

KOMUNIKASI SINGKAT

Konjugat Poliklonal Antibodi Nanopartikel Emas untuk Deteksi *Potato Virus Y*

Polyclonal Antibodi-Gold Nanoparticles for *Potato Virus Y* Detection

Ifa Manzila¹, Tri Puji Priyatno¹, Fikri Hidayatullah²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan
Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor 16111.

²Departemen Biokimia, Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680.

ABSTRAK

Nanopartikel emas merupakan larutan koloid gugus atom emas yang stabil dengan dimensi 1–100 nm dan memiliki plasmon permukaan dengan enam elektron bebas. Keberadaan enam elektron bebas di permukaan plasmon menyebabkan nanopartikel emas mudah berikatan dengan berbagai jenis bioreseptor termasuk poliklonal antibodi. Konjugat poliklonal antibodi *potato virus Y* (PVY) dengan nanopartikel emas telah berhasil dibuat dengan tujuan untuk pengembangan metode deteksi cepat infeksi PVY pada tanaman. Pembuatan nanopartikel emas dilakukan dengan reaksi reduksi emas (III) klorida trihidrat (HAuCl₄) dengan sodium sitrat 1%. Kemudian nanopartikel yang dihasilkan digunakan untuk pembuatan konjugat-antibodi PVY-nanopartikel emas. Deteksi PVY dilakukan dengan *dot blot* pada membran nitroselulosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus PVY pada membran dapat terdeteksi 10–30 menit setelah inkubasi bergantung pada konsentrasi konjugat dan konsentrasi virus pada sampel. Penggunaan konjugat nanopartikel emas mampu meningkatkan efisiensi metode *immunodot blot* sekitar 1 jam dan dapat dikembangkan menjadi sistem *lateral flow* untuk deteksi PVY di lapangan.

Kata kunci: Biokonjugasi, Nanopartikel Emas, Nanopartikel Karakterisasi,
Nanopartikel interaksi, PVY

ABSTRACT

Gold nanoparticles are stable colloidal solutions with dimensions of 1-100 nm having surface plasmon resonance with six free electrons. The existing of six free electrons on the surface of a plasmon causes gold nanoparticles to bind easily to various types of bioreceptors including polyclonal antibodies. Polyclonal potato virus Y (PVP) antibody been successfully conjugate with gold nanoparticles in order to develop a rapid detection for PVY infection in potato plants. The gold nanoparticles was synthesized by the reduction of gold (III) chloride trihydrate (HAuCl₄) with 1% sodium citrate. Subsequently, the nanoparticles were used to make gold nanoparticle-antibody PVY-conjugate. PVY detection was carried out with dot blot method on the nitrocellulose membrane. The results showed that the PVY virus on the membrane can be detected 10-30 minutes after incubation, depend on the concentration of the conjugate and the concentration of the virus in the sampel. The use of gold nanoparticle conjugates can increase the efficiency of the immunodot blot method in about 1 hour, and this method can be developed to be a lateral flow system for field detection of PVY.

Key words: bioconjugation, gold nanoparticles, nanoparticle characterization,
nanoparticle-cell interaction, PVY

*Alamat penulis korespondensi: Peneliti Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. Jalan Tentara Pelajar no. 3A Bogor 16111.
Tel: 0251-8338820, Faks: 0251 – 8338820, Surel: ifamanzila@gmail.com

Potato virus Y (PVY) merupakan salah satu virus penting penyebab penyakit pada tanaman kentang dan beberapa Solanaceae lainnya seperti tomat, cabai, kentang, dan tembakau (Friendland *et al.* 2008). PVY termasuk dalam anggota genus Potyvirus dan famili Potyviridae yang dapat menginfeksi tanaman secara mekanis dan bantuan serangga vector (Hussain *et al.* 2016). Gejala infeksi serangan akan muncul kurang lebih 10 hari setelah infeksi, mulai dari gejala ringan (pembengkokan folikel, goresan, dan mosaik) hingga parah (nekrosis daun, patah daun, dan kematian) (Hussain *et al.* 2016). Serangan PVY dapat menurunkan produksi dan mutu kentang hingga menyebabkan kerugian yang besar (Schramm *et al.* 2011). Pengendalian PVY dapat dilakukan dengan menyediakan benih bebas virus karena PVY termasuk virus yang bersifat tular benih. Hal ini memerlukan teknologi deteksi dini virus yang cepat dan akurat.

