

Sintesis Konjugat Bsa-Hapten Asam 4-(4,6-Diamino-1,3,5-Triazin-2-Ylamino) Butanoat Untuk Pengembangan Deteksi Selektif Melamin

Leni Legasari

UIN Raden Fatah Palembang, Sumsel Indonesia

E-mail: lenilegasari_uin@radenfatah.ac.id

Abstrak

Sejak isu kontaminasi melamin pada produk susu diketahui secara luas, diperlukan penelitian terbaru tentang teknik pemantauan yang cepat dan akurat untuk mendeteksi melamin dalam produk susu. Suatu metode *indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay* (icELISA) dengan spesifisitas yang tinggi dikembangkan untuk deteksi melamin dalam susu. Sintesis hapten dan pembentukan konjugat hapten-protein dilakukan sebagai immunogen untuk membentuk antibodi yang selektif terhadap melamin. Hapten telah disintesis dari asam gamma-amino butirat (GABA) dengan 2-kloro-4,6-diamino-1,3,5-triazin (CAAT). Digunakan *disikloheksilkarbodiimida* (DCC) dan *N-hidroksisuksinimida* (NHS) untuk merubah gugus karboksilat hapten menjadi ester aktif sehingga dapat dikonjugasikan ke *bovine serum albumin* (BSA). Hapten asam 4-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-ylamino)-butanoat berhasil disintesis dengan yield 8,16%, dan serapan maksimum UV pada panjang gelombang 233 nm. Karakterisasi hapten menunjukkan adanya serapan inframerah gugus amina sekunder pada bilangan gelombang 1654,92 cm^{-1} dan spektrum *mass spectroscopy* pada m/z 212,4 yang menunjukkan massa relatif hapten ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$). Konjugat hapten-BSA menunjukkan serapan UV maksimum pada panjang gelombang 215 nm. Hasil karakterisasi menunjukkan hapten dan konjugat hapten-BSA telah berhasil disintesis.

Kata kunci: *melamin; sintesis; hapten; konjugat BSA-Hapten*

Abstract

Since the issue of melamine contamination in dairy products is widely known, new research is urgently on fast and accurate monitoring techniques for detecting melamine in dairy products. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) method developed for the detection of melamine in milk. The synthesis of hapten and hapten-protein conjugate formation shows an immunogen of selective antibodies with melamine. Hapten is synthesized by gamma-amino butyric acid (GABA) with 2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine (CAAT). Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) convert hapten carboxylic groups to active esters so they can be conjugated to bovine serum albumin (BSA). The hapten was successfully synthesized with 8.16% yield, UVmax absorption at 233 nm, infrared absorption at 1654.92 cm^{-1} , and mass spectroscopy at m/z 212.4 which shows the relative mass of hapten ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$). The hapten-BSA conjugate shows UVmax absorption at 215 nm. The characterization results show that the hapten and hapten-BSA conjugate have been successfully synthesized.

Keywords: *melamine; synthesis; hapten; BSA-Hapten conjugate*

Pendahuluan

Melamin (2,4,6-triamino-1,3,5-triazine) merupakan bahan kimia yang penting dalam produksi resin melamin sebagai sejenis senyawa organik dengan cincin heterosiklik nitrogen yang banyak digunakan dipengolahan kayu, plastik, cat, pembuatan kertas, tekstil, kulit, industri listrik dan kedokteran menurut Cao B, *et al.* (2013) dan Liu, JX, *et al.* (2010). Metode deteksi melamin telah menjadi topik hangat sejak ditemukannya batu ginjal anak-anak yang disebabkan oleh susu formula bayi yang terkontaminasi melamin bubuk di Cina dan kematian hewan peliharaan karena pakan yang terkontaminasi melamin di Amerika. (Wei, DU Xin, *et al.* 2016).

Melamin memiliki kadar nitrogen yang tinggi sehingga secara sengaja ditambahkan dalam produk susu sehingga dapat memberikan informasi palsu pengukuran jumlah protein dalam susu yang diukur berdasarkan jumlah nitrogennya berdasarkan metode Kjeldahl. Metode Kjeldahl dikembangkan pada tahun 1883 oleh pembuat bir bernama Johann Kjeldahl. Makanan didigesti dengan asam kuat sehingga melepaskan nitrogen yang dapat ditentukan kadarnya dengan teknik titrasi yang sesuai. Jumlah protein yang ada kemudian dihitung dari kadar nitrogen dalam sampel. Metode ini masih merupakan metode standar untuk penentuan kadar protein (Ningrum, dian kartika, 2018 dan Miguel, Edwin García. *Et al.* 2018).

