

## Kajian spesifisiti antibodi terhadap penanda hormon tumbuhan untuk kajian ketulenan madu kelulut

(Specificity study of antibody against plants hormone markers for pure stingless bee honey determination)

Hazana Razali, Nur Azura Mohd Said, Noor Sheryna Jusoh, Mohd Shahrin Ghazali, Faridah Salam, Norhafniza Awaludin, Mohammad Rejab Ismail dan Rosliza Jajuli

### Pengenalan

Madu merupakan sejenis manisan yang dihasilkan oleh lebah menggunakan nektar bunga. Madu kelulut adalah sejenis madu yang dihasilkan oleh lebah yang tidak menyengat iaitu *Melipona* spp. dan *Trigona* spp. Madu kelulut mempunyai pelbagai kebaikan untuk kesihatan; terbukti mempunyai nilai tambah yang lebih tinggi dan kesan terapeutik berbanding dengan madu lebah *Apis*. Madu kelulut mempunyai profil rasa yang manis dan sedikit masam berikutan kehadiran asid yang rendah. Disebabkan oleh manfaatnya yang banyak, madu kelulut telah diiktiraf sebagai *Superfood* Malaysia. Lambakan madu tiruan di negara ini merupakan isu atau cabaran dalam industri madu kelulut. Pemalsuan atau penipuan itu didorong oleh permintaan yang tinggi terhadap madu kelulut di pasaran. Masalah pemalsuan ini sudah sekian lama wujud dan sukar dibendung. Berdasarkan kajian, hampir 80% madu yang dihasilkan di negara ini didakwa sebagai madu tiruan selain diimport. Madu tiruan dijual dalam pasaran terbuka seperti madu asli menyebabkan pengguna sukar untuk membezakan antara madu kelulut asli dan tiruan. Seseengah pengeluar madu mencampurkan madu tulen dengan gula industri, bahan kimia seperti asid asetik dan air sama ada secara langsung atau tidak. Pengambilan madu tiruan dalam jangka masa panjang boleh memudaratkan kesihatan pengguna seperti menyebabkan kanser, diabetes dan penyakit jantung.

Ketulenan madu ditentukan berdasarkan piawaian Codex (*Codex standard honey codex CXS 12-1981. Amended at 2019*) yang menyatakan bahawa madu komersial adalah produk tulen yang tidak membenarkan sebarang penambahan bahan-bahan lain. Sehingga kini, proses mengenal pasti madu tiruan hanya boleh dilakukan menerusi ujian makmal. Atas justifikasi ini, satu kaedah penentuan yang mudah dan tepat amat diperlukan bagi menangani isu pemalsuan ini dan melindungi hak keselamatan pengguna. Dalam kajian ini, biosensor elektrokimia berasaskan antibodi terhadap penanda hormon tumbuhan iaitu asid absisik (ABA) telah dibangunkan bagi pengesanan ketulenan madu kelulut. ABA merupakan hormon tumbuhan (fitohormon) yang terdapat dalam nektar, madu dan lebah madu dewasa. Aplikasi dan keupayaan ABA sebagai penanda kimia dalam madu telah

dilaporkan seawal tahun 1996 oleh Ferreres et al., diikuti oleh Yao et al. (2004) dan Jasicka-Misiak et al. (2012). Selain ABA, galotannin tumbuhan juga digunakan sebagai penanda untuk pengenalpastian madu tulen menggunakan pendekatan biosensor elektrokimia pada elektrod karbon kaca (GCE). Sensor optik berasaskan aptamer untuk mengesan ABA juga dilaporkan pada permukaan kapilari mikrobendalir yang merekodkan isyarat anjakan puncak. Dalam kajian ini, spesifisiti antibodi terhadap penanda hormon tumbuhan (ABA) telah diukur melalui biosensor elektrokimia.

### **Penghasilan antibodi poliklonal terhadap penanda hormon madu kelulut**

Antibodi yang spesifik terhadap penanda hormon madu kelulut iaitu asid absisik (ABA) telah dibangunkan secara dalaman di Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi MARDI (nombor kelulusan Animal Ethics Committee MARDI 20190829/R/MAEC00054) menggunakan arnab daripada baka New Zealand White untuk proses imunisasi. ABA yang telah dikonjugasi dengan protein ovalbumin (OVA) digunakan sebagai imunogen dan disuntik kepada arnab bagi menghasilkan antibodi yang spesifik terhadap penanda hormon tersebut. Imunisasi ini dijalankan mengikut garis panduan yang telah ditetapkan oleh Leenars dan Hendriksen (2005).