Saat ini teknik deteksi virus berbasis imunologi berkembang pesat dengan adanya dukungan teknologi nano. Salah satu material nano yang banyak digunakan dalam pengembangan immunosensor ialah nanopartikel emas yang memiliki sifat plasmon permukaan sangat baik. Plasmon permukaan adalah osilasi elektron-elektron pada permukaan logam yang mampu berikatan dengan berbagai macam bioreseptor, seperti enzim, protein, antibodi, organel, jaringan, sel bakteri, dan DNA/RNA (Yeh *et al.* 2012). Nanopartikel emas merupakan larutan koloid gugus atom emas yang memiliki dimensi 1–100 nm dan enam elektron bebas di permukaan logamnya (Parida *et al.* 2011; Eustis dan El-Sayed 2005; Razak *et al.* 2016). Penggunaan nanopartikel emas untuk immunosensor terbukti dapat meningkatkan sensitivitas dan akurasi, serta mudah dibuat menjadi perangkat deteksi berukuran mini (Yeh *et al.* 2011).

Koloid nanopartikel emas disintesis dari gold (III) chloride hydrate (HAuCl_4 , Sigma-Aldrich, USA) dengan metode reduksi menggunakan sodium sitrat (Tyagi *et al.* 2016). Sebanyak 50 mL larutan HAuCl_4 dengan

konsentrasi 0.004%, 0.006%, dan 0.008% dimasukkan dalam erlenmeyer (100 mL) dan dipanaskan pada *hotplate stirrer* sambil diaduk hingga mendidih. Selanjutnya larutan ditambahi 1 mL sodium sitrat 1% sambil terus dididihkan dan diaduk merata hingga larutan HAuCl_4 berubah menjadi warna merah yang menunjukkan telah terjadinya pembentukan koloid nanopartikel emas. Hasil sintesis nanopartikel emas ini dicek panjang gelombangnya dengan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian larutan koloid nanopartikel emas diatur pH menjadi 8.2 dan disimpan pada suhu 4 °C sebelum digunakan.

Konjugat poliklonal antibody PVY-nanopartikel emas dibuat dengan mencampurkan 50 μL antibody PVY (Agdia, USA) yang telah diencerkan 200 \times dalam *carbonat coating buffer* dalam tabung mikro (1.5 mL) dengan 1 mL larutan koloid nanopartikel emas hasil sintesis dengan konsentrasi HAuCl_4 0.004% (Cao *et al.* 2011). Campuran diinkubasikan pada suhu ruang selama satu jam sambil digoyang dengan orbitas shaker 150 rpm. Setelah satu jam, campuran ditambahkan 100 μL BSA 10% dan diinkubasikan lagi selama 30 menit pada kondisi inkubasi yang sama. Kemudian larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13 000 \times g selama 15 menit pada suhu 4 °C dan sedimennya dilarutkan dalam 1 mL bufer yang mengandung sodium fosfat 20 mM, tween-20 0.25%, sukrosa 10%, dan BSA 5%. Konjugat antibodi-nanopartikel emas ini disimpan pada suhu 4 °C sebelum digunakan.

Konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas digunakan untuk mendeteksi infeksi PVY pada 10 sampel daun kentang yang dikoleksi dari Pangalengan, Bandung, Jawa Barat. Setiap sampel diambil dari lima tanaman kentang bergejala serangan PVY di sejumlah lokasi pertanaman kentang. Sampel daun dibalut tisu basah pada bagian pangkalnya, disimpan dalam plastik, dan ditaruh dalam boks es untuk menjaga kesegaran sampel. Untuk keperluan pengujian, sebanyak 100 mg sampel daun digerus hingga lumat dalam 1 mL bufer PBS 1X. Kemudian 5 μL suspensi ekstrak tanaman diteteskan pada membran nitroselulosa

