (*control line*), dan antibodi yang dilabel dengan pewarna (Jayalie *et al.*, 2016).



Gambar 2.2. Skema komponen strip imunokromatografi
(Nuntawong *et al.*, 2022)

Imunokromatografi biasanya terbuat dalam bentuk strip yang dirakit dari beberapa komponen, sebagaimana pada Gambar 2.2, diantaranya yaitu:

a. *Backing card* atau plat penopang

Backing card atau plat penopang berfungsi untuk menyatukan komponen-komponen lain dari strip imunokromatografi sehingga strip lebih kokoh dan memungkinkan penggunaan strip menjadi lebih mudah. *Backing card* biasanya terbuat dari plastik polimer seperti polivinil klorida atau polisterena. Biasanya pada *backing card* yang dijual khusus untuk pembuatan strip *lateral flow assay* telah dilengkapi dengan perekat agar memudahkan pengguna untuk menempelkan komponen-komponen lain pada plat tersebut (Nuntawong *et al.*, 2022).

b. Bantalan sampel atau *sample pad*

Bantalan sampel atau *sample pad* adalah komponen yang berfungsi untuk menempatkan sampel. *Sample pad* biasanya terbuat dari selulosa atau serat kaca. Bantalan sampel harus mampu mengangkut sampel dengan baik dan homogen (Sajid *et al.*, 2015). Ukuran pori pada bantalan sampel harus homogen dan dilakukan preparasi terlebih dahulu (jika perlu) untuk mengontrol laju aliran dan mengurangi waktu pengujian (Nuntawong *et al.*, 2022).

d. Bantalan konjugat atau *conjugate pad*

Bantalan konjugat atau *conjugate pad* berfungsi sebagai tempat terakumulasinya molekul antibodi reporter yang siap dilepaskan jika ada cairan sampel yang melewatinya. Bantalan konjugat ini biasanya terbuat dari serat kaca, selulosa, atau bahan lainnya. Bahan bantalan konjugat harus dapat segera melepaskan konjugat antibodi yang berlabel setelah kontak dengan cairan sampel. Sifat bahan bantalan konjugasi memiliki efek pada pelepasan antibodi berlabel dan sensitivitas pengujian (Nuntawong *et al.*, 2022; Sajid *et al.*, 2015).

Daftar bahan yang dapat digunakan sebagai label dalam imunokromatografi sangat banyak contohnya nanopartikel emas, partikel magnetik, nanopartikel karbon, nanopartikel selenium, nanopartikel perak, fluorofor organik, pewarna tekstil, enzim, liposom dan lain sebagainya. Bahan apa pun yang digunakan sebagai label harus dapat dideteksi pada konsentrasi yang sangat rendah dan harus mempertahankan sifat-sifatnya pada saat konjugasi dengan molekul antibodi. Selain itu, kemudahan dalam konjugasi dengan antibodi dan stabil dalam periode waktu tertentu juga merupakan kriteria label yang baik (Sajid *et al.*, 2015). Salah satu label yang biasa digunakan dalam mengidentifikasi keamanan makanan adalah nanopartikel emas (*gold nanoparticles*). Nanopartikel emas memiliki sifat fisikokimia yang baik dan biokompatibel dengan

berbagai senyawa. Diameter nanopartikel emas yang digunakan dalam *immunoassay* bervariasi dari 1 hingga 100 nm, namun yang paling umum digunakan dalam kisaran 20–40 nm. Penggunaan nanopartikel emas juga dapat memangkas biaya menjadi lebih murah. Nanopartikel emas dapat disintesis menggunakan metode *Turkevich-Frens* dengan mereduksi asam kloroaurat (HAuCl_4) pada 100 °C dengan natrium sitrat (Mirica *et al.*, 2022).

e. Membran nitroselulosa

Membran nitroselulosa merupakan tempat terjadinya reaksi antara antigen dan antibodi. Ukuran pori membran nitroselulosa ini sangat mempengaruhi sensitivitas strip karena berhubungan dengan laju aliran kapilernya. Apabila laju alirnya rendah maka kemungkinan reaksi antigen dan antibodi menjadi lebih tinggi (Nuntawong *et al.*, 2022). Garis uji dan garis kontrol berada bagian membran ini. Pemberian bioreagen yang tepat, pengeringan dan pemblokiran berperan dalam meningkatkan sensitivitas pengujian (Sajid *et al.*, 2015).

f. Bantalan penyerap atau *absorbent pad*

Bantalan penyerap atau *absorbent pad* berfungsi sebagai wadah untuk menahan kelebihan cairan dari sistem agar laju aliran dapat berjalan dengan baik tanpa adanya cairan yang kembali ke komponen sebelumnya (Nuntawong *et al.*, 2022).

2.1.4. Keuntungan Penggunaan Imunokromatografi

Terdapat beberapa keuntungan dari metode pengujian menggunakan imunokromatografi yaitu memberikan hasil dalam waktu yang relatif cepat (15-20 menit), stabil dalam jangka panjang, dan relatif murah untuk diproduksi. Keunggulan tersebut membuat pengujian imunokromatografi cocok diaplikasikan langsung di tempat karena mudah digunakan dan tidak memerlukan bantuan instrumentasi khusus (Jayalie *et al.*, 2016; Kuswandi *et al.*, 2017).

2.1.5. Faktor Yang Dapat Mempengaruhi Kinerja Imunokromatografi

Parameter dalam strip imunokromatografi yang dapat mempengaruhi kualitas kinerja metode, antara lain:

- 1) ukuran nanopartikel emas (GNPs/ *gold nanoparticles*),
- 2) kondisi konjugasi antibodi dengan nanopartikel emas,
- 3) konsentrasi antibodi di zona penangkap,
- 4) efek penggunaan zat penghambat/ *blocking substances* dan buffer kimia yang berbeda dalam preparasi strip (Amini *et al.*, 2020).

Ukuran nanopartikel merupakan faktor kritis yang mempengaruhi sensitivitas metode jika menggunakan label nanopartikel emas, terutama akan mempengaruhi warna intensitas garis pada strip (Mirica *et al.*, 2022). Ukuran nanopartikel emas mempengaruhi sifat optik partikel, interaksi antara nanopartikel emas dengan antibodi, dan ikatannya dengan antigen yang dapat menyebabkan perubahan batas deteksi yang juga berpengaruh pada

sensitivitas metode (Safenkova *et al.*, 2012). Ketika nanopartikel emas disintesis, warna larutan HAuCl_4 berubah dari kuning menjadi merah anggur. Semakin besar ukuran nanopartikel emas maka warna larutan akan menjadi lebih gelap. Penggunaan nanopartikel emas dengan ukuran besar akan meningkatkan sensitivitas metode, namun konjugat menjadi kurang stabil (Amini *et al.*, 2020).

Selain ukuran nanopartikel emas, kondisi konjugasi antibodi-nanopartikel emas juga dapat mempengaruhi kinerja imunokromatografi. Dalam proses preparasi konjugat, pH nanopartikel emas dan jumlah antibodi memegang peranan penting agar kualitas kinerja metode tetap terjaga dengan baik. pH optimum untuk konjugasi adalah pH isoelektrik, karena di bawah titik ini, antibodi bermuatan positif akan bereaksi terhadap nanopartikel bermuatan negatif sehingga nanopartikel akan terakumulasi dan mempengaruhi kualitas pelepasan konjugat. Apabila pH dikondisikan di atas titik isoelektrik, antibodi bermuatan negatif akan menolak nanopartikel dan konjugasi tidak akan terjadi. Oleh karena itu, metode pengendapan yang diinduksi garam digunakan untuk menentukan pH nanopartikel emas yang optimal dan jumlah antibodi yang sesuai untuk pembuatan konjugat antibodi-nanopartikel emas yang stabil. Ketika pH nanopartikel emas berada pada titik isoelektrik, antibodi akan diserap ke permukaan nanopartikel emas melalui reaksi ionik dan hidrofobik sehingga dengan penambahan garam konsentrasi tinggi maka tidak akan terjadi aglomerasi. Muatan

di sekitar nanopartikel akan semakin negatif dengan meningkatnya pH dan toleransi nanopartikel emas terhadap garam juga akan meningkat. Akibatnya antibodi tidak dapat mengikat nanopartikel dengan baik dan menyebabkan pengendapan nanopartikel pada tahap pembentukan konjugat sehingga konjugat yang dihasilkan tidak akan stabil. (Amini *et al.*, 2020).

Konjugasi antara antibodi dan nanopartikel emas dapat terjadi melalui *cross-linker* atau adsorpsi langsung. Antibodi terikat kuat pada permukaan nanopartikel emas karena adanya gaya elektrostatik dari nanopartikel emas yang bermuatan negatif dan antibodi yang bermuatan positif. Adsorpsi langsung antibodi ke permukaan nanopartikel emas tergantung pada pH, titik isoelektrik, dan konsentrasi protein. Titik isoelektrik antibodi adalah sekitar 7 sehingga antibodi dapat mempertahankan konfigurasi dan bioaktivitasnya pada kondisi pH yang dekat dengan titik isoelektriknya. Kondisi koloid nanopartikel emas dengan pH 7 merupakan kondisi keasaman optimum untuk adsorpsi protein (Suherman *et al.*, 2020).

Spesifisitas dan sensitivitas metode adalah parameter yang sangat penting dalam penggunaan imunokromatografi sebagai metode deteksi cemaran babi pada produk makanan. Spesifisitas metode imunokromatografi dipengaruhi oleh karakteristik dari antibodi yang digunakan, sedangkan sensitivitas dipengaruhi oleh karakteristik komponen strip yang berhubungan dengan laju aliran dari sistem. Laju

aliran pada strip imunokromatografi dikontrol oleh ukuran pori, hidrofilitas, dan perlakuan awal dari bahan yang digunakan, khususnya pada komponen *sample pad* (bantalan sampel) dan membran nitroselulosa yang berperan besar dalam mengontrol laju aliran sistem strip imunokromatografi (Nuntawong *et al.*, 2022).

2.2. Antibodi Poliklonal

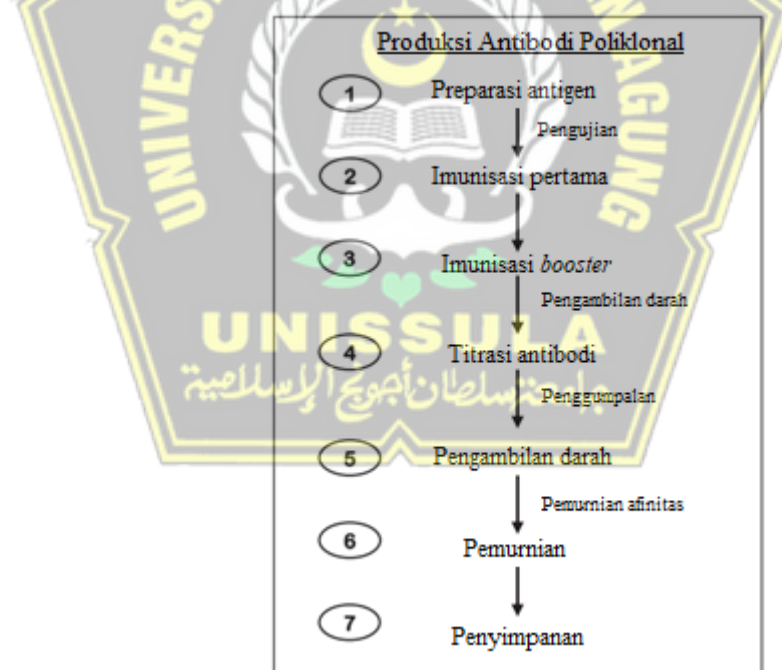
2.2.1. Definisi Antibodi Poliklonal

Antibodi adalah protein alami yang berfungsi sebagai entitas pengikat antigen pada membran sel limfosit B, yang juga disekresikan oleh sel plasma. Antibodi yang disekresikan berfungsi untuk melawan infeksi virus dan zat patogen lainnya. Ketika antigen masuk ke dalam tubuh, sistem kekebalan berperan untuk menghasilkan banyak antibodi yang dapat menargetkan antigen tersebut. Antibodi poliklonal adalah beberapa imunoglobulin yang merespon epitop yang berbeda pada molekul antigen. Antibodi poliklonal biasa diterapkan untuk melacak berbagai pencemaran pada bahan pangan serta hasil olahannya (Cruse & Lewis, 2010; Fusvita *et al.*, 2016).

2.2.2. Produksi Antibodi Poliklonal

Produksi antibodi merupakan ciri khas dari respon imun adaptif. Antibodi diproduksi untuk menetralkan atau menghilangkan antigen atau patogen. Antibodi diproduksi oleh limfosit B setelah berdiferensiasi menjadi sel plasma. Produksi antibodi poliklonal umumnya dilakukan pada mamalia dari proses imunisasi. Kriteria

pemilihan hewan model untuk meningkatkan produksi antibodi poliklonal didasarkan pada dua variabel penting yaitu tujuan penggunaan antibodi poliklonal dan jumlah antiserum yang dibutuhkan. Jika volume atau jumlah antiserum diperlukan dalam jumlah besar, maka hewan yang lebih besar atau hewan perah dapat dipilih sebagai hewan produksinya. Hewan yang sering digunakan sebagai produksi antibodi poliklonal diantaranya kambing, kuda, marmut, kelinci, hamster, tikus, domba, dan ayam. Kelinci dan mencit merupakan hewan laboratorium yang paling umum digunakan sebagai produksi antibodi (Fusvita *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2013).



Gambar 2.3. Tahapan produksi antibodi poliklonal
(Singh *et al.*, 2013)

Prinsip produksi antibodi poliklonal adalah hewan harus dipapar atau diimunisasi dengan antigen tertentu atau antigen yang telah

dimurnikan. Tahapan produksi antibodi poliklonal dapat terbagi menjadi empat langkah, sebagaimana tercantum pada Gambar 2.3.

Tahapan produksi antibodi yaitu:

- a) Persiapan antigen, dimana antigen harus disiapkan menggunakan FCA (*Freund's Complete Adjuvant*) atau FIA (*Freund's Incomplete Adjuvant*);
- b) Imunisasi, dimana hewan disuntikkan antigen yang tersedia secara subkutan dan diberikan dosis *booster* pada interval waktu tertentu;
- c) Titrasi antibodi, dimana proses ini akan memberikan informasi untuk menentukan dosis *booster* dan waktu pengumpulan antibodi;
- d) Permurnian, dimana proses tersebut yang dilakukan jika pada antibodi masih terdapat protein serum atau plasma yang dapat mengganggu hasil sintesis (Singh *et al.*, 2013).

