

Upaya produksi dan karakterisasi hibridoma untuk penanggulangan bakteri penyakit pada ikan: I. Pembentukan hibridoma penghasil antibodi monoklonal anti *Aeromonas hydrophila*

Hambali Supriyadi¹, Tauhid¹, dan Gozali Moekti²

¹Balai Penelitian Perikanan Air Tawar Sukamandi, Jalan Raya Sukamandi, Subang 41255, Indonesia

²Balai Penelitian Veteriner, Jalan R.E. Martadinata 30, Bogor 16111, Indonesia

Abstract

Production and characterization of hybridoma for fish disease control: I. Cloning of hybridoma produced monoclonal antibody anti Aeromonas hydrophila.

The aim of this study is to produce monoclonal antibody from *Aeromonas hydrophila* for fish disease control purposes. Antigen used is obtained from *A. hydrophila* strain No. 26 prepared by "alcohol killed" method. Lymphocytes of immunized mice was fused with myeloma cell Sp2/O-Ag on the base medium with polyethylene glycol (PEG) solution. Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine medium was then used soon after the fusion of both lymphocytes and myeloma cells. Hybrid's antibody secretion was analyzed using ELISA method, and the hybrid cells that produce antibody monoclonal were then cloned by restricted dilution technique. Results indicated that 100% of hybrid cells were grown and developed. About 97% of hybrids were positively secreted monoclonal antibody, and the best 10 clones of hybridomas of the highest monoclonal antibody production were selected and stored in liquid nitrogen.

[Keywords: Monoclonal antibody, *Aeromonas hydrophila*, cloning, myeloma, hybridoma, lymphocyte]

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi antibodi monoklonal anti bakteri *Aeromonas hydrophila* yang akan digunakan dalam mendiagnosis dan mencegah penyakit bakteri pada ikan. Antigen yang digunakan adalah *A. hydrophila* galur 26 yang disiapkan berupa sediaan "alcohol killed". Sel limfosit mencit terimunisasi difusikan dengan sel mieloma Sp2/O-Ag dengan bantuan *polyethylene glycol* (PEG). Sel hasil fusi segera ditumbuhkan dalam media *Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidines*. Sel hibrid yang terbentuk dianalisis antibodi yang disekresikan dengan metode ELISA. Hibridoma yang produktif dikloning dengan metode pelarutan terbatas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 100% sel hibrid (hibridoma) tumbuh dan berkembang. Dari hibridoma yang tumbuh, 97% mensekresikan antibodi monoklonal dan 10 klon diantaranya merupakan hibridoma yang produktif untuk disimpan dalam tabung nitrogen cair.

[Kata kunci: Antibodi monoklonal, *Aeromonas hydrophila*, kloning, mieloma, hibridoma, limfosit]

Pendahuluan

Penyakit bakterial merupakan masalah serius pada usaha budi daya ikan air tawar karena sering mengakibatkan kematian (Supriyadi dan Taufik, 1981; Taufik, 1992). Salah satu penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* dapat menimbulkan kematian sebanyak 50-100% (Supriyadi dan Rukyani, 1990). Keterlambatan penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh penggunaan teknik-teknik yang kurang cepat dan tepat dalam diagnosis penyakit merupakan masalah umum yang dihadapi. Di samping itu, kesalahan diagnosis yang terjadi dapat mengakibatkan kerugian yang lebih parah.

Teknik diagnosis untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat antara lain dengan menggunakan anti-

bodi monoklonal yang spesifik. Metode serologis umumnya dapat dilakukan dengan cepat, namun sering terjadi kesalahan diagnosis karena menggunakan antibodi yang kurang spesifik. Teknik diagnosis dengan menggunakan antibodi monoklonal dapat menghindari kesalahan-kesalahan tersebut (Campbell, 1986). Dengan demikian penyebab penyakit dapat diketahui secara pasti, dan upaya penanggulangannya dapat segera dilakukan secara terarah. Penggunaan antibodi monoklonal dalam bidang imunologi perikanan pada hakekatnya sudah banyak dilakukan, seperti untuk studi imunoglobulin (Ig) serum ikan *channel catfish* (Lobb dan Clem, 1982), ikan trout (DeLuca *et al.*, 1983), dan pada kelompok ikan *Cyprinus carpio* (Secombes *et al.*, 1983). Sedangkan penggunaan antibodi monoklonal