Beberapa metode untuk penentuan melamin di berbagai sampel telah diusulkan termasuk kromatografi gas/spektrometri massa (GC-MS), kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), kromatografi cair-elektrospray bersama spektrometri massa, kapiler elektroforesis (CE), spektroskopi inframerah, dan lain sebagainya. Namun, pendekatan metode-metode ini memerlukan biaya mahal dan peralatan yang rumit, atau terbatas dalam laboratorium penelitian

ilmiah (Zhou, Yu, *et al.* 2012 dan Zeng H, *et al.* 2011)

Metode lain yang digunakan yaitu ELISA. Metode ini sangat sensitif dan dapat digunakan untuk mendeteksi dan menentukan protein spesifik secara kuantitatif dalam jumlah sangat kecil, sebagai contoh antigen dengan kuantitas kurang dari 10 ng/mL. Metode ELISA dapat digunakan untuk deteksi melamin pada pangan, dimana enzim yang berkonjugasi dengan melamin berkompetisi dengan melamin dari sampel untuk membentuk ikatan melamin-antibody (Wang, Zongyi, *et al.* 2010). Metode ini memerlukan preparasi sampel yang sangat mudah dilakukan dan dapat langsung digunakan di lapangan (*on site*), waktu analisa juga relative singkat, serta peralatan *immunoassay* ini sangat sederhana, mudah dioperasional dan harga peralatannya relatif murah (Preechakasedkit, *et al.* 2012 dan Yin, W, *et al.* 2010).

Pada penelitian yang menggunakan metode ELISA diperlukan sintesis senyawa haptent yang dikonyugasikan dengan protein BSA untuk diinjeksikan ke hewan percobaan (kelinci) sehingga dapat memproduksi antibodi yang spesifik terhadap melamin. Haptent merupakan senyawa organik kecil yang mampu menstimulasi pembentukan antibodi jika berkonjugasi dengan senyawa karier/pembawa yang lebih besar, misalnya protein (BSA) (Lei *et al.* 2010). Pada penelitian ini akan disintesis haptent dan konjugasi haptent yang akan siap digunakan untuk pengembangan metode ELISA untuk deteksi spesifik terhadap melamin.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan *Hot plate*; pipet tetes; pipet volumetrik; batang pengaduk; pH-meter; botol semprot; spatula; labu ukur 50, 100, dan 500 mL; corong; labu bulat; *waterbath* atau *oilbath*; mikropipet 10, 200

dan 1000 μL ; gelas piala/*beaker glass* 50 mL, 250 mL dan 500 mL; labu ekstraksi 200 mL, pengaduk magnetik/*magnetic stirrer*, plat kromatografi lapis tipis/*thin layer chromatography* (TLC); kertas saring; alat sentrifugasi; membran cellofan; seperangkat alat refluks; refrigerator; termometer; *syringe*; melting point apparatus; timbangan; erlenmeyer; objek glass; *microwave*; gel puncher; dan plat polistiren.

Bahan yang digunakan yaitu 2-kloro-4,6-diamino-1,3,5-triazin (CAAT), etanol absolut, asam 4-aminobutirat / gamma amino butyric acid (GABA), kalium hidroksida (KOH), natrium karbonat, (Na_2CO_3), CH_2Cl_2 (metilen klorida), CHCl_3 (kloroform), metanol (MeOH), asam klorida (HCl) 6N, bovine serum albumin (BSA), N - hidroksi suksinimida (NHS), dimetil formamida (DMF), phosphate buffer saline (PBS) 10 mM pH 7,4, Disikloheksilkarbodiimida (DCC), Asam sulfat (H_2SO_4) 2 M, Aquabidest, phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4 mengandung 0,1% tween 20, 5% skim milk.