(ThermoFisher Scientific). Sebagai kontrol negatif ialah suspensi ekstrak daun tanaman sehat, sedangkan kontrol positifnya menggunakan *sap control positive* PVY (Agdia, USA, no. katalog LPC20001). Setelah dikeringanginkan, membran direndam dalam larutan blocking (2% BSA dalam PBS 1X) dalam cawan petri selama 45 menit pada suhu 37 °C sambil digoyang di orbital shaker 50 rpm, lalu dicuci tiga kali dengan PBS 1X yang mengandung tween-20 0.1% (PBST). Selanjutnya, membran direndam dalam 5 mL PBS yang mengandung 50 µL konjugat antibodi PVY–nanopartikel emas dan diinkubasikan pada kondisi yang sama seperti di atas. Interaksi konjugat dengan antigen PVY akan terlihat melalui sinyal berwarna merah yang muncul beberapa menit setelah inkubasi.

Pengujian juga dilakukan untuk mengetahui kemampuan konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas dalam mendeteksi PVY menggunakan beberapa konsentrasi *sap control positive* PVY. *Sap control positive* PVY diencerkan dalam *general extract buffer* (GEB) dengan tingkat pengenceran 400×, 600×, 800×, 1000×, 1200× dan 1600×. Setiap 5 µL larutan *sap control positive* PVY diteteskan pada membran nitroselulosa, lalu direaksikan dengan konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas seperti prosedur di atas.

Hasil deteksi PVY dengan konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas diverifikasi dengan metode *double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay* (DAS-ELISA) dan RT-PCR. Pengujian dengan DAS-ELISA dilakukan sesuai protokol standar. Sampel daun digerus hingga lumut dalam bufer GEB, lalu 100 µL suspensi ekstrak daun dimasukkan dalam sumuran cawan mikro titer untuk diuji.

Metode RT-PCR dilakukan dengan pasang primer *forward* PVY-EAF 5'- GTAAACTT - GCATACGA - CATA GGAGAACT-3'), dan *reverse* PVY-EAR(3'-ACATGTTCTCA CTCCAAGTAGAGTATGC5'). Isolasi RNA total dilakukan dengan RNA Mini Kit Plant dan sintesis RNA menjadi cDNA (Geneaid) sesuai protokol. RNA disintesis menjadi cDNA menggunakan cDNA synthesis kit (Bioline, USA). cDNA digunakan untuk PCR

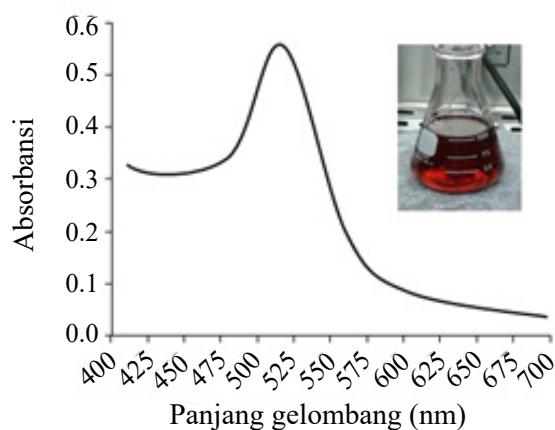
menggunakan Go Tag Green Master Mix 2× 12.5 µL (Promega, USA). PCR dilakukan pada mesin PCR T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) dengan program: denaturasi awal 94 °C selama 5 menit, kemudian dilanjutkan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi 94 °C selama 30 detik, aneling pada suhu 55 °C selama 45 detik, pemanjangan pada suhu 72 °C selama 1 menit, dan diikuti pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1% dan divisualisasi dengan UV transiluminator setelah diwarnai dengan etidium bromida. Pengukuran DNA menggunakan penanda 100 pb ladder (Fermentas, Canada).

