

Pengembangan Teknik Produksi dan Aplikasi Antibodi Monoklonal *Ralstonia Solanacearum* (RS)

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

ABSTRAK

Komponen dasar yang penting dan menentukan keberhasilan pengendalian suatu penyakit tanaman adalah informasi tentang patogen secara dini, cepat dan akurat, serta epidemi penyakit di lapang. Teknik serologi, khususnya ELISA, merupakan salah satu teknik yang menjanjikan untuk keperluan tersebut, karena relatif mudah dan murah, serta berpeluang untuk digunakan secara langsung di lapang. Kepekaan teknik serologi sangat tergantung pada kespesifikan reaksi antibodi yang digunakan. Antibodi poliklonal memiliki kespesifikan yang tinggi. Penelitian dilakukan untuk membuat, menyeleksi, dan mengkarakterisasi sel hibridoma penghasil antibodi monoklonal *Ralstonia solanacearum* (MAb RS). Produksi hibridoma dilakukan melalui fusi sel mieloma SP2 dengan limposit mencit hibrida Balb c yang telah diimunisasi dengan antigen RS. Biakan hibridoma berhasil diperoleh dari fusi sel mieloma dengan limposit mencit. Delapan nomor hibridoma yang potensial menghasilkan MAb RS telah diperoleh melalui seleksi dengan teknik DAS-ELISA dan disimpan secara kriogenik. Uji kespesifikan reaksi masih memerlukan pengujian lebih lanjut. Setelah pengujian, hibridoma penghasil MAb spesifik RS dapat disimpan dalam waktu lama, sebagai sumber untuk produksi MAb RS secara massal dan berkesinambungan.

Kata kunci: ELISA, *Ralstonia solanacearum*, antibodi monoklonal.

ABSTRACT

Technique for production of monoclonal antibody for the detection of *Ralstonia solanacearum*. The success of an integrated control of a plant disease, such as bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*, RS) is very much dependent on accurate detection of the pathogen and epidemiology of the disease. Serological techniques, such as ELISA is a promising technique to obtain the information, since they are relatively simple, accurate, and applicable in the field. Sensitivity of the technique depends on specificity of the antibody. Monoclonal antibody generally has a specific reaction to the target pathogen. A research activity was conducted to produce and screen hybridoma cells capable of producing monoclonal antibodies specific to RS. Production of hybridomas was done through fusions of SP2 myeloma cells with lymphocytes of mice hybrid Balb c that have been immunized with an RS antigen. Hybridoma cells were produced from the fusions. Eight hybridoma clones potential of producing MAb RS were selected and stored cryogenically in the laboratory. Specificity of the MAb produced by the hybridomas is being done. The selected hybridomas may be stored for an unlimited time and used as sources for production of MAb RS whenever needed.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, monoclonal antibody.

PENDAHULUAN

Penyakit layu bakteri yang disebabkan *Ralstonia solanacearum* (Rs) masih menjadi kendala produksi tanaman pertanian, misalnya pada kacang tanah, kentang, tomat, tembakau, pisang dan jahe. Bakteri RS bersifat *soil born* dan polifaga ini mempunyai variasi strain yang tinggi, baik berdasarkan kisaran inangnya, tingkat virulensinya, maupun kemampuan memanfaatkan karbohidrat sebagai nutrisinya (Machmud 1996). Beberapa mikroba patogen penting lainnya pada tanaman pangan dan hortikultura juga telah dikoleksi dalam plasma nutfah mikroba di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian Bogor. Komponen antigenik dari mikroba tersebut akan digunakan untuk produksi antibodi bagi pengembangan kit ELISA untuk deteksi dini dan identifikasi serangan penyakit.

Teknik serologi dan model perangkatnya dengan menggunakan antibodi poliklonal (PAb) dan monoklonal telah banyak dikembangkan untuk deteksi dan identifikasi virus dan bakteri patogen utama tanaman. Meskipun teknik ini cukup efektif, namun penggunaannya dianggap masih sangat mahal karena perangkat kit ELISA-nya masih tergantung pada produk impor. Di samping itu juga tidak mampu untuk mendeteksi adanya variasi strain patogen yang ada di lapang yang berkembang dengan sangat cepat dan bersifat spesifik lokasi. Melalui pembuatan perangkat kit

ELISA sendiri, permasalahan tersebut dapat teratasi. Teknik dan perangkat yang akan dikembangkan diharapkan dapat dimanfaatkan oleh peneliti dan pengguna lainnya, baik untuk keperluan penelitian maupun untuk penggunaan secara rutin dan praktis, misalnya deteksi dini patogen di lapang dan deteksi patogen dari benih untuk keperluan karantina dan sertifikasi benih (Machmud *et al.* 1999).