Prosedur Kerja

Sintesis Hapten asam 4-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-ylamino) butanoat menggunakan CAAT (2-kloro-4,6-diamino-1,3,5-triazin) (0,605 g; 4,05 mmol) dilarutkan dalam 150 mL etanol absolut, kemudian ditambahkan asam 4-aminobutirat (0,48 g; 4,7 mmol) dan KOH (0,82 g; 12,45 mmol) dalam 5 mL etanol absolut setetes demi setetes, direfluks selama 24 jam pada 70°C, dimonitor dengan TLC (fasa gerak $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 60:20$). Campuran reaksi difiltrasi kemudian filtrat didinginkan untuk menghasilkan padatan putih. Padatan tersebut lalu dilarutkan dalam 37,5 mL natrium karbonat 5% dan diekstraksi dengan 30 mL metilen klorida (3 x 10 mL). Fasa aqueous diasamkan hingga pH 3 dengan 6 N HCl, dikonsentrasi dan didinginkan (*freeze dry*) hingga terbentuk hapten berbentuk padatan putih. Padatan direkristalisasi dengan etanol, difiltrasi,

kemudian filtrat diuapkan hingga seluruh etanol menguap dan diperoleh kristal putih hapten. Hapten tersebut kemudian dideteksi dengan TLC. Hapten yang terbentuk lalu dikarakterisasi menggunakan spektrometer UV vis, penentuan titik leleh, instrumen IR, dan Spektroskopi Massa.

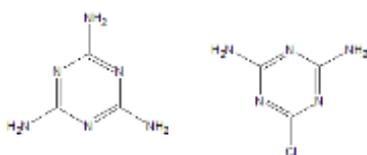
Preparasi Konjugat Hapten-BSA dan Hapten-OVA menggunakan bovin serum albumin (BSA) dan ovalbumin (OVA). Sebanyak 20 mg (100 μmmol) hapten dan 17 mg (150 μmmol) N- hidroksisusksinimida (NHS) dilarutkan dalam 1 mL dimetilformamida (DMF), diikuti dengan penambahan 31 mg (150 μmmol) disikloheksilkarbodiimida (DCC). Aktivasi reaksi dilakukan dengan pengadukan (*stirring*) selama semalam (*overnight*) pada suhu 4°C. Endapan putih disiklourea disingkirkan dari larutan dengan sentrifugasi. Supernatan (900 μL) ditambahkan setetes demi setetes pada 113 mg BSA atau OVA (75 mg) dalam 8 mL 10 mM phosphate buffer saline (PBS) dengan pH 7,4. Campuran konjugat kemudian diaduk (*stirred*) selama 12 jam pada suhu 4°C.

Selanjutnya dilakukan dialisis untuk menghilangkan garam-garam anorganik dan NHS yang terdapat pada hapten. Dialisis dilakukan menggunakan membran cellofan dan PBS 10 mM pH 7,4. Membran *cellofan* dipotong dengan panjang sesuai kebutuhan, kemudian direndam selama beberapa jam (kurang lebih 3 jam) dalam akua bidestilata. Setelah itu membran direbus dalam air 70°C selama 30 menit, diangkat, lalu direndam dalam larutan EDTA alkalis 1% selama 1 jam. Setelah direndam 1 jam, membran dipanaskan sampai 70°C. Konjugat hapten-BSA dimasukkan kedalam membran. Membran dijepit rapat ujung-ujungnya dan terakhir deteksi konjugat hapten-BSA menggunakan serapan maksimum UV konjugat hapten-BSA pada daerah 200-400 nm. Sebelum pengukuran, terlebih dahulu dilakukan pengenceran konjugat hapten-BSA hingga 100 kali dengan pelarut air.

