

Produksi Antibodi Monoklonal untuk Deteksi Dini *Rice Tungro Virus* (RTV)

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

ABSTRAK

Rice Tungro Virus (RTV) merupakan penyakit penting yang dapat menyebabkan kehilangan hasil sebesar 10% sampai puso. Dalam upaya pengendaliannya dilakukan deteksi dengan antibodi monoklonal. Mencit Balb/c disuntikan dengan antigen RTV secara berkala dengan interval seminggu. Sel limposit dipanen dari limpa mencit yang telah diimunisasi, selanjutnya difusikan dengan sel mieloma SP2 untuk memperoleh hibridoma yang selanjutnya diseleksi untuk memperoleh hibridoma penghasil McAb RTV. Dari 22 hibridoma yang terbentuk dilakukan uji kandungan antibodinya menggunakan metode ELISA. Ternyata hanya dua hibridoma yang memproduksi antibodi, yaitu antibodi monoklonal RTV-2B2 (McAb-RTV2B2) dan RTV-3D7 (McAb-RTV3D7). Koloni hibridoma ini disimpan secara kriogenik dalam tabung yang 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 monoklonal, deteksi, *rice tungro virus* (RTV).

ABSTRACT

Rice tungro virus (RTV) is the important disease that reduce 10%-outbreak. Alternatif methode to control is by detection used monoclonal antibody. Mice balb/c was immunized by injecting with RTV antigen periodic a week. Lymphocytes from immunized mice were harvested and used for cell fusion with SP2 myelomas cell to produce hybridomas. Results of the trial showed that 22 hybridomas colonies producing McAb RTV were obtained from cell fusion. Two hybridoma colonies potential as sources for McAb RTV productions were obtained,ie., RTV-2B2 and RTV-3D7. These hybridomas were stored under a cryogenic condition in a liquid nitrogen for further works.

Key words: Monoclonal antibody, detection, *rice tungro virus* (RTV).

PENDAHULUAN

Mikroba patogen banyak menimbulkan penyakit yang serius dan menghambat produksi pada tanaman pangan dan hortikultura di Indonesia. Pada tanaman padi misalnya, penyakit tungro yang disebabkan oleh virus tungro (*Rice Tungro Virus*, RTV) masih belum dapat diatasi dengan baik. Endemi tungro masih dijumpai di beberapa daerah, dan epideminya seringkali muncul secara tiba-tiba bila kondisi lingkungan mendukung (Jumanto dan Tantera 1987; Anonim 1992; Hasanuddin 1999; Koesnang *et al.* 1993). Penyakit tungro disebabkan oleh infeksi dua bentuk virus, yaitu partikel virus bulat (*Rice Tungro Sphaerical Virus*, RTSV) dan partikel virus batang (*Rice Tungro Bacilliform Virus*, RTBV) (Hibino *et al.* 1978). Virus tungro mempunyai variasi strain yang tinggi antar daerah endemik, baik dari ciri-ciri fisik, molekuler, maupun virulensinya (Hibino 1983; Cabauatan dan Azzam 1998a). Di samping itu, daya adaptasi serangga vektornya pada varietas padi tahan juga sangat cepat bila ada tekanan seleksi yang kuat. Oleh karena itu, strategi penggunaan varietas tahan sering menghadapi kendala meskipun ketahanan varietas di lapang dapat diperpanjang melalui pergiliran varietas. Strategi lain yang perlu diterapkan adalah melakukan deteksi dini perkembangan penyakit agar dapat menentukan strategi penggunaan varietas tahan yang tepat.

Komponen antigenik dari mikroba tersebut merupakan komponen dasar yang dapat digunakan untuk produksi antibodi bagi pengembangan kit ELISA untuk deteksi dini dan identifikasi serangan penyakit. Pada virus tungro yang telah diketahui memiliki sebaran yang sangat luas memungkinkan terbentuknya strain-strain virus yang memiliki sifat genetik, biokimia, dan patogenitas yang berbeda dari RTV lainnya sehingga tidak mudah dideteksi dengan metode konvensional. Deteksi menggunakan metode inang alternatif dan tanaman indikator membutuhkan waktu yang cukup lama sehingga tidak praktis digunakan sebagai alat analisis rutin. Sampai saat

ini metode analisis yang cepat dan banyak digunakan untuk deteksi patogen adalah metode *immunoassay* yang reaksinya didasarkan pada reaksi antigen-antibodi. Beberapa jenis produk komersial yang menggunakan antibodi monoklonal sebagai pendeteksi virus dapat diperoleh secara komersial namun dengan harga yang mahal.