Sintesis nanopartikel emas menggunakan HAuCl₄ dengan sodium sitrat menghasilkan larutan koloid nanopartikel berwarna merah yang berdasarkan deteksi spektrofotometer memiliki titik puncak absorbansi panjang gelombang 517–534 nm. Semakin tinggi konsentrasi larutan klorida emas semakin tinggi nilai absorbansinya (Tabel 1; Gambar 1). Menurut Sapsford *et al.* (2013) warna larutan koloid nanopartikel emas bergradasi dari warna merah tua hingga biru mengikut ukuran partikelnya. Larutan koloid yang berwarna merah tua memiliki partikel berbentuk bulat berukuran lebih kecil dari 100 nm, sedangkan koloid berwarna biru/ungu dihasilkan dari partikel berbentuk batang yang berukuran lebih besar. Perbedaan ukuran nanopartikel emas juga memengaruhi spektrum absorbansi panjang gelombang. Nilai absorbansi nanopartikel emas yang berukuran 10–100 nm memiliki kisaran absorbansi 517–575 nm (Link dan El-Sayed 1999). Nanopartikel yang umum digunakan dalam pelabelan antibodi ialah berukuran 20 nm ± 3.5 nm (Ljungblad 2009). Dengan demikian, sintesis nanopartikel emas yang menggunakan HAuCl₄ 0.004%–0.008% menghasilkan nanopartikel dengan ukuran yang sesuai untuk pembuatan konjugat antibodi-nanopartikel.

Dalam pembuatan konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas, hasil reaksi konjugasi nanopartikel emas pada antibodi menunjukkan adanya perubahan warna larutan koloid nanopartikel dari merah

Tabel 1 Analisis UV-Vis larutan koloidal nanopartikel emas

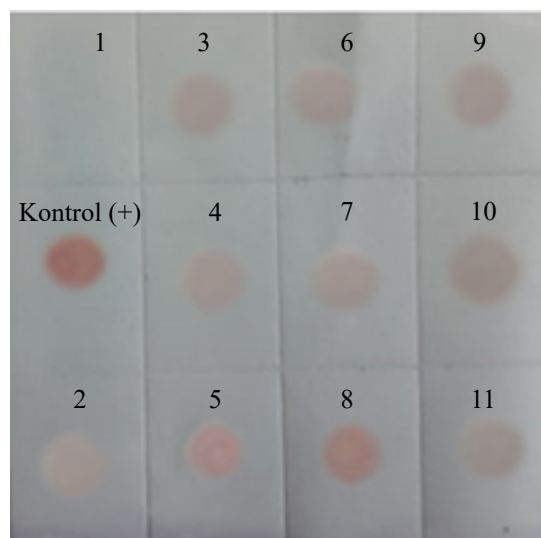
Konsentrasi H ₂ AuCl ₄ (%)	pH	Posisi puncak	
		Absorbansi (ABS)	Panjang gelombang (nm)
0.004	8.170	0.548	517.0
0.006	8.210	1.016	518.5
0.008	8.222	1.550	534.5



Gambar 1 Spektrum UV-Vis larutan koloidal nanopartikel emas.

pekat menjadi agak pudar. Perubahan ini disebabkan oleh adanya pengikatan antibodi pada permukaan nanopartikel emas. Menurut Pham *et al.* (2012), semakin tinggi konsentrasi antibodi yang ditambahkan ke dalam larutan nanopartikel, semakin banyak protein yang terikat hingga semua situs permukaan pengikatan nanopartikel penuh dan terjadi perubahan warna yang sangat nyata.

Hasil deteksi sampel daun kentang yang memiliki gejala PVY dengan konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas disajikan pada Gambar 2. Sinyal berwarna kemerahan muncul pada semua sampel daun yang bergejala PVY, sedangkan pada kontrol tanaman sehat tidak menunjukkan adanya sinyal. Pada *sap control positive* PVY terlihat sinyal kemerahan yang sangat jelas dibandingkan dengan sampel lainnya. Sinyal muncul 10–15 menit setelah membran direaksikan dengan konjugat antibodi-nanopartikel emas. Hasil ini menunjukkan bahwa konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas efektif untuk mendeteksi adanya virus PVY dari sampel tanaman. Hasil penelitian yang sama juga dilaporkan oleh Pham *et al.* (2012) yang mendeteksi virus



Gambar 2 Hasil *imunodot blot* PVY dengan konjugat antibodi-nanopartikel emas. No. 1 = daun dari tanaman sehat; 2 = daun tanaman sakit asal Pangalengan; 3–4 = daun tanaman sakit asal Legok Bako; 5 = daun tanaman sakit asal Cipaganti; 6 = daun tanaman sakit asal Cimenyan; 7–8 = daun tanaman sakit asal Los; 9 = daun tanaman sakit asal Padaawas; 10 = daun tanaman sakit asal Kertamana; 11 = daun tanaman sakit asal Cimenyan.