Titer antibodi terhadap antibodi poliklonal yang dihasilkan ditentukan melalui kaedah *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bagi mengukur kualiti antibodi yang terhasil. Antibodi praimunisasi digunakan sebagai antibodi kawalan dan dibandingkan dengan antibodi yang terhasil selepas proses imunisasi. Keputusan menunjukkan aktiviti antibodi yang tinggi dihasilkan iaitu menunjukkan nilai penyerapan tiga kali ganda lebih tinggi daripada antibodi praimunisasi. Antibodi kali ketiga selepas pengambilan darah menunjukkan aktiviti titer yang paling optimum pada kedua-dua ekor arnab kajian (*Rajah 1*). Antibodi daripada kumpulan ini seterusnya digunakan dalam pembangunan imunosensor.

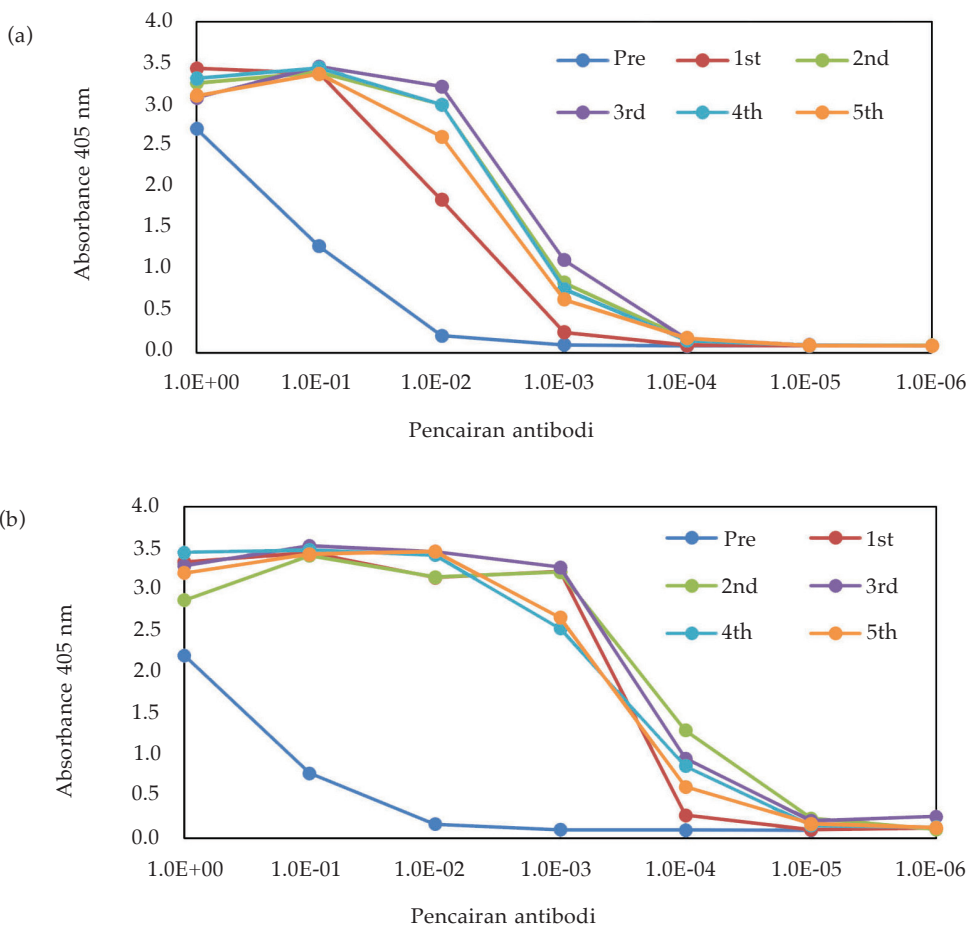
### **Pembangunan imunosensor berasaskan antibodi terhadap penanda hormon tumbuhan**

Antibodi (Ab) yang dihasilkan digunakan sebagai platform sensor bersama dengan polimer polianiline (PANi). Antibodi yang spesifik terhadap ABA telah dikonjugasi dengan 20 nm emas nanokoloid (Au) terlebih dahulu sebelum dipegunkan ke atas permukaan elektrod karbon bercetak skrin (SPCE) bersama PANi. Selepas satu jam, PANi dan konjugasi Ab-Au yang tidak dipegunkan pada permukaan elektrod dibasuh dengan larutan penimbal salin fosfat (PBS) dan dikeringkan. Kemudian, 1% *bovine serum albumin* (BSA) digunakan sebagai agen penyekat bagi mengelakkan tapak pengikatan yang tidak spesifik di atas *working electrode* (WE). Selepas itu, ABA piawai atau sampel madu