Penggunaan larutan FCA (*Freund's Complete Adjuvant*) atau FIA (*Freund's Incomplete Adjuvant*) sebagai adjuvan berfungsi untuk memperlambat pengeluaran antigen dari tubuh sehingga produksi antibodi akan semakin bertambah. Larutan *Freund's Adjuvant* terdiri dari minyak mineral, zat pengemulsi, dan *Mycobacterium tuberculosis* yang telah dimatikan. Perbedaan antara larutan FCA (*Freund's Complete Adjuvant*) dengan FIA (*Freund's Incomplete Adjuvant*) terletak pada ada atau tidaknya bakteri. Antigen yang dimasukkan atau diimunisasikan ke dalam hewan uji akan merangsang produksi antibodi oleh sel B sehingga serum darah yang diambil dari hewan uji akan

menghasilkan banyak antibodi yang akan bereaksi dengan antigen. Setelah diimunisasi dan dilakukan pengambilan darah terakhir, didapatkan serum darah kelinci yang mengandung banyak antibodi. Antibodi yang dihasilkan akan dievaluasi secara kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan teknik seperti imunodifusi, hemaglutinasi, imunoelektroforesis, SDS-PAGE, *western blot*, *dot blot*, atau ELISA. Kemudian dilakukan purifikasi atau pemurnian menggunakan metode seperti *ion exchange*, kromatografi afinitas, pengendapan dengan amonium sulfat, atau menggunakan metode asam kaprilat untuk menghilangkan protein-protein lain dalam darah sehingga didapatkan protein spesifik yaitu imunoglobulin G atau IgG. IgG merupakan antibodi yang merespon bakteri dan virus yang memiliki konsentrasi paling tinggi dalam serum dan biasa digunakan sebagai bahan uji laboratorium (Bunyamin *et al.*, 2015; Sohrabi *et al.*, 2011).

2.2.3. Karakteristik Antibodi Poliklonal

Struktur dasar antibodi terdiri dari dua rantai polipeptida yang berbeda. Idealnya setiap antibodi mengandung dua salinan identik dari rantai berat (55 kb) dan rantai ringan (28 kb). Rantai berat dan rantai ringan disatukan oleh ikatan disulfida serta interaksi non-kovalen lainnya (Singh *et al.*, 2013). Imunoglobulin G atau IgG merupakan salah satu antibodi yang berperan penting dalam kekebalan tubuh karena merupakan antibodi utama dalam darah dan cairan ekstraseluler

(Agustina, 2017). Berat molekul IgG berkisar antara 150-160 kDa (Fusvita *et al.*, 2016).

2.2.4. Keuntungan Penggunaan Antibodi Poliklonal

Penggunaan antibodi poliklonal dalam *immunoassay* memiliki keuntungan yaitu lebih sensitif dibandingkan antibodi monoklonal. Hal ini dikarenakan antibodi poliklonal memiliki kemampuan pengikatan heterogen yang dapat mengikat target antigen atau epitop yang lebih beragam. Selain itu antibodi poliklonal lebih mudah larut dan mudah disimpan karena antibodi poliklonal bersifat lebih resisten terhadap perubahan lingkungan (suhu dan pH) dibandingkan dengan antibodi monoklonal (Ascoli & Aggeler, 2018). Proses produksi antibodi poliklonal juga lebih mudah dibandingkan dengan proses produksi antibodi monoklonal yang membutuhkan waktu yang lebih lama karena proses imunisasi yang lebih kompleks dan memerlukan peralatan yang canggih sehingga membutuhkan biaya yang lebih besar (Nugroho *et al.*, 2021).

2.2.5. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Antibodi Poliklonal

Beberapa faktor yang penting untuk diperhatikan pada proses produksi antibodi poliklonal adalah sebagai berikut:

a. Persiapan antigen

Kualitas dan kuantitas antigen yang akan digunakan merupakan hal penting dalam produksi antibodi. Apabila terdapat senyawa lain atau senyawa pengotor dalam antigen walaupun

hanya berjumlah sangat sedikit (<1%) akan menyebabkan hasil antibodi yang memiliki aktivitas imun melawan senyawa pengotor dibandingkan dengan antigen yang diinginkan, sehingga perlu dilakukan pemurnian antigen agar antibodi yang dihasilkan benar-benar spesifik terhadap antigen (Leenaars & Hendriksen, 2005).

b. Pemilihan hewan uji

Pemilihan hewan uji dalam produksi antibodi penting untuk mempertimbangkan hal-hal berikut:

- 1) jumlah antibodi yang diperlukan,
- 2) kemudahan dalam memperoleh sampel darah,
- 3) hubungan filogenetik antara antigen dan spesies hewan,
- 4) tujuan penggunaan antibodi.

Penggunaan hewan uji yang telah dewasa juga sangat dianjurkan karena memiliki respon imun tubuh yang kuat dibandingkan hewan dengan usia muda dan tua. Selain itu, status kesehatan hewan uji pun juga harus dipertimbangkan. Penggunaan hewan yang bebas penyakit akan mengurangi terjadinya reaktivitas silang terhadap antigen lain (Leenaars & Hendriksen, 2005).

c. Pemilihan dan persiapan adjuvan

Adjuvan digunakan untuk menginduksi respon imun yang lebih efektif untuk memproduksi antibodi. Adjuvan yang biasa digunakan dalam produksi antibodi poliklonal adalah *Freund's Complete Adjuvant* (FCA), *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA),

garam aluminium (seperti Al(OH)_3 , AlPO_4), Quil A, Iscoms, Montanide, TiterMax™, and RIBI™. FCA sangat banyak digunakan dalam produksi antibodi karena dapat menginduksi banyak antibodi dengan berbagai tipe antigen (Leenaars & Hendriksen, 2005).

d. Protokol imunisasi

Protokol imunisasi dapat dilakukan berbeda berdasarkan hewan uji dan adjuvan yang digunakan. Pemilihan rute imunisasi juga didasarkan pada karakteristik dan volume antigen yang akan diinjeksikan. Rute injeksi yang sering digunakan untuk produksi antibodi poliklonal adalah: subkutan (s.c.), intradermal (i.d.), intramuskular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), dan intravena (i.v.). Pemilihan rute imunisasi dipengaruhi oleh hewan uji yang digunakan, misalnya pada hewan uji pengerat seperti tikus, mencit, hamster tidak direkomendasikan melalui rute intradermal, sedangkan pada hewan uji kelinci tidak direkomendasikan pemilihan rute intraperitoneal. Pemilihan rute injeksi intravena dan intraperitoneal juga tidak direkomendasikan untuk imunisasi *booster* karena dapat meningkatkan risiko *shock* anafilaksi pada hewan. Pemilihan volume antigen yang diinjeksi juga harus diperhatikan. Penggunaan antigen dengan volume kecil sangat dianjurkan dalam produksi antibodi (Leenaars & Hendriksen, 2005).

e. Pengamatan setelah imunisasi

Setelah imunisasi, hewan harus dipantau setiap hari dan diperiksa untuk efek samping tertentu minimal tiga kali per minggu (Leenaars & Hendriksen, 2005).

2.3. Antigen

Antigen merupakan agen infeksi berupa mikroorganisme, partikel, sel, atau molekul yang dapat memicu respon imun. Secara khusus, antigen atau imunogen adalah zat yang mampu merangsang sel B, sel T, atau keduanya dari respon imun tubuh. Antigen dapat diartikan juga sebagai zat yang bereaksi dengan produk respon imun yang dirangsang oleh imunogen spesifik, termasuk antibodi dan/atau reseptor limfosit T (Cruse & Lewis, 2010).

2.4. Gelatin

2.4.1. Definisi Gelatin

Kata gelatin berawal dari bahasa latin “*gelatus*” yang berarti kaku atau beku. Gelatin adalah produk turunan kolagen yang diperoleh dengan hidrolisis dari kulit, tulang, dan jaringan ikat hewan yang bersifat transparan, tidak berasa, serta tidak berwarna (Rehman *et al.*, 2016).

2.4.2. Sumber Gelatin

Bahan baku produksi gelatin umumnya berasal dari bahan hewani, seperti sapi, babi, beberapa ikan, unggas, unta, atau bahkan hewan amfibi seperti katak dan juga salamander. Umumnya 29,4% berasal dari kulit sapi, 46% produksi gelatin berasal dari kulit babi,

sekitar 23,1% berasal dari campuran tulang babi dan sapi, dan sisanya 1,5% berasal dari ikan. Adapun gelatin nabati atau gelatin yang berasal dari tumbuhan juga dapat digunakan sebagai alternatif gelatin hewani. Contoh gelatin nabati antara lain adalah konjak (yang biasa digunakan dalam masakan Jepang), *yam* atau ubi rambat, agar rumput laut, karagenan, pektin, pati jagung, dan sebagainya (Alipal *et al.*, 2019).

2.4.3. Macam Gelatin

Secara umum, terdapat dua jenis gelatin berdasarkan cara pembuatannya, yaitu gelatin tipe A dan gelatin tipe B. Gelatin tipe A merupakan gelatin yang diproses melalui *pre-treatment* asam sebelum didenaturasi dan memiliki titik isoelektrik pada pH 6-9. Gelatin tipe A biasanya berasal dari kulit babi atau ikan. Gelatin Tipe B adalah gelatin yang melalui proses *pre-treatment* alkali dan memiliki titik isoelektrik pada pH 4,7–5,5. Gelatin tipe B berasal dari kulit sapi (Alipal *et al.*, 2019; Noor *et al.*, 2021). Selain berbeda dari segi bahan baku pembuatan kolagen, kedua tipe gelatin tersebut juga mengandung komponen ikatan α , ikatan β , dan ikatan γ dengan berat molekul yang bervariasi dari 10-400 kDa. Berat molekul ikatan/ rantai α berkisar antara 80-125 kDa, ikatan/ rantai β berkisar antara 160-250 kDa, dan ikatan/ rantai γ berada pada kisaran 250-300 kDa (Panjaitan, 2016; Pertiwi *et al.*, 2018). Hal tersebut juga mempengaruhi kekuatan gel antara kedua tipe gelatin. Gelatin tipe A memiliki distribusi fraksi berat molekul yang lebih luas (10-200 kDa) dengan ukuran peptida yang

lebih kecil dibandingkan dengan Tipe B. Adapun pada gelatin tipe B, sebagian besar fraksi berat molekul berada pada kisaran 100 kDa yang berkontribusi pada kekuatan pembentuk gel yang tinggi pada gelatin tipe B (Noor *et al.*, 2021; Rehman *et al.*, 2016).

2.4.4. Karakteristik Gelatin

Gelatin dapat berbentuk lembaran, kepingan, atau serbuk tergantung ukuran partikel pembentuknya. Gelatin stabil saat kering, namun mudah terurai mikroba jika sudah dilarutkan atau dalam keadaan lembab (Aris *et al.*, 2020). Sifat fisik gelatin tergantung pada sifat kimianya, seperti distribusi berat molekul dan komposisi asam aminonya. Gelatin dengan kandungan asam amino glisin dan prolin yang tinggi akan memiliki kekuatan gel atau viskositas yang tinggi (Cahyaningrum *et al.*, 2021). Secara fisik, gelatin tidak berasa, transparan atau bening, dan tidak berwarna atau berwarna kuning pucat. Gelatin dapat menyerap banyak air sekitar 5-10 kali dari beratnya. Gelatin dapat larut dalam air panas dan akan membentuk gel jika didinginkan. Karakteristik yang dimiliki gelatin bergantung pada jenis asam amino penyusunnya. Gelatin tersusun dari 18 asam amino yang saling terikat satu sama lain. Susunan asam amino gelatin sendiri berupa triplet peptida, yaitu Glisin-X-Y, dimana X adalah asam amino prolin dan Y adalah asam amino hidroksiprolin (Suryani *et al.*, 2009).

2.4.5. Produksi Gelatin

Gelatin dihasilkan dari hidrolisis kolagen secara parsial menggunakan bantuan larutan asam atau basa dan juga pemanasan. Penggunaan larutan asam atau basa dalam pembuatan gelatin menyebabkan pemotongan ikatan silang protein pada kolagen sehingga strukturnya menjadi putus dan mudah larut dalam air. Potongan rantai protein yang larut air tersebutlah yang akan menjadi gelatin (Aris *et al.*, 2020). Adapun tahapan yang dilakukan untuk produksi kolagen adalah proses *pre-treatment* dengan mengeliminasi kalsium (*demineralisasi*), protein non-kolagen (*deproteinizing*), dan lemak (*defatting*), kemudian diekstraksi serta dilakukan pemurnian gelatin (Wardhani *et al.*, 2017).

2.4.6. Pemanfaatan Gelatin

Gelatin banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri baik industri pangan maupun non pangan. Gelatin sering dimanfaatkan sebagai bahan pembentuk busa, pengental, *stabilizer*, pembentuk gel dalam produk *marshmallow*, jeli, permen, dan es krim (Febryana *et al.*, 2018). Dalam industri farmasi, gelatin umumnya dimanfaatkan sebagai bahan cangkang kapsul untuk obat dan juga sebagai bahan penyalut (*coating agent*) untuk melapisi produk farmasi yang kurang stabil (Aris *et al.*, 2020). Gelatin juga digunakan dalam industri non-pangan seperti industri kosmetik. Gelatin digunakan untuk menstabilkan emulsi dan pengental dalam produk shampoo, *lotion*, sabun, masker wajah, lipstik,

krim wajah, dan cat kuku (Andela *et al.*, 2019; Aris *et al.*, 2020; Febryana *et al.*, 2018).

2.5. Validasi Metode

Validasi metode adalah penilaian terhadap suatu parameter tertentu pada percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut telah memenuhi persyaratan dan tujuan penggunaannya (Harmono, 2020). USP (*United States Pharmacopeia*) telah menerbitkan pedoman khusus mengenai prosedur validasi setiap parameter analitis dan membagi metode menjadi empat kategori berdasarkan penggunaannya dalam bab 1225. Kategori tersebut adalah sebagai berikut berikut:

1. Kategori I: Prosedur analitis untuk kuantisasi komponen utama atau bahan aktif (termasuk pengawet) dalam produk farmasi.
2. Kategori II: Prosedur analitis untuk penentuan pengotor dalam obat atau senyawa yang terdegradasi dalam produk farmasi. Prosedur ini meliputi uji kuantitatif dan uji batas.
3. Kategori III: Prosedur analitis untuk penentuan karakteristik kinerja (misalnya: disolusi, pelepasan obat, uji sterilitas).
4. Kategori IV: Uji identifikasi (Lopez *et al.*, 2011).

Berdasarkan ketentuan validasi prosedur analitis yang dikeluarkan oleh ICH (*International Conference of Harmonization*), terdapat 4 karakteristik atau parameter kinerja yang utama pada metode yang digunakan untuk mengevaluasi kinerja prosedur analitis. Karakteristik atau parameter kinerja tersebut adalah sebagai berikut:

1. Spesifisitas/ selektivitas.
2. Batas *range* kinerja (batas deteksi dan batas kuantifikasi).
3. Akurasi dan presisi.
4. Ketahanan (*robustness*) (ICH, 2022).