Produksi antibodi monoklonal dapat dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo* dengan menumbuhkan klon hibridoma hasil fusi sel limfosit dengan sel mieloma sehingga dapat dihasilkan antibodi monoklonal spesifik pendeteksi RTV secara terus menerus. Sel limfosit yang digunakan berasal dari organ limpa mencit Balb/c yang sudah disuntik antigen yang berasal dari RTV.

Respon imun yang ditunjukkan dengan terbentuknya antibodi oleh sel limfosit dapat dihasilkan dengan menginjeksi hewan percobaan dengan antigen yang diketahui sebagai antigen potensial dengan mengembangkan prosedur ELISA yang tepat yang menggunakan antibodi monoklonal yang dapat mendeteksi RTV akan membantu mengendalikan sebaran penyakit tungro terutama didaerah-daerah sentra produksi padi di Indonesia.

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 limfosit penghasil antibodi dengan sel mieloma (*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 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; 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). McAb telah diproduksi untuk berbagai patogen tanaman termasuk virus, fitoplasma, dan bakteri (Converse dan Martin 1990; McLaughlin dan Chen 1990). Tujuan dilakukannya studi ini adalah untuk membuat, menyeleksi dan mengkarakterisasi sel hibridoma penghasil McAb RTV dan RS.

BAHAN DAN METODE

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, hemositometer, 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 16G, 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).

Perbanyak Tanaman Terinfeksi Virus Tungro

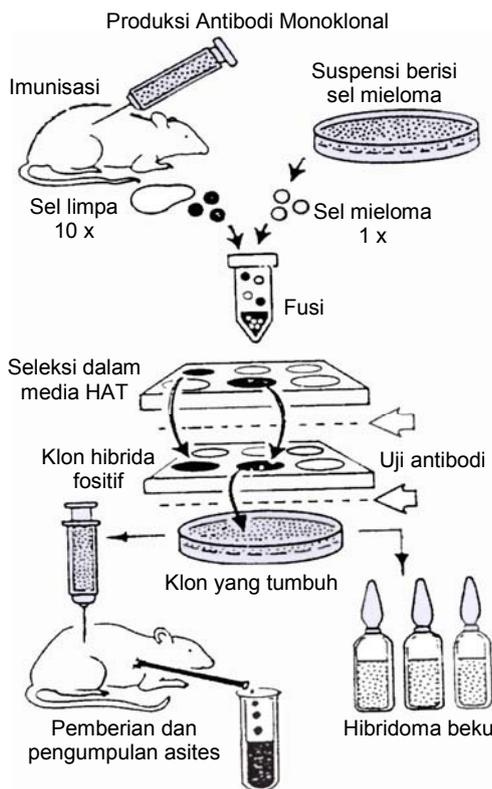
Tanaman padi varietas IR64 yang mengandung virus tungro dengan ciri-ciri daun berwarna kuning atau kuning kemerahan yang dimulai dari ujung daun sampai ke bagian pangkal daun, yang diperoleh dari Serang dan Sukamandi dipelihara di rumah kaca sebagai sumber inokulum awal. Wereng hijau dewasa hasil perbanyak diinfestasikan pada tanaman padi sumber inokulum awal selama 1 hari. Setelah 1 hari, wereng hijau dikeluarkan dengan menggunakan aspirator dan dipindahkan ke tanaman perbanyak (padi varietas Pelita 1-1 dan IR64) berumur 7-10 hari sebanyak 2 ekor wereng hijau yang telah mengandung virus per tanaman selama 1 hari. Kemudian wereng hijau dikeluarkan dengan aspirator. Setelah itu, tanaman ditanam di ember plastik dan dipelihara di rumah kaca sebagai sumber inokulum berikutnya. Berikutnya tanaman padi terinfeksi tungro diperbanyak dalam bak plastik berukuran 45 cm x 30 cm x 12 cm. Tiap bak plastik ditanam sebanyak 20 tanaman. Pada umur 1-1½ bulan tanaman padi terinfeksi tersebut dipanen dan dipurifikasi.

