

Teknik Produksi Antibodi Monoklonal (McAb) untuk Deteksi dan Identifikasi *Ralstonia solanacearum*

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

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Penelitian laboraorium telah dilakukan untuk mengadopsi teknik produksi antibodi monoklonal (McAb) guna memproduksi McAb *Ralstonia solanacearum* (RS). Imunisasi hibrida mencit Balb/c dengan antigen RS telah dilakukan. Limposit (sel-sel limpa) dipanen dari mencit yang telah diimunisasi dan digunakan untuk fusi sel dengan sel mieloma SP/O-Ag14. Tiga ratus sel hibridoma telah diperoleh dari fusi dan diseleksi guna memperoleh hibridoma penghasil McAb RS. Hasil akhir seleksi menunjukkan bahwa tiga nomor hibridoma, RS-(1)-1 C10, RS-(1)-1 F09, dan RS (6)-2 F09 memiliki potensi yang cukup baik sebagai sumber penghasil McAb Biakan ketiga nomor hibridoma ini disimpan secara kriogenik dalam tangki nitrogen cair untuk kegiatan selanjutnya.

Kata kunci: Antibodi monoklonal, teknik ELISA; deteksi dan identifikasi, *Ralstonia solanacearum*

ABSTRACT

A laboratory trial was done to adopt a technique for the production of monoclonal antibody (McAb) for detection of of bacterial wilt pathogen (*Ralstonia solanacearum*, RS). Immbunization of mice hybrid Balb/c with RS antigen was successfully done. Lymphocytes from immunized mice were harvested and used for cell fusion with SP2/O-Ag14 myeloma cells to produce hybridomas. Hybridomas capable of producing McAb RS were selected from 300 hybridoma colonies. Three hybridoma colonies potentially capable of producing high titer of McAb RS were obtained, i.e., RS-(1)-1 C10, RS-(1)-1 F09, and RS (6)-2 F09. These hybridomas were stored under a cryogenic condition in a liquid nitrogen for further works.

Key words: Monoclonal antibody, detection and identification, ELISA technique, *Ralstonia solanacearum*

PENDAHULUAN

Penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* (Sin: *Pseudomonas solanacearum*) masih menjadi kendala produksi berbagai tanaman pertanian di Indonesia, terutama pada kentang, tomat, cabai, tembakau, kacang tanah, jahe, dan pisang (Machmud, 1986). Akhir-akhir ini epifitotik penyakit layu bakteri pada pisang sudah sampai pada tingkat membahayakan industri pisang di tanah air. Penyakit layu ini sulit dikendalikan, karena patogennya bersifat tular tanah dan polifag, mempunyai kisaran inang yang sangat luas meliputi lebih dari 140 spesies tanaman yang tergolong dalam lebih dari 40 famili. Hal ini terutama disebabkan oleh variabilitas genetiknya yang luas dan kemampuannya untuk ber-

adaptasi dengan lingkungan setempat, sehingga di alam dijumpai berbagai strain *R. solanacearum* yang ciri-cirinya sangat beragam, seperti patogenisitas, virulensi, reaksi fisiologi, dan biokimia, reaksi serologi, serta kepekaannya terhadap bakteriofah. Saat ini, komponen pengendalian penyakit layu yang efektif dan efisien sulit diperoleh, misalnya sulit diperoleh kultivar tanaman yang tahan terhadap penyakit ini, sehingga upaya pengendalian harus dilakukan dengan cara memadukan berbagai komponen pengendalian yang ada termasuk deteksi dini patogen pada benih dan di lapang.

Pengetahuan tentang epifitologi penyakit layu bakteri dan bioekologi patogennya sangat diperlukan guna menunjang keberhasilan pengendalian suatu penyakit tanaman, tetapi hal ini belum banyak dikaji di Indonesia. Pengetahuan ini diperlukan sebagai acuan dasar bagi upaya penyusunan strategi pengendalian penyakit secara terpadu, termasuk untuk penyakit layu bakteri (Seal dan Elphinstone, 1994). Deteksi patogen di samping diperlukan untuk mengetahui secara dini keberadaan suatu patogen juga sangat penting dalam pengkajian epifitologi suatu penyakit tanaman dan bioekologi patogennya. Sebagai contoh, deteksi patogen dari benih dapat digunakan untuk mengetahui potensi penularan patogen melalui biji (Machmud, 1986).