Pada penelitian yang dilakukan Masiri *et al.* (2016), validasi metode dilakukan pada *lateral flow device* (LFD) adalah dengan menentukan sensitivitas (LOD), rentang dinamis pengujian, dan spesifisitas (analisis reaksi silang). Pada penelitian tersebut, penentuan LOD dilakukan menggunakan ekstrak campuran daging babi dan sapi dalam larutan garam 0,9% yang dilarutkan dalam larutan buffer. Pengujian dilakukan hingga 60 kali sampai sinyal warna mulai terlihat jelas. Hasil pengujian didapatkan bahwa pada kontaminasi 0,001% daging babi dalam daging sapi, tidak ada strip uji yang terbaca positif atau menunjukkan sinyal. Namun pada kontaminasi 0,01% didapatkan hasil positif 100% mengandung cemaran daging babi. Hasil pengujian dikonfirmasi dengan mengulangi tes hingga sebanyak dua puluh kali. Berdasarkan hasil tersebut, LOD yang didapatkan adalah 0,01% berupa kontaminasi daging babi mentah pada sampel daging sapi. Pengujian spesifitas metode dilakukan dengan mencampur daging babi dengan daging dari hewan lain seperti ayam, kalkun, sapi, domba, kambing, dan kuda lalu diekstraksi dan dievaluasi menggunakan strip imunokromatografi yang dibuat. Berdasarkan hasil tersebut, tidak terdeteksi adanya reaktivitas silang dari semua spesies hewan yang dicampurkan dalam sampel daging, sehingga terlihat bahwa

metode tersebut spesifik untuk mendeteksi kontaminasi daging babi (Masiri *et al.*, 2016).

2.6. Spesifisitas Metode

Spesifisitas menunjukkan kemampuan metode analisis untuk menentukan analit tertentu pada sampel secara spesifik dan tidak terpengaruh oleh adanya pengotor. Pengujian spesifisitas dapat dilakukan dengan menggunakan hasil pengukuran sampel yang ditambahkan pengotor atau eksipien lain yang dibandingkan dengan hasil pengukuran sampel tanpa penambahan apapun. Spesifisitas metode ditunjukkan dengan derajat kesesuaian dari kedua hasil pengukuran tersebut (Ramadhan & Musfiroh, 2021). Pada pengujian spesifitas, metode dapat dilihat dari reaktivitas silang (*cross-reactivity*) yang terjadi selama pengujian. Pada penelitian Masiri *et al.* (2016) yang mengidentifikasi kontaminasi daging babi yang telah dicampur dengan berbagai daging dari hewan lainnya, didapatkan hasil bahwa tidak terdeteksi adanya reaktivitas silang dari semua spesies hewan yang dicampurkan dalam sampel daging. Pengujian menggunakan serum albumin babi juga didapatkan hasil tidak terjadi reaksi silang, sehingga terlihat bahwa metode tersebut spesifik untuk mendeteksi kontaminasi daging babi.

2.7. Konsep Halal dan Haram

Dalam ajaran Islam disebutkan bahwa semua umat muslim diwajibkan untuk menggunakan dan mengonsumsi produk atau makanan yang berasal dari bahan yang halal. Halal berarti diperbolehkan dalam bahasa Arab. Namun dalam Al-Qur'an dan hadist, halal tidak hanya diartikan sebagai produk yang

disiapkan dengan prosedur dan bahan yang sesuai dengan hukum Islam, tetapi juga bermanfaat bagi tubuh secara fisik maupun psikis dan membawa kebaikan (*thayyib*) (Aransyah *et al.*, 2019).

Al-Qur'an telah menjelaskan bahan-bahan atau makanan yang halal (boleh dikonsumsi) dan yang haram (tidak boleh dikonsumsi). Terdapat lima parameter kehalalan untuk memastikan produk yang kita konsumsi atau gunakan, khususnya produk makanan, antara lain:

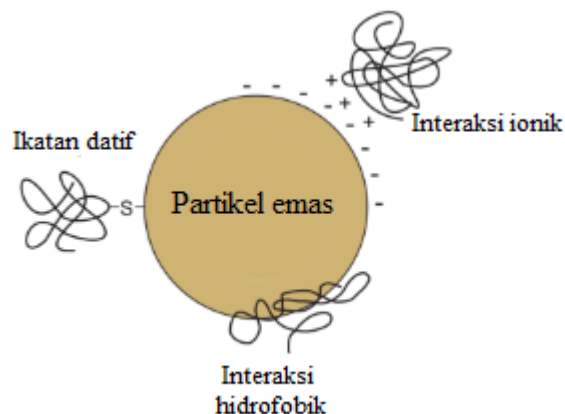
- 1) tidak mengandung babi atau turunannya,
- 2) tidak mengandung anggur, alkohol, atau zat terkait lainnya,
- 3) produk yang berasal dari daging harus disembelih berdasarkan tata cara dalam syariat Islam,
- 4) tidak mengandung zat terlarang yang dianggap najis, seperti bangkai, segala jenis darah, organ manusia, sampah, dan lain-lain,
- 5) proses penyimpanan, penjualan, pengolahan, pengelolaan, dan pengangkutan pangan halal tidak menggunakan alat yang digunakan untuk babi atau barang haram lainnya (Firdausi *et al.*, 2020).

2.8. Hubungan antara Keasaman Media dan Konsentrasi Antibodi yang Digunakan dengan Stabilitas Konjugat Antibodi-Nanopartikel Emas

Optimalisasi parameter uji pada metode imunokromatografi sangat penting dilakukan agar hasil deteksi yang didapatkan baik dan akurat. Salah satu parameter yang dapat dioptimalkan untuk mendapatkan kualitas deteksi yang baik adalah kondisi konjugasi antibodi dengan nanopartikel emas (GNPs) (Amini *et al.*, 2020). Keberhasilan konjugasi sangat penting dalam pembuatan

strip imunokromatografi. Konjugat yang stabil dapat membantu meminimalkan pengikatan nonspesifik dan meningkatkan keakuratan hasil sehingga perlu untuk mengoptimalkan kondisi dalam pembuatan konjugat yang stabil (Momeni *et al.*, 2022).

Dalam proses konjugasi, diperlukan interaksi antara antibodi dan nanopartikel emas agar molekul antibodi dapat menempel dan berikatan dengan permukaan nanopartikel emas sehingga terbentuk konjugat antibodi dan nanopartikel emas. Interaksi yang terjadi dapat berupa interaksi fisik dan interaksi kimia. Interaksi fisik antara antibodi dan nanopartikel emas bergantung pada: (i) daya tarik ionik antara nanopartikel emas yang bermuatan negatif dan antibodi yang bermuatan positif; (ii) daya tarik hidrofobik antara antibodi dan permukaan nanopartikel emas; dan (iii) ikatan kovalen antara keduanya. Interaksi kimia dapat tercapai dengan beberapa cara diantaranya adalah (i) melalui kemisorpsi dengan bantuan turunan tiol; (ii) melalui penggunaan penghubung bifungsional; dan (iii) menggunakan bantuan molekul adaptif (Jazayeri *et al.*, 2016). Pembentukan kompleks protein (antibodi) dan nanopartikel emas bergantung pada beberapa interaksi, diantaranya adalah: (i) daya tarik elektronik antara nanopartikel emas yang bermuatan negatif dan situs bermuatan positif pada molekul protein, (ii) pengikatan protein terhadap permukaan nanopartikel emas secara hidrofobik, dan (iii) pengikatan nanopartikel emas dengan atom sulfhidril, oksigen, atau nitrogen melalui pasangan elektron tidak terbagi yang membentuk ikatan datif (Hermanson, 2013), sebagaimana pada Gambar 2.4 berikut.



Gambar 2.4. Interaksi protein dan partikel emas
(Hermanson, 2013)

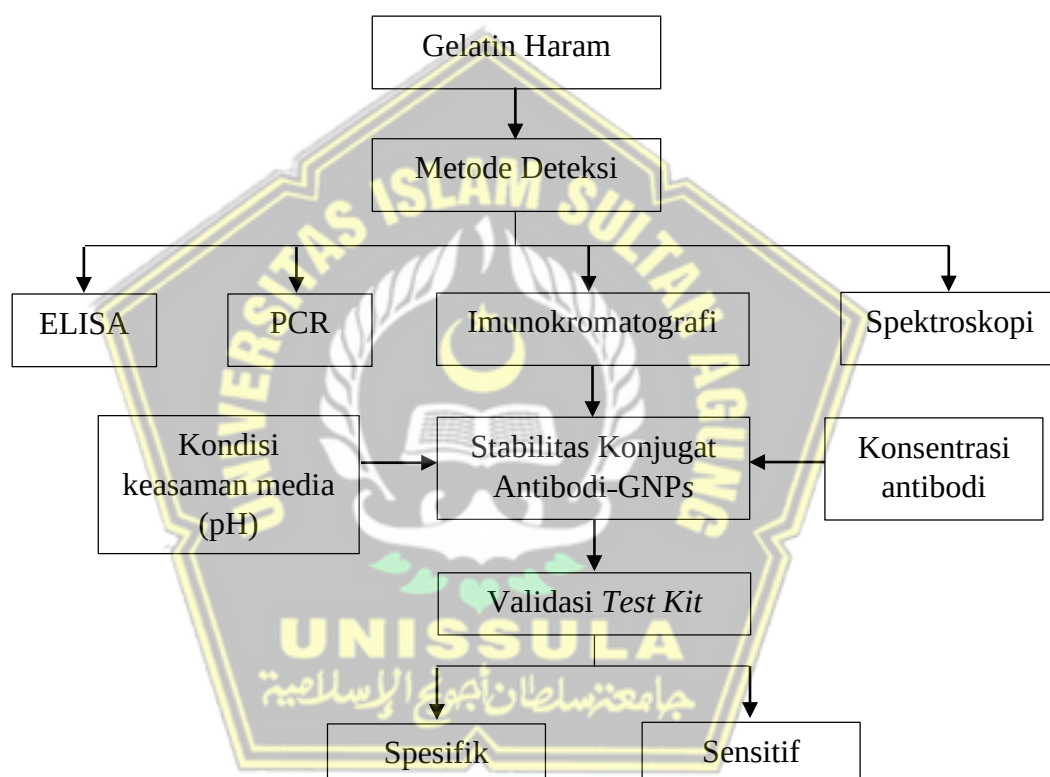
Antibodi dapat secara fisik berkonjugasi pada permukaan nanopartikel emas dengan interaksi elektrostatis. Antibodi yang terprotonasi pada kondisi pH yang optimum akan membentuk ikatan ionik dengan nanopartikel emas yang bermuatan negatif. Pada saat proses konjugasi, apabila campuran nanopartikel emas dan antibodi tidak jenuh, larutan akan berubah warna dari merah menjadi biru-ungu kehitaman ketika ditambahkan larutan garam. Hal tersebut menunjukkan ketidakstabilan konjugat sehingga terjadi agregasi pada nanopartikel emas (Fan *et al.*, 2016). Agregasi pada nanopartikel emas juga bergantung pada konsentrasi antibodi. Biasanya konsentrasi minimum antibodi dipilih untuk mencegah agregasi nanopartikel karena adanya kelebihan garam. Namun selama larutan konjugat berubah warna menjadi biru-ungu kehitaman, keadaan tersebut mengindikasikan bahwa jumlah antibodi yang ditambahkan belum cukup untuk menstabilkan nanopartikel emas. Apabila cakupan antibodi pada permukaan nanopartikel emas tinggi, maka jumlah situs pengikatan konjugat dengan antigen pun juga semakin tinggi, sehingga batas deteksi dapat diminimalkan (Safenkova *et al.*, 2012).

Pada penelitian yang dilakukan Lou *et al.* (2012) dijelaskan bahwa stabilitas konjugat antibodi dan larutan nanopartikel emas dipengaruhi oleh perbedaan pH dan konsentrasi antibodi. Perubahan warna larutan konjugat setelah ditambahkan larutan NaCl 1% mengindikasikan bahwa perbedaan pH dan konsentrasi antibodi menyebabkan efek yang berbeda pada hasil konjugasi. Penelitian tersebut menggunakan 4 ukuran nanopartikel berbeda (14; 16; 35; dan 38 nm) yang masing-masing memiliki kondisi konjugasi yang berbeda-beda. Apabila pengaturan pH saat konjugasi kurang optimal maka larutan konjugat akan berubah warna dari merah menjadi biru karena adanya agregasi yang menyebabkan larutan konjugat menjadi tidak stabil saat digunakan dalam pengujian. Hasil penelitian tersebut menyebutkan bahwa semakin kecil ukuran nanopartikel akan membutuhkan kondisi pH yang lebih tinggi untuk melakukan konjugasi dibandingkan dengan nanopartikel yang berukuran lebih besar.

Pada penelitian Byzova *et al.* (2017) yang dilakukan untuk menentukan konsentrasi minimal antibodi untuk sintesis konjugat yang memiliki aktivitas penangkapan antigen yang terbaik. Terdapat dua jenis antibodi yang digunakan, yaitu antibodi monoklonal untuk deteksi bakteri *H. pylori* dan antibodi poliklonal untuk deteksi IgG tikus. Hasilnya menyatakan bahwa konsentrasi antibodi monoklonal untuk konjugasi dapat diturunkan hingga sekitar 6 kali dari konsentrasi optimal. Namun pada antibodi poliklonal, konsentrasi yang digunakan untuk konjugasi merupakan konsentrasi antibodi yang optimal untuk menstabilkan larutan nanopartikel emas. Konsentrasi

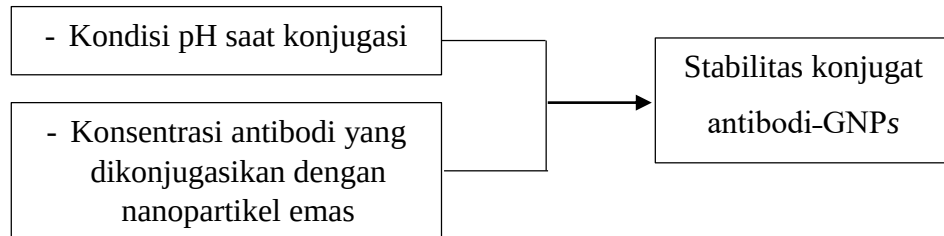
tersebut dapat bervariasi tiap pengujian sesuai dengan hasil kurva flokulasinya. Penggunaan konsentrasi antibodi di bawah konsentrasi optimal untuk konjugasi tidak biasa digunakan pada pengujian yang menggunakan metode *sandwich* karena peningkatan konsentrasi reaktan dapat menyebabkan peningkatan batas deteksi.

2.9. Kerangka Teori



Gambar 2.5. Kerangka teori

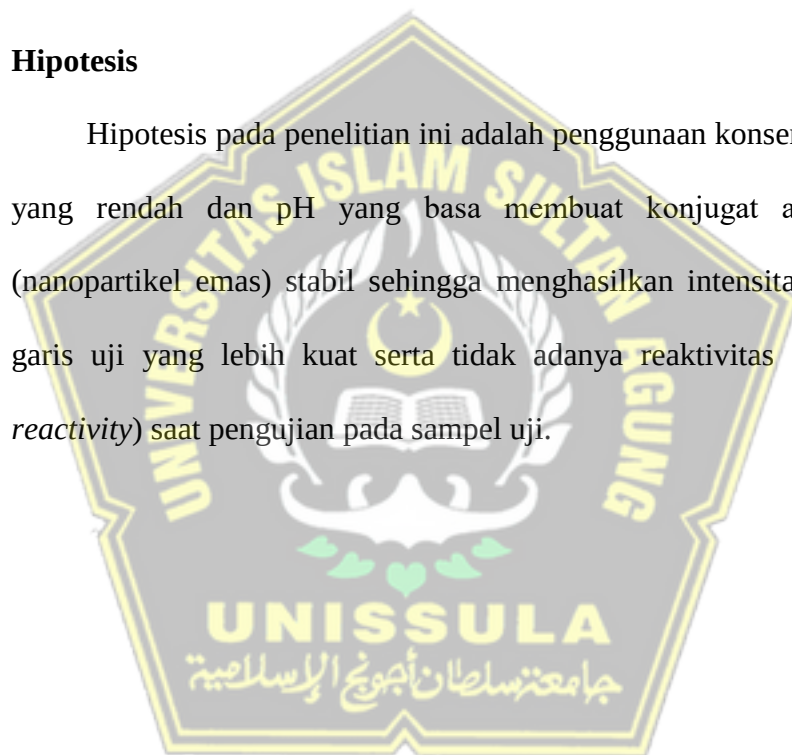
2.10. Kerangka Konsep



Gambar 2.6. Kerangka konsep

2.11. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah penggunaan konsentrasi antibodi yang rendah dan pH yang basa membuat konjugat antibodi-GNPs (nanopartikel emas) stabil sehingga menghasilkan intensitas warna pada garis uji yang lebih kuat serta tidak adanya reaktivitas silang (*cross-reactivity*) saat pengujian pada sampel uji.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen (*experimental*), yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali atau terkontrol. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan faktorial 2 faktor, yaitu kombinasi antara kondisi keasaman media (pH) saat konjugasi dan konsentrasi antibodi poliklonal yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas pada strip imunokromatografi (*Halal Test Kit*).

