



SELESAI

LAPORAN
PENELITIAN MUDA

PAMERAN 01 MAR 2000

SKRINING SEL HIBRID CALON PENGHASIL
ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP
VIRUS SWOLLEN HEAD SYNDROME

Peneliti :

Budi Utomo
Rahayu Ernawati
Suwarno

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 314/XXIII/3/--/1998 Tanggal 31 Maret 1998
Kontrak Nomor : 071/P2 IPT/DPPM/LITMUD/V/1998
Ditbinlitabmas Ditjen Dikti Depdikbud
N

FAKULTAS
UNIVEI

I HEWAN
NGGA

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

3000 005993141

file
kka
571.964
Uto
s



LAPORAN PENELITIAN
PENELITI MUDA

SELESAI

PAMERAN

01 MAR 2000

SKRINING SEL HIBRID CALON PENGHASIL
ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP
VIRUS SWOLLEN HEAD SYNDROME

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Peneliti :

Budi Utomo
Rahayu Ernawati
Suwarno

3000 005 993141

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 314/XXIII/3/--/1998 Tanggal 31 Maret 1998
Kontrak Nomor : 071/P2 IPT/DPPM/LITMUD/V/1998
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud
Nomor Urut : 41

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Januari, 1999



3000 008 993141



LAPORAN KEGIATAN

**SKRINING SEL HIBRID CALON PENGHASIL ANTIBODI MONOKLONAL
TERHADAP VIRUS SWOLLEN HEAD SYNDROME**

Oleh

Budi Utomo, drh.

Rahayu Ernawati, MSc., drh.

Suwamo, MSi., drh.

Dibiayai Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor: /P2IPT/DPPM/Litmud/V/1998
Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan dan Kebudayaan

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
JANUARI 1999**



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	: Skrining Sel Hibrid Calon Penghasil Antibodi Monoklonal terhadap Virus Swollen Head Syndrome
b. Macam Penelitian	: () Fundamental, (✓) Terapan, () Pengembangan
c. Kategori Penelitian	: () I, (✓) II, () III, () IV.
2. Kepala Proyek Penelitian	
a. Nama Lengkap dengan Gelar	: Budi Utomo, drh.
b. Jenis Kelamin	: L/P
c. Pangkat/Golongan dan NIP	: Penata Tingkat I/ III d / 130 701 129
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	: 1 September - 30 Januari 1999
b. Hasil Penelitian	: () Baik Sekali (✓) Baik () Sedang () Kurang



Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga,

Chomo
Dr. Ismudiono, M.S., Drh.

NIP. 130 687 297

Surabaya, 30 Januari 1999
Ketua Peneliti,

Budi Utomo
Budi Utomo, drh.

NIP. 130 701 129



Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
Prof. Dr. Noor Cholies Zaini

NIP. 130 355 372

RINGKASAN

SKRINING SEL HIBRID CALON PENGHASIL ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP VIRUS SWOLLEN HEAD SYNDROME (Budi Utomo, R. Ernawati dan Suwarno. 1999 : 26 halaman).

Proses skrining terhadap sel hibrid hasil fusi antara sel B (asal limpa mencit yang diimunisasi dengan virus *Swollen Head Syndrome*) dengan sel mieloma sangat penting dilakukan untuk menjanging sel hibrid penghasil antibodi. Tahap skrining akan menentukan jumlah (persentase) sel hibrid yang terbentuk, dan dengan demikian akan dapat diketahui keberhasilan hasil fusi antara kedua jenis sel.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining terhadap sel hibrid dengan menggunakan uji ELISA *indirect*, dan untuk mengetahui kemampuan sel hibrid hasil skrining di dalam menghasilkan antibodi.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yakni imunisasi mencit, fusi antara sel B dan sel mieloma, serta skrining terhadap sel hibrid hasil fusi. Imunisasi dimaksudkan untuk menyiapkan sel B dalam keadaan teraktivasi sehingga memiliki responsifitas yang tinggi terhadap sel mieloma. Fusi sel dilakukan dengan bantuan polietilen glikol (PEG-6000). Skrining terhadap sel hibrid hasil fusi dilakukan dengan uji ELISA *indirect*, menggunakan konjugat *rabbit antimouse Ig G* yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase. Data disajikan dalam persentase.

Hasil penelitian menunjukkan, jumlah sel hibrid yang terbentuk sebesar 32,29 %, dan dari jumlah tersebut setelah melalui proses skrining 1 dan 2 hanya dihasilkan sel hibrid yang mampu menghasilkan antibodi masing-masing sebesar 37,42 % dan 55,17 %. Nilai *optical density* yang terdeteksi dari hasil skrining 1 dan 2 supernatan kultur sel hibrid terhadap adanya antibodi anti-SHS masing-masing berkisar antara 0,225-1,033 dan 0,228-1,421.

(Lembaga Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kontrak Nomor : /P2IPT/DPPM/Litmud/V/1998).

SUMMARY

SCRINING HYBRID CELL APPLICANT MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST SWOLLEN HEAD SYNDROME VIRUS (Budi Utomo, R. Ernawati and Suwarno. 1999. 26 pages).

Screening process about hybrid cell fusion product between B cell (from spleen of mice immunized by Swollen Head Syndrome virus) with myeloma cell very important to be done to get hybrid cell antibody producer. Scrinig stage will get quantity production hybrid cell, so that will get successfully fusion result two kind of the cell.

The aim of this study was to make screening about hybrid cell by using indirect ELISA test, and to know ability of hybrid cell product of screening in antibody productivity.

The study consist of several stage was mice immunization, fusion of B cell and myeloma cell, and screening about hybrid cell product of fusion. The mean of immunization was to prepare B cell in the activated situation so that having high responsively about myeloma cell. Helping a polyethylene glycol (PEG-6000) has done the fusion of cell. Testing with indirect ELISA, using rabbit anti-mouse Ig G conjugated that labeled with alkaline phosphatase enzyme has done screening about hybrid cell fusion product. The data showed in percentage.

The result showed that, quantity of hybrid cell production is 32.29 %, and from this quantity after 1st and 2nd screening process, only produced hybrid cell about 37.42 % and 55.17 %, that potential to product antibody. Optical density value can be detected from the result of evaluate after 1st and 2nd screening from supernatant hybrid cell culture about an antibody anti-SHS virus around 0.225-1.033 and 0.228-1.421.