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) merupakan salah satu teknik serologi yang dapat digunakan untuk deteksi dan identifikasi patogen tanaman yang efektif dan efisien (Seal dan Elphinstone, 1994). Teknik ELISA dengan menggunakan antibodi poliklonal (PAb) telah dikembangkan untuk deteksi dan identifikasi virus serta bakteri patogen utama tanaman sejak tahun 1970-an (Halk dan De Boer, 1985; Jordan, 1990; Robinson-Smith *et al.*, 1995). Teknik ini juga telah diadopsi di Indonesia untuk deteksi dan identifikasi beberapa jenis patogen tumbuhan, tetapi perangkatnya, terutama antibodinya, masih harus diimpor dengan harga mahal.

Sejak tahun 1995 peneliti Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (Balitbiogen), Bogor, telah merintis pembuatan perangkat ELISA untuk beberapa patogen utama tanaman pangan. Teknik produksi antibodi poliklonal (PAb) telah dikembangkan untuk virus tungro (*Rice Tungro Virus*, RTV), virus kerdil kedelai (*Soybean Stunt Virus*, SSV), virus bilur kacang tanah (*Peanut Stripe Virus*, PStV), bakteri hawar kedelai (*Pseudomonas syringa* pv. *glycinea*, Psg), bakteri layu (*R. solanacearum*), dan bakteri bisul kedelai (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, Xag) dengan menggunakan PAb. Teknik dan perangkat ELISA yang telah dikembangkan dapat produksi massal untuk keperluan penelitian dan penggunaan secara praktis, misalnya untuk keperluan karantina tanaman dan sertifikasi benih (Machmud *et al.*, 1999; Machmud *et al.*, 2000). Pembuatan perangkat ELISA sendiri di samping lebih murah juga dapat dilakukan untuk semua patogen utama yang ada di Indonesia.

Penggunaan PAb dalam teknik ELISA mempunyai beberapa kelemahan, sehingga akhir-akhir ini para peneliti di luar negeri telah mengembangkan teknologi produksi antibodi monoklonal (*monoclonal antibody*, McAb). Teknik ini mula-mula diperkenalkan oleh Kohler dan Milstein (1975), meliputi pembiakan sel hibridoma

penghasil antibodi yang diperoleh melalui fusi sel limpa (limposit) mencit (tikus putih) dengan sel mieloma (sel tumor, *malignant myeloma cells*). Dengan teknik ini dihasilkan antibodi yang homogen secara berkesinambungan, mempunyai reaksi yang spesifik, dan memiliki ciri-ciri biokimia yang khusus, karena sel-sel hibridoma hasil fusi yang menggabungkan sifat-sifat tetuanya (*parental*) mampu memproduksi (mensekresi) antibodi yang spesifik (McAb) secara terus menerus dan dapat disimpan lama secara kriogenik. (Jordan, 1990).

Makalah ini merupakan laporan hasil kegiatan penelitian tahun 2002 yang bertujuan untuk memproduksi hibridoma penghasil McAb untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri *R. solanacearum*.

BAHAN DAN METODE

Peralatan dan Bahan

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah ruangan khusus untuk pembiakan hibridoma, ruang isolasi (*laminar air flow*), inkubator 5% 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*), kulkas dan *freezer* (-15 dan -80°C), hemasitometer, spektrofotometer, mikropipet 0-200 µl, mikropipet 1000 µl, multipipettor 8 lubang, filter millipore ukuran 0,22 dan 0,45 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 1 ml; tabung sentrifus (konus) bertutup ukuran 5, 15, dan 50 ml; cawan petri bulat dan persegi, pipet pastur, sarung tangan plastik, spuit plastik ukuran 1, 10, dan 50 ml; jarum suntik ukuran 26 dan 16 G, serta gunting operasi. Di samping bahan peralatan laboratorium diperlukan juga mencit (tikus putih) hibrida Balb/c, ruang dan kandang untuk pemeliharaan mencit, dan perlengkapan pemeliharaan mencit. Bahan-bahan lain yang diperlukan untuk kultur sel hewan, yaitu bahan untuk medium pembuatan sediaan limposit, medium pembiakan sel mieloma, dan medium untuk fusi sel dan biakan hibridoma, di antaranya adalah medium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), RPLM-1640, hypoxanthine aminopterin thymidine (HAT), antibiotik kanamisin, serum anak sapi yang baru lahir (*Newly Born Calf Serum*, NBS), dan hypoxanthine thymidine (HT).