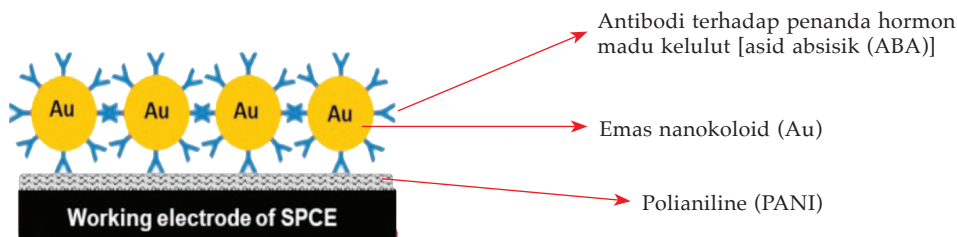
dijerapkan ke atas permukaan elektrod tersebut selama 30 minit sehingga satu jam bagi membenarkan pengikatan ABA terhadap antibodi yang terdapat pada permukaan WE. Sampel ataupun ABA yang tidak terikat pada antibodi dibasuh dengan larutan PBS dan analisis *Differential Pulse Voltammetry* (DPV) dijalankan dengan menggunakan larutan 5 mM/*ferricyanide/ferrocyanide* sebagai larutan untuk pengaliran elektron. Analisis DPV dijalankan pada suhu bilik dengan peralatan Autolab PGSTAT 20 potentiostat dengan perisian NOVA 1.10 (Eco Chemie, Netherlands).

**Kajian sensitiviti dan spesifisiti imunosensor**

Graf bagi ABA piawai dalam larutan penimbal PBS pH 7.4 dan matrik madu telah berjaya dibangunkan pada parameter yang telah dioptimumkan. Arus bagi setiap kepekatan ABA piawai iaitu antara 1 – 7 ppm telah direkodkan melalui pengukuran DPV pada potensi -250 mV hingga 250 mV. Larutan PBS telah digunakan sebagai piawai kawalan atau 0 ppm.



Rajah 1. Graf titer aktiviti antibodi (a) arnab 1 dan (b) arnab 2 terhadap asid absisik (ABA) sebagai penanda hormon madu kelulut

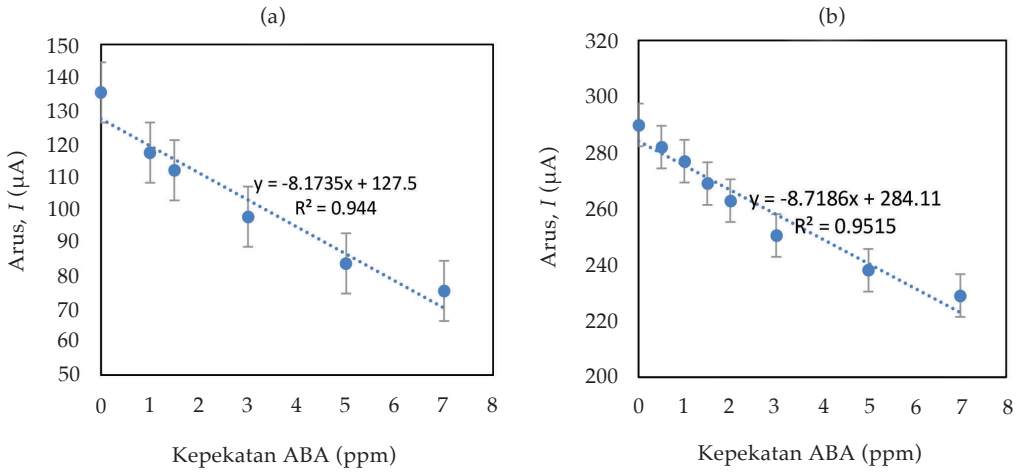


Gambar rajah 1. Skematik diagram pemegungan PANI/Au-ABA antibodi di atas permukaan working electrode (WE) SPCE