Penyediaan Antigen

Contoh tanaman padi terinfeksi RTV diperoleh dari koleksi yang ada di Kelti Rekayasa Protein dan Imunologi (Kelti Biokimia), BB-Biogen, yang semula berasal dari lapang di Sukamandi, Subang, dan Serang. Pemurnian RTV 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 untuk diimunisasi. Sediaan murni RTV yang digunakan sebagai antigen diperoleh dari hasil pemurnian yang telah dilakukan sebelumnya. Antigen RTV 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 Adjuvant*, Sigma) dengan perbandingan 1 : 1. Imunisasi dan booster dilakukan sesuai dengan metode Harlow dan Lane (1988) dengan cara sebagai berikut: antigen RTV diberikan secara intraperitoneal (i.p) dengan dosis yang dilaporkan tidak mematikan tetapi imunogen (Dewanti-Hariyadi *et al.* 1998), yaitu 25 ug patogen/mencit. Mencit yang digunakan berumur 4-6 minggu dengan menyuntikkan 100 µl (10-20 ug) larutan antigen RTV 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 secara intraperitoneal. Tiga hari sebelum mencit disakrifikasikan untuk diambil limfanya diberikan booster akhir secara intravena (i.v) dengan konsentrasi 10 ug antigen/mencit (Gambar 1).



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

Persiapan Sel Limfosit dari Sel Limpa Mencit Hiperimun

Persiapan sel limfosit dilakukan dengan metode Harlow dan Lane (1988) yang dimodifikasi. Mencit Balb/c yang sudah diinjeksi antigen RTV serta sudah disuntik 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. Limpa diurut dengan jarum disposable untuk mengeluarkan sel dan suspensi selanjutnya dipipet ke dalam tabung sentrifugasi 15 ml kemudian disentrifugasi 3 kali dengan medium pencuci. Pelet ditambah dengan medium fusi yang terdiri dari DMEM. Jumlah sel yang diperoleh dihitung dengan *hemocytometer* (*cell counter*). Selanjutnya, secara aseptik pula, limpa yang masih utuh dan segar dipotong kecil-kecil untuk mengeluarkan sel limpa (limposit). Potongan limpa ditekan-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.

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 hemositometer. Bila jumlah sel yang dibutuhkan belum mencukupi, maka disediakan biakan baru dengan menumbuhkan 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 medium DMEM + NBS dengan volume tertentu dan kerapatan selnya dihitung dengan hemasitometer.

Fusi Limfosit dengan Mieloma

Fusi dilakukan dengan cara mencampurkan 1×10^6 sel mieloma dengan 1×10^7 sel limfosit menciit, campuran sel yang difusikan 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 sebanyak 29,7 ml (sesuai dengan hasil perhitungan) dengan menggoyang. Kemudian suspensi didistribusikan ke dalam lubang cawan mikro (*micro-plate*) steril dan bertutup, 100 μ l setiap lubang, 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 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 μ l/sumur dan digantikan dengan medium HAT baru sebanyak 100 μ l/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 HT sebanyak 2 ml/sumur. Penggantian medium selanjutnya dilakukan seminggu sekali dengan medium HT sampai pertumbuhan sel hibrid stabil.

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 1990, tidak dipublikasi). Sebagai antigen digunakan ekstrak daun padi terinfeksi RTV. 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.