(Research institution, Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University, Number of contract : /P2IPT/DPPM/Litmud/V/1998).

KATA PENGANTAR

Proses skrining terhadap sel hibrid hasil fusi antara limfosit B dan sel mieloma penting dilakukan untuk menjanging sel hibrid *producer* yang mampu menghasilkan antibodi. Proses ini dilakukan dengan menggunakan uji ELISA *Indirect*, sehingga diharapkan diperoleh klon-klon spesifik yang mampu menghasilkan antibodi, sebelum proses kloning dilakukan.

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 pembuatan antibodi monoklonal terhadap virus *Swollen Head Syndrome*. Tentu penelitian ini masih banyak kekurangannya, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaannya.

Surabaya, Januari 1999

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	ii
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Swollen Head Syndrome	4
2.2 Hibridoma	5
2.3 Sel Mieloma	5
2.4 Sel B	7
2.5 Tahap Pembuatan Antibodi Monoklonal	7
2.5.1 Imunisasi	7
2.5.2 Fusi sel	8
2.5.3 Seleksi	9
2.5.4 Skining	9
2.5.5 Kloning	10
2.5.6 Propagasi dan kultivasi sel hibridoma	10
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
3.1 Tujuan Penelitian	12

3.2 Manfaat Penelitian	12
BAB 4 METODE PENELITIAN	13
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
4.2 Bahan Penelitian	13
4.3 Peralatan Penelitian	13
4.4 Unit Analisis	14
4.5 Tahap Penelitian	14
4.6 Analisis Data	16
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	17
5.1 Hasil Penelitian	17
5.2 Pembahasan	19
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	23
6.1 Kesimpulan	23
6.2 Saran	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN	26

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Nilai <i>Optical Density</i> (OD) dari Serum Mencit yang Diimunisasi dengan Virus SHS secara Intrasplenik	17
5.2	Rataan Persentase Koloni Sel Hibrid yang Terbentuk antara Sel B dan Sel Mieloma.....	18
5.3	Rataan Persentase Koloni Sel Hibrid <i>Producer</i> Hasil Skrining dengan Uji ELISA <i>indirect</i> dan Kisaran Nilai OD terhadap Antibodi yang Dihasilkan	19

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Perhitungan <i>Nilai Cut off Value</i> (COV) Kontrol Negatif dan Kontrol Positif	26

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Penelitian

Swollen Head Syndrome (SHS) merupakan penyakit yang tergolong baru, karena pertama kali dilaporkan oleh Mortley dan Thomson tahun 1984 pada Broiler di Afrika Selatan. Pada awalnya virus *Corona* diduga sebagai penyebab, tetapi kemudian diakui sebagai virus *Pneumo* (Collins dan Gough, 1988). Spesifikasi dari virus ini adalah karena adanya hubungan antigenik dengan virus *Rhinotracheitis* pada kalkun (Chettle dan Wyeth, 1988).

Di Indonesia kasus ini dilaporkan pertama kali pada tahun 1992 terjadi di sekitar Bogor, Tangerang, Bekasi, Jakarta, dan Magelang. Selain menyerang broiler, virus ini juga dilaporkan kejadiannya pada layer (Jusa dkk., 1992; Guan dan Cua, 1993).

Problem yang saat ini muncul adalah bahwa penyakit sudah merambah hampir di seluruh wilayah Indonesia. Angka kematian dilaporkan mencapai 18,1 %; sedangkan produksi telur dapat menurun hingga 30 % (Ginting dkk., 1994). Sementara itu peneguhan diagnosis secara serologik sulit dilakukan, mengingat harus mendatangkan serum anti-SHS dari Perancis. Diagnosis secara patologik maupun histopatologik belum banyak membantu, karena adanya persamaan dengan penyakit Snot (Gaudry dan Gros, 1995).

Bertitik tolak dari latar belakang masalah tersebut, maka penelitian ini mencoba untuk memproduksi antibodi monoklonal sebagai sarana diagnosis yang sangat spesifik. Dengan melakukan fusi antara sel B yang

telah diaktivasi menggunakan virus SHS dengan sel mieloma, diharapkan dapat diperoleh klon-klon hibridoma yang secara spesifik mensintesis antibodi monoklonal (Sjahrurachman, 1995; Zola, 1995). Pada tahap awal ini baru akan dilakukan skrining terhadap sel hibrid hasil fusi dengan menguji kemampuan dalam menghasilkan antibodi secara *invitro* skrining dilakukan dengan uji *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-indirect*.

Proses skrining sangat penting dilakukan dengan maksud untuk menguji kemampuan sel hibrid yang tumbuh dalam menghasilkan antibodi. Berlangsungnya proses fusi antara sel B dan sel mieloma akan menghasilkan 2 jenis sel hibrid, yaitu sel hibrid *non-producer* dan sel hibrid *producer*. Sel hibrid *non-producer* karena memiliki kekurangan jumlah kromosom sebagai akibat segregasi secara acak dalam peleburan dua inti sel, sehingga gagal dalam menghasilkan antibodi. Sebaliknya, sel hibrid *producer* dan generasinya secara terus menerus dapat menghasilkan antibodi, karena memiliki gen yang berasal dari sel B dan sel mieloma. Sel hibrid *producer* apabila dilakukan kloning secara berulang akan dapat diperoleh klon-klon spesifik yang berasal dari satu sel sehingga dapat menghasilkan antibodi monoklonal yang sangat spesifik terhadap imunogen yang diinginkan (Abbas et al., 1991; Artama, 1991).

Dalam penelitian ini, fusi antara sel B dan sel mieloma dilakukan dengan bantuan polietilen glikol (PEG-6000). Sel B diperoleh dari limpa mencit yang sebelumnya telah diimunisasi dengan virus SHS secara intrasplenik, sedangkan sel mieloma yang digunakan berasal dari *strain*

X63-Ag8.653 yang tidak lagi mensekresi imunoglobulin (Ig). Setelah proses fusi berlangsung, sel hibrid yang terbentuk kemudian dibiakkan dalam mikroplat secara *invitro*. dengan menggunakan medium selektif hipoksantin, aminopterin dan timidin (medium HAT). Adanya antibodi dalam setiap sumuran dari mikroplat dapat dideteksi dengan melakukan skrining terhadap sel hibrid yang tumbuh dalam sumuran tersebut.