Hasil Penelitian dan Pembahasan

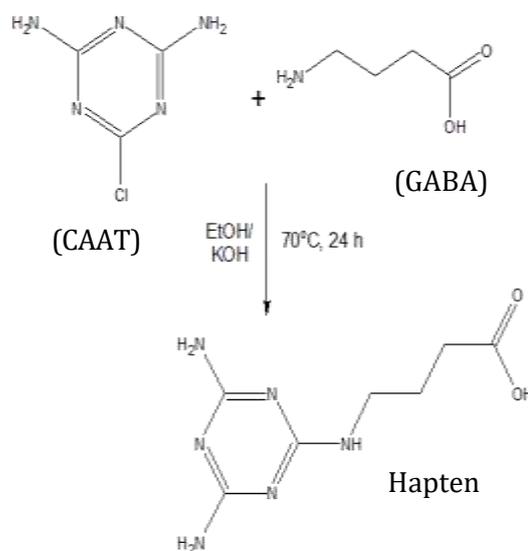
Sintesis Hapten

Pada penelitian ini dipilih metode CAAT (2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazin) karena metode ini lebih mudah dan lebih memungkinkan untuk dilakukan dibandingkan metode lainnya. Pada dasarnya proses sintesis hapten ini menggunakan senyawa organik yang memiliki struktur kimia yang mirip dengan melamin yaitu CAAT, bedanya hanya terletak pada satu gugus amina pada melamin digantikan dengan gugus klor sebagai suatu gugus pergi yang baik sehingga diharapkan proses sintesis akan berlangsung dengan lebih cepat dan mudah. Senyawa CAAT memiliki reaktivitas lebih tinggi dibanding melamin sehingga dapat bereaksi dengan *spacer arm* berupa amina primer alifatik, tidak seperti melamin yang memiliki tiga gugus amina dimana kemampuan untuk bereaksi dengan *spacer arm* sama besar sehingga hasil sintesis akan kurang maksimal.



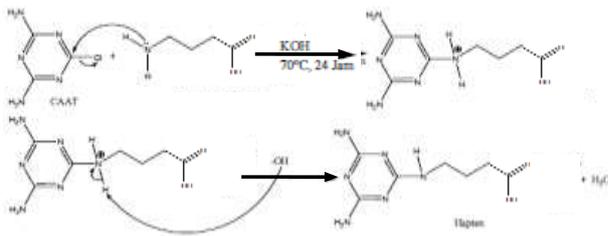
Gambar 1. Melamin (kiri) dan CAAT (kanan)

Sintesis hapten dilakukan dengan mereaksikan CAAT dan asam 4-amino butirat atau *gamma-amino butyric acid* (GABA) ditambah KOH dalam etanol absolut yang kemudian direfluks selama 24 jam pada suhu 70°C (Lei *et al.*, 2010). Reaksi yang terjadi dijelaskan pada **gambar 2**.



Gambar 2. Reaksi pembentukan hapten (Lei *et al.* 2010).

Usulan mekanisme reaksi yang diusulkan untuk reaksi pembentukan hapten dari reaksi di atas yaitu reaksi substitusi nukleofilik. Substitusi nukleofilik yang terjadi antara pergantian ion klorida (Cl^-) dari CAAT sebagai gugus pergi yang baik dengan gugus amina ($-\text{NH}_2$) dari asam 4-amino butirat yang merupakan suatu nukleofil. Pada senyawa asam 4-amino butirat terdapat dua sumber gugus nukleofil yaitu pasangan elektron dari N pada gugus amina dan OH pada gugus karboksilat, akan tetapi gugus amina memiliki sifat keelektronegatifan lebih tinggi dibanding gugus karboksilat. Sifat nukleofilik dipengaruhi oleh elektronegatifitas atom, semakin elektronegatif suatu atom maka semakin sulit atom tersebut untuk mendonorkan pasangannya kepada atom yang bersifat elektrofilik. Karena alasan inilah maka kemungkinan besar reaksi yang terjadi adalah reaksi substitusi antara ion klorida dengan gugus amina.



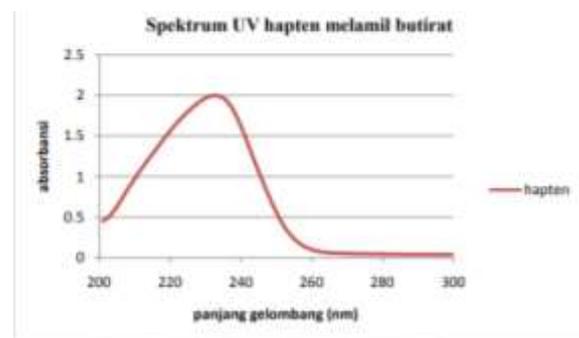
Gambar 3. Mekanisme reaksi pembentukan hapten.