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 perangkatnya masih harus diimpor dengan harga mahal. 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 diantaranya (1) reaksi McAb dapat dibuat spesifik strain, dari satu patogen dapat dibuat beberapa McAb dengan spesifikasi tertentu sesuai kebutuhan; (2) antibodi yang dihasilkan mempunyai kualitas yang stabil serta berkesinambungan; (3) pasokan antibodi dalam jumlah besar mudah 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; McLaughlin dan Chen 1990).

Pada tahun 1975 Kohler dan Milsten (*dalam* Jordan 1990a) memperkenalkan teknik pembiakan sel penghasil antibodi melalui fusi dengan sel mieloma, sehingga dapat menghasilkan antibodi yang homogen secara terus menerus, bereaksi serologi yang spesifik serta memiliki ciri-ciri biokimia tertentu pula. Hibridisasi sel-sel limposit penghasil antibodi dengan sel miolema (*malignant myeloma cells*) menghasilkan sel-sel hibridoma yang menggabungkan sifat-sifat parental dan kemampuan menghasilkan (mensekresi) antibodi yang spesifik dan terus tumbuh berkembangbiak. Kloning dan seleksi lebih lanjut sel-sel hibridoma memberi peluang diproduksinya mAb dengan spesifisitas yang sama (identik) dan efektifitas sesuai dengan yang diinginkan terhadap epitop tertentu pada antigen yang digunakan untuk imunisasi (Jordan 1990b). Akhirnya ini teknik produksi mAb telah diadopsi untuk produksi mAb patogen tanaman. MAb telah digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi patogen tumbuhan termasuk virus, fitoplasma, dan bakteri (Converse dan Martin 1990; McLaughlin dan Chen 1990).

Kelebihan teknik produksi mAb dari teknik pAb di antaranya (1) mampu menghasilkan antibodi dalam jumlah relatif tidak terbatas, (2) kemampuan melestarikan produksi Ab yang spesifik melalui penyimpanan kriogenik hibridoma untuk waktu tidak terbatas, (3) kemampuan memproduksi dan menyeleksi mAb untuk hampir semua determinan antigenik meskipun antigen yang digunakan untuk imunisasi tidak murni atau merupakan campuran (Jordan 1990a dan 1990b; De Boer 1990). Teknologi hibridoma untuk produksi mAb telah diterapkan pada virologi dan bakteriologi tumbuhan. McAb sangat bermanfaat untuk identifikasi esei kualitatif bakteri dan virus tanaman, membedakan tingkat kesamaan antara anggota berbagai kelompok virus dan bakteri, serta mempelajari struktur dan fungsi produk gen (Converse dan Martin 1990).

Metodologi yang mencakup pembuatan galur sel (*cell lines*) yang menghasilkan mAb secara permanen relatif sederhana, tetapi memerlukan tahapan yang panjang dan seringkali sulit (*crucial*). Keberhasilan produksi mAb tidak hanya bergantung pada produksi galur sel hibridoma dalam jumlah banyak, tetapi juga pada keberhasilan imunisasi hewan donornya, pengetahuan dan pengalaman dasar tentang kultur sel (termasuk pembuatan medium, pemeliharaan, dan penyimpanan galur sel), dan pengembangan teknik serologi yang relatif sederhana, cepat, dan akurat untuk mengkarakterisasi dan mengidentifikasi antibodi. Penyediaan dan karakterisasi mAb untuk berbagai antigen tanaman dan patogen dapat dilakukan. Berbagai publikasi tentang teknik produksi mAb dapat digunakan sebagai bahan acuan (Jordan 1990a).

Hibridoma merupakan sel yang mudah rusak, memerlukan pengamatan mikroskopik untuk mengetahui viabilitas dan laju pertumbuhannya. Persyaratan lain untuk produksi McAb adalah antigen dan esei serologis yang digunakan untuk mengidentifikasi dan karakterisasi antibodi hibridoma. Sistem esei yang digunakan sangat tergantung pada jenis antigen dan rencana penggunaan McAb (Jordan 1990a).