Dalam upaya penegakan diagnosis, baik untuk identifikasi virus maupun uji serologik, penggunaan antibodi monoklonal merupakan pilihan reagen dalam berbagai asai imunokimia, karena spesifisitas dan reproduibilitas yang lebih tinggi dibanding antibodi poliklonal. Antibodi monoklonal hanya akan bereaksi dengan epitop pada afinitas tunggal, oleh karena itu penggunaan dalam asai imunokimia harus mengacu pada imunogenitas dari imunogen yang digunakan.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah proses skrining dengan uji ELISA-*indirect* dapat menjangkit sel hibrid producer dari sel hibrid *non-producer* ?
- 2) Apakah sel hibrid producer hasil skrining bersifat stabil dalam menghasilkan antibodi?

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Swollen Head Syndrome

Swollen Head Syndrome (SHS) pertama kali dilaporkan oleh Morley dan Thomson tahun 1984 pada broiler terjadi di Afrika Selatan. Saat itu diyakini sebagai penyebab penyakit adalah kombinasi antara virus *Corona* dan *Eschericia coli*. O'Brien pada tahun 1985 menemukan kasus SHS di Inggris, tetapi hanya menemukan *E. coli* sebagai penyebabnya. Baru pada tahun 1986, Wyeth dkk. melaporkan kasus SHS di Perancis dan berhasil mengidentifikasi agen penyebab sebagai virus *Rhinotracheitis* pada kalkun. Collins dan Gough tahun 1988 memasukkan virus ini ke dalam genus virus *Pneumo* (Jusa dkk., 1992; Ginting dkk., 1994).

Urutan unggas yang peka terhadap virus ini adalah kalkun, ayam, burung kuaw dan belibis. Ayam yang terserang adalah dari jenis petelur, pedaging dan pembibit. Ayam petelur yang terserang di atas 14 minggu dan pada masa produksi dapat menurunkan produksi telur hingga 30 %. Ayam pedaging yang terserang rata-rata pada umur 4 minggu dan pada ayam pembibit dapat ditemukan pada umur 4, 30 atau 43 minggu. Morbiditas mencapai 5 %, tetapi mortalitas bervariasi dan ada yang melaporkan mencapai 60 %. Diagnosis terhadap SHS dapat dilakukan berdasarkan gejala klinis, autopsi dan histopatologik, uji imunofluoresensi, ELISA, netralisasi, imunoperoksidase, atau dengan cara isolasi virus pada kultur sel VERO (Jusa dkk., 1992; Ginting dkk., 1994; Gaudry dan Gros, 1995).

Juhasz dan Easton (1994) yang menganalisis gen protein *attachment* (G) mendapatkan adanya analogi antara virus *Pneumo* unggas dan mamalia. Berdasarkan urutan nukleotida dan asam amino diketahui adanya dua subgrup virus *Pneumo* unggas yang berbeda. Sementara Ling *et al.*(1995) yang menganalisis gen phosphoprotein (P) menunjukkan hubungan yang jauh antara virus *Pneumo* unggas dan mamalia.