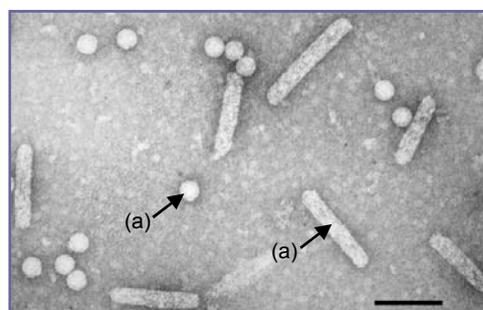
HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbanyak Tanaman Terinfeksi Virus Tungro

Tanaman padi varietas IR64 yang mengandung virus tungro memperlihatkan ciri-ciri sebagai berikut daun berwarna kuning atau kuning kemerahan yang dimulai dari ujung daun sampai ke bagian pangkal daun. Gejalanya sangat khas. Apabila serangan tungronya parah tanaman akan memperlihatkan gejala kerdil dan pada ujung daun terdapat bercak nekrotik berwarna kuning kecoklatan dan jumlah anakan sedikit. Tanaman dengan gejala tersebut diambil daunnya (dipanen) untuk dipurifikasi untuk mendapatkan antigen murni RTV. Daun tanaman padi tersebut diambil pada umur 1-1½ bulan.

Purifikasi Antigen RTV

Dari hasil purifikasi daun padi terinfeksi virus tungro terdapat partikel virus *Rice Tungro Virus*. Partikel virus yang diperoleh dari hasil pengamatan dengan mikroskop elektron adalah sebagian partikelnya berbentuk bulat (spherical) dengan diameter 30 nm dan sebagian lagi berbentuk batang (Bacilliform) dengan diameter 30-35 nm. Hasil pemurnian virus masih rendah, hal ini berkaitan dengan letak virus itu sendiri pada jaringan tanaman padi. RTV pada tanaman padi berada pada phloem, sehingga dilakukan beberapa kali purifikasi untuk mendapatkan virus murni yang cukup untuk diimunitasikan ke kelinci (PAb) dan mencit Bab/c (McAb). Dari beberapa kali purifikasi tersebut diperoleh virus murni. Kemurnian virus ini diketahui setelah dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop elektron yang hanya menghasilkan partikel virus bentuk batang dan bulat dengan ukuran masing-masing adalah 25 x 100 nm dan 30-35 nm (Gambar 2). Kegagalan purifikasi sering terjadi karena terkendala dengan terjadinya agregasi. Sedangkan pada purifikasi yang berhasil, karakteristik kemurnian virus dapat dilihat dari hasil pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer. Pada spektrofotometer didapat angka pun-



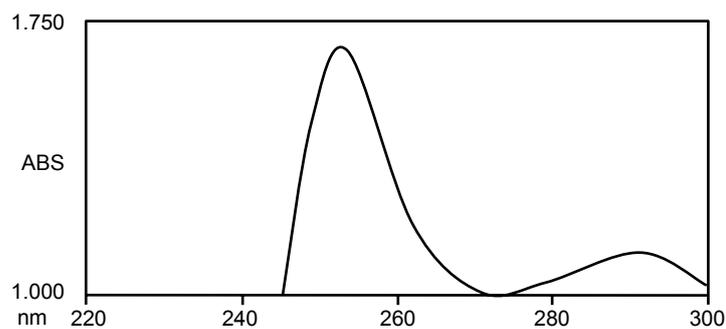
Gambar 2. Partikel dari *Rice Tungro Spherical Virus* (a), *Rice Tungro Bacilliform Virus* (b) (lihat tanda panah) perbesaran 162.000 kali.

cak serapan pada panjang gelombang 254,7 nm (Gambar 3) yang mengindikasikan keberhasilan pemurnian partikel virus dari ekstrak daun padi terinfeksi. Angka absorbansi virus yang diperoleh adalah 1,772 dengan konsentrasi virus yang diperoleh berkisar antara 50-60 ug untuk setiap 100 g daun padi. Dari 6 kali pemurnian diperoleh virus murni sebanyak 480 ug.