untuk diagnosis penyakit ikan dan udang telah dilaporkan oleh Kaatari *et al.* (1986). Di Indonesia produksi dan penggunaan antibodi monoklonal untuk diagnosis penyakit ikan belum dilakukan, akan tetapi untuk penyakit hewan seperti infeksi subklinis *Leptospira interrogans* dan patodiferensiasi infeksi virus *Newcastle Disease* telah dilaporkan masing-masing oleh Moekti (1992) dan Pardede (1991). Antibodi monoklonal di samping berguna dalam teknik diagnosis secara cepat dan akurat, juga dapat digunakan sebagai bahan untuk immunisasi pasif.

Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan teknologi hibridoma dalam meningkatkan upaya diagnosis penyakit bakterial yang disebabkan oleh *A. hydrophila*, sehingga penanggulangan terhadap penyakit tersebut dapat ditegakkan secara cepat dan tepat.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penyakit Ikan, Balai Penelitian Perikanan Air Tawar (Balitkantar) dan Laboratorium Biologi Molekuler (Bioteknologi), Balai Penelitian Veteriner (Balitvet), Bogor. Penelitian berlangsung mulai bulan September sampai Maret 1995.

Antigen

Antigen yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *A. hydrophila* galur 26, koleksi biakan mikroba Balitkantar. Penyiapan antigen dilakukan dengan teknik biakan kering pada *tryptic soy agar* (TSA) dan diinkubasi pada suhu kamar (24-28°C), kemudian dipanen setelah diinkubasi selama 24 jam. Proses inaktivasi bakteri dilakukan dengan alkohol (2-3% v/v) selama 15 menit, kemudian dicuci dengan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7-7,2 sebanyak dua kali. Kadar protein sediaan antigen dioptimasi menggunakan metode Lawry *et al.* (1951) dan dianalisis dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Selanjutnya sediaan antigen tersebut dikemas dalam kemasan 2 ml dan disimpan pada suhu -20°C hingga siap digunakan.

Immunisasi

Mencit Balb/c jantan berumur 6 minggu digunakan sebagai hewan uji. Konsentrasi sediaan antigen (*whole cell*) yang digunakan pada mulanya adalah 10¹¹ cfu. Pada periode immunisasi pertama, mencit

disuntik dengan antigen sebanyak 0,2 dan 0,1 ml/ekor. Namun, semua mencit mengalami kematian setelah 24 jam diimmunisasi.

Berdasarkan hasil tersebut di atas, maka immunisasi berikutnya dilakukan dengan injeksi awal antigen dengan rasio protein 300 µg/ml dengan dosis 0,1 ml/ekor. Dosis ini setara dengan 10⁸ cfu/ekor. Pada minggu ke-2 dan ke-3 dilakukan injeksi ulang (*booster*) dengan antigen serupa secara intra peritoneal masing-masing dengan dosis 0,2 ml/ekor. Pemeriksaan respons kebal terhadap masing-masing mencit yang disuntik dilakukan pada minggu ke-4. Pengukuran titer antibodi anti *A. hydrophila* galur 26 menggunakan metode ELISA. Untuk mendapatkan hasil yang optimal pada uji imunologi (reaksi antibodi), maka ditentukan konsentrasi optimal antigen yang dilakukan dengan metode pengenceran.

Setelah kadar antibodi yang cukup tinggi (log₁₀ 2-3) (Thorns dan Morris, 1983) dilakukan penyuntikan terakhir secara intra vena pada dosis 0.2 ml/ekor untuk mendapatkan sel limfosit *hyperimmune*. Selanjutnya, fusi antara sel limfosit dengan sel mieloma dilakukan 3 hari setelah penyuntikan terakhir.