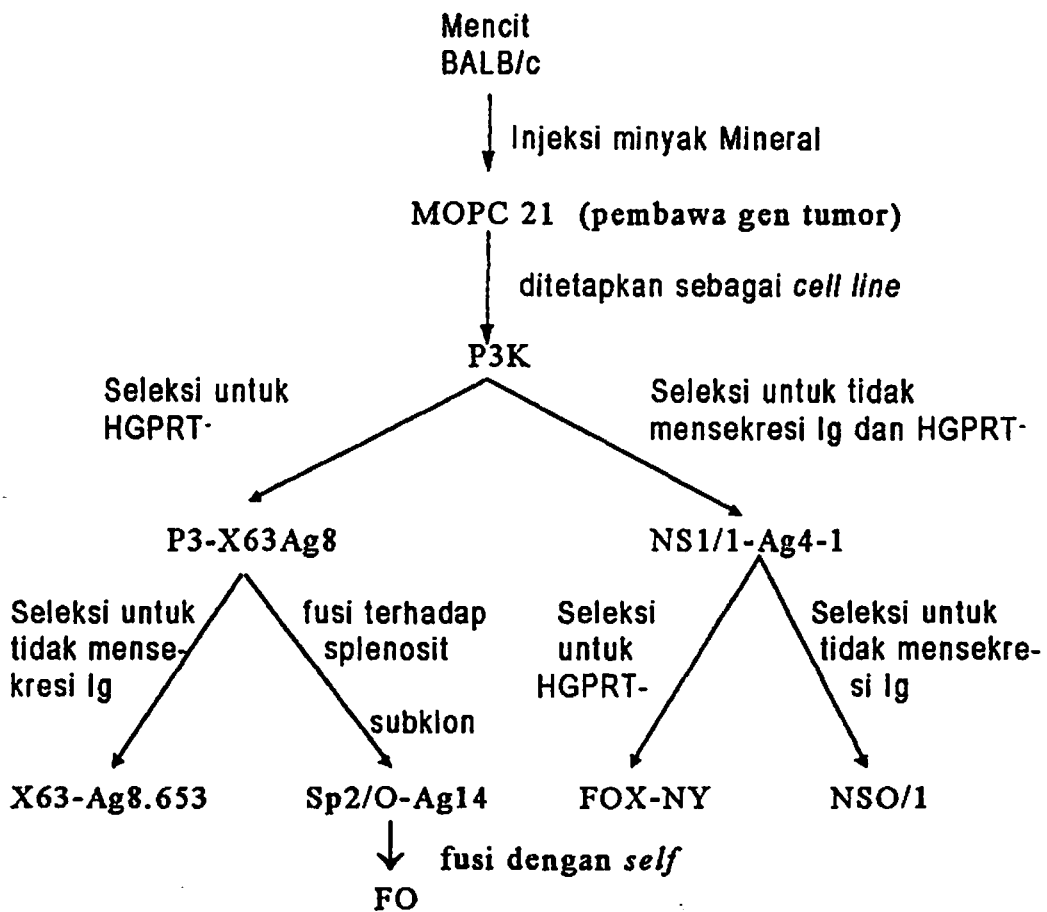
2.2 Hibridoma

Hibridoma merupakan turunan antara sel B dan sel mieloma yang terbentuk setelah melalui proses seleksi dengan menggunakan obat yang dapat memblokir sintesis nukleotida melalui jalur *de novo*. Keberhasilan teknologi hibridoma tergantung dari perkembangan sel mieloma yang dapat tumbuh dalam medium normal, tetapi tidak tumbuh dalam medium selektif HAT, karena sel ini defek terhadap enzim timidin kinase (TK) atau hipoksantin guanin fosforibosil transferase (HGPRT) yang diperlukan untuk sintesis nukleotida dalam medium selektif. Hibridoma mampu tumbuh dalam medium selektif HAT karena memiliki gen yang berasal dari sel B (HGPRT+, TK+) dan gen yang berasal dari sel mieloma (imortal) (Abbas *et al.*, 1991).

2.3 Sel Mieloma

Sel tumor yang disebabkan oleh adanya transformasi malignan sel pembentuk antibodi dinamakan plasmositoma atau mieloma. Sel mieloma yang digunakan sebagai pasangan fusi sel B adalah varian yang tidak

menghasilkan rantai berat ataupun rantai ringan imunoglobulin, tetapi sanggup membentuk antibodi jika difusikan dengan sel B. Kebanyakan sel mieloma yang digunakan untuk produksi hibridoma berasal dari keturunan *mineral oil plasmacytoma-21* (MOPC-21), yaitu sel mieloma asal mencit Balb/c yang mensekresi Ig G1 atau hanya rantai ringan kappa (Harlow dan Lane, 1988; Artama, 1991).



Gambar 2.1 Skema silsilah sel mieloma (Sumber : Harlow dan Lane, 1988).

2.4 Sel B

Sel B yang digunakan pasangan fusi sel mieloma biasanya diambil dari organ limfoid, seperti limpa, kelenjar getah bening, tetapi kadang-kadang dapat digunakan limfosit yang berasal dari darah tepi atau tali pusat. Tingkat pematangan sel B pada mencit dapat diketahui dengan menentukan ciri-ciri sel B sesuai stadium perkembangannya, yaitu ada tidaknya imunoglobulin (Ig) intrasitoplasmik, Ig permukaan dan reseptor permukaan lainnya. Setiap klon sel B mempunyai reseptor Ig pada permukaan sel yang sangat spesifik dan identik dengan Ig yang disintesis oleh sel progeninya. Karena semua reseptor Ig pada suatu klon sel B adalah identik dan berasal dari spesifisitas tunggal, maka suatu klon sel B dapat mengikat dan menanggapi epitop yang hanya ditujukan terhadap Ig reseptornya. Klon sel B dengan spesifisitas yang berbeda, ternyata dihasilkan secara acak dari sumsum tulang. Kespesifikan imunogen yang digunakan untuk mengaktivasi sel B merupakan faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan pembentukan hibridoma dalam menghasilkan antibodi yang diinginkan (Abbas *et al.*, 1991; Roitt *et al.*, 1996).

2.5 Tahap Pembuatan Antibodi Monoklonal

2.5.1 Imunisasi

Untuk dapat memperbanyak hasil fusi antara sel B dan sel mieloma, populasi jumlah sel B spesifik terhadap imunogen yang diinginkan harus ditingkatkan. Banyaknya populasi sel B spesifik sangat dipengaruhi oleh

proses imunisasi yang dilakukan, baik jalur aktivasinya maupun sifat dari imunogen yang diberikan. Imunisasi dapat dilakukan dengan teknik konvensional, yaitu dengan injeksi secara subkutan, intradermat atau intraperitoneal dengan interval waktu 2-3 minggu selama 2-3 bulan. Imunisasi dengan *single short Intrasplenic* dapat dilakukan hanya dalam waktu 3 hari dengan dosis imunogen amat kecil. Pada imunisasi *invitro* dilakukan dengan membiakkan sel limpa, kemudian diaktivasi dengan imunogen yang dikehendaki selama 5 hari (Spitz *et al.*, 1986; Orlic dan Altaner, 1988).

2.5.2 Fusi sel

Fusi sel antara sel B dan sel mieloma dapat dilakukan dengan bantuan virus *Sendai*, polietilen glikol (PEG), lisolesitin atau medan listrik. Frekuensi hasil fusi dipengaruhi oleh bermacam faktor, seperti jenis medium, perbandingan jumlah sel limpa dan sel mieloma, jenis sel mieloma yang digunakan dan jenis fusogen. Proses fusi diawali dengan fusi membran plasma sehingga menghasilkan sel besar dengan dua atau lebih inti yang berasal dari kedua induk sel yang berbeda jenis, disebut heterokarion. Sel ini tumbuh dan membelah diri sehingga terbentuk satu inti yang mengandung kromosom kedua induk, disebut sebagai sel hibrid (Goding, 1986; Harlow dan Lane, 1988).

2.5.2 Seleksi

Seleksi sel hibrid terjadi karena adanya penambahan medium selektif hipoksantin, aminopterin dan timidin (medium HAT). Aminopterin menghambat jalur *de novo* pada biosintesis purin dan pirimidin, sehingga memaksa sel menggunakan jalur pintas. Sel mieloma yang defek terhadap terhadap enzim timidin kinase (TK) atau hipoksantin guanin fosforibodil transferase (HGPRT) mati dalam medium selektif HAT, karena untuk sintesis nukleotida tidak dapat menggunakan jalur pintas. Sel B dalam medium selektif HAT hanya dapat hidup kurang lebih 2 minggu. Dengan demikian hanya sel hibrid yang dapat hidup dalam medium selektif HAT, karena memiliki enzim TK atau HGPRT yang berasal dari sel B dan mempunyai sifat imortal seperti sel mieloma (Abbas *et al.*, 1991).