BAHAN DAN METODE

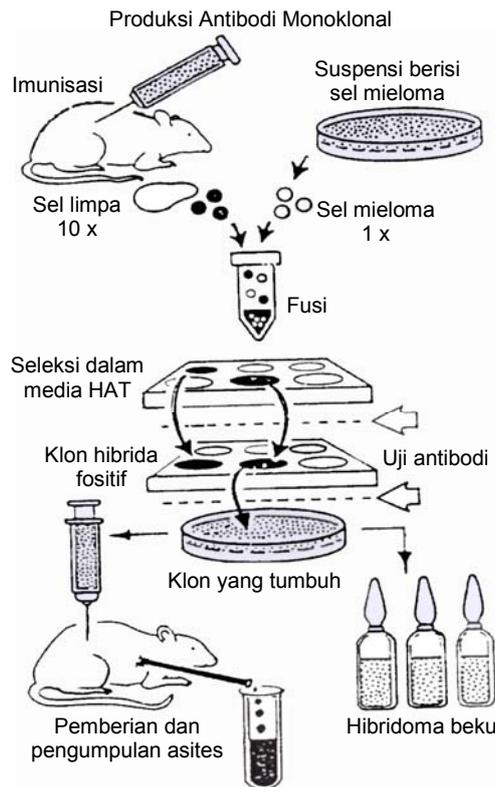
Penelitian dilakukan di Laboratorium Kelti Biokimia, BB-Biogen, Bogor. Peralatan dan bahan yang digunakan dalam penelitian di antaranya ialah ruang isolasi (*laminar air flow*), inkubator CO₂ bersuhu 37°C, mikroskop (*inverted microscope*), sentrifus meja, otoklaf, *waterbath* 37-56°C, alat penyimpanan 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 pipet plastik berukuran 1, 5, 10, dan 25 ml; ampul berukuran 1 ml; tabung sentrifus bertutup ukuran 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 26G dan 16G, serta gunting operasi. Di samping peralatan laboratorium, mencit (tikus putih) hibrida Balb/c, serta ruangan dan kandang untuk pemeliharaannya juga diperlukan. Mencit sebagai hewan untuk diimunisasi 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 albumin anak sapi yang baru lahir (*Newly-borne Calf Serum*, NBS), dan medium Hypoxanthine Thymidine (HT).

Penyediaan Antigen

Contoh tanaman padi terinfeksi RTV dan RS diperoleh dari koleksi yang ada di Kelti Biokimia, BB-Biogen, yang semula berasal dari lapang di Sukamandi, Subang dan Serang. Pemurnian RTV dan RS dilakukan menggunakan teknik pemurnian menurut Saito (1983) yang dimodifikasi.

Imunisasi Mencit

Mencit hibrida Balb/c yang diperoleh dari IPB, Bogor, digunakan untuk diimunisasi. Sediaan murni RS yang digunakan sebagai antigen diperoleh dari hasil pemurnian yang telah dilakukan sebelumnya. Antigen RS dilarutkan dalam bufer fosfat salin (Phosphate Buffered Saline, PBS), pH 7,2, dengan kepekatan 100 µg/ml. Sebelum imunisasi, antigen dicampur dengan Ajuvan Freund Inkomplit (*Incomplete Freund's Adjuvant*, Sigma) dengan perbandingan 1 : 1. Imunisasi dan booster dilakukan sesuai dengan metode Harlow dan Lane (1988) dengan cara sebagai berikut: antigen RS diberikan secara intraperitoneal (i.p) dengan dosis yang dilaporkan tidak mematikan tetapi imunogen (Dewanti-Hariyadi *et al.* 1998), yaitu 25 µg patogen/mencit. Mencit yang digunakan berumur 4-6 minggu dengan menyuntikkan 100 µl (10-20 µg) larutan antigen RS setiap kali secara intravena, melalui vena ekor mencit, secara berkala dengan tenggang waktu satu minggu. Pada minggu 2, 3, 4, 5, dan 6 setelah imunisasi diberikan booster, yaitu penyuntikan dengan IFA (*incomplete Freund's adjuvant*) secara intraperitoneal (i.p). Tiga hari sebelum mencit disakrifikasi untuk diambil limfanya diberikan booster akhir secara intravena (IV) dengan konsentrasi 10 µg antigen/mencit.