Perhitungan secara teoritis, sebanyak 0,605 g (4,05 mmol) CAAT jika direaksikan dengan 0,48 g (4,7 mmol) GABA akan menghasilkan sebanyak 1,03 g (0,405 mmol) hapten. Perbedaan massa kristal putih yang didapatkan dengan teoritis berbeda, hal ini mungkin disebabkan terjadinya pembentukan garam dari reaksi pengasaman yang menggunakan HCl dengan Na_2CO_3 . Garam-garam hasil reaksi pengasaman tersebut ikut terkristalkan pada saat dilakukan proses *freeze dry* sehingga menambah bobot kristal hapten. Percobaan rekristalisasi yang dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol absolut menghasilkan filtrat yang diperkirakan mengandung hapten dan garam-garam yang tidak larut mengendap pada dasar wadah. Garam-garam ini kemudian disaring dengan teknik filtrasi, filtrat diambil sedangkan supernatant diambil lalu dievaporasi kembali untuk mendapatkan endapan hapten yang diharapkan bebas dari garam-garam. Hapten hasil rekristalisasi dikumpulkan, diperoleh berat sebesar 84.10 mg. Dengan demikian, melalui perhitungan yang sederhana, diperoleh % yield hapten sebesar 8,16 %.

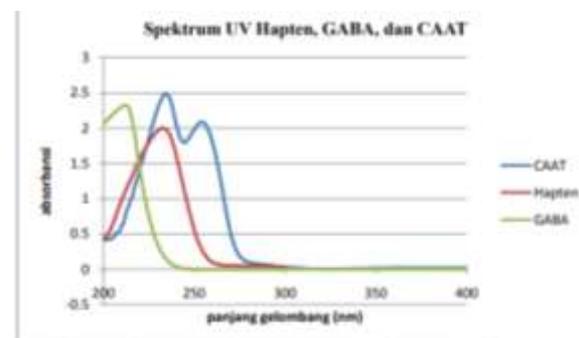
Karakterisasi Hapten dengan Instrumentasi

Spektrofotometer UV digunakan untuk mendeteksi terbentuknya senyawa baru (hapten) dengan melihat perbedaan serapan maksimumnya dengan senyawa-senyawa pembentuknya. Spektrofotometer UV akan memberikan informasi yang berguna pada sistem terkonjugasi. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan

disebabkan karena adanya gugus kromofor, dimana kromofor merupakan gugus fungsi yang mengabsorpsi radiasi elektromagnetik di daerah panjang gelombang ultraviolet dan daerah cahaya tampak. Contoh kromofor: C=O, C=C, N=N dan NO_2 . Pada produk sintesis ini, gugus kromofornya adalah C=O dan C=N sedangkan gugus kromofor pada GABA C=O saja sedangkan gugus kromofor pada CAAT yaitu C=N saja sehingga ketika GABA dan CAAT bergabung tentu akan menghasilkan panjang gelombang berbeda dengan GABA dan CAAT sendiri.



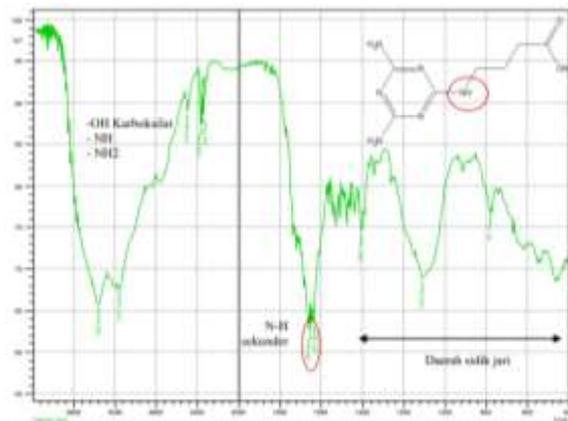
Gambar 4. Karakter spektrum UV hapten



Gambar 5. Perbedaan Karakter spektra UV hapten, GABA dan CAAT

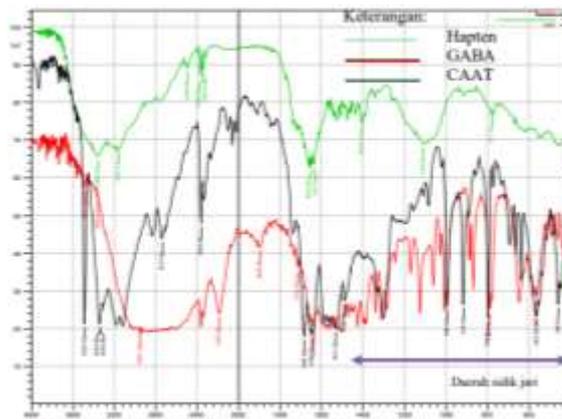
Instrumen FTIR dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam suatu senyawa berdasarkan spektrum infra merah yang dihasilkan. Spektrum infra merah senyawa organik bersifat khas, dimana tidak ada satu pun dari dua senyawa yang berbeda memiliki spektrum infra

merah yang sama. Karakterisasi hapten dengan uji FTIR dilakukan agar diketahui puncak-puncak khas yang menunjukkan gugus fungsi dari hapten serta melihat perbandingannya dengan senyawa pembentuknya. Dari hasil karakterisasi FTIR, terlihat serapan dari beberapa gugus fungsi yang diharapkan. Vibrasi ulur -OH terlihat jelas pada area 3000-3600 cm^{-1} (*very broad*). Kondisi spektrum yang sangat *broad* (lebar) dikarenakan spektrum O-H, -NH₂ dan -NH pada panjang gelombang 3000-3600 cm^{-1} menumpuk. Begitu pula vibrasi amina tersier triazin, terlihat pada area 2400 cm^{-1} . Serapan khas hapten melamil butirrat terlihat pada area 1654.92 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi N-H sekunder.



Gambar 6. Karakter spektrum FTIR hapten

Selain dilakukan karakterisasi FTIR hapten, dilakukan pula karakterisasi FTIR untuk CAAT dan GABA. Perbandingan puncak-puncak serapan pada hapten, GABA, dan CAAT ditunjukkan oleh Gambar 7.



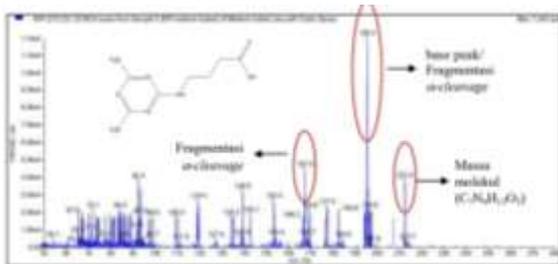
Gambar 7. Perbandingan Karakter spektrum FTIR hapten, CAAT dan GABA.

Dari gambar-gambar spektrum FTIR terlihat perbedaan daerah sidik jari antara ketiga spektrum yang menunjukkan kekhasan dari masing-masing senyawa. Pada spektrum CAAT, vibrasi ulur -NH₂ muncul di area serapan 3000- 3600 cm^{-1} , sedangkan pada hapten, vibrasi ini seolah tidak tampak. Pada GABA, terlihat puncak serapan yang luas pada bilangan gelombang yang luas 2500 sampai 3200 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi amina primer, namun setelah menjadi hapten vibrasi ini tidak muncul dikarenakan amina primer pada GABA telah berubah menjadi amina sekunder.

Spektroskopi Massa dilakukan untuk mengetahui berat molekul atau massa relatif yang disertai dengan pola fragmentasi dari komponen senyawa produk reaksi yang akan diidentifikasi sehingga dapat ditentukan struktur dari senyawa tersebut. Pada literatur, massa molekul ion hapten asam 4 - (4,6-diamino- 1, 3, 5 - triazin - 2 - ylamino) butirrat adalah m/z 212.23, sementara pada penelitian ini diperoleh m/z sebesar 212,4. Base peak yang diperoleh adalah m/z 195,5. Terjadi pula fragmentasi pada m/z 167,5, lihat gambar 8.

Dalam penelitian ini diperoleh massa molekul ion m/z 212.4. Nilai ini bernilai genap karena hapten memiliki jumlah N genap. Hapten asam 4-(4,6- diamino-1,3,5- triazin-2-ylamino) butirrat atau C₇N₆H₁₂O₂

memiliki 6 atom N. Berdasarkan *nitrogen rule* untuk spektroskopi massa, suatu senyawa yang mengandung atom nitrogen berjumlah ganjil akan memberikan massa molekul ion bernilai ganjil, sementara senyawa yang mengandung atom nitrogen berjumlah genap akan memberikan massa molekul bernilai genap. Nilai base peak yang diperoleh yaitu m/z sebesar 195.5 menunjukkan fragmentasi α -cleavage ujung gugus karboksilat hapten. Terlihat pula fragmen pada m/z 167.5 yang juga menunjukkan fragmentasi α -cleavage ujung gugus karboksilat. Berdasarkan literatur, nilai yang seharusnya adalah m/z 167.21. Pola Fragmentasi α -cleavage gugus karboksilat pada hapten dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 8. Hasil pengukuran MS hapten.