2.5.4 Skrining

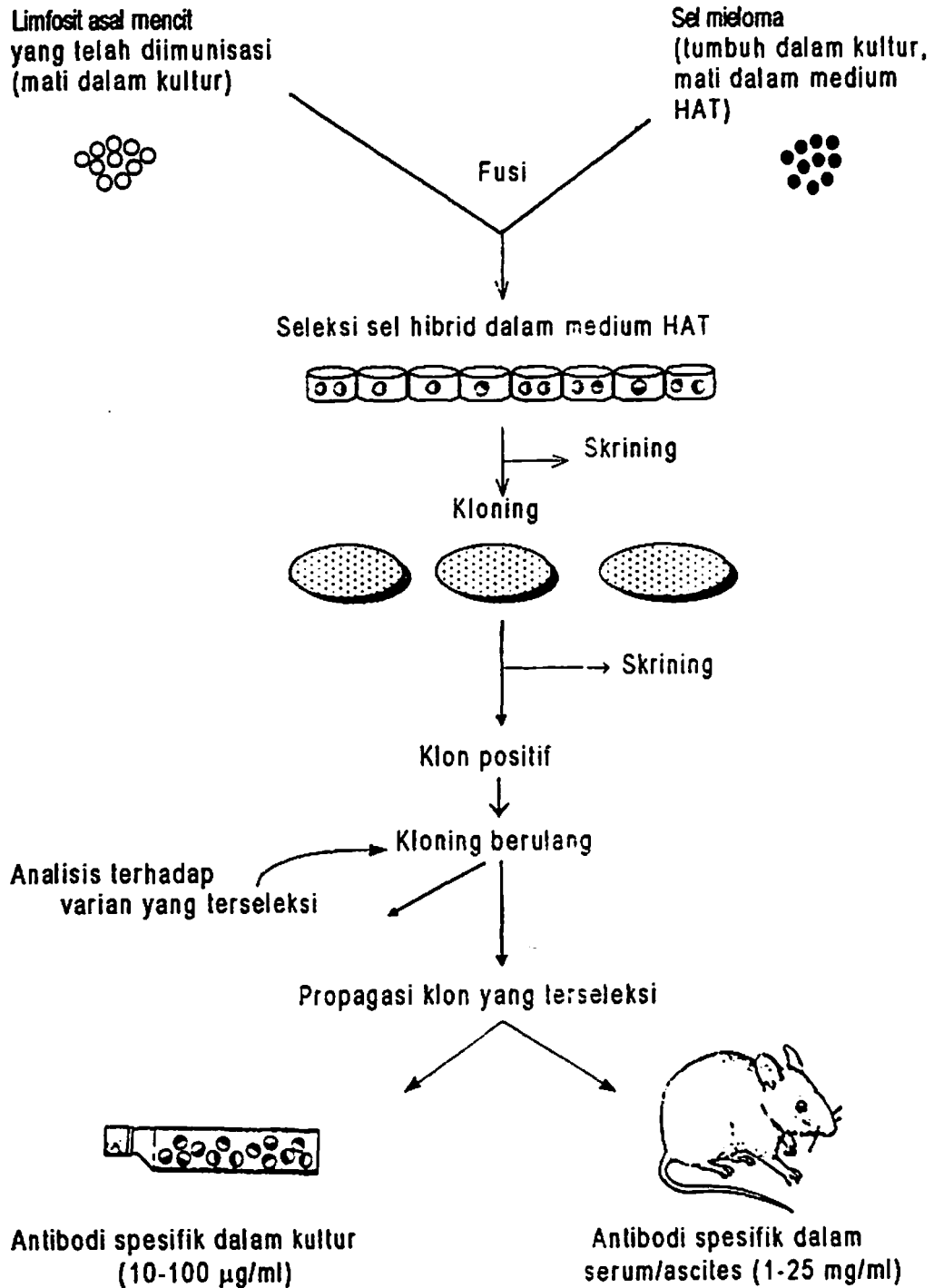
Sel hibrid yang tumbuh akan membentuk koloni sel. Koloni sel hibrid ini masih merupakan campuran antara sel hibrid *producer* dan sel hibrid *non-producer*, oleh karena itu perlu segera dilakukan skrining untuk menjaring sel hibrid *producer*. Sel hibrid *producer* mampu membentuk antibodi dengan kadar cukup tinggi 10 - 100 µg/ml, sehingga diperlukan uji serologik yang dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi. Uji yang sering digunakan untuk skrining sel hibrid adalah *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Radio Immuno Assay* (RIA) dan *plaque test* (Artama, 1991; Sjahrurachman, 1995).

2.5.5 Kloning

Kloning terhadap sel hibrid *producer* dimaksudkan untuk dapat membiakkan koloni sel hibridoma yang berasal dari satu sel, sehingga nantinya didapatkan suatu populasi sel yang homogen secara fenotif maupun genotif dan bersifat stabil dalam menghasilkan antibodi. Dengan melakukan kloning secara berulang, maka akan diperoleh klon sel hibridoma spesifik yang stabil dan mampu menghasilkan antibodi monoklonal yang berasal dari suatu subklas tertentu (Abbas *et al.*, 1991; Zola, 1995).

2.5.6 Propagasi dan kultivasi sel hibridoma

Setelah klon hibridoma yang diinginkan dapat diisolasi, maka produksi antibodi monoklonal dapat dilakukan dengan cara *invitro* maupun *invivo*. Secara *invitro* dilakukan dengan jalan membiakkan sel pada medium biakan dalam *flask* dan antibodi dapat dipanen dari supernatan. Kadar antibodi yang diperoleh pada umumnya mencapai kadar 10-100 µg/ml. Jika kultivasi sel hibridoma dilakukan secara *invivo*, dilakukan dengan jalan menyuntikkan sel tersebut ke dalam rongga peritoneal mencit Balb/c. Secara *invivo* kadar antibodi yang dihasilkan dari cairan ascites dapat mencapai 1-25 mg/ml (Goding, 1986; Artama, 1991).



Gambar 2.2 Skema pembentukan hibridoma yang mampu memproduksi antibodi monoklonal (Sumber : Artama, 1991).

BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN



3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan umum

Untuk menjajagi kemungkinan produksi antibodi monoklonal terhadap virus Swollen Head Syndrome (SHS) dalam upaya penegakan diagnosis penyakit secara virologik dan serologik.

3.1.2 Tujuan khusus

- 1) Untuk melakukan skrining terhadap sel hibrid hasil fusi antara sel B dan sel mieloma dengan uji ELISA indirect.
- 2) Untuk mengetahui kemampuan sel hibrid hasil skrining di dalam menghasilkan antibodi.

3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan sumbangan ilmiah bagi pengembangan dunia kedokteran hewan pada khususnya maupun ilmu pengetahuan pada umumnya, dalam pengembangan hibridoma sebagai produk penghasil antibodi monoklonal. Selain itu juga diharapkan dapat digunakan sebagai tolok ukur dalam produksi antibodi monoklonal yang berkaitan dengan proses produksi secara komersial.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 4 bulan dari bulan September 1998 sampai dengan Januari 1999, bertempat di Lab. Virologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

4.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan : sel mieloma X63.Ag8.653 dalam bentuk *cell lines*, virus SHS, splenosit asal limpa mencit Balb/c yang telah diimunisasi dengan virus SHS, mencit Balb/c sebagai sumber makrofag, kit ELISA, medium pertumbuhan (RPMI-1640 yang mengandung Penstrep 100 µg/ml, Amfoterisin B 2,5 ug/ml, FCS 10 %, NaHCO₃ 24 mmol/l, Hepes 25 mmol/l), medium selektif HAT (medium pertumbuhan yang mengandung HAT 2 %), medium HT (medium pertumbuhan dengan HT 2 %), NaOH 3 N, HCl 1 N, alkohol 70 %, kloroform.

4.3 Peralatan Penelitian

Peralatan untuk kultur sel, *laminar flow Hood*, *ELISA reader*, peralatan untuk ELISA, peralatan untuk pengambilan darah dan serum.

4.4 Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah supernatan yang berasal dari sumuran mikroplat yang di dalamnya terdapat pertumbuhan koloni sel hibrid. Supernatan diuji terhadap adanya antibodi terhadap virus SHS dengan Uji ELISA *Indirect*, menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

4.5 Tahap Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 3 tahap, yaitu sebagai berikut. Tahap 1 digunakan untuk imunisasi mencit. Lima ekor mencit betina strain Balb/c betina umur 6 minggu diimunisasi dengan virus SHS sebanyak 20 µg/ekor. Imunisasi dilakukan secara intrasplenik dengan melakukan pembedahan pada daerah abdomen sebelah kiri, kemudian dilakukan penutupan jaringan kembali. Tiga hari pasca imunisasi, dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan serum anti-SHS dengan uji ELISA *indirect*. Mencit yang menunjukkan nilai *optical density* (OD) tertinggi, selanjutnya dibunuh untuk diambil limpanya guna preparasi splenosit (Spitz et al., 1984; Spitz, 1986).

Tahap 2 digunakan untuk fusi sel. Fusi sel antara sel B asal limpa dengan sel mieloma X63.Ag8.653 dengan teknik yang dimodifikasi dari Orlic dan Altaner (1988). Fusi sel dilakukan dengan perbandingan 1 : 1 (5×10^7 splenosit dengan 5×10^7 mieloma), selanjutnya dikultur dalam mikroplat yang telah diisi dengan medium selektif HAT. Sehari sebelum fusi dilakukan, dibiakkan terlebih dulu sel pendukung (*feeder layer*) yang berasal

dari sel-sel peritoneal mencit normal dalam medium selektif HAT, sebanyak 5 mikroplat-96 sumuran dan tiap sumuran mengandung 10^4 sel peritoneal per 50 μ l medium. Sel hasil fusi kemudian didistribusikan ke dalam setiap sumuran sebanyak 10^5 sel fusi/100 μ l medium. Mikroplat selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan kadar CO_2 5 % pada suhu 37°C . Pada hari ketiga dilakukan penggantian medium segar. Penggantian medium dilakukan setiap medium dalam sumuran tampak kuning sampai pertumbuhan sel hibrid terlihat konfluen. Sel hibrid yang pertumbuhannya tampak konfluen pada hari ke-8 sampai ke-11, supernatannya dapat diuji terhadap antibodi yang dihasilkan. Sel hibrid yang tumbuh lambat dapat diuji pada hari ke-14 sampai ke-18 (Godling, 1986; Hariow dan Lane, 1988).

Tahap 3 digunakan untuk skrining terhadap sel hibrid yang tumbuh dalam tiap sumuran mikroplat. Sel hibrid yang tampak konfluen, supernatannya diuji terhadap antigen SHS dengan uji ELISA indirect. Antigen SHS sebanyak 10 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan dengan bufer karbonat (50 mmol/l karbonat, pH 9,6) kemudian diadsorbsikan pada mikroplat ELISA sebanyak 100 $\mu\text{l/sumuran}$ dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Mikroplat kemudian diblok dengan bufer blocking (1 % BSA, 0.02 % NaN_3 dalam PBS) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci dengan bufer pencuci (0,15 M NaCl, 0,05 % Triton x-100, 0,02 % NaN_3) 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 bufer pencuci, kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*rabbit anti-mouse*

Ig G yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase) yang diencerkan dengan *bufer blocking* dengan pengenceran 1 : 1000 sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37° C. Berikutnya mikroplat dicuci kembali dengan bufer pencuci untuk kemudian ditambahkan substrat (2,7 mmol/l 4-nitrofenil fosfat dalam 1 M dietanolamin, 0,5 M MgCl₂, 0,02 % NaN₃, pH 9,8) sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi selama 10-30 menit dalam ruang gelap. Resapan kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm (Artama, 1991).

4.6 Analisis Data

Data yang terkumpul, kemudian diolah dalam bentuk persentase. Pemeriksaan antibodi didasarkan pada *Cut off Value* (COV) kontrol negatif maupun kontrol positif.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Hasil imunisasi intrasplenik dari kelima ekor mencit berdasarkan pemeriksaan antibodi terhadap virus SHS, dapat dilihat pada Tabel 5.1. Nilai *cuf off value* (COV) dari kontrol negatif diperoleh sebesar 0,148; sedangkan COV kontrol positif adalah 0,248. Dengan demikian antibodi dikatakan positif apabila menunjukkan nilai sama dengan atau lebih besar dari kontrol positif (Lampiran 1).

