



LAPORAN PENELITIAN  
DOSEN MUDA  
TAHUN ANGGARAN 1999/2000

KKC  
KK  
571.96  
Suw  
k

## KULTUR FIBROBLAS EMBRIO AYAM SEBAGAI FEEDER LAYER PERTUMBUHAN HIBRIDOMA MENCIT DALAM INKUBATOR TANPA KARBONDIOKSIDA



Peneliti :

Drh. SUWARNO, M.S.  
Drh. NANIK SIANITA, S.U.  
Drh. KUSNOTO



19/00  
10

### LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan  
DIP Nomor : 019 /XXIII/3/--/1999 Tanggal 1 Juni 1999  
Kontrak Nomor : 022/ P2 IPT/DPPM/99/DM/1999  
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud  
Nomor Urut : 02

3000 066013141

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Januari, 2000



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
LEMBAGA PENELITIAN

Jl. Mulyorejo Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246, Surabaya 60115

IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian	: Kultur Fibroblas Embrio Ayam sebagai <i>Feeder Layer</i> Pertumbuhan Sel Hibridoma Mencit dalam Inkubator Tanpa Karbondioksida
b. Macam Penelitian	: ( ) Fundamental, (✓) Terapan, ( ) Pengembangan
c. Kategori Penelitian	: ( ) I, (✓) II, ( ) III, ( ) IV.
2. Kepala Proyek Penelitian	
a. Nama Lengkap dengan Gelar	: Suwarno, MSi., drh.
b. Jenis Kelamin	: L/P
c. Pangkat/Golongan dan NIP	: Penata / IIIc / 131 836 994
d. Jabatan Fungsional	: Lektor Madya
e. Fakultas / Jurusan	: Kedokteran Hewan
f. Univ. / Inst. / Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu yang Diteliti	: Imunologi
3. Jumlah Tim Peneliti	: 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian	: Surabaya
5. Kerjasama dengan Instansi lain	
a. Nama Instansi	: -
b. Alamat	: -
6. Jangka Waktu Penelitian	: 6 (enam) bulan
7. Biaya yang Diperlukan	: 4.500.000,00 (Empat juta lima ratus ribu rupiah)
8. Seminar Hasil Penelitian	
a. Dilaksanakan Tanggal	: 22 Juli - 22 Desember 1999
b. Hasil Penelitian	: ( ) Baik Sekali (✓) Baik ( ) Sedang ( ) Kurang

Mengetahui  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga,

Dr. Ismudiono, M.S., Drh.

NIP. 130 687 297

Surabaya, 30 Januari 2000  
Ketua Peneliti,

*S. Warno*

Suwarno, MSi., drh.

NIP. 131 836 994

Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini

NIP. 130 355 372

## RINGKASAN

KULTUR FIBROBLAS EMBRIO AYAM SEBAGAI *FEEDER LAYER* PERTUMBUHAN SEL HIBRIDOMA MENCIT DALAM INKUBATOR TANPA KARBONDIOKSIDA (Suwarno, N. Sianita dan Kusnoto. 2000: 27 halaman).

Hibridoma yang merupakan hasil fusi antara limfosit B dan sel mieloma, saat ini banyak dikembangkan sebagai penghasil antibodi monoclonal. Hibridoma amat sensitif terhadap pH alkalis, karena sel ini memiliki toleransi pH antara 6,8-7,8. Dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub> dapat dipastikan tidak akan terjadi pertumbuhan hibridoma, mengingat kespesifikannya terhadap pH alkalis. Untuk mengatasi hal tersebut, penggunaan sel fibroblas embrio ayam (FEA) dapat dijadikan suatu alternatif. Hal ini mengingat beberapa kelebihan sel FEA, antara lain mudah ditumbuhkan dalam incubator tanpa CO<sub>2</sub>, cepat bermetabolisme untuk menghasilkan CO<sub>2</sub>, dapat menghasilkan *growth factor* dan mampu menjembatani kontak antar sel.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa sel FEA dapat berperan sebagai *feeder layer* di dalam memacu pertumbuhan hibridoma mencit dan dapat meningkatkan kemampuan hibridoma dalam menghasilkan antibodi, serta untuk mengetahui jumlah optimal sel FEA sebagai *feeder layer*.

Penelitian ini menggunakan hibridoma yang telah diskruining kemampuannya dalam menghasilkan antibodi terhadap virus Gumboro. Hibridoma dengan kepadatan  $1 \times 10^6$  sel/5 ml/ flask ditumbuhkan ke dalam flask-flask pada kelompok A (mengandung sel FEA  $2 \times 10^5$  sel/flask), B (sel FEA  $4 \times 10^5$  sel/flask), C (sel FEA  $6 \times 10^5$  sel/flask), D (sel FEA  $8 \times 10^5$  sel/flask), dan E (sel FEA  $10 \times 10^5$  sel/flask), masing-masing diulang sebanyak 10 kali. Variable yang diukur adalah kepadatan pertumbuhan hibridoma dan kemampuannya dalam menghasilkan

antibodi pada hari ke-2, 4, dan 6. Penghitungan kepadatan hibridoma menggunakan hemositometer dan kemampuan menghasilkan antibodi diuji dengan ELISA *indirect*. Rancangan penelitian adalah RAL pola *Split Plot*. Data dianalisis dengan General Linier Model dari SPSS rel 7.5 for Windows dan dilanjutkan dengan Tukey dengan tingkat kepercayaan 95%.

Hasil penelitian menunjukkan, adanya interaksi antara perlakuan dan waktu inkubasi. Hasil terbaik diperoleh pada kelompok A, B, dan C pada hari ke-6, yang secara nyata tidak menunjukkan adanya perbedaan. Penggunaan sel FEA dengan kepadatan  $4 \times 10^5$  sel/flask (Kelompok B) dapat mengoptimalkan pertumbuhan hibridoma, disbanding kepadatan di bawah atau di atas nilai tersebut. Kemampuan menghasilkan antibodi hanya diperoleh pada hibridoma pada kelompok B yang menunjukkan hasil positif lemah dengan nilai *optical density* (OD) antara 0,245-0,521, sedangkan perlakuan lainnya dengan hasil negatif.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan, bahwa sel FEA mampu berperan sebagai *feeder layer* dan dapat meningkatkan hibridoma dalam menghasilkan antibodi.

(Lembaga Penelitian, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kontrak Nomor : /P2IPT/DPPM/VI/1999).

## SUMMARY

CHICKEN EMBRYO FIBROBLAST CELL CULTURE AS AN FEEDER LAYER OF MOUSE HIBRYDOMAS CELL GROWTH IN INCUBATOR WITHOUT CARBON-DIOXYDE (Suwarno, N. Sianita, and Kusnoto. 2000: 27 pages).