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel Bebas

Kondisi keasaman media (pH) saat konjugasi dan konsentrasi antibodi poliklonal yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas pada strip imunokromatografi (*Halal Test Kit*).

3.2.1.2. Variabel Terikat

Stabilitas konjugat antibodi dan nanopartikel emas (GNPs) yang digunakan pada strip kromatografi (*Halal Test Kit*).

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Keasaman media saat konjugasi adalah kondisi pH pada saat proses sintesis konjugat antibodi-nanopartikel emas. Nilai pH yang digunakan adalah 6; 7; 8.

Skala data: interval.

3.2.2.2. Konsentrasi antibodi adalah konsentrasi antibodi poliklonal *anti-Swine IgG* yang diambil dari plasma darah kelinci yang telah diproses sebelumnya yang akan dikonjugasikan dengan nanopartikel emas (dalam satuan ng/mL).

Skala data: rasio.

3.2.2.3. Stabilitas konjugat antibodi dan nanopartikel emas adalah kemampuan konjugat untuk mempertahankan ikatan antara antibodi dan nanopartikel emas sehingga tidak terjadi agregasi dengan mengevaluasi secara visual intensitas warna larutan dan berdasarkan nilai absorbansi.

Skala data: ordinal.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah strip imunokromatografi yang dibuat dengan ukuran 6 cm x 0,5 cm.

3.3.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah strip imunokromatografi yang dibuat dengan mengkondisikan strip dalam berbagai variasi pH atau keasaman media pada saat konjugasi (6;7;8) dan variasi konsentrasi antibodi poliklonal yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas.

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cellulose fiber sample pad* yang dibeli dari Merck Millipore (Billerica, MA, AS), *glass fiber conjugated pad* yang dibeli dari Merck Millipore (Darmstadt, Jerman), *Hi-Flow™ Plus 120 membrane cards* yang dibeli dari Merck Millipore (Burlington, MA, AS), mikropipet yang memiliki kapasitas 0-10 µL; 10-100 µL; 100-1000 µL yang diproduksi oleh DLAB Scientific (Beijing, China), *96-well microplate* yang diproduksi oleh Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Austria), alat sentrifugasi 24 lubang dengan kapasitas 1,5-2 mL (dengan *range* kecepatan 200-15.000 rpm dan *range* suhu yang dapat diatur mulai dari -20 °C sampai 40 °C) yang diproduksi oleh Hermle Labortechnik

(Jerman), ELISA reader (dengan *range* panjang gelombang monokromator 200-1000 nm dan kecepatan deteksi menggunakan 96-well plate adalah ± 6 detik) yang diproduksi oleh Thermo Scientific™ (Göteborg, Swedia), lemari pendingin (LG, Korea Selatan), *microtube*, mikrotip, strip indikator pH universal produksi Merck Millipore (Darmstadt, Jerman), gelas ukur, labu ukur, dan batang pengaduk produksi Pyrex Glassware, pipet tetes produksi OneMed, tabung reaksi produksi Iwaki LabWare, penggaris berukuran 30 cm, gunting.

3.4.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan nanopartikel emas 40 nm yang diproduksi oleh Sigma-Aldrich (Jerman), antibodi poliklonal *rabbit anti-swine* IgG yang diperoleh dari hasil imunisasi gelatin babi pada kelinci, antibodi poliklonal *goat anti-rabbit* IgG produksi ABclonal (Woburn, MA, AS), kalium karbonat (K_2CO_3), natrium klorida (NaCl), Tween-20, dan natrium azida (NaN_3) produksi Merck Millipore (Darmstadt, Jerman), *bovine serum albumin* (BSA) produksi HiMedia (Kenner Square, PA, AS), akuades, larutan buffer Tris-HCl, larutan *phosphate buffer saline* (PBS), ELISA kit yang diproduksi oleh Fine Test (Wuhan Fine Biotech, China), gelatin sapi produksi Sigma (St. Louis, MO, AS), gelatin babi produksi Sigma Aldrich (St. Louis, MO, AS), produk *jelly* yang ada di pasaran.

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Pembuatan Reagen *Halal Test Kit*

3.5.1.1. Pengambilan antibodi poliklonal

Antibodi poliklonal diproduksi oleh kelinci yang diimunisasi dengan gelatin babi. Kelinci disuntik secara intradermal menggunakan 10 mg gelatin babi yang dilarutkan dengan 0,2 mL larutan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dan 0,2 mL larutan FCA (*Freund's Complete Adjuvant*) selama 3 hari berturut-turut. Imunisasi kedua dilakukan setelah 7 hari imunisasi pertama dengan disuntik secara subkutan menggunakan 10 mg gelatin babi yang dilarutkan dalam 0,5 mL larutan PBS dan 0,5 mL larutan FIA (*Freund's Incomplete Adjuvant*). Pengambilan darah dilakukan setiap 2 hari setelah imunisasi pertama dan dilakukan pada sinus orbitalis mata kelinci. Darah yang telah diambil diendapkan dalam *microtube* yang telah berisi larutan EDTA 10% (10 gr EDTA dilarutkan ke dalam akuades hingga 100 mL di dalam labu ukur) dengan perbandingan 1 mL darah : 0,01 mL EDTA 10% selama kurang lebih 1 jam. Setelah itu, *microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 150 menit pada suhu ruang untuk mendapatkan plasma. Permurnian antibodi dilakukan menggunakan metode presipitasi dan

dialisis. Kadar antibodi diukur menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Proses penelitian ini telah mendapatkan lulus uji etik atau *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran/ Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan nomor dokumen No. 441/XI/2022/Komisi Bioetik.

3.5.1.2. Sintesis konjugat antibodi poliklonal-nanopartikel emas

3.5.1.2.1. Preparasi larutan antibodi

Antibodi poliklonal (konsentrasi tertinggi dari hasil imunisasi gelatin babi terhadap kelinci) diencerkan menggunakan larutan *antibody dilution buffer* hingga 8 kali pengenceran pada 8 *microtube* yang berbeda. Pengenceran dilakukan dengan mencampurkan 120 μL antibodi dan larutan *antibody dilution buffer* sebanyak 120 μL . Larutan antibodi tersebut dimasukkan ke dalam *microtube* I. Kemudian dari *microtube* I, larutan diambil sebanyak 120 μL , dimasukkan ke dalam *microtube* II, dan diencerkan kembali menggunakan larutan *antibody dilution buffer* sebanyak 120 μL . Pengenceran tersebut dilakukan terus menerus hingga 8 kali pengenceran dan didapatkan 8 *microtube* dengan konsentrasi antibodi yang berbeda.

3.5.1.2.2. Perhitungan konsentrasi antibodi dengan metode ELISA

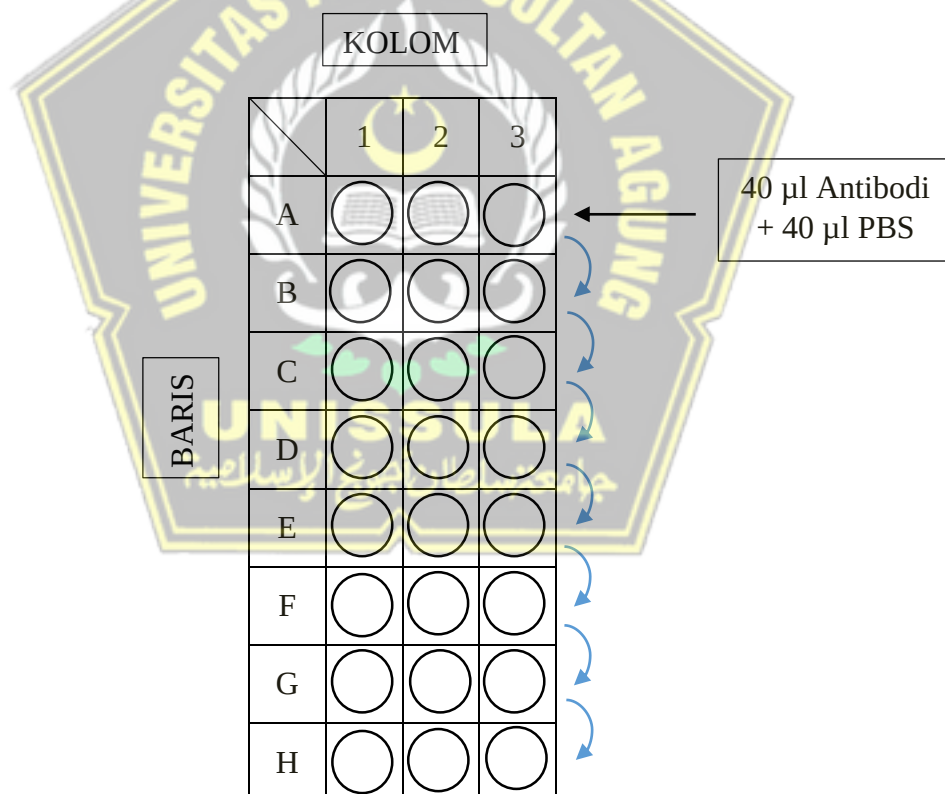
Larutan standar *rabbit* IgG sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam *plate* sumuran. Larutan antibodi yang telah dipreparasi pada poin 3.5.1.3.1 dimasukkan ke dalam sumuran masing-masing 100 μ L. Sumuran kemudian ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Sumuran dicuci tiga kali menggunakan *wash buffer* dan didiamkan selama satu menit. Kemudian HRP-*conjugated goat anti-rabbit* IgG ditambahkan pada sumuran masing-masing 100 μ L, kemudian sumuran ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah diinkubasi, sumuran dicuci lima kali dengan *wash buffer* dan didiamkan selama 1-2 menit. Larutan 3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine* (TMB) lalu ditambahkan ke dalam sumuran masing-masing 90 μ L dan diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 10-20 menit. Sumuran kemudian ditambahkan *stop solution* masing-masing 50 μ L. Pembacaan kadar dilakukan pada panjang gelombang 450 nm menggunakan ELISA *reader*.

3.5.1.2.3. Pengenceran antibodi

Antibodi poliklonal (IgG kelinci yang telah diinduksi gelatin babi) sejumlah 40 μ L dimasukkan ke dalam lubang sumuran pada 96-well *microplate* dan

ditambahkan 40 μL larutan PBS lalu dihomogenkan. Campuran tersebut diambil sebanyak 40 μL lalu dimasukkan ke dalam lubang sumuran pada baris selanjutnya dan ditambahkan larutan PBS sebanyak 40 μL kemudian dihomogenkan. Pengenceran dilakukan terus menerus hingga baris terakhir pada *microplate* (baris H) dan direplikasi pada kolom 2 dan 3. Ilustrasi gambaran pengenceran antibodi pada *well microplate* tersaji pada

Gambar 3.1.

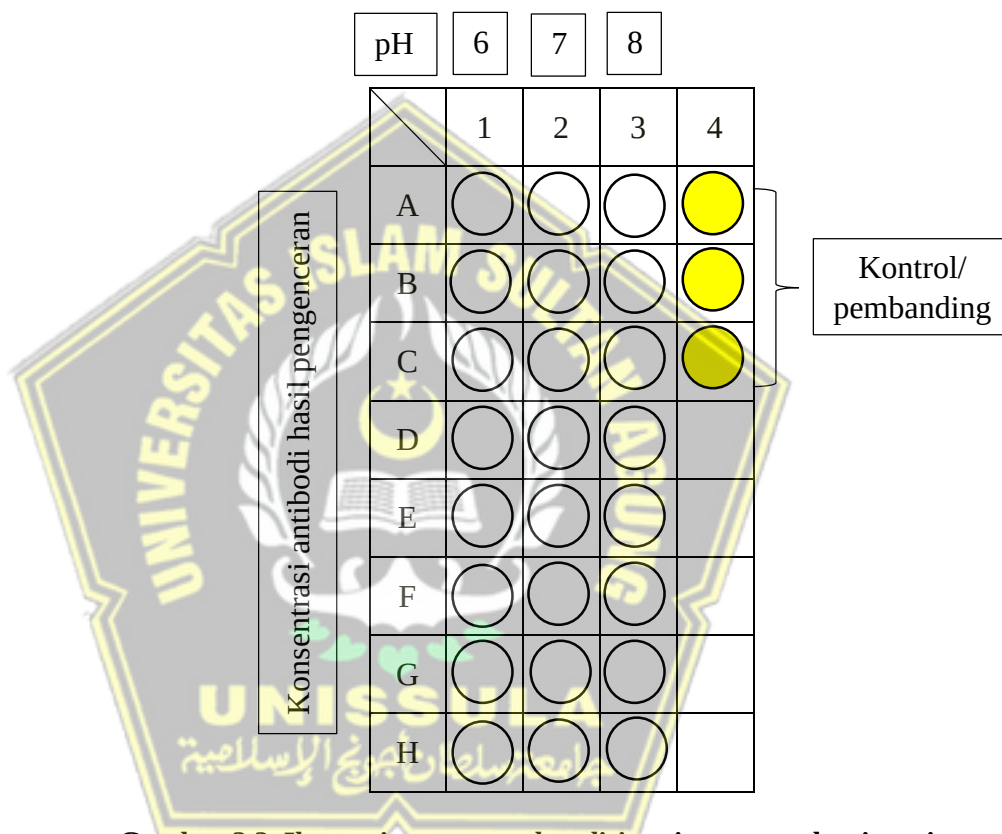


Gambar 3.1. Ilustrasi pengenceran antibodi

3.5.1.2.4. Penentuan pH dan konsentrasi antibodi yang optimum

Sebanyak 2 mL larutan GNP (*gold nanoparticles*) dimasukkan dalam 3 *microtube* dan ditambahkan larutan K_2CO_3 untuk mengatur pH 6 (3 μ L) pada *microtube* I, pH 7 (6 μ L) pada *microtube* II, dan pH 8 (12 μ L) pada *microtube* III. Nilai pH dipastikan menggunakan indikator pH universal. Masing-masing larutan dimasukkan sebanyak 200 μ L ke dalam sumuran 96-well *microplate* yang telah diberi antibodi pada poin 3.5.1.3.3 sebelumnya dan dihomogenkan. Larutan GNP dengan pH 6 dimasukkan ke lubang sumuran kolom ke 1, larutan GNP dengan pH 7 dimasukkan ke lubang sumuran kolom ke 2, dan larutan GNP dengan pH 8 dimasukkan ke lubang sumuran kolom ke 3. Pada kolom ke 4 yang kosong (tanpa antibodi), larutan GNP berbagai pH dimasukkan ke 3 lubang sumuran berbeda sebagai kontrol atau pembanding. Larutan konjugat tersebut kemudian didiamkan selama sekitar 15 menit pada suhu ruang. Kemudian setiap sumuran ditambahkan 40 μ L larutan NaCl 10% (10 gr NaCl dilarutkan ke dalam 100 mL akuades) dan ditunggu hingga larutan berubah warna. Jumlah antibodi dalam menstabilkan nanopartikel emas dalam berbagai pH tersebut dievaluasi dengan

pengamatan perubahan warna larutan dari merah menjadi ungu atau biru. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 580 nm. Berikut Gambar 3.2 merupakan gambaran ilustrasi penentuan kondisi optimum saat konjugasi pada *microplate*.