Tabel 5.1 Nilai *Optical Denslty* (OD) dari Serum Mencit yang Diimunisasi dengan Virus SHS secara Intrasplenik

No. mencit	Nilai OD ₄₀₅ *
1	0,257
2	0,356
3	0,236
4	0,372
5	0,421
Kontrol -	0,148
Kontrol +	0,248
Kontrol media	0,008

Keterangan :

*) Serum mencit sebelum diperiksa diencerkan 1 : 10

Mencit yang menunjukkan nilai OD tertinggi selanjutnya dibunuh dan diambil limpanya sebagai sumber sel B untuk difusikan dengan sel mieloma. Hasil fusi antara kedua jenis sel dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Rataan Persentase Koloni Sel Hibrid yang Terbentuk antara Sel B dan Sel mieloma

No. plate	Jumlah sumuran	Sumuran dengan Koloni Sel Hibrid	
		Jumlah	%
1	96	23	23,96
2	96	35	36,46
3	96	30	31,25
4	96	39	40,63
5	96	28	29,17
Jumlah	480	155	32,29

Tabel 5.2 menunjukkan rataan koloni sel hibrid yang terbentuk antara sel B dan sel mieloma. Jumlah koloni yang tumbuh dari masing-masing mikroplat berkisar 32,29 %.

Setelah dilakukan skrining dengan uji ELISA *indirect* terhadap sel hibrid yang terbentuk, ternyata tidak semua sel hibrid mampu menghasilkan antibodi. Tabel 5.3 menunjukkan bahwa koloni sel hibrid *producer* (yang mampu menghasilkan antibodi) hanya berkisar 37,42 %. Sementara itu pada proses skrining kedua dari jumlah tersebut, ternyata didapatkan koloni sel hibrid *producer* sebesar 55,17 %.

Tabel 5.3 Rataan Persentase Koloni Sel Hibrid *Producer* Hasil Skrining dengan Uji ELISA *Indirect* dan Kisaran Nilai OD terhadap Antibodi yang Dihasilkan

No. plate	Koloni sel hibrid awal	Skrining 1		Skrining 2	
		jml %	Kisaran OD	jml %	Kisaran OD
1	23	34,78	0,225-0,987	75,00	0,453-1,103
2	35	45,71	0,310-0,827	50,00	0,339-1,421
3	30	36,67	0,243-0,794	63,64	0,228-1,133
4	39	33,33	0,337-1,003	46,15	0,275-0,877
5	28	35,71	0,372-1,033	50,00	0,248-0,946
Jumlah	155	37,42	0,225-1,033	55,17	0,228-1,421

5.2 Pembahasan

Penelitian ini dilakukan dalam upaya langkah awal untuk mengembangkan teknologi hibridoma yang mampu menghasilkan antibodi monoklonal terhadap virus SHS. Pada tahap awal ini hanya membahas proses skrining terhadap sel hibrid hasil fusi antara sel B (asal limpa dari mencit yang diimunisasi dengan virus SHS) dengan sel mieloma.

Virus SHS yang diinjeksikan secara intrasplenik pada mencit Balb/c, ternyata dapat menggertak sistem imun untuk menghasilkan antibodi dalam waktu relatif cepat, yakni 4 hari. Timbulnya respon imun pada mencit ini menunjukkan adanya kecocokan reseptor antara virus SHS dengan sel-sel imun mencit dan ketepatan dosis yang diberikan. Hal ini berarti, sel B yang ada dalam kelompok splenosit setelah mengalami aktivasi akan berproliferasi dan berdeferensiasi menjadi sel plasma yang siap menghasilkan antibodi.

Proses imunisasi yang dilakukan secara intrasplenik dapat dikatakan memperpendek waktu untuk mengaktivasi sel B, bila dibandingkan dengan teknik imunisasi melalui darah, subkutan atau peritoneal. Hal ini disebabkan imunogen yang diberikan langsung mengenai target organ sasaran, sehingga mempermudah pemrosesan imunogen oleh sel-sel imun dalam limpa (Spitz *et al.*, 1984; Spitz, 1986).

Jika imunogen disuntikkan ke dalam darah, sebagian besar akan dibuang secara alami, sedangkan melalui kulit atau peritoneal akan tersaring kelenjar getah bening regional, makrofag dan sel retikuler. Dengan demikian hanya sebagian kecil imunogen yang terlibat respon imun. Pada pembentukan hibridoma yang diperlukan adalah sel B pada limpa, oleh karena itu untuk mencegah eliminasi imunogen oleh bagian lain dari tubuh dilakukan suntikan imunisasi langsung pada limpa. Menurut Sjahrurachman (1995), ada dua keuntungan jika imunisasi dilakukan secara intrasplenik, yaitu dapat menghemat pemakaian imunogen dan mempercepat pengaktifan sel B.

Bila dicermati lebih lanjut, ternyata pada proses fusi tidak semua sel dapat difusikan sesuai dengan harappam, yaitu fusi antara satu sel B dengan satu sel mieloma. Secara acak akan terjadi fusi dengan berbagai kemungkinan, yaitu mieloma dengan mieloma, limfosit dengan limfosit, limfosit dengan mieloma dan fusi antara berbagai sel, serta sebagian besar tetap berada dalam keadaan tidak terfusi. Hasil fusi ternyata juga sangat bervariasi, tergantung kesiapan sel B dan sel mieloma yang difusikan.

Beberapa peneliti menganjurkan, untuk dapat meningkatkan hasil fusi diperlukan teknik tertentu, seperti penambahan dimetilsulfoksid (DMSO) bersama dengan PEG, penggunaan medan listrik atau perlakuan perfusi dengan menggunakan PEG dosis rendah (Orlic dan Altaner, 1988; Waldman dan Colbold, 1993; Suwarno, 1996).