Virus murni yang diperoleh kemudian diimunisasikan ke mencit. Contoh darah diambil empat hari setelah imunisasi terakhir dan diproses untuk memperoleh antibodi poliklonal (PAb) RTV dan diuji titernya menggunakan teknik mikropresipitasi (Klement *et al.* 1990). Hasilnya menunjukkan serum bereaksi positif berdasarkan uji mikropresipitasi. Hal ini menunjukkan adanya respon antibodi dari mencit terhadap antigen RTV yang disuntikkan. Setelah diketahui bahwa mencit telah memproduksi Ab, pada hari yang sama mencit dimatikan untuk diambil limpanya.

Imunisasi Mencit. Mencit (tikus putih) hibrida Balb/c yang diperoleh dari IPB, Bogor, digunakan imunisasi dengan sediaan murni RTV. Untuk RTV menggunakan enam ekor mencit. Sediaan murni RTV yang digunakan sebagai antigen diperoleh dari hasil pemurnian yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya dan penelitian tahun 2004. Antigen RTV 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 dilakukan pada mencit umur 4 minggu dengan menyuntikkan 100 µl (10-20 ug) larutan antigen RTV setiap kali secara intraperitoneal, melalui vena ekor mencit, secara berkala dengan tenggang waktu satu minggu. Imunisasi dilakukan empat kali. Pada saat imunisasi 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 disuntikkan adalah konsentrasi 10 ug. Penyuntikan terakhir dilakukan empat hari sebelum dilakukan fusi sel limposit mencit dengan sel mieloma.

Perbanyakkan mieloma dilakukan dengan menumbuhkan sel tersebut dalam media biakan 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 selnya. Saat ini sebanyak 57 ampul sel mieloma disimpan dalam kondisi penyimpanan beku (N 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 pertum-



Gambar 3. Hasil purifikasi virus diamati dengan spektrofotometer.

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

| Konsentrasi antigen | Jumlah mencit RTV Ink. 1 minggu | Jumlah mencit RTV Ink. 2 minggu |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 5 ug | 0*/5** | 0/5 |
| 10 ug | 0/5 | 0/5 |
| 15 ug | 3/5 | 3/5 |
| 20 ug | 5/5 | 3/5 |

RTV = *Rice Tungro Virus*, * = mencit yang mati, ** = jumlah Mencit yang digunakan.

bahan sel mieloma diupayakan juga perbanyak mencit BALB C baru untuk bahan produksi sel limposit.

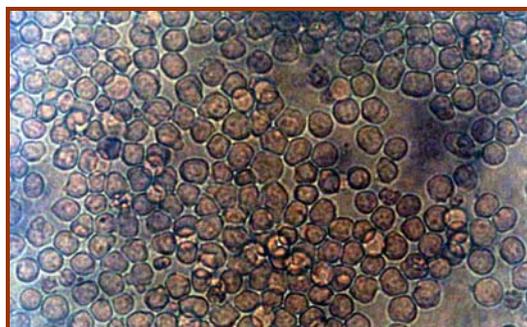
Penyediaan dan Fusi Sel Mieloma dan Limposit

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 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 sebanyak 29,7 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 di dasar lubang, dan lubang yang ditumbuhi sel hibridoma diberi tanda. Pada penelitian ini telah 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.

Skrining Sel Hibridoma

Sel hibridoma yang tumbuh pada saat ini belum banyak sehingga skrining hibridoma penghasil MCAB RTV dan RS belum bisa dilakukan. Hal ini disebabkan karena jumlah sel hibridoma



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

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.

Sel hibridoma yang terbentuk dari hasil fusi pada medium yang mengandung sel feeder dan IL-6 diperlihatkan pada Tabel 2. Sumur yang menunjukkan adanya sel hibridoma berkisar antara 10,04-19,79%. Perlakuan keduanya, yaitu penggunaan sel feeder mendorong pembentukan koloni pada 11 sumur pelat mikro 96 dan perlakuan interleukin-6 pembentukan koloni hanya 5 sumur pelat mikro 96.