Gambar 3.2. Ilustrasi penentuan kondisi optimum saat konjugasi

3.5.1.2.5. Pembuatan konjugat antibodi poliklonal-nanopartikel emas dengan pH dan konsentrasi antibodi yang telah optimum

Sebanyak 50 μ L antibodi dengan kondisi optimal hasil pengujian pada poin 3.5.1.3.3 dilarutkan menggunakan larutan GNP sebanyak 0,5 mL di dalam *microtube*.

Larutan konjugat didiamkan pada suhu ruang selama 45 menit. Larutan BSA 1% ditambahkan sebanyak 0,5 mL kemudian didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Campuran lalu disentrifugasi dengan kecepatan 9000xg selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan pelet dilarutkan kembali dalam 50 µL larutan Tris buffer.

3.5.2. Preparasi Komponen Strip *Halal Test Kit*

Bantalan sampel dibuat dengan ukuran 15 x 5 mm dipreparasi menggunakan larutan buffer borat 50 mM dengan pH 7,4, yang mengandung 1% BSA, 0,5% Tween-20, dan 0,05 % natrium azida (1 gr BSA; 0,05 gr natrium azida; 0,5 mL Tween-20 dilarutkan ke dalam 100 mL larutan buffer borat) pada suhu kamar selama kurang lebih 24 jam. Bantalan konjugat dibuat dengan ukuran 8 x 5 mm dan dipreparasi dengan larutan konjugat antibodi-nanopartikel emas (*gold nanoparticles*) sebanyak 50 µL, lalu dikeringkan pada suhu kamar selama kurang lebih 24 jam. Antibodi poliklonal yang telah disiapkan ditetaskan ke membran nitroselulosa sebagai reagen penangkap pada garis uji (*test line*) dan antibodi poliklonal *goat anti-rabbit IgG* sebagai reagen penangkap pada garis kontrol (*control line*), lalu dikeringkan pada suhu ruang.

3.5.3. Perakitan Strip *Halal Test Kit*

Komponen strip yang telah dipreparasi sebagaimana pada poin 3.5.2 dipasang pada lapisan plat plastik sebagai strip dengan ukuran 6 cm x 5 mm. Setiap komponen dibuat tumpang tindih sebesar kira-kira 2 mm untuk memastikan larutan bermigrasi dengan baik selama pengujian. Strip uji yang dibuat tersaji pada Gambar 3.3.

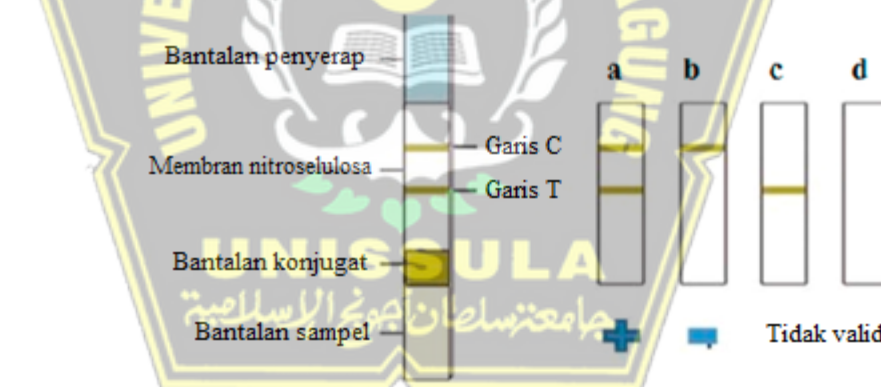


Gambar 3.3. Skema strip uji

3.5.4. Validasi Metode *Halal Test Kit*

Validasi metode yang diujikan adalah parameter spesifisitas dengan melihat kemampuan strip uji untuk mendeteksi cemaran babi pada larutan kontrol yaitu larutan gelatin babi murni dan larutan gelatin sapi murni. Serbuk gelatin babi dan sapi masing-masing ditimbang sebanyak 5 gr, kemudian dilarutkan ke dalam akuades sebanyak 10 mL dan dipanaskan hingga meleleh dan tercampur sempurna. Kemudian sebanyak 1 mL larutan sampel dipindahkan ke dalam *microtube* untuk mempermudah pencelupan. Bantalan sampel pada strip dicelupkan ke

dalam larutan sampel sampai batas, lalu ditunggu 10-15 detik agar cairan sampel menyerap sempurna. Kemudian strip uji diangkat dan diletakkan di atas permukaan rata dan steril, ditunggu 2-10 menit supaya sampel akan bermigrasi hingga ke ujung strip lainnya, lalu dievaluasi secara visual. Jika terdapat garis berwarna pada garis T (*test line*) dan garis C (*control line*) maka sampel menunjukkan adanya komponen babi. Namun jika hanya muncul garis berwarna tunggal pada garis C maka sampel menunjukkan tidak adanya komponen daging babi. Apabila tidak ada garis warna yang muncul atau adanya garis warna tunggal pada garis T maka pengujian dianggap tidak valid dan harus diulang, sebagaimana pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4. Interpretasi hasil warna strip imunokromatografi
(Kuswandi *et al.*, 2017)

3.5.5. Aplikasi Pengujian Sampel Menggunakan *Halal Test Kit*

Sampel uji yang digunakan berupa beberapa produk *jelly* yang beredar di pasaran. Sampel sebanyak 5 gr dihancurkan lalu dilarutkan ke dalam akuades sebanyak 10 mL dan dipanaskan hingga meleleh dan tercampur sempurna. Kemudian sebanyak 1 mL larutan sampel

dipindahkan ke dalam *microtube* untuk mempermudah pencelupan. Bantalan sampel pada strip dicelupkan ke dalam larutan sampel sampai batas, lalu ditunggu 10-15 detik agar cairan sampel menyerap sempurna. Kemudian strip uji diangkat dan diletakkan di atas permukaan rata dan steril, ditunggu 2-10 menit supaya sampel akan bermigrasi hingga ke ujung strip lainnya, lalu dievaluasi secara visual.

3.6. Alur Penelitian



Gambar 3.5. Alur penelitian

3.7. Tempat dan Waktu

3.7.1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

3.7.2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan selama kurun waktu 4 bulan, dimulai pada bulan Februari hingga Mei 2023.

3.8. Analisis Hasil

Data hasil penelitian dianalisis secara kualitatif dengan melihat perubahan warna pada larutan konjugat setelah penambahan larutan garam (NaCl 10%) untuk menentukan kondisi optimum konjugat sebelum digunakan pada strip uji dan menilai spesifisitas strip dengan melihat adanya titik merah di titik kontrol dan/ titik uji pada strip imunokromatografi untuk mendeteksi cemaran babi pada sampel.



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dalam kurun waktu 4 bulan, yaitu Februari - Mei 2023.

4.1.1. Perhitungan Kadar Antibodi dengan Metode ELISA

Berdasarkan hasil analisis kadar antibodi dengan metode ELISA didapatkan bahwa konsentrasi menurun seiring dengan pengenceran yang dilakukan, kecuali pada pengenceran ke 3 yang mengalami peningkatan konsentrasi. Data hasil analisis kadar antibodi IgG tersaji pada Tabel 4.1.

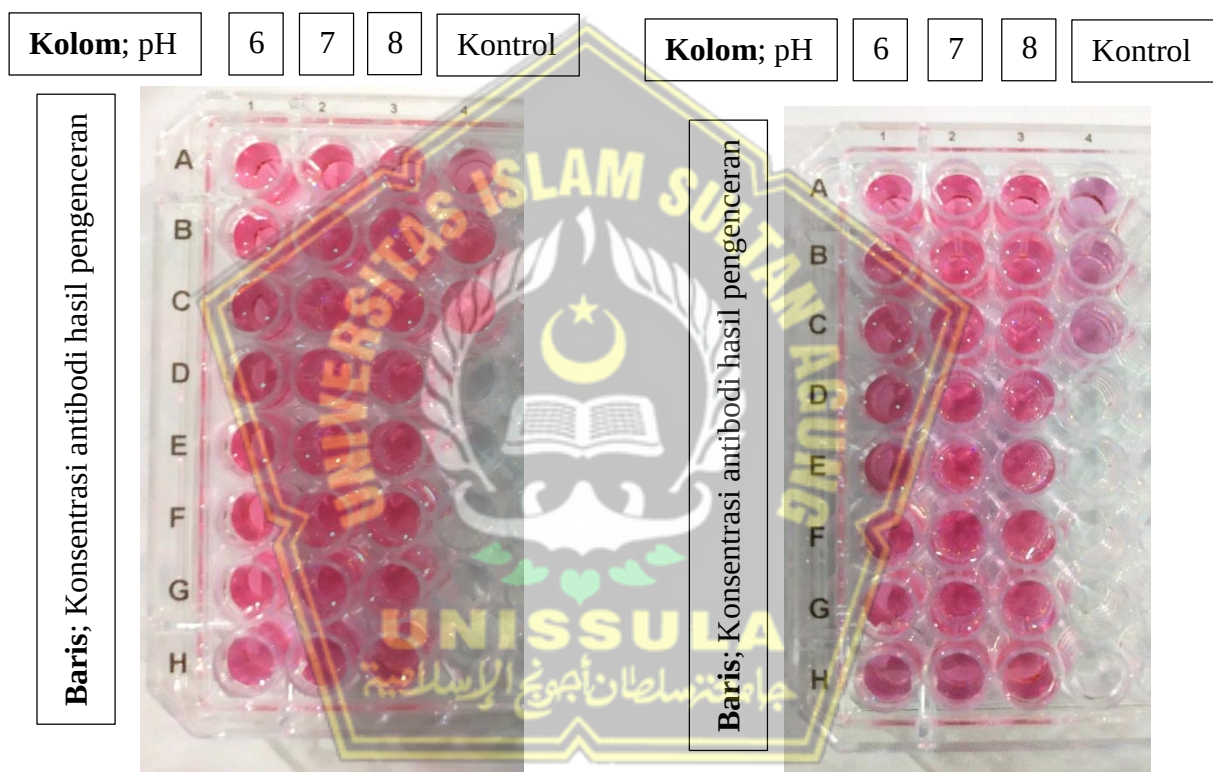
Tabel 4.1. Hasil Kadar IgG Pada Setiap Pengenceran Antibodi dengan Metode ELISA

Seri Pengenceran ke-	Absorbansi	Kadar IgG (ng/mL)
1	3,4731	84,48
2	3,3323	79,91
3	3,3951	81,94
4	3,2896	78,54
5	3,2626	77,68
6	3,1881	75,31
7	3,1799	75,05
8	3,1419	73,85

Keterangan: 1= 0 kali pengenceran; 2= 2 kali pengenceran; 3= 4 kali pengenceran; 4= 8 kali pengenceran; 5= 16 kali pengenceran; 6= 32 kali pengenceran; 7= 64 kali pengenceran; 8= 128 kali pengenceran.

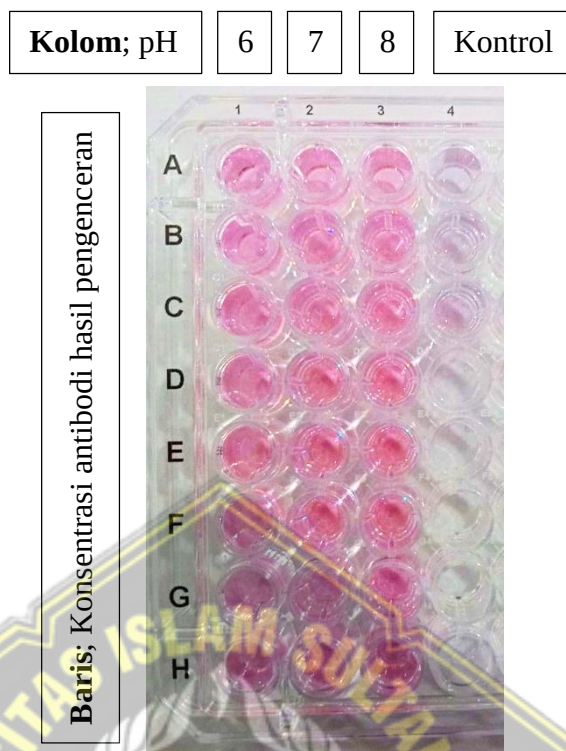
4.1.2. Penentuan pH dan Konsentrasi Antibodi Optimum saat Konjugasi

Gambar 4.1 menunjukkan kondisi awal konjugat sebelum ditambahkan larutan NaCl 10%, Gambar 4.2 menunjukkan kondisi konjugat 20 menit (A) setelah penambahan larutan NaCl 10%, dan Gambar 4.3 menunjukkan kondisi konjugat kurang lebih 2 jam (B) setelah penambahan larutan NaCl 10%.



Gambar 4.1. Sebelum penambahan NaCl 10%

Gambar 4.2. Sesudah penambahan NaCl 10% (A)



Gambar 4.3. Sesudah penambahan NaCl 10% (B)

Pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3 terlihat bahwa pada saat penambahan larutan NaCl 10% terjadi perubahan warna larutan nanopartikel emas yang awalnya berwarna merah muda menjadi ungu pada beberapa sumuran. Pada Kolom 4 (baris paling kanan) yang merupakan larutan nanopartikel emas tanpa antibodi terlihat perubahan warna yang sangat signifikan yaitu dari merah muda menjadi ungu (setelah 20 menit penambahan NaCl 10%) dan hampir tidak berwarna (setelah 2 jam penambahan NaCl 10%). Hal tersebut menunjukkan terjadinya agregasi pada nanopartikel emas karena tidak adanya antibodi yang berikatan dengan nanopartikel. Berbeda dengan perubahan warna pada Baris D-F; Kolom 2 dan 3 di Gambar 4.3, larutan menunjukkan perubahan warna merah gelap setelah 2 jam

penambahan larutan NaCl 10% yang mengindikasikan pada kondisi tersebut larutan konjugat lebih stabil.

Hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 580 nm yang dilakukan pada Baris D-F yang memiliki warna merah yang stabil tersaji pada Tabel 4.2. berikut.