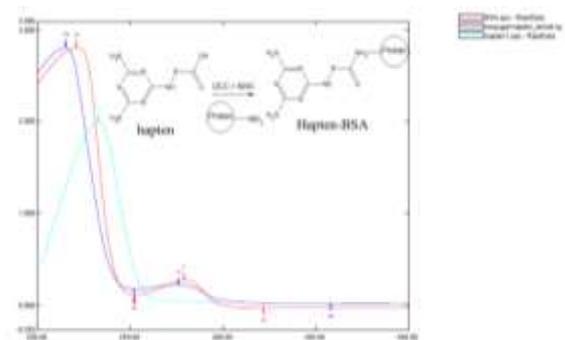
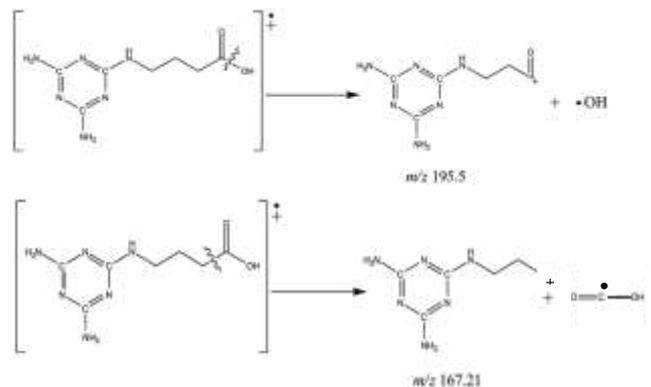
Gambar 9. Fragmentasi α -cleavage gugus karboksilat pada hapten.

Karakterisasi titik leleh hapten dilakukan sebagai satu cara mengetahui sifat fisik dari hapten asam 4-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-ylamino) butirat. Diperoleh titik leleh hapten yaitu 183 °C. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan titik leleh hapten asam 6-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-ylamino) kaproat seperti yang dilaporkan oleh Lei et al. (2010), yaitu 186 °C. Hal ini sangat sesuai, karena semakin panjang rantai *spacer arm* maka semakin tinggi suhu yang dibutuhkan untuk memutus ikatan rantai.

Pembentukan Konjugat Hapten-Protein (BSA)

Preparasi konjugat hapten-protein dilakukan setelah produk sintesis terbentuk. Tujuan dari konjugat hapten dengan protein adalah agar didapatkan sebuah antigen yang berukuran lebih besar, karena hapten bersifat antigenik bukan immunogenik. Telah dijelaskan sebelumnya dalam tinjauan pustaka bahwa hapten memiliki sifat sebagai antigen (dapat berinteraksi dengan antibodi) namun tidak bersifat immunogen karena tidak dapat memicu pembentukan antibodi. Proses konjugasi protein dilakukan dalam tiga tahap yaitu pembentukan ester aktif hapten, konjugasi dan dialisis.

Konjugat Hapten-BSA akan dilihat dari nilai pergeseran panjang gelombang. Konjugat hapten-BSA memiliki puncak serapan pada panjang gelombang 215 nm. Puncak ini diindikasikan sebagai hasil kontribusi lompatan-lompatan elektron hapten-BSA.



Gambar 10. Pergeseran puncak serapan UV hapten, BSA, dan Hap-BSA

Pada Gambar 10 menunjukkan perbedaan serapan panjang gelombang antara konjugat hapten-BSA dengan serapan panjang gelombang maksimum dari hapten dan BSA itu sendiri. Hal ini menunjukkan bahwa adanya ikatan konjugasi yang terbentuk, dengan adanya perpindahan elektron dari π ke π^* , sekaligus menunjukkan adanya senyawa yang baru. Konjugat Hapten-BSA lebih bersifat kompleks dibandingkan hapten dan BSA, sehingga ketika melakukan perpindahan elektron membutuhkan energi lebih tinggi, dibandingkan hapten yang belum terkonjugatkan. Semakin besar energi yang diperlukan tinggi, maka serapan panjang gelombang yang dihasilkan bernilai semakin kecil. Energi berbanding terbalik dengan serapan panjang gelombang.