Proliferasi sel hasil fusi masih rendah sehingga hasil skrining pun masih rendah akan tetapi hasil yang telah dicapai saat ini merupakan hibridoma potensial untuk selanjutnya dapat diperbanyak dan diklon sebagai sumber antibodi monoklonal. 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

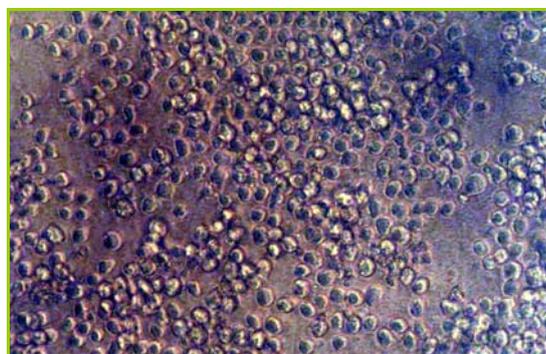
Kesimpulan

1. Tahapan yang dilakukan untuk memperoleh antibodi monoklonal tidak dapat dilakukan secara terpisah antara satu kegiatan dengan kegiatan lainnya. Hal ini disebabkan karena perlakuan untuk mendapatkan antigen murni mutlak diperlukan sebagai komponen dasar untuk membentuk Pab dan McAb. Pab masih diperlukan untuk kepentingan seleksi atau pembandingan McAb. Kedua teknik untuk memproduksi Pab dan McAb sudah dapat dimodifikasi.

Tabel 2. Persentase hibridoma hasil fusi antara sel limfosit mencit Balb/c yang diimunisasi RTV dengan sel mieloma SP2.

| No. pelat | Jumlah sumur | Sumur yang positif menunjukkan sel hibrid | | Sumur dg sel hibridoma membentuk koloni | | Sumur dengan antibodi | |
|-----------|--------------|---|------------|---|------------|-----------------------|------------|
| | | Jumlah | Persentase | Jumlah | Persentase | Jumlah | Persentase |
| 1 | 96 | 3 | 3,13 | 3 | 3,13 | 0 | 0 |
| 2 | 96 | 4 | 4,17 | 4 | 4,17 | 1 | 25 |
| 3 | 96 | 5 | 5,21 | 5 | 5,21 | 1 | 20 |
| 4 | 96 | 3 | 3,13 | 3 | 3,13 | 0 | 0 |
| 5 | 96 | 7 | 7,29 | 7 | 7,29 | 0 | 0 |

No. pelat 1 = no mikroplat.



Gambar 5. Hibridoma (pembesaran 450 kali).

2. Fusi sel mieloma SP/2-O dengan limposit mencit Balb/c yang telah diimunisasi dengan *Rice Tungro Virus* (RTV) dan bakteri *R. solanacearum* dapat menghasilkan sel hibridoma penghasil McAb terhadap RTV dan 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 RTV dan RS.

DAFTAR PUSTAKA

- Carter, M.J. and V. Ter Meulen. 1984.** The application of monoclonal antibodies in the study of viruses. *In* Lauffer, M.A. 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* Hampton, R. 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.
- 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. p. 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.
- Hibino, H.M. Roechan, S. Sudarisman, and D.M. Tantera. 1977.** A virus disease of rice (kerdil hampa) transmitted by brown hopper, *Nilaparvata lugens* Stal in Indonesia. *CRIA Contributions* 35:1-15.
- Hasanuddin, A. 1999.** Laporan monitoring dan evaluasi serangan tungro di Nusa Tenggara Barat. Balitpa, Sukamandi.
- 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.
- Jumanto, H. and D.M. Tantera. 1987.** Tungro and tungro-like disease in West Java, Indonesia. Proc. Workshop on Rice Tungro Virus. Maros, Indonesia.
- Koesnang, A. Muis, M. Slamet, dan A. Hasanuddin. 1993.** Intensitas serangan penyakit tungro dan fluktuasi populasi wereng hijau *N. virescens* Distant pada berbagai waktu tanam di Sulawesi Selatan. *Agricam* 8(3):79-83.
- 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., Y. 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.
- Martin, R.R. 1985.** Recent advances in virus detection. *Hort. Sci.* 20:8.
- 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.
- Morris, B.A. and M.N. Clifford. 1985.** Immunoassay in food analysis. Elsevier Applied Science Publishers. UK.
- Muhsin, M. 1999.** Teknik ELISA untuk mendeteksi virus-virus tungro padi. *Dalam* Sugiono *et al.* (Eds.). Prosiding Temu Ilmiah Bioteknologi Pertanian di Bogor, Maret 1998. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor. hlm. 60-63.
- Ou, S.H. 1985.** Rice diseases. Commonw. Mycol. Inst., Kew Surrey, England. 377 p.
- 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.

Lampiran 1. Komposisi medium untuk pertumbuhan sel hibridoma.

| | | | |
|---------------------------------------|---|-----------------|-------|
| A. Medium kultur | : | DMEM | 20,0% |
| | | NBC serum | 2,0% |
| | | Natrium pyruvat | 2,0% |
| | | L-Glutamin | 0,2% |
| | | Kanamycine | 0,2% |
| B. Medium fusi | : | DMEM | 10,0% |
| | | NBC serum | 1,0% |
| | | Natrium pyruvat | 1,0% |
| | | L-Glutamin | 0,1% |
| | | Kanamycine | 0,1% |
| C. Medium HAT (seleksi) | : | Medium kultur | |
| | | Hypoxhantin | 4,0% |
| | | Aminopterin | 2,0% |
| | | Thimidine | 4,0% |
| D. Medium HAT (seleksi) | : | Medium kultur | |
| | | Hypoxhantin | 4,0% |
| | | Aminopterin | 2,0% |
| | | Thimidine | 4,0% |
| E. Perawatan sel hibridoma hasil fusi | | | |
| 1. Medium HAT | | | |
| 2. Medium HT | : | Medium kultur | |
| | | Hypoxhantin | 4,0% |
| | | Thymidine | 4,0% |
| 3. Kloning | : | DMEM | |
| | | NBC serum | 10,0% |
| | | Natrium pyruvat | 1,0% |
| | | L-Glutamin | 1,0% |
| | | Kanamycine | 0,1% |

Lampiran 2. Hasil uji ELISA untuk mendeteksi antibodi.

| Mikroplat | McAb | Keberadaan antibodi |
|-----------|------|---------------------|
| 1 | B 10 | - |
| | D 4 | - |
| | F 5 | - |
| 2 | A 5 | - |
| | A 6 | - |
| | A 10 | - |
| | B 2 | + |
| 3 | A 10 | - |
| | C 6 | - |
| | D 7 | + |
| | E 1 | - |
| | E 3 | - |
| 4 | A 4 | - |
| | B 5 | - |
| | G 1 | - |
| 5 | A 3 | - |
| | A 5 | - |
| | B 7 | - |
| | B 11 | - |
| | F 6 | - |
| | F 9 | - |
| | G 9 | - |
| | H 11 | - |

Lampiran 3. Hibridoma hasil fusi antara sel mieloma dengan sel limpa (mikroplat 1).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | x | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | x | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | x | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

X = hibridoma (B10, D4, F5).

Lampiran 4. Hibridoma hasil fusi antara sel mieloma dengan sel limpa (mikroplat 2).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | x | x | | | | x | | |
| B | | x | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

X = hibridoma (A5, A6, A10, B2).

Lampiran 5. Hibridoma hasil fusi antara sel mieloma dengan sel limpa (mikroplat 3).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | x | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | x | | | | | | |
| D | | | | | | | x | | | | | |
| E | x | | x | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

X = hibridoma (A10, C6, D7, E1, E3).

Lampiran 6. Hibridoma hasil fusi antara sel mieloma dengan sel limpa (mikroplat 4).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | x | | | | | | | | |
| B | | | | | x | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | x | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

X = hibridoma (A4, B5, G1).

Lampiran 7. Hibridoma hasil fusi antara sel mieloma dengan sel limpa (mikroplat 5).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | x | | x | | | | | | | |
| B | | | | | | | x | | | | x | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | x | | | x | | | |
| G | | | | | | | | | x | | | |
| H | | | | | | | | | | | x | |

X = hibridoma (A3, A5, B7, B11, F6, F9, G9, H11).