Pembuatan Stok Medium

Medium DMEM lengkap. Komposisi medium ini terdiri atas DMEM (Sigma) 4,5 g, akuades 500 ml, NBS 75 ml, larutan pekat glutamin 10 ml, dan larutan pekat kanamisin 1 ml. Medium DMEM Lengkap dibuat dengan melarutkan bubuk DMEM 4,5 g ke dalam akuades 500 ml, diaduk selama 30 menit, kemudian diotoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C dan pH-nya dinetralkan (pH 7,0) dengan menambahkan Na-bisulfit, hingga warnanya menjadi merah jambu (*pink*).

New Calf Born Serum (NBS, Sigma). Pada waktu baru diterima dari pemasok, biasanya NBS dalam wadah yang berisi es kering (*dry ice*) dan selalu disimpan dalam *freezer*. Segera ketika akan digunakan, NBS dicairkan dalam penangas air bersuhu 56°C selama 30 menit, untuk menonaktifkan komplemen, dibagi-bagi ke dalam botol berukuran 100 ml, setiap botol diisi 80 ml. Botol NBS segera disimpan di dalam *deep freezer* (-80°C) hingga digunakan. Tiap medium NBS dalam botol digunakan sampai habis, sebelum menggunakan medium dari botol lain.

Medium HAT. Medium ini dibuat dengan komposisi medium DMEM tanpa NBS (DMEM-NBS) 500 ml, larutan pekat hypoxanthine 5 ml, larutan pekat aminopterin 1 ml, larutan pekat thymidine 1 ml, larutan pekat glutamin 1 ml, NBS 75 ml, dan larutan pekat antibiotik kanamisin 0,5 ml

Medium HT. Medium ini dibuat dengan cara yang sama dengan medium HAT, tetapi tanpa aminopterin.

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

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

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

Larutan pekat glutamine (50 kali). Larutan ini dibuat dengan melarutkan 2,92 g L-glutamine 2,92 g ke dalam 100 ml akuades.

Larutan hypoxanthine, aminopterin, dan glutamine masing-masing disterilkan melalui filtrasi dengan filter Millipore 0,45 µm, 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 (Sigma) dalam 5 ml akuades steril di dalam botol kanamisin.

Larutan sodium bikarbonat (10%). Larutan sodium bikarbonat dibuat dengan melarutkan 10 g NaHCO₃ ke dalam 100 ml akuades. Larutan ini disterilkan dengan otoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit, kemudian disimpan pada suhu ruang.

Pembuatan Antigen

Sebagai sumber antigen digunakan isolat *R. solanacearum* Rs 9006 asal tanaman kentang dari Lembang yang tergolong Ras 1 Biovar 3. Isolat ini diperbanyak dengan membiakkan pada cawan petri berisi medium Sukrose Pepton Agar (SPA) (Lelliot dan Stead, 1987). Biakan *R. solanacearum* umur 48 jam dipanen dengan menambahkan 10 ml akuades steril kedalam tiap cawan biakan. 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 pospat 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 imunisasi mencit, larutan stok antigen dicairkan, diambil sebagian untuk diencerkan dengan PBS steril sehingga kerapatan selnya $\pm 10^6\text{-}10^8$ sel/ml. Enceran antigen ini digunakan untuk imunisasi mencit.

Imunisasi Mencit

Mencit (tikus putih) hibrida Balb/c diperoleh dari IPB, Bogor. Sediaan murni RSSV yang digunakan sebagai antigen diperoleh dari hasil pemurnian yang telah dilakukan sebelumnya. Imunisasi mencit dilakukan dengan menyuntikkan 100 μl (25-50 μg) antigen RS secara intraperitoneal, ke dalam rongga peritoneum mencit secara berkala dengan tenggang waktu satu minggu. Imunisasi terakhir dilakukan empat hari sebelum dilakukan fusi sel limposit mencit dengan sel mieloma.

Penyediaan Limposit Mencit

Empat hari setelah imunisasi, mencit putih 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 agar limpositnya keluar ke dalam medium. Kemudian suspensi limposit disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 7 menit dan endapannya dicuci dengan DMEM-NBS empat kali.

Penyediaan Sel Mieloma

Sel mieloma yang digunakan adalah SP 2/O-Ag14, diperoleh dari Balitvet, Bogor. Sel ini dibiakkan di dalam medium DMEM + NBS + L-glutamine dan diinkubasikan dalam inkubator 5% CO_2 dengan suhu 37°C . Pada hari ke-2 inkubasi, pertumbuhan biakan 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.

Biakan sel mieloma yang telah ditumbuhkan hingga fase pertumbuhan logaritmik disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit, kemudian disuspensikan kembali dalam medium DMEM + NBS + L-glutamine dengan volume tertentu dan jumlah selnya dihitung dengan hemasitometer. Penyediaan biakan sel mieloma diatur sedemikian rupa, sehingga pada saat fusi sel akan dilakukan, jum-

lah dan viabilitasnya pada kondisi puncak. Perbandingan antara mieloma dan sel limpa biasanya 1 : 10. Dari limpa seekor tikus putih biasanya diperoleh 10^8 sel limpa, sehingga sel mieloma yang harus disiapkan adalah 10^7 sel. Oleh karena itu, perlu disiapkan beberapa cawan petri steril yang berisi 20 ml medium dan diinokulasi dengan 10^3 sel mieloma. Sel mieloma yang tumbuh dalam keadaan normal, jumlahnya menjadi dua kali lipat setelah diinkubasi selama 15 jam dalam inkubator 5% CO_2 dengan suhu 37°C .

Cara penghitungan limposit dan sel mieloma yang akan digunakan untuk fusi adalah (1) apabila kerapatan sel limpa pada hemasitometer 52 sel, maka total jumlah sel dalam cawan yang berisi 20 ml biakan adalah $52 \times 10^4 \times 20 \text{ sel} = 1,04 \times 10^8$ sel dan (2) apabila kerapatan sel mieloma pada hemasitometer 64 sel, maka total jumlah sel dalam cawan yang berisi 20 ml biakan adalah $64 \times 10^4 \times 20 \text{ sel} = 1,28 \times 10^7$ sel. Dengan demikian jumlah sel mieloma yang dibutuhkan adalah $1,04 \times 10^7$ 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.

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.

Setelah dilakukan fusi sel mieloma dengan limposit mencit, sel yang difusikan (fusan) 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 harus dilakukan dalam rentang waktu 60 detik, mulai dari tetesan pertama hingga tetesan terakhir. Tahapan pemberian PEG adalah 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.

Selanjutnya pengaruh PEG terhadap campuran sel dikurangi dengan menambahkan medium DMEM-NBS 9 ml ke dalam tabung secara bertahap dan bertingkat dalam rentang waktu 5 menit, menggunakan pipet berukuran 10 ml. 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 sebanyak 28,7 ml (sesuai dengan hasil perhitungan) dengan menggoyang. Kemudian suspensi didistribusikan ke dalam lubang cawan mikro (*microplate*) steril dan bertutup, 100 μ l setiap lubang, menggunakan mikropipet 1000 μ l, dan cawan mikro diinkubasikan di dalam inkubator CO₂ bersuhu 37°C, untuk membiakkan hibridoma.

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

Skrining Sel Hibridoma

Skrining untuk menyeleksi sel hibridoma penghasil hibridoma dilakukan dua kali melalui pengujian dengan teknik ELISA Tidak Langsung (*Indirect ELISA*, Robinson-Smith *et al.*, 1995) terhadap cairan medium yang ditumbuhi biakan hibridoma. Cairan medium dari biakan hibridoma digunakan sebagai antibodi. Antigen yang digunakan dua macam, yaitu ekstrak kentang terinfeksi RS dan sediaan murni RS. Apabila reaksi ELISA positif, maka berarti biakan hibridoma menghasilkan McAb. Skrining I dilakukan untuk menyeleksi biakan hibridoma penghasil McAb.

Skrining II dilakukan dengan teknik yang sama untuk menguji kembali hibridoma penghasil McAb yang diperoleh dari skrining I guna memperoleh hibridoma yang potensial menghasilkan McAb tinggi. Koloni hibridoma dari hasil skrining I kembali dibiakkan dalam medium HAT seperti diuraikan di atas, kemudian suspensi mediumnya diuji dengan teknik ELISA untuk mengetahui produksi McAb-nya.