Setelah melalui proses skrining dengan uji ELISA *indirect*, terlihat bahwa sel hibrid yang terbentuk masih merupakan campuran antara sel hibrid *producer* dan sel hibrid *non-producer*. Sel hibrid *non-producer* memiliki kecenderungan untuk tumbuh lebih cepat daripada sel hibrid *producer*. Hal ini terlihat pada proses skrining yang kedua, ternyata koloni sel hibrid yang semula dapat menghasilkan antibodi berubah menjadi negatif, karena pertumbuhannya terdesak oleh sel hibrid *non-producer*. Artama (1991) menyatakan, koloni sel hibrid *non-producer* jumlahnya mencapai 50-100 kali lebih banyak dari sel hibrid *producer*. Hal ini dapat disebabkan dari jumlah splenosit (minimal 1×10^9 sel), yang merupakan sel B kurang lebih sekitar 7×10^6 sel dan dari jumlah tersebut hanya 10^2 - 10^4 sel B yang spesifik terhadap imunogen yang dimaksud. Oleh karena itu, agar tidak kehilangan sel hibrid *producer*, jika jumlah sel hibrid yang tumbuh sudah melebihi 10^3 sel/sumuran, perlu segera dilakukan kloning untuk menghindari hilangnya koloni sel hibrid *producer*.

Dalam melakukan proses skrining penggunaan uji serologik yang dipilih juga merupakan faktor penentu. Hal ini disebabkan antibodi yang disekresi oleh sel hibrid *producer* hanya berkisar antara 10-100 $\mu\text{g/ml}$, di

mana jumlah ini dihasilkan oleh sekitar 500 - 600 sel hibrid *producer* dalam tiap sumuran mikroplat (Sjahrurachman, 1995; Zola, 1995).

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasar hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut.

- 1) Proses skrining pertama menghasilkan sel hibrid *producer* sebesar 37,42 %, sedangkan dari jumlah tersebut setelah dilakukan skrining kedua hanya menghasilkan 55,17 % yang mampu memproduksi antibodi spesifik.
- 2) Sel hibrid *producer* hasil skrining sifatnya masih belum stabil dalam menghasilkan antibodi.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disarankan beberapa hal, sebagai berikut.

- 1) Untuk mencegah hilangnya klon hibrid yang mampu menghasilkan antibodi perlu segera dilakukan kloning setelah proses skrining berlangsung.
- 2) Perlu penelitian lanjutan untuk melakukan kloning berulang, sehingga nantinya dapat dihasilkan klon-klon hibridoma spesifik yang mampu menghasilkan antiobodi monoklonal.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K , A.H. Lichtman, J.S. Poter, 1991. *Celluler and Molecular Immunology*. USA: WB Saunders Company, pp. 13 - 33.
- Artama W.T. 1991. *Antibodi Monoklonal. Theori, Produksi, Kha-rakterisasi dan Penerapan. Pedoman Kuliah*. Yogyakarta: PAU-Bioteknologi, UGM.
- Chettle, N.J., and T.J. Wyeth. 1988. Turkey Rhinotracheitis detection of antibodies using an ELISA test. *British Vet. J.* 114: 282.
- Collins, M.S., and R.E. Gough. 1988. Characterization of a virus associated with turkey Rhinotracheitis. *J. Gen. Virology*. 69: 909-916.
- Gaudry, D., and F.X. Gross. 1995. Up to date on the Swollen Head Syndrome. D.G./MCG. Rhone Merieux, France. Pp. 1-12.
- Ginting, N., H. Hamid dan Hermawan. 1994. Swollen Head Syndrome pada broiler, layer dan broiler breeder di Indonesia (Laporan Kasus). *Penyakit Hewan*. 26: 53-56.
- Goding, J.W. 1986. *Monoclonal Antibodies. Principles and Practice*. 2nd Ed. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Guan, L.T., and A. Cua. 1993. Avian diseases in the Asia Fasific Region. *Poult. Int.* December, 42-46.
- Harlow, E.N., and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. USA.
- Juhasz, K., and A.J. Easton. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gen of Avian pneumovirus. *J. Gen. Virol.* 75: 2873-2880.
- Jusa, E.R., R.D. Sujudono, C.S. Leksmono, M.A.R. Noor, S.B. Siregar, and M. Partadiredja. 1992. Serological investigation on Swollen Head Syndrome in Indonesia. Case report. Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agriculture Institute. pp. 1-9.

- Ling, R., P.J. Davies, Q. Yu, C.M. Wood, C.R. Priingle, D. Cavanagh, and A.J. Easton. 1995. Sequence and invitro expression of the phophoprotein gen of Avian pneumovirus. *Virus Res.* 36: 247-257.
- 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.
- Sjachrurachman, A. 1995. Perkembangan Teknik Hibridoma. *Cermin Dunia Kedokteran.* 104: 52-56.
- Spitz, M., L. Spitz, R. Thorpe, and E. Eugui. 1984. Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Method.* 170: 139-143.
- Spitz, M. 1986. "Single shot" immunization for the production of monoclonal antibodies. In: *Methods in Enzymology.* Vol 121. Academic Press, Orlando. p. 33 - 41.
- Suwarno. 1996. Perbedaan sel B asal limpa dan kelenjar getah bening sebagai pasangan fusi sel mieloma dalam pembentukan hibridoma. Thesis. Program Pascasarjana Unair.
- Waldman, H, and S. Colbold. 1993. The use monoclonal antibodies to achieve immunological tolerance. *Immunology Today.* 14 : 247 - 251.
- Zola, H. 1995. Produksi antibodi monoklonal. Dalam: *Teknologi Elisa dalam Diagnosis dan Penelitian.* Graham W. Burgerss. (Ed.). Gajahmada University Press. 134-153.

Lampiran 1. Penghitungan *Cut off Value* (COV)

$$\begin{aligned}\text{COV kontrol negatif} &= \text{rataan kontrol negatif} + \text{SD} \\ &= 0,149 + 0,133 + 0,142 + 0,139 \\ &= 0,141 + 0,007 \\ &= \underline{0,148}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{COV kontrol positif} &= \text{rataan kontrol positif} + \text{SD} \\ &= 0,187 + 0,234 + 0,195 + 0,251 \\ &= 0,217 + 0,031 \\ &= \underline{0,248}\end{aligned}$$