H5N1 dengan imunoblotting menggunakan konjugat antibodi-nanopartikel emas virus tersebut. Menurut Tripathi dan Driskell (2018), konjugasi nanopartikel emas pada antibodi tidak memengaruhi interaksi antibodi dengan antigen, sehingga konjugat antibodi-nanopartikel emas masih mampu mendeteksi antigen yang ada di permukaan membran.

Hasil uji sensitivitas menunjukkan bahwa konjugat antibodi-nanopartikel masih mampu mendeteksi antigen (kontrol positif PVY) hingga konsentrasi pengenceran *sap control positive* PVY 800× (Gambar 3). Pada tingkat pengenceran *sap control positive* PVY yang lebih rendah lagi, konjugat antibodi-

nanopartikel emas sudah tidak mampu mendeteksi lagi. Sinyal yang dihasilkan dari hasil deteksi pengenceran *sap control positive* PVY 800× juga tidak terlalu nyata dengan warna keabu-abuan pudar. Perubahan gradasi warna sinyal yang dihasilkan sangat ditentukan oleh jumlah konjugat antibodi-nanopartikel yang berinteraksi dengan jumlah antigen PVY yang dideteksi. Hasil ini menunjukkan bahwa konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas cukup sensitif mendeteksi partikel PVY. Meskipun hasil ini tidak diverifikasi dengan metode *dot blot* menggunakan konjugat antibodi-enzim, tapi penggunaan konjugat antibodi-nanopartikel emas memiliki efisiensi waktu 30–60 menit dibandingkan dengan penggunaan konjugat antibodi-enzim *horse radish peroxidase* atau *fosfat alkalin*.

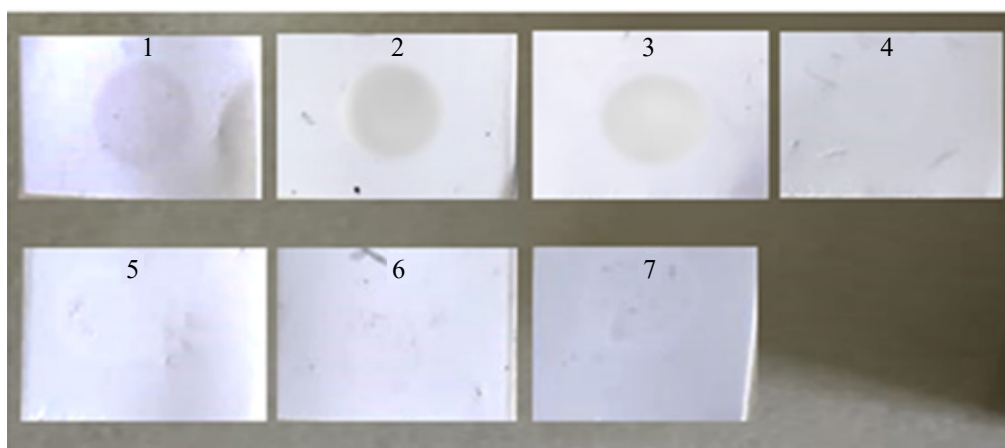
Hasil verifikasi dengan metode DAS-ELISA dan RT-PCR memastikan bahwa konjugat antibodi PVY-nanopartikel emas efektif untuk mendeteksi PVY. Berdasarkan uji DAS-ELISA, semua sampel positif terinfeksi PVY dan nilai absorbansi setiap sampel >2 kali nilai absorbansi kontrol negatif (buffer dan tanaman sehat) (Tabel 2). Tetapi hasil RT-PCR mendeteksi ada satu sampel yang negatif, yaitu sampel daun dari Cipaganti. Produk PCR dari hasil amplifikasi dengan pasangan

primer PVY-EAF/ PVY-EAR berupa pita tunggal berukuran ~500 pb seperti ditargetkan (Gambar 4). Deteksi dengan PCR yang dianggap sangat sensitif sering dipengaruhi oleh faktor kuantitas dan kualitas DNA cetakan, suhu pemanjangan, serta volume dan konsentrasi komponen dalam reaksi PCR (Sambrook dan Russell 2001).