Simpulan dan Saran

Simpulan

Pada penelitian ini telah berhasil disintesis hapten (asam 4-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-ylamino) butanoat) dengan yield sebesar 8,16%. Karakterisasi hapten menunjukkan serapan maksimum UV pada panjang gelombang 233 nm. Serapan inframerah gugus amina sekunder pada bilangan gelombang 1654,92 cm^{-1} dan spektrum *mass spectroscopy* pada m/z 212,4 yang menunjukkan massa relatif hapten ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$). Hasil karakterisasi juga menunjukkan konjugat hapten-BSA telah berhasil disintesis yang menunjukkan serapan UV maksimum pada panjang gelombang 215 nm.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan hapten-BSA yang berhasil dibuat menggunakan metode ELISA agar bisa dilihat serum antibodi yang dihasilkan

memiliki sensitifitas yang baik untuk deteksi melamin.

Daftar Pustaka

- Cao B., Hong Y., Juan S., Huafang C., Shuqun Li., Anping D. 2013. *Sensitivity and Specificity Enhanced Enzyme-Linked Immunosorbent Assay by Rational Hapten Modification and Heterogeneous Antibody/Coating Antigen Combinations for the Detection of Melamine in Milk, Milk Powder and Feed Samples*. *Talanta* 116 : 173-180
- Lei, H.T., Shen, Y.D., Song, L.J., Yang, J.Y., Chevallier, O.P., Haughey, S.A., Wang, H., Sun, Y.M., Elliott, C.T. 2010. *Hapten synthesis and antibody production for the development of a melamine immunoassay*. *Anal. Chim. Acta.*, vol. 665 : 84-90.
- Liu, J.X., Zhong, Y.B., Liu, J. 2010. *An enzyme linked immunosorbent assay for the determination of cyromazine and melamine residues in animal muscle tissues*. *Food Control*, vol. 21 : 1482-1487.
- Miguel, Edwin García, et al. 2018. *Detection of Cyanuric Acid and Melamine in Infant Formula Powders by Mid-FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis*. *Journal of food quality*, Volume 2018 Article ID 7926768
- Ningrum, dian kartika, Gervacia Jenny Ratnawati, Indah Purwaningsih. 2018. Pengaruh Suhu Penyeduhan Terhadap Kadar Protein Pada Susu Formula Menggunakan Metode Kjeldahl. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa* e-ISSN : 2597-9531
- Preechakasedkit, P., Kulwadee P., Wijitar D., Weena S., Wanpen *immuno chromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid*

- detection of Salmonella typhi in human serum. Biosensors and Bioelectronics* : 562– 566.
- Wang, Zongyi, *et al.* 2010. *Screening and Determination of Melamine Residues in Tissue and Body Fluid Samples.* *Analytica Chimica Acta* 662 : 69–75.
- Wei, DU Xin., ZHANG Yan-xin, SHE Yong-xin, LIU Guang-yang, ZHAO Feng-nian¹, WANG Jing, WANG Shan-shan, JIN Fen, SHAO Hua, JIN M1zao-jun, ZHENG Lu-fei. 2016. *Fluorescent competitive assay for melamine using dummy molecularly imprinted polymers as antibody mimics.* *Journal of Integrative Agriculture* 2016, 15(5): 1166–1177
- Yin, W., Liu, J., Zhang, T., Li, W., Liu, W., Meng, M., He, F., Wan, Y., Feng, C., Wang, S. 2010. *Preparation of monoclonal antibody for melamine and development of an indirect competitive ELISA for melamine detection in raw milk, milk powder, and animal feeds.* *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58 : 8152– 8157.
- Zeng H., Ran Y., Qing-wen W., Jian-jun L., Ling-bo Q. 2011. *Determination of Melamine by Flow Injection Analysis Based on Chemiluminescence System.* *Food Chemistry* 127 : 842–846.
- Zhou, Yu, *et al.* 2012. *Monoclonal antibody based inhibition ELISA as a new tool for the analysis of melamine in milk and pet food samples.* *Food Chemistry* Volume 135, Issue 4, 15 December 2012, Pages 2681-2686