Recently, monoclonal antibodies were developed as a result of fusion of hybridization between B cell lymphocyte and myeloma cell. Hybridomas are sensitive to alkalis perhaps of their pH range tolerances in 6.8-7.8. No any hybridomas growth was happened in the incubator without CO<sub>2</sub>, cause of its sensitivity towards alkalis conditions. To overcome this problems, an alternative way is to use chicken embryo fibroblast (CEF) cells. The advantage of CEF cells are easy to grow in incubator without CO<sub>2</sub>, fast metabolize to yield CO<sub>2</sub>, able to produce growth factor and act as complement interrelationship of the cells.

The aim of this study are to prove that CEF cells can be able act as feeder layer to stimulate growth of mouse hybridomas and to elevate the ability of hybridomas to in antibody production, and also to know the optimum members of CEF cells for feeder layer.

In this research we used hybridomas which had been screened for the ability of antibody production to Gumboro virus. Hybridomas with density  $1 \times 10^6$  cell/5ml/flask were ground in flask as member of group A (contain CEF cells  $2 \times 10^5$  cells/flask), group B (CEF cells  $4 \times 10^5$  cells/flask), group C (CEF cells  $6 \times 10^5$  cells/flask), group D (CEF cells  $8 \times 10^5$  cells/flask), and group E (CEF cells  $10 \times 10^5$  cells/flask), each of group were repeated 10 times. Variable measurement were done by measured the growth density of hybridomas and the ability of antibody production at day 2, 4, and 6. hybridomas density were calculated with haemocytometers and the capacity of antibody production was tasted by indirect ELISA. The experiment design used in

this work was Completely Randomized Design with Split Plot Design. The data was analysis with General Linear Model from SPSS rel 7.5 program for Windows and continued by Tukey Test with significant level 95%.

The results of this work showed that there was an interaction between treatment and incubation periods. The best result were found from group A, B, and C was at day-6 with no significant differences with density of CEF cells  $4 \times 10^5$  cells/flask (Group B) can optimized hybridomas growth, compared with lower/higher density level. Antibody production capacity was only obtained from hybridomas group B with slight positive value of optical density range 0.245-0.521, otherwise were negative.

We concluded that CEF cells can be a feeder layer and can elevate antibody production by hybridomas.

(Research Institution, Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University, Number of contract : /P2IPT/DPPM/VI/1999).

## KATA PENGANTAR

Hibridoma tidak dapat tumbuh dalam inkubator tanpa karbondioksida (CO<sub>2</sub>), oleh karena sel ini memerlukan kadar CO<sub>2</sub> 5-10 % yang dapat disuplai dari luar medium pertumbuhan (inkubator CO<sub>2</sub>). Persyaratan utama terhadap proses pertumbuhan hibridoma adalah pH medium pertumbuhan berkisar antara 7,2-7,6.

Penelitian ini berusaha untuk meningkatkan pertumbuhan hibridoma dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>, dengan bantuan kultur sel fibroblas embrio ayam (FEA) sebagai *feeder layer*. Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan informasi dalam upaya mengembangkan hibridoma penghasil antibodi monoklonal, pada laboratorium yang tidak memiliki inkubator CO<sub>2</sub>.

Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada Pimpinan Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan/DP3M Dikti Debdikbud, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dan semua pihak yang secara langsung ataupun tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesaikannya laporan ini.

Akhirnya semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan informasi yang berkaitan dengan teknik kultivasi hibridoma. Tentu penelitian ini masih banyak kekurangannya, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaannya.

Surabaya, Januari 2000

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
RINGKASAN .....	ii
SUMMARY .....	iv
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Penelitian .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Hipotesis .....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Hibridoma .....	4
2.2 Sel Fibroblas Embrio Ayam .....	5
<b>BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....</b>	<b>7</b>
3.1 Tujuan Penelitian .....	7
3.2 Manfaat Penelitian .....	7
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>8</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	8
4.2 Sel Fibroblas Embrio Ayam .....	8
4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	8
4.4 Sampel Penelitian .....	8
4.5 Unit Analisis .....	9



4.6 Variabel Penelitian .....	9
4.7 Metode Penelitian .....	9
4.7.1 Tahun pertama .....	9
4.7.1 Tahun kedua .....	10
4.8 Teknik Penghitungan Sel .....	11
4.9 Pengujian Antibodi dengan ELISA <i>indirect</i> .....	11
4.10 Analisis Data .....	12
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN .....	13
5.1 Hasil Penelitian .....	13
5.2 Pembahasan .....	16
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....	18
6.1 Kesimpulan .....	18
6.2 Saran .....	18
DAFTAR PUSTAKA .....	19
LAMPIRAN .....	21

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>		<b>Halaman</b>
5.1	Hasil Pertumbuhan Hibridoma pada Kultur Sel Fibroblas Embrio Ayam dengan Berbagai Kepadatan dalam Inkubator Tanpa CO <sub>2</sub> .....	13
5.2	Hasil Pertumbuhan Hibridoma pada Waktu Inkubasi yang Berbeda dalam Inkubator Tanpa CO <sub>2</sub> .....	14
5.3	Hasil Pertumbuhan Hibridoma pada Kultur Sel Fibroblas Embrio Ayam dengan Berbagai Kepadatan dan Waktu Inkubasi yang Berbeda dalam Inkubator Tanpa CO <sub>2</sub> .....	15

## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
5.1	Hubungan antara waktu inkubasi dengan jumlah sel hibridoma ( $\times 10^6$ ) pada berbagai perlakuan .....	15

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Analisis Statistik terhadap Jumlah Hibridoma terhadap Kepadatan Sel FEA dan Waktu Inkubasi yang Berbeda...	21

## BAB I PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Hibridoma yang merupakan hasil fusi antara limfosit B dan sel mieloma, saat ini banyak dikembangkan sebagai penghasil antibodi monoklonal. Hibridoma amat sensitif terhadap pH alkalis, karena sel ini memiliki toleransi pH antara 6,8-7,8. Dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub> dapat dipastikan tidak akan terjadi pertumbuhan hibridoma, mengingat kesensitifannya terhadap pH alkalis.

Pada awal pembentukan hibridoma, pasca fusi antara limfosit B dan sel mieloma, diperlukan kadar karbondioksida (CO<sub>2</sub>) yang cukup, baik yang berasal dari medium pertumbuhan (intern) atau yang berasal dari inkubator (ekstern). Suplementasi CO<sub>2</sub> diperlukan untuk mempertahankan pH medium, sehingga pH medium dapat bertahan pada kisaran 7,2-7,4 selama proses pertumbuhan. Tanpa suplementasi CO<sub>2</sub> secara ekstern, pH medium cepat menjadi basa dengan akibat tidak adanya pertumbuhan hibridoma. Hal ini merupakan kendala bagi laboratorium yang tidak memiliki inkubator CO<sub>2</sub> untuk dapat menghasilkan hibridoma, padahal saat ini hibridoma amat sangat dibutuhkan sebagai penghasil antibodi monoklonal.

Artama (1996) berpendapat, bahwa untuk pertumbuhan hibridoma diperlukan CO<sub>2</sub> dengan kadar 5 - 10% yang berasal dari inkubator CO<sub>2</sub>. Sementara secara intern sebagai sumber CO<sub>2</sub> dapat berasal dari NaHCO<sub>3</sub> dan atau Hepes (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-2- etanesulfonic acid)).