Gambar 1. Skema tahapan kegiatan produksi antibodi monoklonal dari imunisasi sampai mendapatkan klon hibridoma.

Persiapan Sel Limposit dari Sel Limpa Mencit Hiperimun

Persiapan sel limfosit dilakukan dengan metode Harlow dan Lane (1988) yang dimodifikasi. Mencit Balb/c yang sudah diinjeksi antigen RS serta sudah dibooster 4 kali dan diberi booster akhir secara i.v (umur 6 minggu setelah imunisasi) dimatikan dan direndam dalam alkohol 70%. Limpa diambil secara aseptik dan dicuci 3 kali dengan media DMEM tanpa serum. Cara lain yang juga dilakukan untuk mendapatkan sel limfosit adalah 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 (diurut) 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 digunakan lima ekor yang masing-masing diimunisasi dengan 100 ug antigen RS/injeksi.

Persiapan Sel Mieloma

Pada hari ke-2 inkubasi, kondisi pertumbuhan, dan kerapatan sel biakan mieloma SP2 diperiksa. Diperkirakan dua hari ini sel mieloma tumbuh pada fase log. 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 menum-

buhkan sel mieloma yang telah ada dalam cawan petri yang berisi media 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 disentrifusi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit dan disuspensikan kembali dalam 20 ml medium DMEM-serum free dengan volume tertentu dan kerapatan selnya dihitung dengan hemasitometer.

Fusi Limfosit dengan Mieloma

Fusi dilakukan dengan cara mencampurkan sel mieloma dengan sel limfosit mencit, dengan perbandingan 10 : 1. Campuran sel disentrifusi dengan kecepatan 1000 rpm pada suhu kamar selama 7 menit. Selanjutnya supernatan 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 menggoyang 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 4.00 ditambah 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 (sesuai dengan hasil perhitungan). Kemudian suspensi didistribusikan ke dalam lubang cawan mikro (microplate) steril dan bertutup, 100 ml setiap lubang, dan cawan mikro diinkubasikan di dalam inkubator CO₂ bersuhu 37°C.

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

Perawatan Sel Hibridoma Hasil Fusi

Medium sel hibridoma diganti untuk pertama kalinya pada hari ke-5 setelah fusi dengan cara menganbil media sebanyak 100 ul/sumur dan digantikan dengan medium HAT baru sebanyak 100 ul/sumur. Penggantian medium selanjutnya dilakukan setiap 3 hari dengan medium HT (HAT tanpa Aminopterin).

Sel hibridoma yang sudah terlalu banyak dalam pelat mikro 96 sumur harus segera dipindahkan ke dalam pelat mikro 24 sumur yang sudah berisi medium sebanyak 1 ml/sumur. Begitu pula jika sel dalam pelat mikro 24 sumur sudah penuh juga harus segera dipindahkan ke dalam pelat mikro 6 sumur yang sudah berisi medium kultur sebanyak 2 ml/sumur.

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* (AAI)-ELISA dan *Indirect Double Antibody Sandwich* (IDAS)-ELISA (Jumanto 1998; tidak dipublikasi). Sebagai antigen digunakan ekstrak daun padi terinfeksi RTV dan sediaan murni RS. 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 sel hibridoma penghasil McAb yang potensial menghasilkan McAb tinggi dan stabil, dari koloni hibridoma penghasil McAb yang diperoleh pada seleksi I.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi, Seleksi, dan Karakterisasi Sel Hibridoma Penghasil McAb RS

Hasil yang dicapai pada dua kegiatan, di mana antara kegiatan yang ke satu dengan kegiatan kedua diharapkan memiliki capaian yang sama, yaitu antibodi monoklonal yang spesifik terhadap RTV dan RS. Pada penelitian ini tahapan kegiatan yang dilakukan ada 6 enam tahapan, yaitu purifikasi antigen, immunisasi, penyediaan dan perbanyakkan mieloma, fusi sel limposit dan sel mieloma, hibridisasi, skrining hibridoma. Hanya saja pada tahapan untuk mendapatkan antigen yang berbeda.