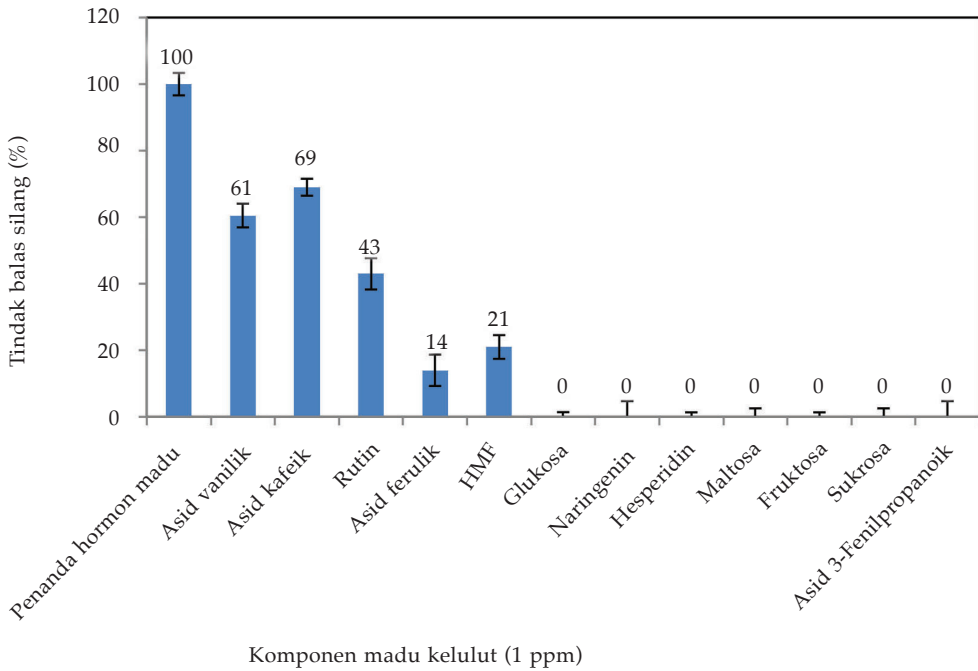
Graf piawai menunjukkan garisan linear berbalik atau perkadaran songsang iaitu arus semakin berkurang dengan peningkatan kepekatan ABA dengan  $R^2 = 0.944$ . Manakala bagi graf piawai untuk sistem larutan penimbal dalam sistem matrik madu telah berjaya diperolehi dengan nilai  $R^2 = 0.951$  (Rajah 2). Imunosensor yang dibangunkan telah menunjukkan kepekaannya dengan had pengesanan (LOD) ialah 2.39 ppm dalam sistem larutan penimbal dan 0.64 ppm dalam matriks madu manakala had kuantifikasi (LOQ) masing-masing ialah 7.23 ppm dan 1.93 ppm.

Menurut kajian oleh Habib et. al. (2014), selain gula (glukosa dan fruktosa) dan air, terdapat komponen lain juga dalam madu kelulut seperti asid organik, sebatian fenolik (asid fenolik dan flavanoid), protein, asid amino, enzim dan mineral. Oleh yang demikian, kajian spesifisiti telah dijalankan ke atas imunosensor yang dibangunkan dengan melakukan tindak balas silang menggunakan komponen-komponen lain yang terdapat dalam madu kelulut tersebut (Rajah 3).

Kajian tindak balas silang ini menunjukkan imunosensor yang dibangunkan menunjukkan sedikit tindak balas dengan asid vanilik dan asid kafeik iaitu masing-masing menunjukkan peratusan tindak balas sebanyak 61% dan 69% manakala tindak balas silang terhadap rutin, asid ferulik dan HMF adalah bawah 50%. Bagi komponen-komponen lain, tiada tindak balas silang ditunjukkan. Ini membuktikan bahawa imunosensor yang dibangunkan adalah sangat spesifik untuk pengesanan ABA sebagai penanda tumbuhan dalam madu kelulut.