Pemakaian bikarbonat, Hepes dan CO<sub>2</sub> dalam proporsi yang sesuai dan osmolaritas yang ditolerir oleh kultur (290-300 mOsm) umumnya mendukung pertumbuhan sel secara optimal. Penambahan asam piruvat ke dalam medium akan merangsang sel untuk meningkatkan produksi *endogenous* CO<sub>2</sub>, sehingga bisa mengurangi ketergantungan sel akan *exogenous* CO<sub>2</sub>.

Sebagai solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut, penggunaan sel fibroblas embrio ayam (FEA) dapat dijadikan suatu alternatif. Hal ini mengingat beberapa kelebihan sel FEA, antara lain mudah ditumbuhkan dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>, cepat bermetabolisme untuk menghasilkan CO<sub>2</sub>, dapat menghasilkan *growth factor* dan mampu menjembatani kontak antar sel (Muslin, *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1995).

Berawal dari kegagalan pembentukan hibridoma dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>, Suwarno dkk.(1999) mencoba menggunakan kultur sel FEA sebagai wahana hibrid limfosit B dan sel mieloma mencit dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>. Hasil penelitian menunjukkan, bahwa kultur sel FEA mampu mempertahankan pH medium pada kisaran 7,35 - 7,64 dan dapat meningkatkan pertumbuhan hibridoma antara 28,53 - 54,17%.

Berdasarkan hasil tersebut, penelitian ini mencoba untuk menguji kecepatan pertumbuhan hibridoma dan kemampuannya di dalam menghasilkan antibodi. Penelitian ini sekaligus untuk menguji hipotesis, bahwa kultur sel FEA mampu berperan sebagai *feeder layer*, yakni menjembatani kontak antar sel hibridoma yang ditumbuhkan dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>.

## 1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah sel FEA dapat berperan sebagai *feeder layer* di dalam memacu pertumbuhan hibridoma mencit?
- 2) Apakah sel FEA dapat meningkatkan kemampuan hibridoma dalam menghasilkan antibodi?

## 1.3 Hipotesis

Dalam penelitian ini dapat diajukan hipotesis sebagai berikut :  
Kultur sel FEA mampu berperan sebagai *feeder layer* di dalam memacu pertumbuhan hibridoma mencit.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hibridoma

Hibridoma adalah hasil turunan limfosit B dan sel mieloma yang mampu menghasilkan antibodi monoklonal. Limfosit B normal memiliki enzim hipoksantin guanin fosforibosil transferase (HGPRT+) dan timidin kinase (TK+), serta mampu hidup dalam kultur selama kurang lebih sepuluh hari; sedangkan sel mieloma defek terhadap kedua enzim tersebut (HGPRT- dan TK-) dan mempunyai sifat immortal (dapat dibiakkan terus-menerus). Hibridoma memiliki sifat dari kedua induk, yakni mempunyai enzim HGPRT dan TK, serta bersifat immortal (Abbas *et al.*, 1991; Hamilton dan Davis, 1995).

Untuk menentukan keberhasilan fusi antara limfosit B dengan sel mieloma digunakan medium selektif HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin). Adanya aminopterin akan menghambat sintesis nukleotida dari fosforibosil pirofosfat melalui hambatan terhadap tetrahidrofolat pada jalur *de novo*, sehingga sel yang defek terhadap enzim HGPRT dan TK akan mati dalam medium selektif. Sel mieloma (HGPRT- dan TK-) akan mati dalam waktu 24 jam karena tidak mampu mengubah timidin menjadi timin dan hipoksantin menjadi guanin melalui jalur pintas. Limfosit B (HGPRT+, TK+) akan tetap hidup karena dapat menggunakan timidin dan hipoksantin untuk sintesis timin dan guanin dalam jalur pintas, namun jangka waktu hidup limfosit B hanya sekitar 7-10 hari. Karena hibridoma memiliki sifat dari kedua induknya (HGPRT+, TK+, immortal), maka



hibridoma akan tetap hidup dalam medium selektif dan dibiakkan terus-menerus (Harlow dan Lane, 1988; Artama, 1996; Roitt *et al.*, 1996).

## 2.2 Sel Fibroblas Embrio Ayam

Kultur primer sel FEA dibiakkan dengan jalan mengambil langsung dari embrio ayam yang berumur 8-10 hari. Jaringan embrio ayam didispersi menjadi sel dengan bantuan enzim proteolitik, seperti tripsin, kolagenase dan pronase, atau kombinasi enzim dengan *chelating agent*, seperti EDTA. Kultur sel FEA banyak digunakan karena mudah didapat, murah harganya dan mudah cara pembuatannya (Sardjono, 1998).

Kultur sel FEA pada awalnya merupakan media yang digunakan untuk isolasi dan identifikasi virus, serta untuk mempelajari histopatogenesis dari infeksi virus. Namun pada perkembangannya, kultur sel FEA banyak dimanfaatkan untuk produksi vaksin, penghasil produk biologik (sitokin) dan mengetahui aktivitas suatu enzim (Fresney, 1992; Belandia *et al.*, 1994; Sardjono, 1998).

Suwarno dkk.(1999) berhasil memfusikan limfosit B dan sel mieloma mencit dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>, dengan menggunakan kultur sel FEA sebagai wahana hibrid. Keberhasilan proses fusi terjadi karena pH pada medium kultur sehari setelah terbentuk monolayer dapat dipertahankan pada kisaran 7,64; sedangkan jumlah koloni sel hibrid yang terbentuk rata-rata sekitar 43,646%. Sementara Winarno (1999) dapat memanfaatkan supernatan dari kultur sel FEA yang diaktivasi berbagai jenis imunogen sebagai pelarut vaksin. Pada minggu pertama

pascavaksinasi dengan virus *Newcastle Disease* (ND) , titer antibodi yang terbentuk lebih tinggi dibanding menggunakan pelarut *phosphate buffer saline* (PBS).

Menurut Cheng *et al.* (1995) sel fibroblas dapat dibedakan dengan sel mioblas karena sifat adhesinya yang jauh lebih kuat. *Doubling time* untuk sel FEA lebih pendek dibanding sel mioblas. Medium kultur dengan pH 7,4 - 7,7 merupakan lingkungan yang paling ideal untuk pertumbuhan sel fibroblas.

### **BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1 Tujuan Penelitian**

- 1) Untuk membuktikan bahwa kultur sel FEA dapat berperan sebagai *feeder layer* di dalam memacu pertumbuhan hibridoma mencit.
- 2) Untuk membuktikan bahwa sel FEA dapat berperan meningkatkan kemampuan hibridoma dalam menghasilkan antibodi.
- 3) Untuk mengetahui jumlah optimal sel FEA yang dapat meningkatkan pertumbuhan hibridoma dan kemampuannya di dalam mendorong hibridoma menghasilkan antibodi.