Penyiapan limpa (splenosit)

Limpa mencit diambil secara aseptik setelah mencit dibunuh dengan cara mematahkan tulang leher (*servical dislocation*). Seluruh bagian tubuh mencit disucihamakan dengan menggunakan etanol 70%. Limpa dikeluarkan dari bagian abdominal dan diletakkan di dalam cawan Petri yang steril. Setelah itu, limpa dicuci dua kali dengan *Dulbecco Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang mengandung antibiotik; lalu diproses seperti pada pembuatan kultur jaringan hingga diperoleh suspensi splenosit yang siap difusikan. Penghitungan konsentrasi sel limfosit dilakukan menurut metode Schots *et al.* (1992) dengan menggunakan larutan Turk dan dibiarkan selama 3 menit.

Sel mieloma

Sel mieloma yang digunakan untuk perlakuan fusi pada percobaan ini adalah biakan sel lestari Sp2/O-Ag. Sebelum pelaksanaan proses hibridisasi, harus diketahui bahwa perkembangan sel mieloma dalam keadaan normal dan sehat. Penghitungan konsentrasi sel mieloma dilakukan secara konvensional (Schots *et al.*, 1992) dengan larutan *tryphan blue* dan menggunakan *hemocytometer*.

Hibridisasi

Fusi antara sel limfosit dengan sel mieloma dilakukan 3 hari setelah *booster* terakhir. Teknik fusi dikerjakan menurut metode Thorns dan Morris (1983) dengan bantuan larutan PEG 4000 (Kohler dan Milstein, 1975) selama 60 detik. Perbandingan konsentrasi sel mieloma dengan sel limfosit sebesar 1 : 10. Hibridisasi dilakukan dalam "T/C-24 wells" dengan tiga T/C. Pada T/C pertama, selain ditumbuhkan pupukan jaringan hasil fusi sebanyak 20 lubang (*wells*), juga ditumbuhkan pupukan jaringan (mieloma) sebanyak empat lubang sebagai kontrol yang selanjutnya diberi tanda K1, K2, K3, dan K4. Sedangkan lubang-lubang pada kedua T/C lainnya digunakan untuk pupukan jaringan hasil fusi (hibrid). Jumlah keseluruhan lubang yang digunakan untuk pupukan jaringan hasil fusi sebanyak 68 lubang. Jadi seluruhnya ada 72 lubang.

Sel hasil fusi dibiakkan dalam medium DMEM yang disuplementasi dengan 10% *foetal calf serum* (FCS) dan *Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine* (HAT). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C di dalam suasana lembap dengan CO₂ 5%. Setelah terbentuk hibrid, media yang digunakan adalah FCS diperkaya dengan *Hypoxanthine-Thymidine* (HT).

Untuk kepentingan uji sekresi antibodi monoklonal dari masing-masing hibrid, maka diambil sekresi antibodi monoklonal yang berasal dari ketiga T/C-24 kemudian dipindahkan ke dalam T/C-96, dan selanjutnya diuji dengan metode ELISA.

Skrining

Pada penelitian ini, kemampuan sekresi antibodi dari klon hibridoma yang tumbuh sampai dengan hari ke-14 diperiksa dengan menggunakan metode ELISA. Antigen yang digunakan adalah supernatan yang dipisahkan dari suspensi bakteri *A. hydrophila* di dalam PBS 7,2 yang telah dinaktifkan dengan alkohol seperti telah diterapkan sebelumnya. Materi yang diperiksa adalah supernatan yang dipisahkan dari medium kultur sel hibridoma. Semua diluen ELISA termasuk antigen, antibodi, konjugat, dan bloker yang digunakan terlebih dahulu dioptimalkan secara *checker board* konvensional. Klon-klon hibridoma yang sangat berpotensi dalam memproduksi antibodi monoklonal segera dibuat duplikat untuk ditumbuhkan, kemudian disimpan di dalam tabung nitrogen cair sebagai bank hibridoma.