Rajah 2. Pembangunan graf piawai bagi (a) ABA piawai dalam sistem larutan peninbal (b) ABA piawai dalam sistem matriks madu



Rajah 3. Kajian tindak balas silang ABA immunosensor dengan komponen lain dalam madu kelulut pada kepekatan 1 ppm

## Kesimpulan

Dalam kajian ini, immunosensor elektrokimia bagi penentuan ketulenan madu kelulut asli telah berjaya dibangunkan dengan menggunakan ABA sebagai penanda hormon bagi madu kelulut. Graf piawai telah berjaya dibangunkan dalam sistem larutan penimbal dan sistem matriks madu dengan masing-masing  $R^2 = 0.944$  dan  $R^2 = 0.951$ . Kepekaan immunosensor yang dibangunkan untuk mengesan kehadiran ABA pada LOD yang rendah juga membuktikan bahawa sensitiviti sistem yang dibangunkan. Kajian tindak balas silang yang rendah terhadap komponen-komponen lain dalam madu juga menunjukkan bahawa immunosensor tersebut sangat spesifik untuk pengesanan ABA sebagai penanda hormon tumbuhan dalam madu kelulut asli. Ini menunjukkan antibodi poliklonal yang berjaya dihasilkan adalah sangat spesifik dan selektif terhadap ABA.

## Penghargaan

Penulis merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada pihak Bahagian Industri Tanaman, Ternakan dan Perikanan (ITTP), MAFI atas geran penyelidikan yang telah diberikan bawah kod projek K-RB2A9-1001-KSR999 dan ahli-ahli Kumpulan Penyelidikan Projek Kit Pengesanan Ketulenan Madu Kelulut Asli bawah Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan serta Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran yang terlibat secara langsung atau tidak dalam pelaksanaan projek ini.

## Bibliografi

- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Albertini, M.C. dan Piatti, E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry* 97(2): 217 – 222
- Codex Alimentarius Commission (1981). Revised Codex Standard for Honey Codex Stand 12-1981, Rev 1(1987), Rev 2 (2001), Codex Standard, Vol. 12, m.s. 1 – 7
- Ferreres, F., Andrade, P. dan Tomás-Barberán, F.A. (1996). Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(8): 2,053 – 2,056
- Habib, H.M., Al Meqbali, F.T., Kamal, H., Souka, U.D. dan Ibrahim, W.H. (2014). Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chemistry* 153: 35 – 43
- Hamid, Z.A. (2019). Stingless bees the next “super food” industry. *New Straits Times*. Diperoleh dari <https://www.nst.com.my/opinion/columnists/2019/08/514289/stingless-bees-next-super-food-industry>
- Ismail, M.R., Mat Hayin N.A. dan Mahmud, N.H. (2021). Tulen atau Campuran? Keaslian Madu di pasaran tempatan diragui. *Metro Ahad*. m.s. 2
- Ismail, N.I.B. (2017). Characterisation of Malaysian honeys and electrochemical detection of gallotannin for pure honey identification. *Doctoral dissertation*, Universiti Teknologi Malaysia

- Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Dereń, M. dan Kafarski, P. (2012). Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry* 131(4): 1,149 – 1,156
- Kek, S.P., Chin, N L., Yusof, Y.A., Tan, S.W. dan Chua, L.S. (2014). Total phenolic contents and colour intensity of Malaysian honeys from the *Apis* spp. and *Trigona* spp. bees. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2: 150 – 155
- Lisut, O., Abdul Rahim, R.I. dan Zainuddin, M.Z. (2017). Madu Bertukar Jadi Penyakit. *Berita Harian*. m.s. 8 – 9
- Negri, P., Maggi, M.D., Ramirez, L., De Feudis, L., Szwarski, N., Quintana, S., Eguaras, M.J. dan Lamattina, L. (2015). Abscisic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. *Apidologie* 46(4): 542 – 557
- Song, C., Chen, C., Che, X., Wang, W. dan Que, L. (2017). Detection of plant hormone abscisic acid (ABA) using an optical aptamer-based sensor with a microfluidics capillary interface. In *2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)* m.s. 370 – 373
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N. dan Raymont, K. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry* 86(2): 169 – 177