#### **3.2 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat menyumbangkan ilmu pengetahuan bagi perkembangan kedokteran hewan pada umumnya dan bioteknologi pada khususnya, dalam mengembangkan hibridoma pada laboratorium yang tidak memiliki inkubator CO<sub>2</sub>. Selain itu juga diharapkan dapat memberi masukan dalam teknik pembuatan antibodi monoklonal yang dihasilkan oleh hibridoma yang telah berhasil ditumbuhkan dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>, dengan menggunakan sel FEA sebagai *feeder layer*.

## **BAB IV METODE PENELITIAN**

### **4.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan selama 5 bulan, mulai bulan Juli 1999 sampai Desember, 1999, bertempat di Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair.

### **4.2 Sel fibroblas embrio ayam**

Sebagai sumber sel fibroblas untuk pembuatan kultur sel primer adalah telur ayam berembrio (TAB) umur 10 hari.

### **4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *The Posttest Only Control Group Design* untuk pengujian terhadap sel hibrid. Rancangan yang digunakan pada penelitian ini Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola *Split Plot* (Steel dan Torrie, 1988).

### **4.4 Sampel Penelitian**

Penelitian ini menggunakan sampel berupa kultur sel fibroblas embrio ayam (FEA) dan hibridoma yang terdiri dari tiga (3) waktu pengamatan yang berbeda dan lima (5) perlakuan serta masing-masing perlakuan sebanyak 10 flask. Secara keseluruhan terdapat 3 x 5 x 10 ulangan.

#### 4.5 Unit Analisis

Penelitian ini menggunakan kultur sel FEA dan hibridoma. Koloni hibridoma yang tumbuh dalam setiap flask dan supernatannya merupakan unit analisis untuk pengukuran jumlah hibridoma dan keberadaan antibodi. Kepadatan hibridoma dihitung dalam satuan mililiter, sedangkan supernatan diuji terhadap adanya antibodi anti-Gumboro dengan uji ELISA *indirect* menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

#### 4.6 Variabel Penelitian

Sebagai variabel kendali dalam penelitian adalah umur dan sumber TAB. Sebagai variabel bebas adalah kultur sel FEA dan hibridoma. Sebagai variabel tergantung adalah jumlah hibridoma yang terbentuk dan nilai *optical density* (OD) dari kerapatan antibodi.

#### 4.7 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian terdahulu (Tahun I) yaitu sebagai berikut.

##### 4.7.1 Tahun pertama (*Sudah dilakukan*)

Pada tahap ini sudah dilakukan penelitian dengan judul "Kultur Fibroblas Embrio Ayam sebagai Wahana Hibrid Limfosit B dan Sel Mieloma Mencit dalam Inkubator tanpa Karbondioksida". Pada pene-

litian ini sudah dapat membuktikan hipotesis, bahwa kultur sel FEA dapat dimanfaatkan sebagai wahana hibrid antara limfosit B dan sel mieloma mencit dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>. Kultur sel hibrid sel yang terbentuk dan telah diuji kemampuannya di dalam menghasilkan antibodi, selanjutnya digunakan sebagai bahan pada penelitian tahap II. Kultur sel hibrid tersebut untuk sementara ini disimpan dalam medium pertumbuhan yang mengandung DMSO dan dibekukan pada suhu -176°C. Teknik pembentukan hibridoma mengacu pada Harlow dan Lane (1988) maupun Orlic dan Altaner (1988).

#### 4.7.2 Tahun kedua (Kultur hibridoma)

Hibridoma yang tumbuh dalam tahun pertama dan telah diskri-ning kemampuannya dalam menghasilkan antibodi dengan uji ELISA *indirect* (Harlow dan Lane, 1988), digunakan pada penelitian ini.

Hibridoma yang diperoleh pada tahun pertama, kemudian ditumbuhkan dalam medium pertumbuhan RPMI-1640 (mengandung HT 2%; FCS 10%; NaHCO<sub>3</sub> 24 mMol; Hepes 25 mMol dan Penstrep 100 µg/ml, pH 7,2). Hibridoma dengan kepadatan  $1 \times 10^6$  sel/5ml/flask ditumbuhkan ke dalam flask-flask pada kelompok A (mengandung sel FEA  $2 \times 10^5$  sel/flask), B (sel FEA  $4 \times 10^5$  sel/flask), C (sel FEA  $6 \times 10^5$  sel/flask), D (sel FEA  $8 \times 10^5$  sel/flask), E (sel FEA  $10 \times 10^5$  sel/flask). masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Flask yang digunakan dalam penelitian ini berukuran 25 cm<sup>3</sup>.

Variabel yang diukur adalah adanya kepadatan pertumbuhan hibridoma dan kemampuannya menghasilkan antibodi, pada hari ke-2, 4 dan 6.

#### 4.8 Teknik Penghitungan Sel

Sel FEA dan hibridoma dihitung pertumbuhannya dengan menggunakan hemositometer. Sel dihitung dalam satuan mililiter (Harlow dan Lane, 1988).

#### 4.9 Pengujian Antibodi dengan ELISA *Indirect*

Antigen Gumboro sebanyak 10 µg/ml diencerkan dengan *carbonat buffer* (50 mmol/l karbonat, pH 9,6) kemudian diadsorbsikan pada mikroplat ELISA sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Mikroplat kemudian diblok dengan *blocking buffer* (1 % BSA, 0,02 % NaN<sub>3</sub> dalam PBS) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci dengan *washing buffer* (0,15 M NaCl, 0,05 % Triton x-100, 0,02 % NaN<sub>3</sub>) sebanyak 3 kali. Supernatan yang diuji dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada 37° C selama 1 jam, setelah itu dicuci 3 kali dengan *washing buffer*, kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*rabbit anti-mouse Ig G* yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase) yang diencerkan dengan *blocking buffer* dengan pengenceran 1 : 1000 sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Berikutnya mikroplat

dicuci kembali dengan *washing buffer* untuk kemudian ditambahkan substrat (2,7 mmol/l 4-nitrofenil fosfat dalam 1 M dietanolamin, 0,5 M  $MgCl_2$ , 0,02 %  $NaN_3$ , pH 9,8) sebanyak 100  $\mu$ l/sumuran dan diinkubasi selama 10-30 menit dalam ruang gelap. Resapan kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm (Artama, 1996).

#### 4.10 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan General Linier Model dari program statistik komputer *SPSS rel. 7.5 for Windows*, dan dilanjutkan dengan uji Tukey dengan tingkat kepercayaan 95%.





## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil Penelitian

Tabel 5.1 menunjukkan hasil pertumbuhan hibridoma dengan menggunakan kultur sel fibroblas embrio ayam (FEA) pada berbagai kepadatan. Hibridoma dengan jumlah awal  $1 \times 10^6$  sel/5 ml/flask yang ditumbuhkan pada kultur sel FEA dengan kepadatan  $2 \times 10^5$  sel/flask (A),  $4 \times 10^5$  sel (B), sel FEA  $6 \times 10^5$  sel/flask (C),  $8 \times 10^5$  sel/flask (D), dan  $10 \times 10^5$  sel/flask (E). mampu tumbuh berturut-turut menjadi  $9,997 \times 10^6$  sel,  $11,137 \times 10^6$  sel,  $9,373 \times 10^6$  sel,  $6,680 \times 10^6$  sel dan  $6,077 \times 10^6$  sel. Kelompok B dengan kepadatan sel FEA  $4 \times 10^5$  sel menunjukkan hasil pertumbuhan hibridoma tertinggi, diikuti kelompok A, C, D, dan E.

Berdasarkan hasil perhitungan statistik dengan uji Tukey HSD (*honestly significant difference*) tampak bahwa kelompok B berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok A, C, D, dan E (Lampiran 1).

**Tabel 5.1 Hasil Pertumbuhan Hibridoma pada Kultur Sel Fibroblas Embrio Ayam dengan Berbagai Kepadatan dalam Inkubator Tanpa CO<sub>2</sub>**

Perlakuan	Jumlah sel hibridoma ( $\times 10^6$ )
A	$9,997 \pm 6,852$
B	$11,137 \pm 7,484$
C	$9,373 \pm 6,323$
D	$6,860 \pm 4,512$
E	$6,077 \pm 4,069$

Keterangan : A = sel FEA dengan kepadatan  $2 \times 10^5$  sel/flask, B =  $4 \times 10^5$  sel/flask, C =  $6 \times 10^5$  sel/flask, D =  $8 \times 10^5$  sel/flask, E =  $10 \times 10^5$  sel/flask.

Tabel 5.2 menyajikan pengaruh waktu inkubasi terhadap pertumbuhan hibridoma. Hibridoma dengan jumlah awal  $1 \times 10^6$  sel/flask, pada hari kedua menjadi  $2,438 \times 10^6$  sel/flask, hari keempat menjadi  $7,530 \times 10^6$  sel/flask, dan hari keenam menjadi  $15,990 \times 10^6$  sel/flask. Waktu inkubasi pada hari keenam menunjukkan hasil rata-rata tertinggi diikuti pada hari keempat dan kedua.

Secara statistik antar ketiga waktu inkubasi yang dianalisis dengan uji Tukey HSD menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) (Lampiran 2).

**Tabel 5.2 Hasil Pertumbuhan Hibridoma pada Waktu Inkubasi yang Berbeda dalam Inkubator Tanpa CO<sub>2</sub>**

Waktu Inkubasi (Hari)	Jumlah sel hibridoma ( $\times 10^6$ )
2	$2,438 \pm 0,538$
4	$7,530 \pm 2,079$
6	$15,990 \pm 4,225$

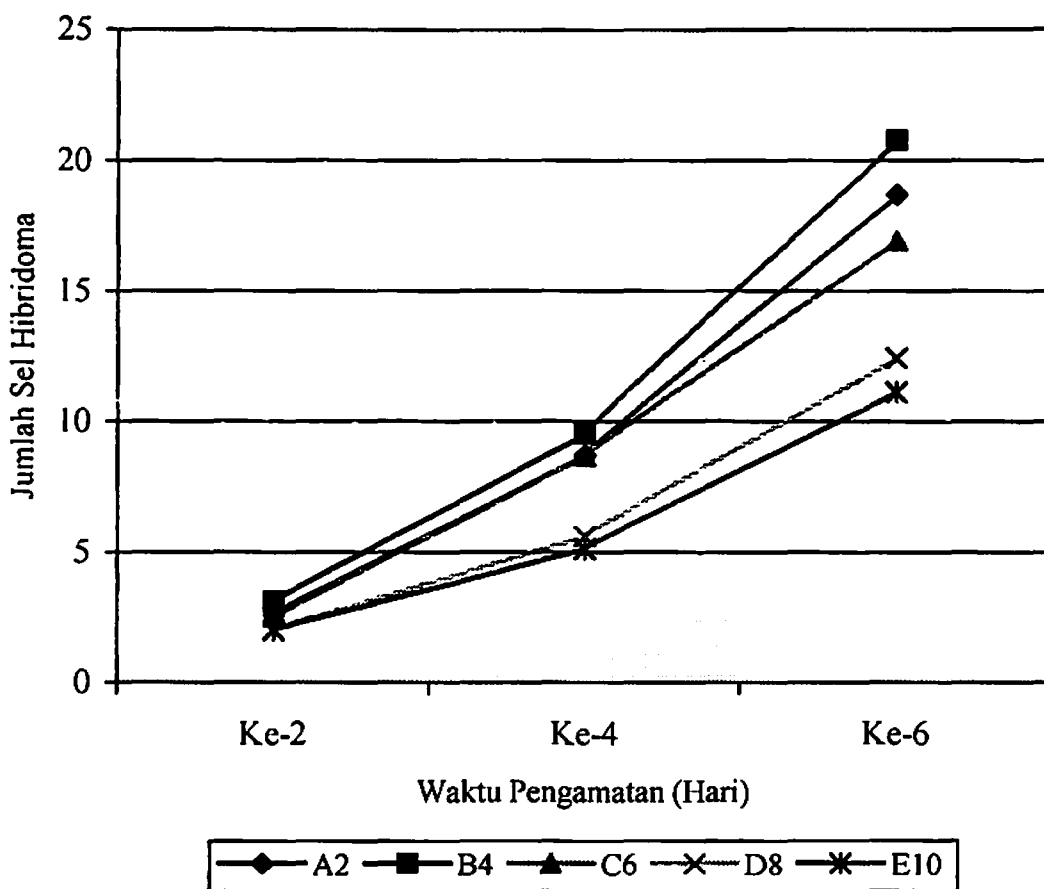
Hasil pengamatan pertumbuhan hibridoma akibat pengaruh interaksi antara kultur sel fibroblas embrio ayam dengan berbagai kepadatan dan waktu inkubasi yang berbeda dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub> dapat dilihat pada Tabel 5.3. Interaksi terbaik terlihat pada kelompok A, B dan C dengan waktu inkubasi pada hari ke-6, di mana di antara ketiga kelompok tidak terdapat perbedaan tetapi berbeda dengan kelompok lainnya.

Hubungan antara waktu inkubasi dengan jumlah sel hibridoma pada berbagai perlakuan disajikan dalam grafik, seperti yang terlihat pada Gambar 5.1.