Pada kegiatan 2, antigen RS diperoleh dari hasil isolasi bakteri *Ralstonia solanacearum* dari tanaman kacang tanah yang berasal dari Bogor dan sekitarnya. Kemudian dilakukan seleksi terhadap ras patogen yang ada. Isolat ini diperbanyak dengan membiakkan pada cawan petri berisi medium Sukrose Pepton Agar (SPA) (Lelliot dan Stead 1987). Biakan *R. solanacearum* (Gambar 3) umur 48 jam dipanen dengan menambahkan 10 ml akuades steril kedalam tiap cawan biakan. Suspensi biakan ini diamati dengan menggunakan standart Mc. Farlan sampai diperoleh biakan dengan optikal densiti 10^7 .

Biakan dikeruk dengan jarum ose sambil diaduk, kemudian suspensi bakteri dipindahkan ke tabung sentrifus steril dan diaduk menggunakan *vortex mixer* hingga menjadi suspensi yang homogen. Selanjutnya suspensi bakteri ini dicuci tiga kali dengan larutan 0,1 N bufer fosfat salin (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) dengan pH 7,2 melalui sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm masing-masing selama 10 menit. Akhirnya pelet bakteri disuspensikan kembali dalam PBS steril hingga kepekatannya $\pm 10^{10}$ sel/ml dan disimpan pada suhu -15°C untuk digunakan sebagai stok antigen. Sebelum immunisasi mencit, larutan stok antigen dicairkan, diambil sebagian untuk diencerkan dengan PBS steril sehingga kerapatan selnya $+10^6-10^8$ sel/ml. Enceran antigen ini digunakan untuk immunisasi mencit.

Imunisasi Mencit. Mencit (tikus putih) hibrida Balb/c yang diperoleh dari IPB, Bogor, digunakan immunisasi dengan sediaan murni RTV dan RS. Untuk RTV menggunakan enam ekor mencit dan untuk RS menggunakan 4 ekor mencit. Sediaan murni RTV dan RS yang digunakan sebagai antigen diperoleh dari hasil pemurnian yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya dan penelitian tahun 2004. Antigen RTV dan RS dilarutkan dalam bufer fosfat salin (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), pH 7.2. Sebelum immunisasi, antigen dicampur dengan Ajuvan Freund Inkomplit (*Incomplete Freund's Ajuvant*, Sigma) dengan perbandingan 1 : 1. Immunisasi dilakukan pada mencit umur 4 minggu dengan menyuntikkan 100 μl (10-20 ug) larutan antigen RTV dan RS setiap kali secara intraperitoneal, melalui vena ekor mencit, secara berkala dengan tenggang waktu satu minggu. Immunisasi dilakukan empat kali. Pada saat immunisasi RTV kedua sebanyak tiga ekor mencit mati yang sisa 4 ekor (Tabel 1). Keadaan ini memicu untuk dilakukan modifikasi mengenai konsentrasi antigen yang akan diinjeksikan. Injeksi dilakukan dengan konsentrasi antigen RTV 5, 10, 15, dan 20 ug. Dari hasil optimasi konsentrasi antigen RTV yang baik untuk disuntikan adalah konsentrasi 10 ug.

Perbanyakkan mieloma. Sel-sel mieloma diperbanyak dengan membiakkan dalam media RPMI 1640 yang mengandung NBS/FSC dan L-glutamine. Dari hasil beberapa optimasi diperoleh sel mieloma yang cukup banyak dan baik (Gambar 4). Pada fase pertumbuhan dihitung populasi sel nya. Saat ini sebanyak 57 ampul sel mieloma disimpan dalam kondisi kriogenik dalam tabung nitrogen cair, namun dalam proses mengaktifkan kembali sel dari ampul tersebut masih mengalami kendala di mana selnya banyak mengalami kematian. Sel yang tersisa sedang ditumbuhkan kembali untuk bahan fusi sel dalam medium DMEM. Saat ini bersamaan dengan pertumbuhan sel mieloma diupayakan juga perbanyakkan mencit BALB C baru untuk bahan produksi sel limposit.

Sel Hibridoma

Setelah dilakukan pencampuran sel mieloma dengan limposit mencit (fusi) diperoleh sel hibridoma (Gambar 5). Memasuki hari ke-15 pertumbuhan sel baru mencapai 1/10 luasan cawan. Hasil ini belum maksimal. Memasuki hari ke 20 pertumbuhan sel mengalami hambatan, hal ini dikarenakan terjadi penurunan konsentrasi gas CO₂ yang disebabkan terjadi kebocoran alat. Tahapan fusi sel perlu diulang kembali.

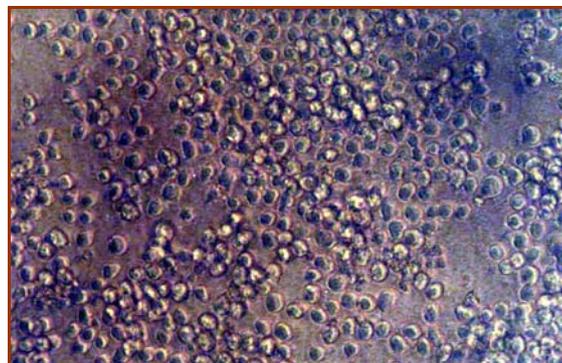
Tabel 1. Optimasi penggunaan konsentrasi antigen RS saat imunisasi pada mencit Balb/c.

Konsentrasi antigen RS (ug)	Mencit yang digunakan/yang mati pada inkubasi	
	1 minggu	2 minggu
5	5/0	5/0
10	5/0	5/0
15	5/2	5/1
20	5/2	5/2

RS = *Ralstonia solanacearum*; * = mencit yang mati; ** = Jumlah mencit yang digunakan.



Gambar 4. Koloni sel mieloma SP2 yang diperbanyak pada medium DMEM.



Gambar 5. Hibridoma (pembesaran 450 kali).

Tabel 2. Persentase skrining sel hibridoma hasil fusi antara sel limfosit mencit Balb/c yang diimunisasi RTV dengan sel mieloma SP2 Cawan 1. (Hasil Fusi 1).

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	10	H11	H12

Tabel 3. Hasil fusi I sel mieloma dengan limfosit yang menghasilkan hibridoma.

Hibridoma	Fusi ke-1 RS
(RS)I A.01	+
(RS)I B.09	+
(RS)I.C.07	+
(RS)I.E.01	+
(RS)I.F.05	+
(RS)I.H.01	+
(RS)I.H.02	+

Tabel 4. Hasil fusi II sel mieloma dengan limfosit yang menghasilkan hibridoma.

Hibridoma	Fusi ke-2 RS
(RS)II A.05	+
(RS)II A.12	+
(RB)II.B.02	+
(RS)II.C.11	+
(RS)II.E.01	+
(RS)II.F.07	+
(RS)II.F.04	+
(RS)II.H.03	+

Skrining Sel Hibridoma

Sel hibridoma yang tumbuh pada saat ini belum banyak sehingga skrining hibridoma penghasil MCAb RTV dan RS perlu diulang. Hal ini disebabkan karena jumlah sel hibridoma yang diharapkan sebanyak 1/5 dari luasan cawan petri belum didapat. Sel yang ada masih sedikit pertumbuhannya belum optimal dan terkendala dengan alat yang ada. Akan tetapi teknik perbanyakannya sudah diperoleh hanya saja masih perlu dilakukan modifikasi.

Proliferasi sel hasil fusi masih rendah sehingga belum memungkinkan untuk dilakukan skrining sel hibridoma. Skrining dilakukan untuk mengetahui titer antibodi sel hibridoma yang diperoleh dari hasil fusi mencit Balb/c dengan sel mieloma SP2. Pengujian spesifisitas antibodi merupakan hal penting pada produksi antibodi monoklonal. Antibodi monoklonal yang spesifik menurut Morris dan Clifford (1985) hanya akan bereaksi dengan antigen pembentuknya. Antigen yang benar-benar spesifik sangat jarang ditemukan dikatakan pula bahwa sebagian besar antibodi bereaksi silang dengan metabolit, fragmen atau molekul-molekul lain yang memiliki kesamaan urutan asam amino. Reaksi silang terjadi karena kesamaan epitop antara bakteri maupun virus. Sesama golongan masih dimungkinkan terjadi reaksi silang.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Tahapan yang dilakukan untuk memperoleh antibodi monoklonal tidak dapat dilakukan secara terpisah antara satu kegiatan dengan kegiatan lainnya. Hal ini disebabkan bahwa perlakuan untuk mendapatkan antigen murni mutlak diperlukan sebagai komponen dasar untuk membentuk Pab dan McAb. Pab masih diperlukan untuk kepentingan seleksi atau perbandingan McAb. Kedua teknik untuk memproduksi Pab dan McAb sudah dapat dimodifikasi.
2. Fusi sel mieloma SP/2-O dengan limfosit mencit Balb/c yang telah diimunisasi dengan bakteri *R. solanacearum* dapat menghasilkan sel hibridoma penghasil McAb terhadap RS.
3. Skrining sel hibridoma penghasil McAb belum mendapat kandidat sel hibridoma yang spesifik karena belum dapat dilakukan skrining. Hal ini disebabkan sel hibridoma yang diperoleh masih terlalu sedikit, belum mencukupi untuk perlakuan skrining.
4. Hasil biakan sel mieloma dan tiga koloni sel hibridoma yang diperoleh disimpan secara kriogenik dalam tabung berisi nitrogen cair, untuk kemudian diperbanyak dan diseleksi yang saat ini tahapan seleksi sel hibridoma masih tertunda.