Penyimpanan Hibridoma dan McAb

Secara aseptik, koloni hibridoma penghasil McAb dipindahkan ke petridish kecil berdiameter 11 cm yang berisi 5 ml medium HAT dan diinkubasikan di dalam inkubator CO₂ selama 2-3 hari. Selanjutnya biakan hibridoma disentrifusi dengan kecepatan 1000 rpm selama 7 menit dan peletnya disuspensikan kembali dengan menambahkan 100 μ l larutan 10% DMSO dalam NBS. Kemudian suspensi hibridoma disimpan pada suhu -80 °C semalam dan akhirnya dipindahkan ke dalam tabung kriopreservasi yang berisi nitrogen cair. Cairan supernatannya yang merupakan suspensi McAb disimpan dalam ampul dengan teknik kering beku pada -30°C (Sly, 1983).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Imunisasi Tikus Putih

Contoh darah diambil seminggu setelah imunisasi terakhir dan dimurnikan serumnya. Hasil pengujian dengan teknik mikropresipitasi positif, berarti bahwa mencit menunjukkan respon antibodi terhadap antigen *R. solanacearum* yang disuntikkan.

Penyediaan dan Fusi Sel Mieloma dan Limposit

Biakan sel mieloma berupa lapisan film sel mieloma yang tumbuh didasar lubang cawan medium. Kerapatan sel mieloma yang diperoleh pada saat akan dilakukan fusi dengan sel limposit mencit adalah 10^7 sel/ml. Sel limposit dari lima mencit dihasilkan dengan kerapatan sekitar 10^8 sel/ml.

Fusi sel mieloma dengan sel limposit mencit yang telah diimunisasi dengan RS menghasilkan fusan sel hibridoma. Hal ini ditunjukkan adanya pertumbuhan biakan sel pada dasar medium. Hasil fusi mencapai 30,5%. Sel hibridoma yang diperoleh tidak semuanya menghasilkan McAb, sehingga perlu dilakukan skrining untuk memperoleh sel hibridoma penghasil McAb.

Skrining Sel Hibridoma

Pada skrining I diperoleh 10 biakan hibridoma yang menghasilkan McAb (Tabel 1). Kemampuan menghasilkan McAb dari setiap koloni sel hibridoma berbeda-beda, oleh karena itu, dilakukan skrining II untuk memperoleh biakan hibri-

Tabel 1. Nomor-nomor koloni hibridoma penghasil McAb *R. solanacearum* yang diperoleh dari skrining I hasil fusi sel mieloma dengan sel limposit mencit yang diimunisasi dengan antigen *R. solanacearum*. Bogor, 2002

No. hibridoma	Reaksi ELISA (OD ₄₅₀)		
	1	2	Rataan
RS-(1)-01 C10	0,48	0,45	0,47
RS-(1)-01 F03	0,17	0,52	0,35
RS-(1)-01 F08	0,41	0,47	0,44
RS-(2)-03 C12	0,11	0,13	0,12
RS-(3)-01 B05	0,32	0,26	0,29
RS-(3)-01 E05	0,26	0,28	0,27
RS-(3)-01 G04	0,37	0,32	0,35
RS-(4)-02 A09	0,22	0,32	0,27
RS-(5)-01 E03	0,35	0,37	0,36
RS-(6)-02 F09	0,45	0,61	0,53

Nomor hibridoma RS-(1)-01 C10: RS = antigen *R. solanacearum* yang digunakan; angka dalam kurung (1) = nomor fusi; 01 = nomor cawan hasil fusi, dan C10 = nomor lubang yang bereaksi positif. Angka pada kolom reaksi ELISA merupakan hasil pengukuran kerapatan optik (OD₄₅₀) menggunakan spektrofotometer. Nilai di bawah angka 1 = contoh uji berupa ekstrak umbi kentang terinfeksi *R. solanacearum*, dan di bawah angka 2 = contoh uji berupa sediaan murni *R. solanacearum*

doma yang potensial menghasilkan McAb tinggi untuk digunakan sebagai sumber penghasil McAb selanjutnya.

Pada skrining II diperoleh 3 kandidat sel hibridoma penghasil McAb yang potensial, berdasarkan kemampuan menghasilkan McAb yang tinggi, yaitu RS-(1)-1 C10, RS-(1)-1 F08, dan RS-(6)-2 F09 (Tabel 2). Hasil skrining menunjukkan bahwa hibridoma yang menghasilkan McAb tertinggi pada skrining I juga tetap menghasilkan McAb tertinggi pada skrining II.