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa penggunaan konjugat antibody PVY-nanopartikel emas dengan metode imunoblotting memiliki efektivitas dan sensitivitas tinggi untuk deteksi PVY. Teknik ini juga memiliki efisiensi waktu dibandingkan dengan teknik yang sama, yaitu menggunakan konjugat antibody-enzim. Oleh karena itu, konjugat antibody PVY-nanopartikel emas prospektif untuk digunakan dalam pengembangan metode deteksi dini PVY mendukung pengadaan bibit kentang bebas virus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Sherli Anggarini SP. atas bantuannya di laboratorium maupun dalam survei dan pelaksanaan teknis di lapangan.



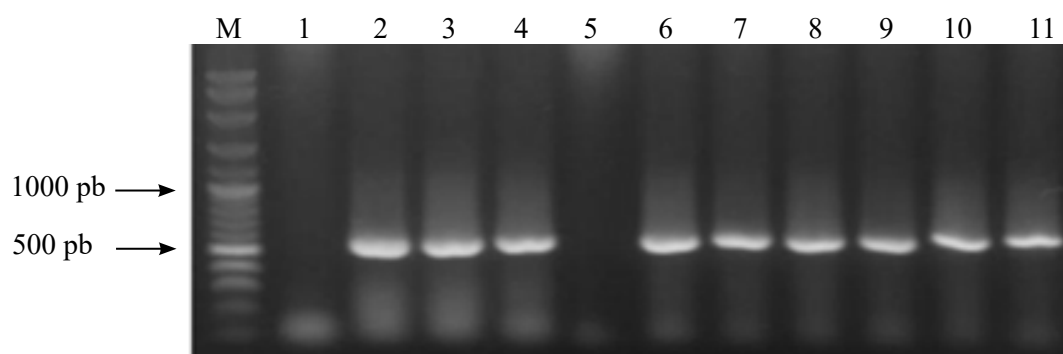
Gambar 3 Konsentrasi antigen yang dapat terdeteksi oleh konjugat antibodi-nanopartikel emas. 1 = pengenceran 400×; 2 = 600×; 3 = pengenceran 800×; 4 = pengenceran 1000×; 5 = pengenceran 1200×; 6 = pengenceran 1600×; 7 = kontrol (-)

Tabel 2 Hasil deteksi virus PVY dengan teknik ELISA dan PCR

Nomor sampel	Asal	Gejala	ELISA*		PCR**
			Absorbansi	Keterangan	
Buffer	-	-	0.149	-	
Kontrol Positif	Agdia	-	1.174	+++	
1 Tanaman sehat	Pengalengan	Tidak bergejala	0.169	-	-
2 Tanam sakit	Pengalengan	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	1.089	+++	+
3 Tanam sakit	Legok Bako	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	1.394	+++	+
4 Tanam sakit	Legok Bako	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	1.284	+++	+
5 Tanam sakit	Cipaganti	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	0.619	++	-
6 Tanam sakit	Cimemyan	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	1.722	+++	+
7 Tanam sakit	Los	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	0.554	+	+
8 Tanam sakit	Los	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	1.074	+++	+
9 Tanam sakit	Padaawas	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	0.451	+	+
10 Tanam sakit	Kertamanah	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	0.823	++	+
11 Tanaman sakit	Cimemyan	Tulang daun pucat, bentuk daun berubah	1,298	++	+

Ket:*Hasil reaksi ELISA: +++ = positif kuat; ++ = positif sedang; + = positif; - = negatif

**Hasil PCR: + = ada amplicon sesuai target; - = tidak ada amplicon



Gambar 4 Amplicon hasil PCR sampel daun kentang terinfeksi PVY. Lajur 1 = daun dari tanaman sehat; 2 = daun tanaman sakit asal Pengalengan; 3-4 = daun tanaman sakit asal Legok Bako; 5 = daun tanaman sakit asal Cipaganti; 6 = daun tanaman sakit asal Cimemyan; 7-8 = daun tanaman sakit asal Los; 9 = daun tanaman sakit asal Padaawas; 10 = daun tanaman sakit asal Kertamana; dan 11 = daun tanaman sakit asal Cimemyan.

DAFTAR PUSTAKA

- Cao B, Xi T, Hiu D. 2011. Preparation of nanogold labeled goat-anti-rabbit IgG and their application in an immunoassay. *Metalurgija-MJoM*. 17(2):79-85.
- Eustis S, El-Sayed M. 2005. Aspect ratio dependence of the enhanced fluorescence intensity of gold nanorods: experimental and simulation study. *J Phys Chem B*. 109 (34):16350-16356. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp052951a>.

- Friendland RP, Tedesco JM, Wilson AC, Atwood CS, Smith MA, Perry G, Zagorski MG. 2008. Antibodies to Potato virus Y bind the A β peptide: Immunohistochemical and NMR studies. *J Biol Chem.* 10: 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M802088200>.
- Hussain A, Arif M, Abbas A, Hussain B, Ali M, Jaffar S. 2016. A review on aphid-borne virus (*Potato virus Y*). *JEZS.* 4(3):189-192.
- Ljungblad J. 2009. Antibodi-conjugated gold nanoparticles integrated in a fluorescence based biochip. [thesis]. Linkoping (SE): Linkopings Universitet.
- Link S, El-Sayed MA. 1999. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J Physic Chem B.* 103:4212–4217. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp984796o>.
- Parida UK, Bindhani BK, Nayak P. 2011. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using onion (*Allium cepa*) extract. *World J Nano Sci Engineering.* 1:93–98. DOI: <https://doi.org/10.4236/wjnse.2011.14015>.
- Pham VD, Hoang H, Phan TH, Conrad U, Chu HH. 2012. Production of antibody labeled gold nanoparticles for influenza virus H5N1 diagnosis kit development. *Adv Nat Sci.* 3:1–7. DOI: <https://doi.org/10.1088/2043-6262/3/4/045017>.
- Razak KA, Makhsin SR, Zakaria ND, Nor NM. 2016. Chapter 2.6. Gold nanoparticles for diagnostic development. Di dalam: Ismail A, Nor NM, Abdullah JM, Acosta A, Sarmiento ME (editor). *Sustainable Diagnostics for Low Resource Areas.* Kuala Lumpur (MY): Universiti Sains Malaysia.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapsford KE, Algar WR, Berti L, Gemmill KB, Casey BJ, Oh E, Stewart MH, and Medintz IL. 2013. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews.* 113(3):1904–2074. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr300143v>.
- Schramm S, Frost K, Charkowski A, Gray S, Crockford A, Groves RL. 2011. Management of *Potato virus Y* (PVY) in Wisconsin seed potato production. [graduated research]. Madison (US): University of Wisconsin.
- Tripathi K, Driskell JD. 2018. Quantifying bound and active antibodies conjugated to gold nanoparticles: a comprehensive and robust approach to evaluate immobilization chemistry. *ACS Omega.* 2018(3):8253–8259. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00591>.
- Tyagi H, Kushwaha A, Kumar A, Aslam M. 2016. A facile pH controlled citrate-based reduction method for gold nanoparticle synthesis at room temperature. *NRL.* 11(362):1–11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1576-5>.
- Yeh CS, Cheng FY and Huang CC. 2012. Bioconjugation of noble metal nanoparticles and their applications to biolabeling and bioimaging. Di dalam: Chau LK dan Chang HT, editor. *From Bioimaging to Biosensors: Noble Metal Nanoparticles in Biodetection.* California (US): Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. Hlm 11–28. DOI: <https://doi.org/10.1201/b13162-3>.