### Ringkasan

Madu adalah produk semula jadi daripada nektar bunga dan dihasilkan oleh lebah kelulut dan lebah *Apis*. Madu kelulut sangat terkenal kerana kemanisannya yang tersendiri, bercampur dengan rasanya yang berasid dan tekstur cecairnya membuatkan ia mempunyai nilai tambah yang lebih tinggi berbanding dengan madu lebah *Apis*. Selain itu, madu kelulut mempunyai banyak khasiat yang penting untuk kesihatan. Isu pemalsuan madu kelulut semakin mendapat perhatian berikutan permintaan yang tinggi di pasaran. Sesetengah pengeluar madu mencampurkan madu kelulut asli dengan gula tambahan, bahan kimia dan air secara langsung atau tidak langsung. Justeru, satu kaedah ataupun alat bagi pengesanan ketulenan madu kelulut telah dibangunkan bagi menangani isu ini. Asid absisik (ABA) digunakan sebagai penanda hormon tumbuhan dalam pembangunan sensor. Antibodi poliklonal terhadap ABA telah dibangunkan secara dalaman dan digunakan sebagai bioreseptor pada platform sensor. Platform sensor telah diubah suai dengan polianilin (PANi) dan emas nano koloid untuk meningkatkan isyarat dan sensitiviti sensor tersebut. Graf piawai telah dibangunkan antara 0 hingga 7 bahagian per juta (ppm) dalam larutan penimbal dan matriks madu masing-masing dengan  $R^2 = 0.944$  dan  $R^2 = 0.9515$ . Sensitiviti dan kepekaan immunosensor yang dibangunkan telah diuji melalui tindak balas silang dengan sebatian kimia lain yang terdapat dalam madu kelulut seperti glukosa, fruktosa, hesperidin, asid ferulik, asid kafeik dan lain-lain. Sensor yang dibangunkan sangat spesifik untuk mengesan ABA yang menunjukkan tindak balas silang yang rendah dengan bahan kimia yang lain. Sampel-sampel madu kelulut, madu lebah dan madu tualang telah dianalisis sifat elektrokimianya menggunakan immunosensor yang dibangunkan. Parameter lain untuk madu-madu tersebut juga diukur seperti pH, warna dan rasa. Perbandingan juga dibuat menggunakan madu palsu

yang dikenal pasti oleh Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan (tiada kehadiran asid absisik menggunakan HPLC-MS) untuk menentukan korelasi antara kedudukan puncak dan arus puncak yang diukur. Selain itu, madu kelulut yang dicampur dengan aduleran seperti sirap glukosa, sirap jagung fruktosa tinggi (HFCS), air suling dan asid asetik juga dikaji. Kajian menunjukkan arus puncak bagi sampel yang telah dicampur dengan aduleran menunjukkan penambahan atau pengurangan daripada julat arus puncak madu kelulut asli.

### Summary

Honey is a natural product from nectar flower produced by stingless bee and *Apis* bee. Stingless bee honey is popular for its distinct sweetness, mixed with an acidic taste and fluid texture; which gave higher value added compare to *Apis* bee honey. Futhermore, stingless bee honey contains various important and nutritional compounds that beneficial to health. Honey adulteration issues were gain attention due to the high demand on the stingless bee honey in the market. Some honey manufactures adulterate pure honey with industrial sugar, chemicals and water either directly or indirectly. As consequences of this issue, this study was conducted to develop an electrochemical immunosensor for detection of stingless bee honey purity. Abscisic acid (ABA) was used as a phytohormone chemical marker in sensor development. Polyclonal antibody against ABA was developed in house and was used as bio receptors on the sensor platforms. Sensor platform was modified with polyaniline (PANi) and nano colloidal gold to enhance current signal and sensitivity of the sensor. Standard graph has been developed between 0 – 7 part per million (ppm) in buffer system and honey matrix with  $R^2 = 0.944$  and  $R^2 = 0.9515$  respectively. Specificity and sensitivity of the developed immunosensor was investigated by cross reacted with other chemical compounds present in stingless bee honey such as glucose, fructose, hesperidine, ferrulic acid, caffeic acid and etc. It showed that the sensor is very specific to ABA which show low cross reactivity with others chemical compounds. The samples which comprised of stingless bee (*kelulut*) honeys, bee honeys and *tualang* honeys were analysed for their electrochemical properties using the developed immunosensor. Prior the analysis, other parameters and characterisations were also studied, e.g.the pH, colours and taste. Comparisons were also made with fake honeys as identified by Food Science and Technology Research Centre (no abscisic acid presence in HPLC-MS) to determine the correlation between the peak position and peak currents measured. In addition, *kelulut* honey mixed with adulterants such as glucose syrup, high fructose corn syrup (HFCS), distilled water and acetic acid were also studied. Studies show that the peak currents for samples that have been mixed with adulterants show an increase or decrease from the peak current range of natural honey.



**Pengarang**

Hazana Razali

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: hazana@mardi.gov.my

Nur Azura Mohd Said (Dr.), Noor Sheryna Jusoh, Mohd Shahrin Ghazali,  
Faridah Salam (Dr.), Norhafniza Awaludin dan Mohammad Rejab Isamil  
Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Rosliza Jajuli (Dr.)

Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja, Ibu Pejabat MARDI  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor