

Produksi Antibodi Monoklonal (McAb) untuk Deteksi Virus Kerdil Hampa Padi: Produksi Hibridoma Penghasil McAb

Jumanto, M. Machmud, Ifa Manzila, dan Yadi Suryadi

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Teknik produksi antibodi monoklonal telah diadopsi untuk menghasilkan McAb RRSV. Hibridan mencit Balb c diimunisasi dengan antigen RRSV secara berkala dengan interval seminggu. Limposit dipanen dari limpa mencit yang telah diimunisasi, selanjutnya difusikan dengan sel mieloma SP2/O-Ag14 untuk memperoleh hibridoma yang selanjutnya diseleksi untuk memperoleh hibridoma penghasil McAb RRSV. Skrining hibridoma hasil fusi memperoleh 10 koloni hibridoma yang menghasilkan McAb. Seleksi lebih lanjut memperoleh dua nomor koloni hibridoma yang potensial menghasilkan McAb RRSV tinggi, yaitu RR-(2)-3 C10 dan RR-(3)-2 H03. Koloni hibridoma ini disimpan secara kriogenik dalam tabung berisi nitrogen cair. Hibridoma ini akan digunakan sebagai sumber untuk kloning guna memperoleh koloni satu sel hibridoma yang potensial memproduksi McAb tinggi, stabil dan mempunyai reaksi spesifik.

Kata kunci: Antibodi monoclonal, deteksi dan identifikasi, RRSV, padi

ABSTRACT

A technique for production of monoclonal antibody was adopted for the production of McAb RRSV. Mice hybrid Balb c was immunized by injecting with RRSV antigen. Lymphocytes were harvested from spleen of the immunized mice. Cell fusion was done by mixing the lymphocytes with SP2/O-Ag14 myeloma cells. The hybridomas, results of the cell fusion, were selected for those producing McAb. Results of the trial showed that hybridomas producing McAb RRSV were obtained from the cell fusion. Among them, two hybridoma colonies, RR-(2)-3 C10 and RR-(3)-2 H03, were considered potential as sources for McAb RRSV productions. These colonies were stored under cryogenic condition in a liquid nitrogen tank. The colonies were ready for cloning to obtain single-cell colony hybridomas producing high titer and specific McAb RRSV.

Key words: Monoclonal antibody, detection, rice ragged stunt virus (RRSV)

PENDAHULUAN

Penyakit kerdil hampa (*Ragged Stunt*) yang disebabkan virus kerdil hampa padi (*Rice Ragged Stunt Virus*, RRSV) merupakan salah satu penyakit yang berpotensi menurunkan produksi padi di Indonesia. Penyakit ini telah dilaporkan ter-sebar luas di Indonesia sejak 1977 (Hibino *et al.*, 1977; Ou, 1985; Palmer *et al.* 1978). Epidemik penyakit ini terjadi di Indonesia pada periode tahun 1985-1987 dan mengakibatkan kerusakan yang serius pada pertanaman padi (Jumanto, komunikasi pribadi). Sejak saat itu, penyakit

yang ditularkan oleh wereng coklat (WCk, *Nilaparvata lugens* Stahl) ini tidak begitu parah, walaupun masih selalu dijumpai di lapang. Akhir-akhir ini terdapat kecenderungan terjadinya kembali epidemi penya-kit kerdil hampa di lapang, sehingga peluang terjadinya ledakan penyakit ini perlu diwaspadai.

Informasi tentang epidemiologi penyakit kerdil hampa dan ekologi patogen-nya sangat diperlukan untuk menunjang keberhasilan pengendaliannya, tetapi hal ini belum banyak diteliti di Indonesia. Deteksi dini suatu patogen dari tanaman, be-nih, dan serangga penular juga sangat membantu upaya pengendaliannya baik se-cara langsung maupun mencegah penularan penyakit. Deteksi virus patogen se-perti RRSV menggunakan uji kisaran inang memerlukan waktu lama, sehingga per-lu dikembangkan teknik yang cepat dan akurat.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan salah satu teknik serologi yang dapat digunakan untuk mendeteksi patogen tanaman secara efektif dan efisien (Halk dan De Boer, 1985). Teknik ELISA dan perangkat deteksinya menggunakan antibodi poliklonal (PAb) atau McAb telah dikembangkan secara komersial untuk deteksi virus dan bakteri patogen tanaman (Martin, 1985; Van Regenmortel, 1986). Teknik ELISA juga telah diadopsi di Indonesia, tetapi perang-katnya masih harus diimpor dengan harga mahal. Sejak tahun anggaran 1995/96 di Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor, telah di-rintis produksi antibodi dan pembuatan perangkat ELISA. Pada tahun 1999 telah di-kembangkan teknik produksi PAb terhadap virus tungro (*Rice Tungro Virus*, RTV), virus kerdil kedelai (*Soybean Stunt Virus*, SSV), virus bilur kacang tanah (*Peanut Stripe Virus*, PStV), dan virus mosaik kedelai (*Soybean Mosaic Virus*, SMV) dengan menggunakan PAb (Machmud *et al.*, 1999).

Penggunaan PAb untuk uji ELISA memiliki beberapa kelemahan, sehingga sejak tahun 1975, teknologi produksi antibodi monoklonal (*monoclonal antibody*, McAb) telah dikembangkan (Kohler dan Milsten, 1975; Carter dan Ter Meulen, 1984; Gigerli dan Fries, 1983). McAb dari PAb di antaranya (1) reaksi McAb dapat dibuat spesifik strain, dari satu patogen dapat dibuat beberapa McAb dengan spesi-fikasi tertentu sesuai kebutuhan; (2) antibodi yang dihasilkan mempunyai kualitas yang stabil serta berkesinambungan; (3) pasokan antibodi dalam jumlah besar mu-dah dilakukan, dan (4) teknologi McAb hanya modal awal yang relatif mahal, tetapi selanjutnya menjadi murah (Jordan, 1990). McAb telah diproduksi untuk berbagai patogen tanaman termasuk virus, fitoplasma, dan bakteri (Converse dan Martin, 1990).

Tahapan produksi McAb meliputi imunisasi mencit, penyediaan dan fusi sel limpa dan sel mieloma, dan seleksi hibridoma penghasil McAb. Makalah ini me-rupakan hasil kegiatan penelitian tahun 2002 yang bertujuan untuk memproduksi hibridoma penghasil McAb untuk deteksi dan identifikasi RRSV.

BAHAN DAN METODE

Peralatan dan Bahan

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah ruangan khusus untuk pembiakan hibridoma, ruang isolasi (*laminar air flow*), inkubator CO₂ bersuhu 37°C, mikroskop (*inverted microscope*) dan mikroskop floresen, sentrifus meja, otoklaf, *waterbath* 37-56°C, alat penyimpanan kriogenik, alat kering beku (*freeze dryer*), pendingin (*freezer* -15°C dan -80°C, hemasitometer, spektrofotometer, mikropipet 0-200 µl, mikropipet 1000 µl, multipipettor 8 lubang, filter millipore ukuran 0,22 µm. Peralatan dan bahan untuk membiakkan sel hibridoma adalah cawan kultur sel (*microplate*) bertutup dengan 96 lubang; botol kultur sel berdiameter 25, 75, dan 150 cm; pipet gelas atau plastik berukuran 1, 5, 10, dan 25 ml; ampul berukuran 1 ml; tabung sentrifus bertutup berukuran 5, 15, dan 50 ml; cawan petri bulat dan persegi, pipet pastur, sarung tangan plastik, spuit plastik berukuran 1, 10, dan 50 ml; jarum suntik berukuran 26 dan 16 G, serta gunting operasi. Di samping peralatan laboratorium mencit (tikus putih) hibrida Balb/c beserta ruangan dan kandang untuk pemeliharaan juga diperlukan. Mencit sebagai hewan untuk imunisasi dan sumber limposit. Bahan-bahan untuk pembuatan sediaan limposit, biakan sel mieloma, dan biakan sel hibridoma adalah Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), medium hypoxanthine aminopterin thymidine (HAT), antibiotik kanamisin, serum anak sapi yang baru lahir (*Newly Born Calf Serum*, NBS), medium hypoxanthine thymidine (HT).

Pembuatan Stok Medium

Medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Medium ini mempunyai komposisi DMEM 4,5 g, akuades 500 ml, NBS 75 ml, glutamin pekat 10 ml, dan kanamisin pekat 1 ml. Sediaan medium DMEM dibuat dengan melarutkan bubuk DMEM 4,5 g dalam akuades 500 ml dengan diaduk selama 30 menit. Kemudian medium ini diotoklaf selama 20 menit dan pH-nya dinetralkan (pH 7,0) dengan menambahkan Na-bisulfit, hingga warnanya menjadi merah jambu (*pink*).

New Calf Born Serum (NBS). Bahan ini berupa serum anak sapi yang baru lahir. NBS yang baru diterima dari pemasok ditempatkan dalam wadah yang berisi es kering (*dry es*, es CO₂). Serum tersebut dicairkan dalam penangas air bersuhu 56°C selama 30 menit, untuk menonaktifkan komplemen. Kemudian dibagi-bagi ke dalam botol kecil ±100 ml, biasanya diisi 80 ml setiap botolnya, kemudian disimpan di dalam *deep freezer* (-80°C) hingga digunakan. Setiap medium dalam botol digunakan sampai habis, baru kemudian menggunakan botol yang lain.

Medium HAT. Medium ini mempunyai komposisi sebagai berikut: medium DMEM-NBS 500 ml, hypoxanthine pekat 5 ml, aminopterin pekat 1

ml, thymidine pekat 1 ml, glutamin pekat 1 ml, NBS 75 ml, dan kanamisin pekat 0,5 ml.

Medium HT. Komposisi medium HT dan cara pembuatannya sama dengan medium HAT, tetapi tanpa aminopterin.

Larutan pekat hypoxanthine (100 kali). Larutan senyawa hypoxanthine di-buat dengan melarutkan 34 mg hypoxanthine dalam 25 ml akuades dan dipanas-kan pada suhu 70-80°C di atas penangas air.

Larutan pekat aminopterin (500 kali). Larutan ini dibuat dengan melarut-kan 2,32 mg aminopterin dalam 25 ml akuades, kemudian ditambah dengan larut-an NaOH 0,5 N 2-3 tetes.

Larutan pekat thymidine (500 kali). Larutan ini dibuat dengan melarutkan 77,5 mg thymidine dan 4,5 mg glycine dalam 10 ml akuades.

Larutan pekat glutamine (50 kali). Larutan ini dibuat dengan melarutkan 2,92 g L-glutamine 2,92 g dalam 100 ml akuades. Larutan hypoxanthine, aminop-terin, dan L-glutamine masing-masing disterilkan melalui filtrasi dengan filter Millipore 0,45 um, kemudian dibagi-bagi ke dalam botol-botol kecil atau tabung eppendorf dan disimpan pada suhu -30°C hingga diperlukan.

Larutan pekat kanamisin (1000 kali). Larutan kanamisin dibuat dengan melarutkan 1,0 g antibiotik kanamisin dalam 5 ml akuades steril di dalam botol kanamisin.

Larutan sodium bikarbonat (10%). Larutan ini dibuat dengan melarutkan 10 g NaHCO₃ dalam 100 ml akuades 100 ml. Larutan ini diotoklaf selama 20 menit, kemudian disimpan pada suhu ruang.

Penyediaan Antigen

Contoh tanaman padi terinfeksi RRSV diperoleh dari koleksi yang ada di Kelti Diagnostik dan Pengendalian Biologi, Balitbio, yang semula berasal dari lapang di Sukamandi, Subang. Pemurnian RRSV dilakukan menggunakan teknik pemurnian menurut Jumanto yang merupakan modifikasi dari teknik Van Regenmortel (1986).

Imunisasi Mencit

Mencit (tikus putih) hibrida Balb/c yang diperoleh dari IPB, Bogor, digunakan imunisasi. Sediaan murni RSSV yang digunakan sebagai antigen diperoleh dari hasil pemurnian yang telah dilakukan sebelumnya. Antigen RRSV dilarutkan dalam bufer fosfat salin (Phosphate Buffered Saline, PBS), pH 7,2, dengan kepekatan 100 ug/ml. Sebelum imunisasi, antigen dicampur dengan Ajuvan Freund Inkomplit (*Incomplete Freund's Ajuvant*, Sigma) dengan perbandingan 1 : 1. Imunisasi dilaku-kan pada mencit umur 2 bulan dengan menyuntikkan 100 µl (25-50 ug) larutan antigen RSSV setiap kali secara intravenal, melalui vena ekor mencit, secara berka-la dengan tenggang waktu satu minggu. Imunisasi dilakukan empat kali dan yang terakhir

dilakukan empat hari sebelum dilakukan fusi sel limposit mencit dengan sel mieloma.

Penyediaan Limposit Mencit

Empat hari setelah imunisasi terakhir, 1 ml contoh darah diambil dari mencit yang telah diimunisasi, dipisahkan, dan diuji kandungan (titer) antisernya menggunakan teknik mikropresipitasi. Apabila hasilnya positif dan titernya cukup tinggi, maka mencit dimatikan dan limpanya (*spleen*) diambil secara aseptik dan ditempatkan dalam cawan petri steril berisi 20 ml medium DMEM tanpa serum NBS (DMEM-NBS). Selanjutnya, secara aseptik pula, limpa yang masih utuh dan segar dipotong kecil-kecil untuk mengeluarkan sel limpa (limposit). Potongan-potongan limpa di tekan-tekan menggunakan pinset untuk mengeluarkan limpositnya ke dalam medium. Suspensi limposit disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 7 menit dan peletnya dicuci dengan DMEM-NBS empat kali. Selanjutnya limposit disuspensikan kembali dengan 20 ml DMEM-NBS dan dihitung kerapatannya menggunakan hemasitometer. Pada percobaan ini lima ekor mencit diimunisasi dengan RRSV.

Penyediaan Sel Mieloma

Pada hari ke-2 inkubasi, kondisi pertumbuhan dan kerapatan sel biakan mieloma diperiksa. Contoh biakan diambil dari masing-masing cawan petri dan jumlah selnya dihitung menggunakan hemasitometer. Bila jumlah sel yang dibutuhkan belum mencukupi, maka disediakan biakan baru dengan menumbuhkan sel mieloma yang telah ada dalam cawan petri yang berisi medium baru. Pada hari ke-3 inkubasi, populasi sel mieloma diperiksa kembali dan dihitung kerapatannya, dan pada hari ke-4 inkubasi dilakukan fusi sel. Selanjutnya sel mieloma yang telah ditumbuhkan hingga fase pertumbuhan logaritmik disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit dan disuspensikan kembali dalam medium DMEM + NBS + L-glutamine dengan volume tertentu dan kerapatan selnya dihitung dengan hemasitometer.

Fusi Limposit dengan Mieloma

Fusi limposit mencit dengan sel mieloma dilakukan menurut metode Kohler dan Milstein (1975). Fusi sel dilakukan dengan mencampurkan koloni sel mieloma dan sel limposit dengan perbandingan 10 : 1 ke dalam tabung konus. Cara penghitungan sel limpa dan mieloma untuk persiapan fusi adalah (1) apabila kerapatan sel limpa pada hemasitometer 52 sel, maka banyaknya sel dalam cawan yang berisi 20 ml biakan adalah $52 \times 10^4 \times 20 \text{ sel} = 1,04 \times 10^8 \text{ sel}$; (2) apabila kerapatan sel mieloma pada hemasitometer 64 sel, maka kerapatan sel dalam cawan yang berisi 20 ml biakan adalah $64 \times 10^4 \times 20 \text{ sel} = 1,28 \times 10^7 \text{ sel}$. Dengan demikian, banyaknya sel mieloma yang dibutuhkan adalah $1,04 \times 10^7 \text{ sel}$, sehingga volume biakan mieloma yang digunakan adalah $20 \times (1,04 \times 10^7 : 1,28 \times 10^7 \text{ ml}) = 16,25 \text{ ml}$. Dengan demikian, medium HAT

yang harus ditambahkan adalah $1,04 \times 10^7 : 3,5 \times 10^5 \text{ ml} = 29,7 \text{ ml}$. Angka $3,5 \times 10^5$ adalah kepadatan sel mieloma yang dibutuhkan untuk mendapatkan satu hibridoma di setiap lubang biakan.

Setelah dilakukan pencampuran sel mieloma dengan limposit mencit, campuran sel yang difusikan disentrifusi dengan kecepatan 1000 rpm selama 7 menit dan supernatannya dibuang. Ke dalam tabung berisi pelet sel fusan ditambahkan 1 ml larutan 50% polietilen glikol (PEG 4000) dalam DMEM-NBS, setetes demi setetes menggunakan pipet ukur 1 ml sambil digoyang. Penambahan tersebut, mulai dari tetesan pertama hingga tetesan terakhir, harus dilakukan dalam rentang waktu 60 detik. Tahapan pemberian PEG adalah sebagai berikut: Detik ke-1 diteteskan satu tetes PEG, detik ke-10 satu tetes PEG, detik ke-20 satu tetes PEG, detik ke-30 satu tetes PEG, dan detik ke-60 satu tetes PEG lagi, sehingga jumlah volume PEG yang diteteskan dalam satu menit adalah 1 ml. Penetesan PEG dilakukan sambil meng-goyang tabung fusan. Pengaruh PEG 4000 dikurangi dengan menambahkan 9 ml medium DMEM-NBS sedikit demi sedikit menggunakan pipet ukur 10 ml dengan rentang waktu 5 menit. Pada menit ke-1.30 ke dalam tabung ditambahkan 1 tetes medium; menit ke-1.40 1 tetes; menit ke-1.50 1 tetes; dan menit ke-2 1 tetes. Selanjutnya, pada menit ke-2.40 ditambahkan lagi medium DMEM-NBS hingga pada pipet menunjukkan angka 1; pada menit ke-3.20 ditambahkan medium hingga angka 2; pada menit ke 4 ditambahkan 2 ml medium hingga angka 4; pada menit ke-4.40 ditambahkan medium 4 ml hingga angka 8, dan pada menit ke-5 ditambahkan sisa medium hingga angka 10. Selanjutnya suspensi sel fusan disentrifusi dengan kecepatan 1000 rpm selama 7 menit, supernatannya dibuang dan pelet dalam tabung konus disuspensikan kembali dengan menambahkan medium HAT sebanyak 29,7 ml (sesuai dengan hasil perhitungan) dengan menggoyang. Kemudian suspensi didistribusikan ke dalam lubang cawan mikro (*microplate*) steril dan bertutup, 100 μl setiap lubang, menggunakan mikropipet 1000 μl , dan cawan mikro diinkubasikan di dalam inkubator CO_2 bersuhu 37°C , untuk membiakkan hibridoma.

Pada hari ke-2 dan selanjutnya hingga hari ke-1-10 inkubasi, selang dua hari, ke dalam setiap lubang biakan ditambahkan 100 μl medium HAT. Kemudian pada hari ke-11 hingga ke-30 pertumbuhan sel hibridoma di setiap lubang cawan di-amati dengan melihat koloni yang tumbuh di dasar lubang, dan lubang yang di-tumbuhi sel hibridoma diberi tanda. Apabila koloni sel hibridoma sudah tumbuh kurang lebih $1/5$ luasan dasar lubang, maka skring (seleksi) hibridoma penghasil McAb dilakukan.

Skrining Sel Hibridoma

Hibridoma yang tumbuh diharapkan mensekresikan antibodi ke dalam medium, sehingga cairan medium tempat hibridoma tumbuh mengandung antibodi. Keberhasilan memperoleh hibridoma penghasil antibodi diperiksa dengan menguji dengan antigen yang bersangkutan menggunakan teknik

Antigen Adsorption Indirect (AAD)-ELISA dan *Indirect Double Antibody Sandwich* (IDAS)-ELISA (Jumanto, 1990; tidak dipublikasi). Sebagai antigen digunakan ekstrak daun padi terinfeksi RRSV dan sediaan murni RRSV. Hasil reaksi ELISA diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 415 nm. Reaksi positif (>0) berarti hibridoma menghasilkan McAb. Akhirnya, lubang cawan biakan hibridoma yang menghasilkan McAb diberi tanda.

Skrining hibridoma penghasil McAb dilakukan dua kali. Skrining I dilakukan untuk memperoleh hibridoma yang dapat menghasilkan McAb. Skrining II dilakukan dengan cara yang sama dengan skrining I, tetapi untuk memilih kembali beberapa sel hibridoma penghasil McAb yang potensial menghasilkan McAb tinggi dan stabil, dari koloni hibridoma penghasil McAb yang diperoleh pada seleksi I.

Penyimpanan Hibridoma Penghasil McAb

Biakan sel hibridoma yang menghasilkan antibodi yang spesifik terhadap RRSV dipindahkan ke dalam botol-botol kriogenik, kemudian disimpan semalam dalam *freezer* bersuhu -80°C , selanjutnya dipindahkan dan disimpan secara kriogenik dalam tabung nitrogen cair yang bersuhu -96°C . Secara reguler dan berkala, tabung kriogenik diperiksa dan ditambah nitrogen cair guna menjaga suhu tabung penyimpanan. Koleksi hibridoma penghasil McAb RRSV ini selanjutnya setiap saat dapat digunakan sebagai sumber untuk kloning (perbanyak) hibridoma dalam kaitannya dengan produksi massal McAb RRSV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Imunisasi Mencit

Contoh darah diambil empat hari setelah imunisasi terakhir dan diproses untuk memperoleh antibodi poliklonal (PAb) RRSV dan diuji titernya menggunakan teknik mikropresipitasi. Hasilnya menunjukkan darah bereaksi positif berdasarkan uji mikropresipitasi. Hal ini menunjukkan adanya respon antibodi dari mencit terhadap antigen RRSV yang disuntikkan. Setelah diketahui bahwa mencit telah memproduksi PAb, pada hari yang sama mencit dimatikan untuk diambil limpanya.

Penyediaan dan Fusi Sel Mieloma dan Limposit

Sel mieloma yang dibiakkan pada medium DMEM + NBS + L glycine tumbuh baik berupa koloni sel yang terdapat di dasar medium. Biakan sel mieloma yang berumur 72 jam menghasilkan kerapatan $\pm 10^7$ sel/ml. Sel limposit diperoleh dalam bentuk cairan/suspensi dalam medium DMEM-NBS. Setiap mencit menghasilkan $\pm 10^8$ limposit, sehingga dari 5 ekor mencit diperoleh 5×10^8 limposit. Fusi sel mieloma dengan sel limposit mencit yang

Tabel 1. Seleksi I hibridoma penghasil McAb RRSV yang diperoleh dari hasil fusi antara sel mieloma dengan sel limposit mencit yang telah diimunisasi dengan antigen RRSV. Bogor, 2002

No. hibridoma	Reaksi ELISA (OD ₄₁₅)					
	AAI			IDAS		
	1	2	Rataan	1	2	Rataan
RR-(1)-3 D07	0,54	0,60	0,57	0,14	0,22	0,18
RR-(1)-3 H08	0,03	0,02	0,03	0,88	0,30	0,57
RR-(1)-3 D07	0,08	0,17	0,13	0,40	0,28	0,34
RR-(1)-3 B05	0,09	0,08	0,09	0,26	0,22	0,24
RR-(2)-3 C04	0,75	0,35	0,55	0,50	0,78	0,64
RR-(1)-3 D04	0,78	0,19	0,49	0,58	0,19	0,39
RR-(1)-3 E07	0,30	0,50	0,40	0,83	0,93	0,88
RR-(1)-3 F12	0,21	0,31	0,26	0,42	0,39	0,40
RR-(1)-3 H11	0,27	0,52	0,40	0,53	0,24	0,39
RR-(3)-1 H11	0,33	0,94	0,64	0,74	0,91	0,83
RR-(3)-1 B01	0,11	0,10	0,11	0,21	0,22	0,22
RR-(3)-1 E01	0,05	0,11	0,08	0,38	0,11	0,25
RR-(3)-2 H03	0,47	0,88	0,68	1,14	1,29	1,22
RR-(4)-1 D10	0,09	0,22	0,15	0,94	0,61	0,78

Nomor hibridoma RR-(1)-3 D07 artinya RR = antigen yang digunakan RRSV; angka dalam kurung (1) = nomor fusi; 3 = nomor cawan hasil fusi, D07 = nomor lubang yang bereaksi positif. Teknik ELISA yang digunakan adalah AAI (*Antigen Adsorption Indirect*) dan IDAS (*Indirect Double Antibody Sandwiched*) - ELISA. Angka 1 di bawah teknik dan IDAS = contoh uji berupa ekstrak tanaman terinfeksi RRSV; angka 2 = contoh uji berupa sediaan murni RRSV. Angka pada tiap kolom ELISA adalah nilai kerapatan optik pada panjang gelombang 415 nm (OD₄₁₅) menggunakan spektrofotometer

telah diimunisasi dengan RRSV menghasilkan fusan sel hibridoma. Hal ini ditunjukkan adanya pertumbuhan biakan sel pada dasar medium. Hasil fusi hanya mencapai 29,7% dan sel hibridoma yang diperoleh tidak semuanya menghasilkan McAb, sehingga perlu dilakukan skrining untuk memperoleh sel hibridoma penghasil McAb.

Skrining Sel Hibridoma

Pada skrining I, dari 297 suspensi koloni hibridoma dalam lubang cawan mikro yang diuji dengan teknik ELISA diperoleh 14 koloni hibridoma yang menghasilkan McAb RRSV (Tabel 1). Kemampuan menghasilkan McAb dari setiap koloni sel hibridoma berbeda-beda dengan angka kerapatan optik pada panjang gelombang 415 nm (OD₄₁₅) yang berkisar antara 0,03-1,29. Hibridoma pada lubang cawan nomor RR-(3)-2 H03, RR-(3)-1 H11, RR-(1)-3 C07, dan RR-(2)-3 C04 menghasilkan McAb rata-rata tertinggi. Angka rata-rata OD₄₁₅ hasil uji dari suspensi keempat biakan hibridoma tersebut menggunakan teknik AAI-ELISA secara berturut-turut adalah 0,68; 0,64; 0,40; dan 0,55, sedangkan menggunakan teknik IDAS-ELISA masing-masing adalah 1,22; 0,83; 0,88; dan 0,64.

Skrining II dilakukan untuk memperoleh biakan hibridoma yang potensial menghasilkan McAb tinggi dan stabil untuk digunakan sebagai

Tabel 2. Hasil seleksi II hibridoma penghasil McAb RRSV untuk memastikan bahwa koloni hibridoma yang diperoleh dari skrining I tetap potensial memproduksi McAb. Bogor, 2002

No. hibridoma	Reaksi ELISA (OD ₄₁₅)					
	AAI			IDAS		
	1	2	Rataan	1	2	Rataan
RR-(4)-1 D10	0,09	0,22	0,16	0,44	0,30	0,38
RR-(1)-3 D07	0,30	0,55	0,43	0,83	0,43	0,63
RR-(2)-3 C04	0,78	1,28	1,03	1,52	1,66	1,59
RR-(3)-2 H03	0,47	0,88	0,68	1,14	1,29	1,22
RR-(3)-1 H11	0,33	0,44	0,39	0,53	0,24	0,39

Nomor hibridoma RR-(4)-1 D10 artinya: RR = antigen yang digunakan RRSV; angka dalam kurung (4) = nomor fusi; 1 = nomor cawan hasil fusi, dan D10 = nomor lubang yang bereaksi positif. AAI-ELISA = *Antigen Adsorption Indirect-ELISA*. IDAS-ELISA = *Indirect Double Antibody Sandwiched-ELISA*. Angka 1 di bawah teknik dan IDAS = contoh uji berupa ekstrak tanaman terinfeksi RRSV; angka 2 = contoh uji berupa sediaan murni RRSV. Angka pada tiap kolom adalah nilai kerapatan optik pada panjang gelombang 415 nm (OD₄₁₅) menggunakan spektrofotometer

sumber penghasil McAb selanjutnya. Pada skrining II diperoleh dua suspensi biakan sel hibridoma penghasil McAb yang potensial berdasarkan kemampuan menghasilkan McAb yang tinggi dan stabil, yaitu RR-(2)-3 C04 dan RR-(3)-2 H03. Kedua suspensi hibridoma menunjukkan angka rata-rata OD₄₁₅ masing-masing 1,03 dan 0,68 menggunakan teknik AAI-ELISA, serta berturut-turut 1,59 dan 1,22 menggunakan teknik IDAS-ELISA (Tabel 2).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Fusi sel mieloma SP/2-O AG14 dengan limposit mencit Balb/c yang telah diimunisasi dengan virus kerdil hampa padi (RRSV) dapat menghasilkan sel hibridoma penghasil antibodi terhadap RRSV.
2. Skrining sel hibridoma penghasil McAb RRSV memperoleh dua kandidat hibridoma yang potensial memproduksi McAb cukup tinggi, yaitu RR-(2)-3 C04 dan RR-(3)-2 H03, yang potensial untuk dijadikan sumber kloning hibridoma lebih lanjut.

Saran

1. Koloni sel hibridoma yang potensial sebagai sumber McAb RRSV (RR-(2)-3 C04 dan RR-(3)-2 H03) perlu dikloning lebih lanjut untuk memperoleh koloni hibridoma satu sel yang potensial untuk digunakan sebagai sumber utama produksi McAb RRSV pada skala pilot.
2. Penelitian ini perlu dilanjutkan agar koloni hibridoma yang telah dihasilkan dapat dipertahankan kehidupannya melalui penyimpanan

- kriogenik, sehingga apabila suatu saat diperlukan dapat diperbanyak kembali untuk menghasilkan McAb RRSV.
3. Laboratorium biakan sel perlu disediakan untuk keperluan *scale up* produksi McAb.

DAFTAR PUSTAKA

- Carter, M. J. and V. ter Meulen. 1984.** The application of monoclonal antibodies in the study of viruses. *In* M.A. Lauffer and K. Maramorosch (*Eds.*). *Advances in Virus Research*. Academic Press, London. p. 95-124.
- Converse, R.H. and R.R. Martin. 1990.** ELISA methods for plant viruses. *In* R. Hampton and S.H. de Boer (*Eds.*). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A Laboratory Manual*. APS Press, St.Paul, Minn. p. 179-196.
- Gigerli, P. and P. Fries. 1983.** Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* 64:2471-2477.
- Halk, E.L. and S.H. De Boer. 1985.** Monoclonal antibodies in plant disease research. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23:321-350.
- Hibino, H., M. Roechan, S. Sudarisman, and D.M. Tantera. 1977.** A virus disease of rice (kerdil hampa) transmitted by brown hopper, *Nilaparvata lugens* Stahl in Indonesia. *CRIA Contributions* 35:1-15.
- Jordan, R.L. 1990.** Strategy and techniques for the production of monoclonal antibodies. *In* R. Hampton and S.H. de Boer (*Eds.*). *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual*. APS Press, St.Paul, Minn. p. 55-85.
- Kohler and Milsten. 1975.** Continuous culture of fused cell producing antibodies of predefined specificity. *Science* 256:495-497.
- Machmud, M. Jumanto, Y. Suryadi, M.A. Suhendar, dan I. Manzila. 1999.** Pengembangan teknik produksi. Laporan Hasil Penelitian Tahun Anggaran 1998/1999. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor. 72 hlm.
- Martin, R.R. 1985.** Recent advances in virus detection. *Hort. Science* 20:8.
- Ou, S.H. 1985.** Rice diseases. *Commonw. Mycol. Inst., Kew Surrey, England.* 377 p.
- Palmer, L.T., J. Soepriaman, and O. Mochida. 1978.** The distribution of ragged stunt and result in rice yield reduction in Indonesia. *IRRI Newsletter* 3(3):15.

Van Regenmortel, M.H.V. 1986. The potential for using monoclonal antibodies in the detection of plant viruses. *In* R.A.C Jones and L. Torrance (*Eds.*). *Developments and Applications in Virus Testing*. Lavenham Press, Great Britain. p. 89-101.