Penyimpanan Hibridoma dan McAb

Biakan hibridoma nomor RS-(1)-1 C10, RS-(1)-1 F08, dan RS-(6)-2 F09 yang potensial menghasilkan McAb *R. solanacearum* tinggi ditempatkan dalam botol-botol kriogenik yang disimpan dalam tabung berisi nitrogen cair. Koloni hibridoma ini selanjutnya akan diklon untuk memperoleh koloni hibridoma satu sel (*single cell colony hybridoma*) yang menghasilkan McAb spesifik. McAb yang diperoleh pada kegiatan ini disimpan dalam ampul dalam keadaan kering beku pada suhu -20°C.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Fusi sel mieloma SP/2-O AG14 dengan limposit mencit Balb/c yang telah diimunisasi dengan bakteri *R. solanacearum* dapat menghasilkan sel hibridoma penghasil McAb RS.
2. Skrining hibridoma penghasil McAb memperoleh tiga koloni hibridoma yang potensial menghasilkan McAb tinggi dan stabil, yaitu RS-(1)-1 C10, RS-(1)-1 F08, dan RS-(6)-2 F09.

Tabel 2. Hasil skrining II enam nomor koloni hibridoma penghasil McAb *Ralstonia solanacearum* (RS) yang potensial tinggi dan stabil. Bogor, 2002

No. hibridoma	Reaksi ELISA (OD ₄₅₀)		
	1	2	3
RS-(1)-01 F03	0,35	0,28	0,31
RS-(3)-01 G04	0,35	0,30	0,33
RS-(5)-01 E03	0,36	0,24	0,25
RS-(1)-01 C10	0,51	0,62	0,57
RS-(1)-01 F08	0,50	0,57	0,54
RS-(6)-02 F09	0,58	0,69	0,64

Nomor hibridoma RS-(1)-01 C10: RS = antigen *R. solanacearum* yang digunakan; angka dalam kurung (1) = nomor fusi; 01 = nomor cawan hasil fusi, dan C10 = nomor lubang yang bereaksi positif. Angka pada kolom reaksi ELISA merupakan hasil pengukuran kerapatan optik (OD₄₅₀) menggunakan spektrofotometer. Nilai di bawah angka 1 = contoh uji berupa ekstrak umbi kentang terinfeksi *R. solanacearum*, dan dibawah angka 2 = contoh uji berupa sediaan murni *R. solanacearum*

3. Koloni sel hibridoma hasil seleksi disimpan secara kriogenik dalam tabung berisi nitrogen cair, sedangkan McAb *R. solanacearum* yang diperoleh disimpan dalam ampul secara kering beku.

Saran

1. Hibridoma penghasil McAb *R. solanacearum* yang potensial dapat diklon lebih lanjut untuk produksi massal McAb *R. solanacearum*.
2. Laboratorium kultur sel perlu disediakan untuk keperluan *scale up* produksi McAb.

DAFTAR PUSTAKA

- 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 R. Hampton, 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.
- Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous culture of fused cell producing antibodies of predefined specificity. *Nature* 256.
- Lelliot, R.A. and D.E. Stead. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* Blackwell Scientific Publ., London. 216 p.
- Machmud, M. 1986. Bacterial wilt in Indonesia. *ACIAR Proceedings* 3:60-64.
- Machmud, M., Y. Suryadi, M.A. Suhendar, Jumanto, dan M. Roechan. 1999. Perakitan perangkat ELISA untuk deteksi dan identifikasi Rs, SMV, Psg, dan Xcg dengan antibodi poliklonal. Laporan ROPP TA 1998-1999, Balitbio, Bogor. 15 hlm.
- Machmud, M., M. Roechan, Jumanto, dan M.A. Suhendar. 2000. Perakitan dan uji perangkat ELISA untuk deteksi virus RTM dan SMV serta bakteri *P. syringae* pv. *glycinea* dan *X. campestris* pv. *glycines*. Laporan ROPP Tahun Anggaran 1999-2000, Balitbio, Bogor.
- Robinson-Smith, A., P. Jones, and J.G. Elphinstone. 1995. Production of antibodies to *P. solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food Agric. Immunol.* 7:67-79
- Sly, S.L. 1983. Preservation of microbial cultures. In F.C. Fahy and G.J. Persley (Eds.). *Plant Bacterial Diseases.* Academic Press, Sydney. p. 275-298.
- Seal, S.E. and J.G. Elphinstone. 1994. Advanced techniques for detection and identification of *Pseudomonas solanacearum*. In A.C. Hayward and G.L. Hartman (Eds.). *Bacterial Wilt: Its causative agent.* CABI, Wallingford, UK. p. 34-39.