Saran

1. Optimasi teknik untuk mendapatkan biakan koloni sel hibridoma yang lebih banyak perlu dilakukan segera, sehingga nantinya diperoleh koloni sel hibridoma yang lebih banyak dan dapat diseleksi, sehingga hibridoma potensial penghasil McAb dapat diklon lebih lanjut untuk produksi massal.
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 RS.

DAFTAR PUSTAKA

- De Boer, S.H. and N.W. Schaad. 1990.** Application of monoklonal antibodies. Bacteria. *In* Hampton, R. and S.H. De Boer (*Eds.*). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. The APS Press, St Paul, Minnesota. pp. 79-82.
- Dewanti-Hariyadi, R., Z.R. Fransiska, dan E. Sri. 1998.** Produksi antibodi monoklonal untuk mengembangkan pereaksi pendeteksi *Escherichia coli* O157:H7 untuk memantau keamanan pangan. Laporan Riset RUT V (1997-1998). Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi. Dewan Riset Nasional.
- 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.
- Jordan, R.L. 1990.** Strategy and techniques for the production of monoclonal antibodies. *In* Hampton, R., E. Ball, and S. de Boer (*Eds.*). Serological Methods for Detection of Viral and Bacterial Plant Pathogens. APS Press, St. Paul, Minn. p. 55-85.
- Jordan, R.L. 1990a.** Strategy and techniques for the production of monoclonal antibodies: Monoclonal antibody for viruses. *In* Hampton, R. and S.H. De Boer (*Eds.*). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. The APS Press, St Paul, Minnesota. p. 55-85.

- Jordan, R.L. 1990b.** Application of monoklonal antibodies, viruses. *In* Hampton, R. and S.H. De Boer (*Eds.*). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. The APS Press, St Paul, Minnesota. p. 77-78.
- Kohler and Milsten. 1975.** Continuous culture of fused cell producing antibodies of predefined specificity. *Science* 256:495-497.
- Machmud, M. 1986.** Bacterial wilt in Indonesia. *ACIAR Proceedings* 3:60-64.
- Machmud, M. 1996.** Bacterial wilt in Indonesia. *ACIAR Proceedings* 30:60-64.
- Machmud, M., Yadi Suryadi, M.A. Suhendar, J. Harjosudarmo, dan Roechan. 1999.** Perakitan perangkat ELISA untuk deteksi dan identifikasi Rs, SMV, Psg dan Xcg. dengan antibodi poliklonal. Laporan ROPP Tahun Anggaran 1998-1999, UPT Perkebunan.
- Morris, B.A. and Clifford, M.N. 1985.** Immunoassay in food analysis. Elsevier Applied Science Publishers. UK.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1986.** The potential for using monoclonal antibodies in the detection of plant viruses. *In* Jones, R.A.C. and L. Torrance (*Eds.*). Development and Application of Virus Testing. Lavenham Press, Great Britain. p. 89-101.
- Machmud, M., Jumanto H., 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.
- McLaughlin, R.J. and T.A. Chen. 1990.** ELISA methods for plant pathogenic procaryotes. *In* Hampton, R. and S.H. De Boer (*Eds.*). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. The APS Press, St Paul, Minnesota. p. 197-201.