Tabel 4.2. Data Absorbansi pada Panjang Gelombang 580 nm

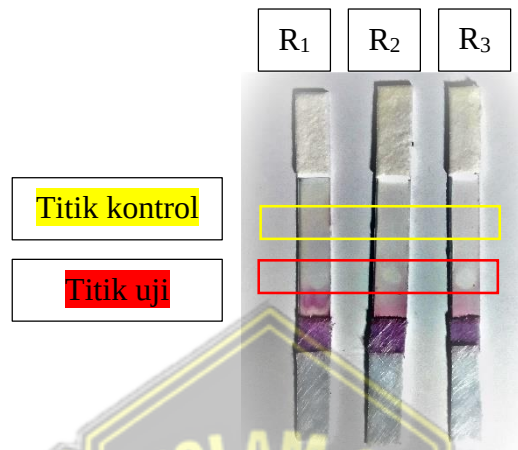
	pH 6	pH 7	pH 8
D	0,1195	0,1208	0,1203
E	0,1244	0,1226	0,1231
F	0,1291	0,1285	0,1325

Berdasarkan data, nilai absorbansi tertinggi terdapat pada Kolom 3; Baris F sebesar 0,1325. Nilai absorbansi tersebut menunjukkan kemampuan antibodi untuk menstabilkan sejumlah nanopartikel emas dan tidak adanya koagulasi (perubahan warna). Kondisi yang dipilih sebagai kondisi optimum untuk pembuatan konjugat antibodi dan nanopartikel emas berdasarkan hasil tersebut adalah pada pH 8 (Kolom 3) yang menjadi pH yang optimum dengan konsentrasi antibodi sebanyak 75,31 ng/mL (Baris F) yang menjadi konsentrasi optimum.

4.1.3. Validasi *Halal Test Kit*

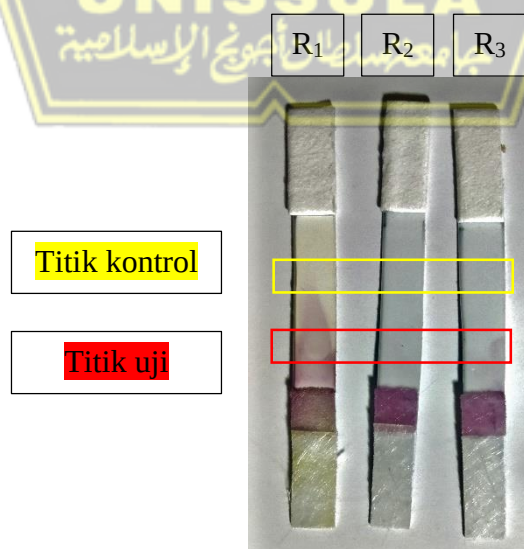
Validasi *Halal Test Kit* dilakukan pada kelompok kontrol yang terdiri dari gelatin sapi murni dan gelatin babi murni. Hasil pengujian tersebut dievaluasi berdasarkan adanya warna merah pada kedua titik/garis, yaitu titik uji dan titik kontrol pada strip. Pada kontrol gelatin sapi murni, hasil uji yang didapatkan invalid, karena pada strip R₁, R₂, dan R₃ terdapat “ghost line” pada titik uji, namun tidak ada bercak

warna merah pada titik kontrol (*control line*) sebagaimana tersaji pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Hasil Uji Kontrol Gelatin Sapi Murni

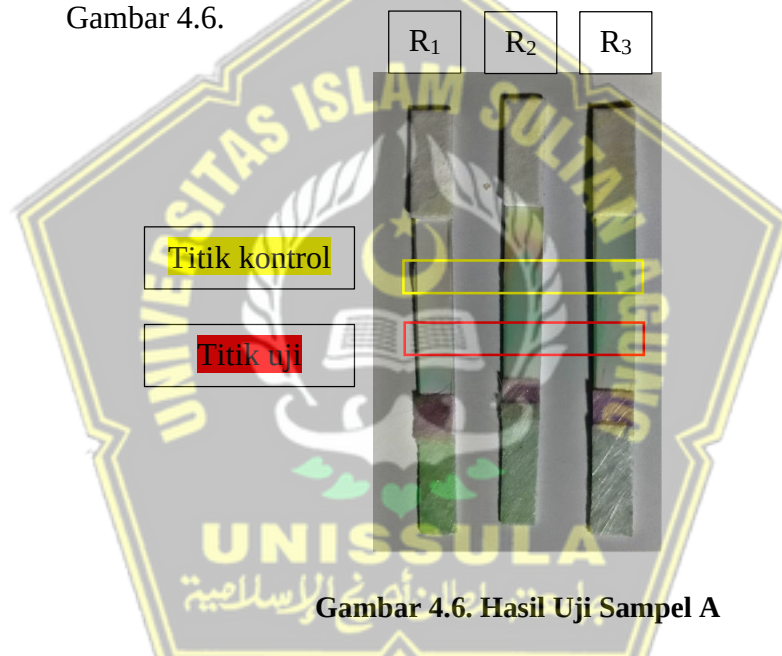
Sama halnya dengan hasil uji kontrol gelatin sapi murni, hasil uji kontrol gelatin babi murni juga invalid, karena pada R₁ hanya terdapat bercak warna pada titik uji, sedangkan pada R₂ dan R₃ tidak ada bercak warna merah pada titik uji (*test line*) maupun titik kontrol (*control line*) sebagaimana pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Hasil Uji Kontrol Gelatin Babi Murni

4.1.4. Aplikasi Pengujian Sampel Menggunakan *Halal Test Kit*

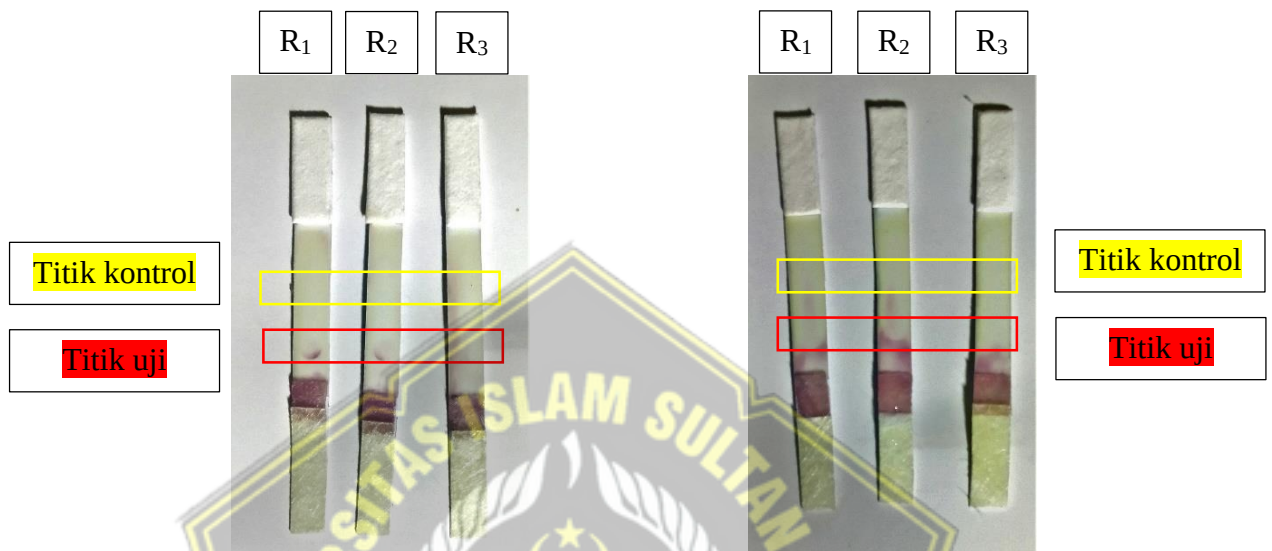
Pengujian *Halal Test Kit* dilakukan pada kelompok sampel yang terdiri dari 4 sampel *jelly* yang dijual di pasaran. Hasil pengujian tersebut dievaluasi berdasarkan adanya warna merah pada kedua titik/garis, yaitu titik uji dan titik kontrol. Pada sampel A, didapatkan hasil uji yang invalid; karena tidak ada bercak warna merah pada titik uji (*test line*) maupun titik kontrol (*control line*) sebagaimana tersaji pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6. Hasil Uji Sampel A

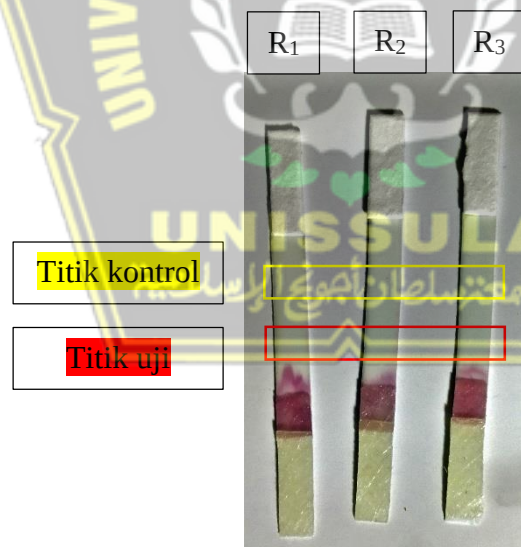
Begitu pula pada hasil uji Sampel B, C, dan D yang menyatakan hasil invalid. Pada sampel B, bercak warna pada titik uji hanya terdapat pada strip R₁ dan R₂, sedangkan pada strip R₃ tidak ada bercak warna merah pada titik uji (*test line*) maupun titik kontrol (*control line*). Hasil uji sampel B tersaji pada Gambar 4.7. Pada sampel C, terdapat “*ghost line*” di titik uji pada strip R₁, R₂, dan R₃, namun tidak ada bercak warna merah pada titik kontrol (*control line*). Hasil uji sampel C tersaji pada

Gambar 4.8. Pada sampel D, dari ketiga strip yang diuji tidak ada bercak warna merah yang terlihat pada titik uji (*test line*) maupun titik kontrol (*control line*). Hasil uji sampel D tersaji pada Gambar 4.9.



Gambar 4.7. Hasil Uji Sampel B

Gambar 4.8. Hasil Uji Sampel C



Gambar 4.9. Hasil Uji Sampel D

4.2. Pembahasan Penelitian

4.2.1. Perhitungan Kadar Antibodi dengan Metode ELISA

Kadar antibodi poliklonal yang didapatkan dari kelinci yang diimunisasi oleh gelatin babi dianalisis menggunakan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) dan diperoleh hasil absorbansi menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm. Metode ELISA sering digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan dan konsentrasi molekul pada cairan biologis, termasuk antibodi IgG karena spesifisitas dan sensitivitasnya yang tinggi (Santoso *et al.*, 2021). Produksi antibodi poliklonal pada hewan uji memiliki proses dan tahapan yang rumit, serta memerlukan waktu yang cukup lama. Interval waktu yang dibutuhkan untuk produksi antibodi poliklonal adalah sekitar 2-4 minggu setelah imunisasi pertama sehingga proses penentuan kadar optimal antibodi yang dihasilkan dari imunisasi antigen, dalam hal ini adalah gelatin babi ke kelinci telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Stills, 2012).

4.2.2. Penentuan pH Optimum saat Konjugasi

Proses konjugasi larutan nanopartikel emas dengan antibodi merupakan langkah yang penting dalam metode *immunoassay*. Hasil konjugat yang stabil akan membantu meminimalkan pengikatan non spesifik dan mengurangi hasil positif palsu sehingga diperlukan optimalisasi kondisi atau parameter yang dapat mempengaruhi kualitas konjugat yang dihasilkan. Pembentukan kompleks protein (antibodi) dan

nanopartikel emas bergantung pada beberapa interaksi, diantaranya adalah: (i) daya tarik elektronik antara nanopartikel emas yang bermuatan negatif dan situs bermuatan positif pada molekul protein, (ii) pengikatan protein terhadap permukaan nanopartikel emas secara hidrofobik, dan (iii) pengikatan nanopartikel emas dengan atom sulfhidril, oksigen, atau nitrogen melalui pasangan elektron tidak terbagi yang membentuk ikatan datif (Hermanson, 2013). Salah satu parameter yang dapat dioptimalkan adalah pH larutan nanopartikel emas pada saat konjugasi. Kondisi pH saat konjugasi harus dioptimalkan sehingga molekul antibodi dapat berikatan sempurna dengan nanopartikel emas (Momeni *et al.*, 2022).

Metode yang digunakan untuk melihat stabilitas konjugat antibodi dan nanopartikel emas pada penelitian ini adalah metode *salt-induced precipitation*. Metode tersebut dilakukan dengan melihat reaksi agregasi dari larutan konjugat antibodi dan nanopartikel emas yang terjadi akibat pemberian garam seperti NaCl (natrium klorida). Pemberian larutan garam akan mengganggu stabilitas koloid nanopartikel emas dengan menyaring sebagian ion negatif di sekitar nanopartikel sehingga menyebabkan agregasi dan sedimentasi yang ireversibel (Christau *et al.*, 2017). Reaksi agregasi konjugat dapat diidentifikasi dengan perubahan warna konjugat secara langsung. Larutan nanopartikel emas yang stabil berwarna merah akan berubah menjadi ungu kehitaman setelah ditambahkan larutan garam (Verdiani *et al.*, 2023).

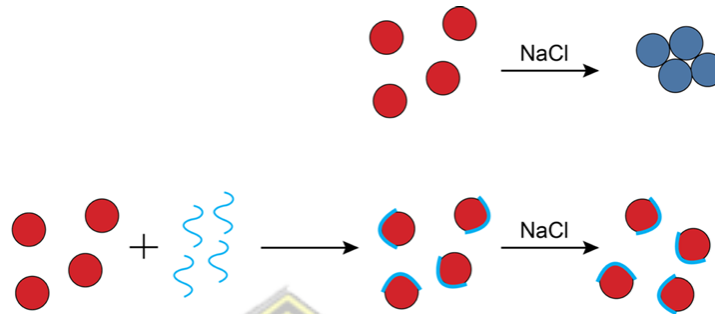
Berdasarkan hasil penelitian, pada pH 6 (Kolom 1) terjadi perubahan warna merah muda menjadi ungu pada larutan setelah penambahan NaCl, sedangkan pada pH 7 (Kolom 2) dan 8 (Kolom 3) beberapa sumuran yang berubah warna menjadi ungu. Warna larutan berubah menjadi merah gelap pada Baris D dan stabil hingga Baris F; Kolom 2 dan 3 (pH 7 dan 8). Hal tersebut menandakan bahwa pada pH rendah, nanopartikel emas menjadi kurang stabil setelah penambahan antibodi sehingga interaksi antara nanopartikel-antibodi terganggu dan terjadi agregasi. Nanopartikel emas lebih rentan mengalami agregasi pada nilai pH yang rendah karena adanya protonasi gugus karboksil ion sitrat pada permukaan nanopartikel yang juga berakibat pada melemahnya gaya tolak antarpartikel setelah ditambahkan larutan garam. Nanopartikel emas lebih stabil pada $\text{pH} > 7$ karena gaya tolak antarpartikel menjadi lebih besar akibat adanya deprotonisasi ion sitrat sehingga pH 8 dipilih sebagai pH optimum untuk proses konjugasi berdasarkan hasil perubahan warna setelah penambahan larutan garam (NaCl 10%) yang menghasilkan warna merah gelap yang lebih stabil (Momeni *et al.*, 2022).