**Tabel 5.3 Hasil Pertumbuhan Hibridoma pada Kultur Sel Fibroblas Embrio Ayam dengan Berbagai Kepadatan dan Waktu Inkubasi yang Berbeda dalam Inkubator Tanpa CO<sub>2</sub>**

Perlakuan	Ke-2	Ke-4	Ke-6
A	2.590 <sup>g</sup> ± 0.463	8.700 <sup>d</sup> ± 1.178	18.700 <sup>a</sup> ± 1.647
B	3.100 <sup>fg</sup> ± 0.377	9.540 <sup>cd</sup> ± 0.810	20.770 <sup>a</sup> ± 1.397
C	2.500 <sup>g</sup> ± 0.455	8.690 <sup>d</sup> ± 1.254	16.930 <sup>a</sup> ± 3.254
D	2.010 <sup>g</sup> ± 0.173	5.610 <sup>c</sup> ± 0.654	12.420 <sup>b</sup> ± 1.738
E	1.990 <sup>g</sup> ± 0.191	5.110 <sup>cf</sup> ± 1.172	11.130 <sup>bc</sup> ± 1.992

a-f superskrip berbeda pada semua baris dan kolom menunjukkan perbedaan sangat nyata ( $p < 0,05$ ).



**Gambar 5.1 Hubungan antara waktu inkubasi dengan jumlah sel hibridoma ( $\times 10^6$ ) pada berbagai perlakuan.**

Jika dilihat kemampuannya dalam menghasilkan antibodi berdasarkan nilai *optical density* (OD) dengan uji ELISA *indirect*, perlakuan B menunjukkan hasil positif lemah dengan nilai OD berkisar antara 0,245 - 0,521, sedangkan perlakuan lainnya dengan hasil negatif.

## 5.2 Pembahasan

Pada penelitian ini diketahui adanya interaksi antara perlakuan pada kelompok dan waktu inkubasi. Hal ini menunjukkan jumlah sel FEA dan waktu inkubasi berperan penting di dalam memacu pertumbuhan hibridoma. Suwarno dkk. (1999) menyatakan, bahwa kultur sel FEA mampu mempertahankan pH medium pertumbuhan, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai wahana hibrid antara limfosit B dan mieloma untuk menghasilkan hibridoma dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub>.

Penggunaan sel FEA dengan kepadatan  $4 \times 10^5$  sel/flask dapat mengoptimalkan pertumbuhan hibridoma dibanding kepadatan di bawah atau di atas nilai tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa pada kisaran kepadatan tersebut sel FEA dapat menghasilkan faktor penumbuh (*growth factor*) yang diduga berperan di dalam memacu pertumbuhan hibridoma dan dapat juga berfungsi sebagai penghubung kontak antar sel hibridoma. Menurut Hamilton dan Davis (1995) hibridoma akan mati atau tumbuh jelek jika ditumbuhkan dengan kepadatan rendah, oleh karena itu diperlukan suatu *feeder layer* yang dapat mendukung pertumbuhan hibridoma. Pada penelitian ini penggunaan sel FEA dengan kepadatan  $8 \times 10^5$  dan  $10 \times 10^5$  sel/flask justru dapat menekan pertumbuhan

hibridoma, karena pertumbuhannya jauh lebih cepat dibanding hibridoma. Umumnya *feeder layer* yang banyak digunakan pada pertumbuhan hibridoma adalah makrofag dan splenosit mencit; limfosit, endothel dan tinosit manusia; atau sel fibroblas manusia/mencit yang sebelumnya telah diradiasi. Radiasi pada sel fibroblas bertujuan untuk mencegah pertumbuhannya, sehingga yang diperlukan hanyalah *growth factor* yang dihasilkannya (Sjahrurrachman, 1995; Artama, 1996). Dalam penelitian ini penggunaan sel FEA tanpa dilakukan radiasi terlebih dahulu, karena yang dilihat adalah kemampuannya sebagai *feeder layer* dalam mempertahankan pH medium dan sebagai elemen kontak antar sel.

Jika dilihat kemampuan setiap kelompok perlakuan dalam menghasilkan antibodi tidaklah sama, karena kultur yang mampu menghasilkan antibodi hanyalah dari kelompok B, sedangkan kelompok A, C, D dan E dengan hasil negatif. Hal ini disebabkan hibridoma yang digunakan dalam penelitian ini belum dilakukan kloning, sehingga pertumbuhan hibridoma *producer* terdesak oleh pertumbuhan hibridoma *non producer* yang tidak menghasilkan antibodi.

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

- 1) Sel FEA dapat berperan sebagai *feeder layer* dalam memacu pertumbuhan hibridoma mencit. Jumlah optimal pertumbuhan hibridoma dapat dicapai pada hari ke-6 dengan kepadatan sel FEA masing-masing sebesar  $2 \times 10^5$  sel/flask,  $4 \times 10^5$  sel/flask, dan  $6 \times 10^5$  sel/flask.
- 2) Sel FEA dengan kepadatan  $4 \times 10^5$  sel/flask dapat meningkatkan kemampuan hibridoma dalam menghasilkan antibodi.

### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disarankan beberapa hal sebagai berikut.

- 1) Untuk menumbuhkan hibridoma mencit dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub> sebaiknya digunakan sel FEA dengan kepadatan  $2 \times 10^5$  sel/flask,  $4 \times 10^5$  sel/flask, dan  $6 \times 10^5$  sel/flask, agar diperoleh pertumbuhan hibridoma yang optimal.
- 2) Sel FEA dengan kepadatan  $4 \times 10^5$  sel/flask dapat digunakan sebagai *feeder layer* di dalam meningkatkan kemampuan hibridoma dalam menghasilkan antibodi.
- 3) Perlu penelitian lanjutan untuk melakukan kloning terhadap hibridoma sebelum diuji kemampuannya dalam menghasilkan antibodi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K , A.H. Lichtman, and J.S. Poter, 1991. Celluler and Molecular Immunology. WB Saunders Company, USA. pp. 13 - 33.
- Artama W.T. 1996. Antibodi Monoklonal. Theori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan. Pedoman Kuliah. Yogyakarta: PAU-Bioteknologi, UGM.
- Delandia, B., D. Brautigan, and J. Martin-Perez. 1994. Attenuation of ribosomal protein S6 phosphatase activity in chicken embryo fibroblasts transformed by Rous Sarcoma virus. *Mol and Cell Biology*. 14 (1): 200 - 206.
- Cheng, K.F., Her, W.Y., Liu, T.S., Chen, S.C., and K.M. Liu. 1995. Primary culture of mouse myoblasts. *Kaohsiung J Med Sci* 11: 306-314.
- Freshney, R.I. 1992. Culture of Manual Cells. Amanual of Basic Technique. 3rd Ed. Cancer Research Campaign, departement of Oncology, University of Glasgow, USA.
- Gupta, C.K., J. Sokhey, R.K. Gupta and H. Singh. 1991. Depeloment of Allogenic Hybridomas for production of monoclonal Antibodies Against Oral Polio vaccine Strains. *Vaccine*. 9: 853-854.
- Hamilton, M.J., and W.C. Davis. 1995. Culture cpnditions that optimize out growth of hybridomas. In : monoclonal Antibody Protocol. Vol 45. Human Press, Totawa, New Jersey.
- Harlow, E.N., and D. Lane. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory. USA.
- Macmichael, G.J. 1989. The Effect of pH and Oxygen on the growth, Monoclonal Antibody Production, and Metabolism of Mouse Hybridoma. *Biotechnology*, March: 10-12.
- Muslin, A.J., K.G. Peters and L.T. Williams. 1994. Direct Activation of Phospholipase C- $\zeta$  by Fibroblast Growth factor Receptor 15 not Required Mesoderm Induction in *Xenopus* Animal Caps. *Molecular and Celluler Biology*, May: 3006-3012.

- Orlic, O. and C. Altaner. 1988. Modification of Hybridoma Technology Which Improve the Yield of monoclonal Antibody Producing Cells. *J. immunol. Methods.* 115: 55-59.
- Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 1996. *Immunology.* 4th Ed. Mosby Year Book Europe Ltd.
- Sardjono, B. 1998. Teknik pembuatan biak sel primer dan sekunder. Lab. Mikrobiologi, FKH UGM. Yogyakarta.
- Sjachrurachman, A. 1995. Perkembangan Teknik Hibridoma. *Cermin Dunia Kedokteran.* 104: 52-56.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torric. 1988. *Principles and Procedures of Statistic. Biometrical Aproach.* Mc. Graw Hill Books. New York.
- Suwarno, R. Ernawati dan N. Sianita. 1999. Kultur fibroblas embrio ayam sebagai wahanan hibrid limfosit B dan sel mieloma mencit dalam inkubator tanpa karbondioksida. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Winarno, I.D. 1999. Pemanfaatan supernatan kultur sel fibroblas embrio ayam sebagai adjuvant vaksin ND. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.



**Lampiran 1 Analisis Statistik terhadap Jumlah Hibridoma terhadap Kepadatan Sel FEA dan Waktu Inkubasi yang Berbeda**

**General Linear Model**

**Descriptive Statistics**

	Waktu	Treat	Mean	Std. Deviation	N
Sel	Hari Ke-2	A2	2.590	.463	10
		B4	3.100	.377	10
		C6	2.500	.455	10
		D8	2.010	.173	10
		E10	1.990	.191	10
		Total	2.438	.538	50
	Hari Ke-4	A2	8.700	1.178	10
		B4	9.540	.810	10
		C6	8.690	1.254	10
		D8	5.610	.654	10
		E10	5.110	1.172	10
		Total	7.530	2.079	50
	Hari Ke-6	A2	18.700	1.647	10
		B4	20.770	1.397	10
		C6	16.930	3.254	10
		D8	12.420	1.738	10
		E10	11.130	1.992	10
		Total	15.990	4.225	50
	Total	A2	9.997	6.852	30
		B4	11.137	7.484	30
		C6	9.373	6.323	30
		D8	6.680	4.512	30
		E10	6.077	4.069	30
		Total	8.653	6.232	150

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Sel

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power <sup>1</sup>
Corrected Model	5531.817 <sup>2</sup>	14	395.130	209.567	.000	2933.936	1.000
Intercept	11230.296	1	11230.296	5956.266	.000	5956.266	1.000
HARI	4685.946	2	2342.973	1242.654	.000	2485.308	1.000
TREAT	570.694	4	142.674	75.670	.000	302.682	1.000
HARI * TREAT	275.177	8	34.397	18.243	.000	145.947	1.000
Error	254.537	135	1.885				
Total	17016.650	150					
Corrected Total	5786.354	149					

1. Computed using alpha = .05

2. R Squared = .956 (Adjusted R Squared = .951)

**Estimated Marginal Means****1. Waktu**

Dependent Variable: Sel

Waktu	Mean	Std. Error
Hari Ke-2	2.438	.194
Hari Ke-4	7.530	.194
Hari Ke-6	15.990	.194

**2. Treat**

Dependent Variable: Sel

Treat	Mean	Std. Error
A2	9.997	.251
B4	11.137	.251
C6	9.373	.251
D8	6.680	.251
E10	6.077	.251

Analyzed by SPSS rel 7.5 for Windows 95

## Post Hoc Tests

Waktu

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sel

Tukey HSD

(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Hari Ke-2	Hari Ke-4	-5.092*	.275	.000	-5.736	-4.448
	Hari Ke-6	-13.552*	.275	.000	-14.196	-12.908
Hari Ke-4	Hari Ke-2	5.092*	.275	.000	4.448	5.736
	Hari Ke-6	-8.460*	.275	.000	-9.104	-7.816
Hari Ke-6	Hari Ke-2	13.552*	.275	.000	12.908	14.196
	Hari Ke-4	8.460*	.275	.000	7.816	9.104

Based on observed means. The error term is Error.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.



Analyzed by SPSS rel 7.5 for Windows 95

Treat

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sel

Tukey HSD

(I) Treat	(J) Treat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A2	B4	-1.140*	.355	.011	-2.107	-.173
	C6	.623	.355	.398	-.344	1.590
	D8	3.317*	.355	.000	2.350	4.284
	E10	3.920*	.355	.000	2.953	4.887
B4	A2	1.140*	.355	.011	.173	2.107
	C6	1.763*	.355	.000	.796	2.730
	D8	4.457*	.355	.000	3.490	5.424
	E10	5.060*	.355	.000	4.093	6.027
C6	A2	-.623	.355	.398	-1.590	.344
	B4	-1.763*	.355	.000	-2.730	-.796
	D8	2.693*	.355	.000	1.726	3.660
	E10	3.297*	.355	.000	2.330	4.264
D8	A2	-3.317*	.355	.000	-4.284	-2.350
	B4	-4.457*	.355	.000	-5.424	-3.490
	C6	-2.693*	.355	.000	-3.660	-1.726
	E10	.603	.355	.433	-.364	1.570
E10	A2	-3.920*	.355	.000	-4.887	-2.953
	B4	-5.060*	.355	.000	-6.027	-4.093
	C6	-3.297*	.355	.000	-4.264	-2.330
	D8	-.603	.355	.433	-1.570	.364

Based on observed means. The error term is Error.

\* The mean difference is significant at the .05 level.

Analyzed by SPSS rel 7.5 for Windows 95

Post Hoc Tests, Analyzed by SPSS rel 7.5 for Windows 95  
 Multiple Comparisons  
 Dependent Variable: Sel  
 Tukey HSD

(I) Tukey	(J) Tukey	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
H2-A	H2-B	-.510	.614	1.000	-2.592	1.572
	H2-C	9.000E-02	.614	1.000	-1.992	2.172
	H2-D	.580	.614	1.000	-1.502	2.662
	H2-E	.600	.614	1.000	-1.482	2.682
	H4-A	-6.110(*)	.614	.000	-8.192	-4.028
	H4-B	-6.950(*)	.614	.000	-9.032	-4.868
	H4-C	-6.100(*)	.614	.000	-8.182	-4.018
	H4-D	-3.020(*)	.614	.000	-5.102	-.938
	H4-E	-2.520(*)	.614	.004	-4.602	-.438
	H6-A	-16.110(*)	.614	.000	-18.192	-14.028
	H6-B	-18.180(*)	.614	.000	-20.262	-16.098
	H6-C	-14.340(*)	.614	.000	-16.422	-12.258
	H6-D	-9.830(*)	.614	.000	-11.912	-7.748
	H6-E	-8.540(*)	.614	.000	-10.622	-6.458
H2-B	H2-C	.600	.614	1.000	-1.482	2.682
	H2-D	1.090	.614	.908	-.992	3.172
	H2-E	1.110	.614	.896	-.972	3.192
	H4-A	-5.600(*)	.614	.000	-7.682	-3.518
	H4-B	-6.440(*)	.614	.000	-8.522	-4.358
	H4-C	-5.590(*)	.614	.000	-7.672	-3.508
	H4-D	-2.510(*)	.614	.004	-4.592	-.428
	H4-E	-2.010	.614	.072	-4.092	7.248E-02
	H6-A	-15.600(*)	.614	.000	-17.682	-13.518
	H6-B	-17.670(*)	.614	.000	-19.752	-15.588
	H6-C	-13.830(*)	.614	.000	-15.912	-11.748
	H6-D	-9.320(*)	.614	.000	-11.402	-7.238
	H6-E	-8.030(*)	.614	.000	-10.112	-5.948
	H2-C	H2-D	.490	.614	1.000	-1.592
H2-E		.510	.614	1.000	-1.572	2.592
H4-A		-6.200(*)	.614	.000	-8.282	-4.118
H4-B		-7.040(*)	.614	.000	-9.122	-4.958
H4-C		-6.190(*)	.614	.000	-8.272	-4.108
H4-D		-3.110(*)	.614	.000	-5.192	-1.028
H4-E		-2.610(*)	.614	.002	-4.692	-.528
H6-A		-16.200(*)	.614	.000	-18.282	-14.118
H6-B		-18.270(*)	.614	.000	-20.352	-16.188
H6-C		-14.430(*)	.614	.000	-16.512	-12.348
H6-D		-9.920(*)	.614	.000	-12.002	-7.838
H6-E		-8.630(*)	.614	.000	-10.712	-6.548

(I) Tukey	(J) Tukey	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
H2-D	H2-E	2.000E-02	.614	1.000	-2.062	2.102
	H4-A	-6.690(*)	.614	.000	-8.772	-4.608
	H4-B	-7.530(*)	.614	.000	-9.612	-5.448
	H4-C	-6.680(*)	.614	.000	-8.762	-4.598
	H4-D	-3.600(*)	.614	.000	-5.682	-1.518
	H4-E	-3.100(*)	.614	.000	-5.182	-1.018
	H6-A	-16.690(*)	.614	.000	-18.772	-14.608
	H6-B	-18.760(*)	.614	.000	-20.842	-16.678
	H6-C	-14.920(*)	.614	.000	-17.002	-12.838
	H6-D	-10.410(*)	.614	.000	-12.492	-8.328
	H6-E	-9.120(*)	.614	.000	-11.202	-7.038
H2-E	H4-A	-6.710(*)	.614	.000	-8.792	-4.628
	H4-B	-7.550(*)	.614	.000	-9.632	-5.468
	H4-C	-6.700(*)	.614	.000	-8.782	-4.618
	H4-D	-3.620(*)	.614	.000	-5.702	-1.538
	H4-E	-3.120(*)	.614	.000	-5.202	-1.038
	H6-A	-16.710(*)	.614	.000	-18.792	-14.628
	H6-B	-18.780(*)	.614	.000	-20.862	-16.698
	H6-C	-14.940(*)	.614	.000	-17.022	-12.858
	H6-D	-10.430(*)	.614	.000	-12.512	-8.348
H4-A	H4-B	-.840	.614	.990	-2.922	1.242
	H4-C	1.000E-02	.614	1.000	-2.072	2.092
	H4-D	3.090(*)	.614	.000	1.008	5.172
	H4-E	3.590(*)	.614	.000	1.508	5.672
	H6-A	-10.000(*)	.614	.000	-12.082	-7.918
	H6-B	-12.070(*)	.614	.000	-14.152	-9.988
	H6-C	-8.230(*)	.614	.000	-10.312	-6.148
	H6-D	-3.720(*)	.614	.000	-5.802	-1.638
	H6-E	-2.430(*)	.614	.007	-4.512	-.348
H4-B	H4-C	.850	.614	.989	-1.232	2.932
	H4-D	3.930(*)	.614	.000	1.848	6.012
	H4-E	4.430(*)	.614	.000	2.348	6.512
	H6-A	-9.160(*)	.614	.000	-11.242	-7.078
	H6-B	-11.230(*)	.614	.000	-13.312	-9.148
	H6-C	-7.390(*)	.614	.000	-9.472	-5.308
	H6-D	-2.880(*)	.614	.000	-4.962	-.798
	H6-E	-1.590	.614	.377	-3.672	.492

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) Tukey	(J) Tukey				Lower Bound	Upper Bound
H4-C	H4-D	3.080(*)	.614	.000	.998	5.162
	H4-E	3.580(*)	.614	.000	1.498	5.662
	H6-A	-10.010(*)	.614	.000	-12.092	-7.928
	H6-B	-12.080(*)	.614	.000	-14.162	-9.998
	H6-C	-8.240(*)	.614	.000	-10.322	-6.158
	H6-D	-3.730(*)	.614	.000	-5.812	-1.648
	H6-E	-2.440(*)	.614	.006	-4.522	-.358
H4-D	H4-E	.500	.614	1.000	-1.582	2.582
	H6-A	-13.090(*)	.614	.000	-15.172	-11.008
	H6-B	-15.160(*)	.614	.000	-17.242	-13.078
	H6-C	-11.320(*)	.614	.000	-13.402	-9.238
	H6-D	-6.810(*)	.614	.000	-8.892	-4.728
	H6-E	-5.520(*)	.614	.000	-7.602	-3.438
H4-E	H6-A	-13.590(*)	.614	.000	-15.672	-11.508
	H6-B	-15.660(*)	.614	.000	-17.742	-13.578
	H6-C	-11.820(*)	.614	.000	-13.902	-9.738
	H6-D	-7.310(*)	.614	.000	-9.392	-5.228
	H6-E	-6.020(*)	.614	.000	-8.102	-3.938
H6-A	H6-B	-2.070	.614	.053	-4.152	1.248E-02
	H6-C	1.770	.614	.204	-.312	3.852
	H6-D	6.280(*)	.614	.000	4.198	8.362
	H6-E	7.570(*)	.614	.000	5.488	9.652
H6-B	H6-C	3.840(*)	.614	.000	1.758	5.922
	H6-D	8.350(*)	.614	.000	6.268	10.432
	H6-E	9.640(*)	.614	.000	7.558	11.722
H6-C	H6-D	4.510(*)	.614	.000	2.428	6.592
	H6-E	5.800(*)	.614	.000	3.718	7.882
H6-D	H6-E	1.290	.614	.735	-.792	3.372

\* The mean difference is significant at the .05 level.

1 NOV 2003

PAMERAN

LIBS NOM 3 2

MAJALAH