Kondisi pH yang optimum untuk konjugasi adalah pH isoelektrik atau sedikit lebih tinggi dari titik tersebut, karena pada pH yang terlalu rendah, antibodi yang bermuatan positif dan nanopartikel yang bermuatan negatif akan bereaksi akibat adanya tarikan elektrostatik kuat sehingga menyebabkan akumulasi partikel yang dapat

mempengaruhi kualitas pelepasan konjugat. Penggunaan pH tinggi atau sedikit di atas titik isoelektrik antibodi yang diharapkan (biasanya $\sim$ pH 6,5–9) akan memberikan antibodi muatan negatif sederhana yang tidak cukup besar untuk mengganggu adsorpsi antibodi pada partikel emas bermuatan negatif dan dapat meningkatkan stabilitas karena interaksi elektrostatis yang tolak-menolak antar konjugat. Hal ini menunjukkan bahwa tolakan elektrostatis pada pH tinggi cukup untuk menstabilkan nanopartikel emas. Namun pada kondisi pH yang terlalu tinggi akan menyebabkan antibodi bermuatan negatif akan menolak berikatan dengan nanopartikel yang juga bermuatan negatif sehingga konjugasi tidak dapat terjadi (Amini et al., 2020; Geng et al., 2016).

Pada kondisi optimum, semua partikel antibodi saling berikatan dengan nanopartikel emas sehingga tidak ada nanopartikel emas yang bebas. Namun, jika kondisi saat konjugasi belum optimum maka nanopartikel emas yang bebas (tidak berikatan dengan antibodi) akan bereaksi dengan natrium klorida (NaCl) sehingga menghasilkan reaksi agregasi (Sukumaran *et al.*, 2021). Perubahan stabilitas nanopartikel emas terjadi akibat perubahan muatan pada permukaan nanopartikel yang menyebabkan penurunan gaya elektrostatis dari nanopartikel emas, sehingga terjadi penurunan jarak antar partikel dan terbentuknya agregat nanopartikel. Ukuran partikel yang membesar akibat agregasi tersebut menyebabkan pergeseran pita plasmon yang mengakibatkan larutan nanopartikel emas berubah warna dari merah menjadi ungu

kehitaman (Verdiani *et al.*, 2023). Berikut Gambar 4.10 adalah ilustrasi agregasi dan konjugasi pada nanopartikel emas dan antibodi.



Gambar 4.10. Ilustrasi agregasi dan konjugasi pada nanopartikel emas dan antibodi (Pires *et al.*, 2017)

Kondisi pH yang optimal untuk antibodi harus ditentukan dengan pengukuran pI relatif dari imunoglobulin. Akan tetapi, sebagian besar antibodi dapat berikatan dengan baik pada pH 8-9 (Hermanson, 2013; Zhang *et al.*, 2020). Penambahan garam (NaCl) juga membuat nanopartikel emas menjadi tidak stabil dan meningkatkan kecenderungan antibodi untuk berkumpul menarik satu sama lain. Ketika garam ditambahkan ke dalam larutan nanopartikel emas yang mengandung antibodi, molekul air tidak bereaksi mengelilingi molekul protein melainkan bereaksi dengan ion Na^+ sehingga terjadi agregasi karena adanya daya tarik antar antibodi melalui zona hidrofobik (Momeni *et al.*, 2022).

4.2.3. Penentuan Konsentrasi Antibodi Optimum saat Konjugasi

Agregasi pada nanopartikel emas juga bergantung pada konsentrasi antibodi. Pada konsentrasi 73,85 dan 75,05 ng/mL terjadi

perubahan warna merah muda menjadi ungu yang disebabkan oleh jumlah nanopartikel emas yang lebih banyak dibandingkan dengan jumlah antibodi sehingga terbentuk agregat. Pada konsentrasi 84,48; 79,91; dan 81,94 ng/mL juga terjadi perubahan warna merah muda menjadi ungu yang disebabkan oleh kepadatan imobilisasi antibodi yang tinggi sehingga antibodi cenderung akan berinteraksi dengan antibodi lain yang terdekat dan tidak berikatan dengan permukaan nanopartikel emas (Byzova *et al.*, 2017). Larutan konjugat yang telah berubah warna menjadi ungu lama kelamaan berubah warna menjadi tidak berwarna atau bening akibat desorpsi antibodi dari permukaan nanopartikel emas (Momeni *et al.*, 2022).

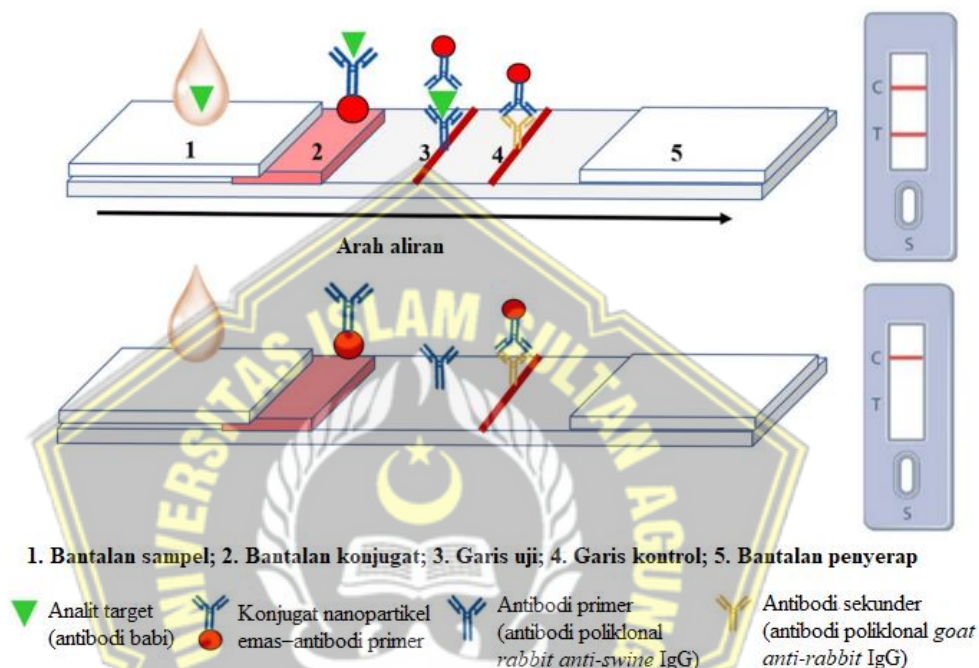
Stabilitas konjugat juga dapat dilihat berdasarkan nilai absorbansinya pada panjang gelombang 580 nm. Nilai absorbansi pada panjang gelombang tersebut dapat menunjukkan kemampuan antibodi untuk menstabilkan sejumlah nanopartikel emas setelah penambahan garam (NaCl 10%). Biasanya konsentrasi minimum antibodi dipilih untuk mencegah agregasi nanopartikel karena adanya kelebihan garam. Namun, selama larutan konjugat berubah warna menjadi biru-ungu kehitaman, keadaan tersebut mengindikasikan bahwa jumlah antibodi yang ditambahkan belum cukup untuk menstabilkan nanopartikel emas dan ditandai dengan penurunan absorbansi pada panjang gelombang 580 nm. Ketika konsentrasi antibodi yang ditambahkan cukup untuk menstabilkan nanopartikel emas dan larutan konjugat tidak berubah

warna (stabil), nilai absorbansi pada 580 nm pun juga meningkat (Safenkova *et al.*, 2012; Zvereva *et al.*, 2020). Konsentrasi antibodi yang mampu menstabilkan larutan nanopartikel emas berdasarkan hasil perubahan warna dan nilai absorbansi adalah kadar 75,31 ng/mL yang dipilih menjadi konsentrasi optimum untuk pembuatan konjugat antibodi dan nanopartikel emas.

4.2.4. Validasi *Halal Test Kit*

Deteksi keberadaan antigen babi pada gelatin sapi dan babi murni dievaluasi berdasarkan hasil uji pada strip imunokromatografi. Larutan gelatin yang terserap pada bantalan sampel akan mengalir menuju bantalan konjugat dan berakhir pada bantalan penyerap. Analit target berupa antigen babi yang melewati bantalan konjugat akan berikatan pada bagian spesifik antibodi anti-babi berlabel nanopartikel emas. Selanjutnya antigen yang terikat pada antibodi *anti-Swine* berlabel nanopartikel emas akan bermigrasi menuju membran nitroselulosa karena adanya kapilaritas membran. Antibodi *anti-Swine* yang berada di garis uji menangkap antigen yang terikat pada antibodi anti-babi berlabel nanopartikel emas, hasilnya sinyal warna merah teramati di garis uji. Kompleks antigen dan antibodi *anti-Swine* berlabel nanopartikel emas yang tidak tertangkap di garis uji akan melewati garis kontrol dan ditangkap oleh antibodi sekunder. Garis kontrol akan selalu menunjukkan sinyal warna merah sebagai tes validasi sebagaimana tersaji pada Gambar 4.11 (Banerjee *et al.*, 2023).

Berdasarkan hasil pengamatan strip secara visual, hasil strip pada kontrol gelatin sapi dan gelatin babi murni menunjukkan hasil yang invalid yang diidentifikasi dengan tidak ditemukannya bercak merah pada garis kontrol yang menjadi parameter validasi pada strip uji.



Gambar 4.11. Ilustrasi proses perubahan warna pada strip
(Banerjee et al., 2023)

4.2.5. Aplikasi Pengujian Sampel Menggunakan *Halal Test Kit*

Hasil strip uji *Halal Test Kit* pada penelitian ini diinterpretasikan dengan terbentuknya titik berwarna merah pada membran nitroselulosa. Apabila sampel mengandung babi, maka antigen akan berikatan dengan antibodi yang berlabel nanopartikel emas (konjugat antibodi-nanopartikel emas) pada bantalan konjugat dan membentuk kompleks antigen dan konjugat. Kompleks antigen-konjugat tersebut akan berpindah ke titik uji pada membran nitroselulosa dengan gaya kapilaritas yang mengakibatkan reaksi antara kompleks tersebut

dengan antibodi *anti-Swine* (babi) yang menyebabkan terbentuknya titik merah pada titik uji. Kompleks antigen-konjugat yang berlebih kemudian bermigrasi mencapai titik kontrol. Pada titik kontrol, kompleks antigen-konjugat akan ditangkap oleh antibodi *goat anti-rabbit* dan muncul titik merah kedua pada membran nitroselulosa sebagai validasi pengujian. Hasil negatif diinterpretasikan jika hanya muncul warna merah pada titik uji dan jika warna merah tidak muncul pada titik kontrol baik ada atau tidaknya warna merah pada titik uji, maka hasil pengujian dianggap tidak valid (Lukman *et al.*, 2018).

Pada semua hasil pengujian sampel A dan sampel D dinyatakan hasilnya tidak valid karena sama sekali tidak terdapat titik merah pada titik uji maupun titik kontrol. Pada beberapa hasil pengujian yaitu pada kontrol gelatin babi murni (R_1) dan sampel B (R_1 dan R_2) juga dinyatakan tidak valid karena memperlihatkan adanya warna merah samar pada titik uji tetapi tidak ada warna pada titik kontrol. Hal tersebut disebabkan karena antigen menjadi penghalang sterik sehingga menghalangi tempat pengikatan antibodi sekunder yang ada pada titik kontrol. Sedangkan pada hasil pengujian pada kontrol gelatin sapi murni dan sampel C terdapat “*ghost line*” atau keadaan dimana latar belakang pada membran nitroselulosa berwarna merah melingkari titik putih tempat ditambahkannya antibodi pada titik uji. Kemunculan “*ghost line*” pada pengujian diidentifikasi sebagai hasil dari konsentrasi tinggi antibodi penangkap pada garis uji yang menolak

untuk berikatan dengan konjugat antibodi-nanopartikel emas yang ikut bermigrasi dari bantalan konjugat (*conjugate pad*) ke garis uji pada strip (Seele *et al.*, 2023).

4.2.6. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah terbatasnya ELISA kit yang digunakan sehingga tidak dilakukan replikasi dan tidak dilakukannya identifikasi ikatan antara antibodi dan nanopartikel emas sehingga tidak diketahui jenis ikatan antibodi yang berikatan dengan nanopartikel emas secara rinci. Ukuran nanopartikel emas yang digunakan pada penelitian ini juga berpengaruh terhadap proses konjugasi antibodi dan nanopartikel emas. Jumlah nanopartikel emas yang digunakan pada penelitian ini lebih banyak dibandingkan dengan jumlah antibodi poliklonal yang didapatkan, serta ukuran nanopartikel emas yang terlalu besar menyebabkan kebutuhan antibodi untuk berikatan pada permukaan nanopartikel emas semakin tinggi. Hal tersebut yang menyebabkan larutan konjugat menjadi mudah teragregasi setelah penambahan larutan garam. Ukuran gelatin juga dapat mempengaruhi validitas strip uji. Gelatin yang berukuran besar akan sulit bermigrasi ke titik uji dan titik kontrol pada strip sehingga diperlukan antigen yang berukuran kecil dan lebih spesifik agar hasil pengujian valid.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

- a. Kondisi optimum yang digunakan saat konjugasi antibodi-nanopartikel emas berdasarkan kestabilan warna konjugat setelah ditambahkan larutan NaCl 10% dan nilai absorbansi pada panjang gelombang 580 nm adalah pada pH 8 dan konsentrasi antibodi 75,31 ng/mL.
- b. Hasil pengujian strip uji pada kontrol maupun sampel belum memenuhi persyaratan spesifisitas.

5.2. Saran

- a. Perlu dilakukan identifikasi jenis ikatan antara antibodi dan nanopartikel emas pada konjugat antibodi-nanopartikel emas secara rinci agar proses konjugasi berjalan lebih sempurna.
- b. Perlu dilakukan pemilihan antigen yang lebih spesifik dengan ukuran yang lebih kecil agar hasil pengujian pada strip yang didapatkan valid.
- c. Ukuran nanopartikel yang digunakan sebaiknya disesuaikan dengan jumlah antibodi yang digunakan agar hasil konjugat menjadi lebih stabil dan hasil strip uji yang didapatkan valid.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, D. (2017). Deteksi Imunoglobulin G dengan Immunoblotting Pasca Imunisasi Subkutan Protein Hemagglutinin Pili *Klebsiella pneumoniae* 12,8 kDa pada Mencit BALB/C. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 3(2), 40–46.
- Alipal, J., Mohd Pu'ad, N. A. S., Lee, T. C., Nayan, N. H. M., Sahari, N., Basri, H., Idris, M. I., & Abdullah, H. Z. (2019). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>
- Amini, M., Pourmand, M. R., Faridi-Majidi, R., Heiat, M., Mohammad Nezhady, M. A., Safari, M., Noorbakhsh, F., & Baharifar, H. (2020). Optimising effective parameters to improve performance quality in lateral flow immunoassay for detection of PBP2a in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Experimental Nanoscience*, 15(1), 266–279. <https://doi.org/10.1080/17458080.2020.1775197>
- Andela, R., Rantina, P., Pransiska, A., Fauziah, W. Z., & Anggara, F. (2019). Analisis Kandungan Gelatin Babi pada Masker Keluaran Korea yang Beredar Dipasaran Online Indonesia. *ALKIMIA: Jurnal Ilmu Kimia Dan Terapan*, 3(2), 79–84.
- Aransyah, M. F., Furqoniah, F., & Abdullah, A. H. (2019). The Review Study of Halal Products and Its Impact on Non-Muslims Purchase Intention. *IKONOMIKA: Jurnal Ekonomi Dan Bisnis Islam*, 4(2), 181–198. <https://ejournal.radenintan.ac.id/index.php/ikonomika>
- Aris, S. E., Jumiono, A., & Akil, S. (2020). IDENTIFIKASI TITIK KRITIS KEHALALAN GELATIN. In *Jurnal Pangan Halal* (Vol. 2, Issue 1).
- Ascoli, C. A., & Aggeler, B. (2018). Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *BioTechniques*, 65(3), 127–136. <https://doi.org/10.2144/BTN-2018-0065>
- Badan Pusat Statistik. (2022). *Data Impor Gelatin di Indonesia*. <https://www.bps.go.id/>
- Banerjee, R., Maheswarappa, N. B., Biswas, S., Dasoju, S., Barbuddhe, S., Rajan, V. M., Patra, G., & Bhattacharyya, D. (2023). Lateral flow immunoassay-based absolute point-of-care technique for authentication of meat and commercial meat products. *Journal of Food Science and Technology*, 60(2), 772–782. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05663-2>
- Bayu, D. (2022). *Sebanyak 86,9% Penduduk Indonesia Beragama Islam*. <https://dataindonesia.id/ragam/detail/sebanyak-869-penduduk-indonesia-beragama-islam>

- BPJPH. (2022). *Lima Tahun BPJPH, Ini Capaian Jaminan Produk Halal di Indonesia Hingga 2022*. <https://bpjph.halal.go.id/detail/lima-tahun-bpjph-ini-capaian-jaminan-produk-halal-di-indonesia>
- BPOM. (2023). *Statistik Produk Yang Mendapat Persetujuan Izin Edar Periode 2019-2023*. <https://cekbpom.pom.go.id/>
- Bunjamin, Mulyana, & Lusiastuti, A. M. (2015). PRODUKSI SERUM Rabbit Anti-Catfish TERHADAP PENYAKIT Motile Aeromonas Septicemia (MAS) PADA IKAN PATIN SIAM (*Pangasius hypophthalmus*). *Jurnal Mina Sains*, 1(1), 24–33.
- Byzova, N. A., Safenkova, I. V., Slutskaia, E. S., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2017). Less is More: A Comparison of Antibody-Gold Nanoparticle Conjugates of Different Ratios. *Bioconjugate Chemistry*, 28(11), 2737–2746. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00489>
- Cahyaningrum, R., Khansa Safira, K., Nazilah Lutfiyah, G., Izdiyar Zahra, S., Aisyah Rahasticha, A., & Aini, N. (2021). POTENSI GELATIN DARI BERBAGAI SUMBER DALAM MEMPERBAIKI KARAKTERISTIK MARSHMALLOW: REVIEW. *Pasundan Food Technology Journal (PFTJ)*, 8(2), 38–44.
- Christau, S., Moeller, T., Genzer, J., Koehler, R., & Von Klitzing, R. (2017). Salt-Induced Aggregation of Negatively Charged Gold Nanoparticles Confined in a Polymer Brush Matrix. *Macromolecules*, 50(18), 7333–7343. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b00866>
- Cruse, J. M., & Lewis, R. E. (2010). *Atlas of Immunology* (J. L. Suggs & B. E. Norwitz (eds.); Third Edition). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Fan, D., Li, Y., Gu, Z., Huang, J., Zhou, W., Zhang, W., Zhao, J., & Zhang, H. (2016). Colloidal Gold Probe-Based Immunochromatographic Strip Assay for the Rapid Detection of Microbial Transglutaminase in Frozen Surimi. *Journal of Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8592962>
- Fasya, A. G., Amalia, S., Imamudin, M., Nugraha, R. P., Ni'mah, N., & Yuliani, D. (2018). OPTIMASI PRODUKSI GELATIN HALAL DARI TULANG AYAM BROILER (*Gallus domesticus*) DENGAN VARIASI LAMA PERENDAMAN DAN KONSENTRASI ASAM KLOORIDA (HCl). *Indonesian Journal of Halal*, 102–108.
- Febryana, W., Idiawati, N., & Agus Wibowo, M. (2018). EKSTRAKSI GELATIN DARI KULIT IKAN BELIDA (*Chitala lopis*) PADA PROSES PERLAKUAN ASAM ASETAT. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 7(4), 93–102.
- Firdausi, A. S. M., Farahdiba, D., & Munthe, A. M. (2020). DETERMINING CONSUMERS' WILLINGNESS TO BUY HALAL MEAT. *Jurnal Bisnis STRATEGI*, 29(2), 143–162.

- Fusvita, A., Maryam, R., & Pribadi, E. S. (2016). Karakterisasi Antibodi Poliklonal terhadap Aflatoksin M1. *Jurnal Sains Veteriner*, 34(1), 9–15.
- Geng, S. B., Wu, J., Alam, M. E., Schultz, J. S., Dickinson, C. D., Seminer, C. R., & Tessier, P. M. (2016). A facile method for preparing stable antibody-gold conjugates and application to affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy. *Bioconjugate Chemistry*, 27(10), 2287–2300.
- Harmono, H. D. (2020). Validasi Metode Analisis Logam Merkuri (Hg) Terlarut pada Air Permukaan dengan Automatic Mercury Analyzer. *INDONESIAN JOURNAL OF LABORATORY*, 2(3), 11–16.
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques* (3rd ed.). Academic Press Elsevier Inc.
- ICH. (2022). Validation of analytical procedures: ICH guidelines Q2(R2). *ICH Harmonised Guidelines*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf
- Jayalie, V. F., Surya, M., & Nainggolan, L. (2016). Prinsip Imunokromatografi Imunoglobulin A Saliva sebagai Metode Deteksi Dini dan Cepat Virus Dengue secara Non-Invasif. *Jurnal Mahasiswa Kedokteran Indonesia*, 22–28. <https://www.researchgate.net/publication/304677417>
- Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., & Sedighimoghaddam, B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002>
- Jiang, W., Zeng, L., Liu, L., Song, S., & Kuang, H. (2018). Immunochromatographic strip for rapid detection of phenylethanolamine A. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 182–192. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1364709>
- Karimah, I. (2018). PERUBAHAN KEWENANGAN LEMBAGA-LEMBAGA YANG BERWENANG DALAM PROSES SERTIFIKASI HALAL. In *Journal of Islamic Law Studies* (Vol. 1, Issue 1). <https://scholarhub.ui.ac.id/jilsAvailableat:https://scholarhub.ui.ac.id/jils/vol1/iss1/4>
- Khirzin, M. H., Ton, S., & Fatkhurrohman, F. (2019). Ekstraksi dan Karakterisasi Gelatin Tulang Itik Menggunakan Metode Ekstraksi Asam. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 14(2), 119–127. <https://doi.org/10.31186/jspi.id.14.2.119-127>
- Kuswandi, B., Gani, A. A., & Ahmad, M. (2017). Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs. *Food Bioscience*, 19, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.05.001>

- Leenaars, M., & Hendriksen, C. F. M. (2005). Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations. *ILAR Journal*, 46(3), 269–279. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269>
- Lopez, P., Buffoni, E., Pereira, F., & Vilchez Quero, J. L. (2011). Analytical Method Validation. In *Wide Spectra of Quality Control*. InTech. <https://doi.org/10.5772/21187>
- Lou, S., Ye, J. Y., Li, K. Q., & Wu, A. (2012). A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: The influence of nanoparticulate size. *Analyst*, 137(5), 1174–1181. <https://doi.org/10.1039/c2an15844b>
- Lukman, Y. M., Dyana, Z. N., Rahmah, N., & Khairunisak, A. R. (2018). Development and Evaluation of Colloidal Gold Lateral Flow Immunoassays for Detection of Escherichia Coli O157 and Salmonella Typhi. *Journal of Physics: Conference Series*, 1082(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1082/1/012049>
- Masiri, J., Benoit, L., Barrios-Lopez, B., Thienes, C., Meshgi, M., Agapov, A., Dobritsa, A., Nadala, C., & Samadpour, M. (2016). Development and validation of a rapid test system for detection of pork meat and collagen residues. *Meat Science*, 121, 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.006>
- Mirica, A.-C., Stan, D., Chelcea, I.-C., Mihailescu, C. M., Ofiteru, A., & Bocancia-Mateescu, L.-A. (2022). Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.922772>
- Momeni, A., Rostami-Nejad, M., Salarian, R., Rabiee, M., Aghamohammadi, E., Zali, M. R., Rabiee, N., Tay, F. R., & Makvandi, P. (2022). Gold-based nanoplatform for a rapid lateral flow immunochromatographic test assay for gluten detection. *BMC Biomedical Engineering*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s42490-022-00062-2>
- Noor, N. Q. I. M., Razali, R. S., Ismail, N. K., Ramli, R. A., Razali, U. H. M., Bahaiddin, A. R., Zaharudin, N., Rozzamri, A., Bakar, J., & Shaarani, S. M. (2021). Application of green technology in gelatin extraction: A review. In *Processes* (Vol. 9, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pr9122227>
- Nugroho, W., Karlina, Maghfirah, S., Rasyid, M. F. A., Purwanto, F. O., Lesmana, M. A., & Aditya, S. (2021). Development of Rabbit's Anti-Pig Serum Polyclonal Antibodies to Detect Pork Adulteration in Meat Products. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9(11), 1919–1924. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.11.1919.1924>
- Nuntawong, P., Putalun, W., Tanaka, H., Morimoto, S., & Sakamoto, S. (2022). Lateral flow immunoassay for small-molecules detection in phytoproducts: a review. In *Journal of Natural Medicines*. Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/s11418-022-01605-6>

- Panjaitan, T. F. C. (2016). OPTIMASI EKSTRAKSI GELATIN DARI TULANG IKAN TUNA (*Thunnus albacares*). *Jurnal Wiyata*, 3(1), 11–16.
- Pertiwi, M., Atma, Y., Mustopa, A., & Maisarah, R. (2018). Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin dari Tulang Ikan Patin dengan Pre-Treatment Asam Sitrat. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 7(2), 83–91. <https://doi.org/10.17728/jatp.2470>
- Pires, T. A., Narovec, C. M., & Whelan, R. J. (2017). Effects of Cationic Proteins on Gold Nanoparticle/Aptamer Assays. *ACS Omega*, 2(11), 8222–8226. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01336>
- Ramadhan, S. A., & Musfiroh, I. (2021). REVIEW ARTIKEL: VERIFIKASI METODE ANALISIS OBAT. *Farmaka*, 19(3), 87–92.
- Rehman, W. U., Majeed, A., Bhushan, S., Bose, J. C., Mehra, R., Rani, P., Saini, K. C., & Bast, F. (2016). *Gelatin: A comprehensive report covering its indispensable aspects: Vol. I* (S. I. Ikram & S. A. Ahmed (eds.)). Nova Science Publishers, Inc. <https://www.researchgate.net/publication/308694247>
- Safenkova, I., Zherdev, A., & Dzantiev, B. (2012). Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: A case study with potato virus X. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(6), 1595–1605. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5985-8>
- Sajid, M., Kawde, A. N., & Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(6), 689–705. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001>
- Santoso, K., Herowati, U. K., Rotinsulu, D. A., Murtini, S., Ridwan, M. Y., Hikman, D. W., Zahid, A., Wicaksono, A., Nugraha, A. B., Afiff, U., Wijaya, A., Arif, R., Tarigan, R., & Sukmawinata, E. (2021). Comparison of Colorimetric-Based Rabies Postvaccination Antibody Titer Detection Using Elisa Reader and Mobile Phone Camera. *Jurnal Veteriner*, 22(1), 79–85. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2021.22.1.79>
- Seele, P. P., Dyan, B., Skepu, A., Maserumule, C., & Sibuyi, N. R. S. (2023). Development of Gold-Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassays for Rapid Detection of TB ESAT-6 and CFP-10. *Biosensors*, 13(3), 354. <https://doi.org/10.3390/bios13030354>
- Singh, A., Chaudhary, S., Agarwal, A., & Verma, A. S. (2013). Antibodies: Monoclonal and Polyclonal. In *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation* (pp. 265–287). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00015-8>
- Sohrabi, S., Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Farhangi, A., Mortazavi, M., Mehrabi, M. R., Chiani, M., Saffari, Z., & Ghassemi, S. (2011). Production and purification of rabbit's polyclonal antibody against factor VIII. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26(4), 354–359. <https://doi.org/10.1007/s12291->

011-0142-2

- Srisrattakarn, A., Tipayawat, P., Chanawong, A., Tavichakorntrakool, R., Daduang, J., Wonglakorn, L., & Lulitanond, A. (2020). Development of a prototype lateral flow immunoassay for rapid detection of staphylococcal protein a in positive blood culture samples. *Diagnostics*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100794>
- Stills, H. F. (2012). Polyclonal Antibody Production. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 259–274). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00011-0>
- Suherman, Damayanti, R., & Indrawati, A. (2020). Preparasi Strip Imunokromatografi Koloid Emas untuk Deteksi Cepat *Aeromonas hydrophila*. *ACTA VETERINARIA INDONESIA*, 8(3), 31–39. <http://www.journal.ipb.ac.id/index.php/actavetindones>
- Sukumaran, A., Thomas, T., Thomas, R., Thomas, R. E., Paul, J. K., & Vasudevan, D. M. (2021). Development and Troubleshooting in Lateral Flow Immunochromatography Assays. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 36(2), 208–212. <https://doi.org/10.1007/s12291-020-00887-5>
- Suryani, N., Sulistiawati, F., & Fajriani, A. (2009). KEKUATAN GEL GELATIN TIPE B DALAM FORMULASI GRANUL TERHADAP KEMAMPUAN MUKOADHESIF. *MAKARA, KESEHATAN*, 13(1), 1–4.
- Verdiani, H., Syafira, D., & Nugrahapraja, H. (2023). MINI REVIEW: PENGEMBANGAN BIOSENSOR KOLORIMETRI BERBASIS AGREGASI NANOPARTIKEL EMAS. *Klorofil: Jurnal Ilmu Biologi Dan Terapan*, 7(1), 1–9.
- Wardhani, D. H., Rahmawati, E., Arifin, G. T., & Cahyono, H. (2017). CHARACTERISTICS OF DEMINERALIZED GELATIN FROM LIZARDFISH (*Saurida* spp.) SCALES USING NaOH-NaCl SOLUTION. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*, 6(2), 132–142. <https://doi.org/10.15294/jbat.v6i2.9621>
- Zhang, L., Mazouzi, Y., Salmain, M., Liedberg, B., & Boujday, S. (2020). Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 165). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112370>
- Zvereva, E. A., Popravko, D. S., Hendrickson, O. D., Vostrikova, N. L., Chernukha, I. M., Dzantiev, B. B., & Zherdev, A. V. (2020). Lateral Flow Immunoassay to Detect the Addition of Beef, Pork, Lamb, and Horse Muscles in Raw Meat Mixtures and Finished Meat Products. *Foods*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/foods9111662>