Kloning hibridoma

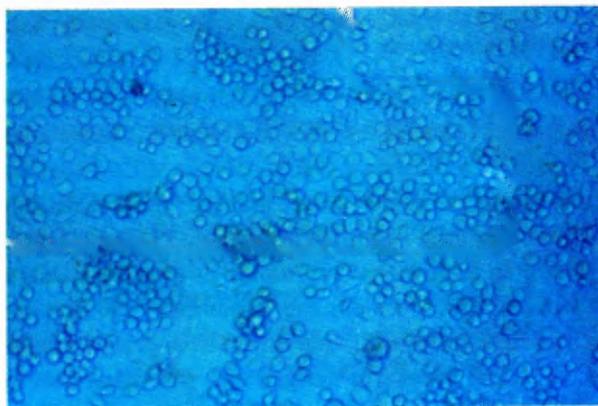
Kloning dilaksanakan mengikuti prosedur metode pelarutan terbatas seperti yang telah dilakukan oleh Thorns dan Morris (1983), hingga dihasilkan sel hibridoma tunggal yang mampu mensekresikan antibodi dan pertumbuhan yang stabil. Pada teknik pelarutan terbatas, sel hibridoma ditumbuhkan dalam medium DMEM lengkap ditambah *Peritoneum Exudate Cells* (PEC), dan diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator dengan CO₂ 5%. Pada hari ke tujuh dilakukan penambahan media segar, kemudian interval penambahan diperpendek menjadi 3-4 hari. Pertumbuhan sel-sel hibridoma yang telah dikloning selalu dimonitor, dan sel hibridoma yang normal segera diskruining secara serologi menggunakan metode ELISA.

Hasil dan Pembahasan

Kematian yang terjadi setelah imunisasi awal dengan menggunakan antigen konsentrasi 10¹¹ cfu sebanyak 0,2 dan 0,1 ml/ekor mencit, diduga akibat terlalu tingginya rasio protein antigen, yaitu sebesar 3000 µg/ml. Endotoksin yang dikandung oleh antigen tersebut cukup tinggi, sehingga mengakibatkan kematian mencit uji.

Periode imunisasi berikutnya dilakukan dengan penyuntikan pertama (*priming*) antigen yang rasio proteinnya diturunkan hingga 300 µg/ml dengan dosis 0,1 ml/ekor setara dengan 10⁸ cfu/ekor. Perubahan dosis didasarkan pada pertimbangan bahwa jumlah konsentrasi yang lebih rendah akan mengurangi toksisitas antigen. Selain itu, nilai titer antigen pada uji ELISA menunjukkan bahwa pada konsentrasi antara 10⁷-10⁸ cfu/ml diperoleh hasil reaksi antigen-antibodi yang optimal. Kisaran konsentrasi antigen sebesar itu selama ini telah digunakan oleh Supriyadi dan Rukyani (1990) untuk penentuan titer antibodi dengan teknik aglutinasi langsung. Nilai titer antibodi serum darah mencit terhadap agen target yang dilakukan dengan teknik ELISA sebelum proses hibridisasi adalah sebesar 3000 unit antibodi; dan kisaran kadar antibodi spesifik tersebut sudah dapat digunakan untuk proses hibridisasi sesuai dengan yang disarankan oleh Thorns and Morris (1983), yaitu sebesar log₁₀ 2-3.

Sel mieloma yang telah diketahui memiliki kepekaan terhadap medium HAT serta dapat tumbuh



Gambar 1. Sel lestari Sp2/O-Ag yang sudah normal pertumbuhannya.

Fig. 1. Normal growth of myeloma cell Sp2/O-Ag.

secara normal (Gambar 1), siap untuk difusikan dengan sel limfosit. Dua belas hari setelah proses fusi sudah menunjukkan adanya pertumbuhan hibridoma pada ketiga TC. Pada saat itu biasanya perkembangan sel hibridoma sudah dapat diketahui yang terlihat transparan dengan dinding sel yang halus (Gambar 2). Pada lubang yang digunakan sebagai kontrol tidak ditemukan adanya sel yang tumbuh. Penambahan media baru senantiasa dilakukan apabila kesuburan media sudah mulai menurun yang ditandai dengan warna kekuningan (asam).

Tingkat keberhasilan proses hibridisasi pada percobaan ini adalah 100%, dimana pada semua lubang yang digunakan untuk pupukan jaringan hasil fusi ditemukan hibridoma dengan pertumbuhan yang normal. Tingkat keberhasilan yang baik ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yang saling mendukung antara lain perbandingan konsentrasi sel mieloma dengan sel limfosit (1:10), yang merupakan perbandingan optimal. Perbandingan tersebut



Gambar 2. Sel hibridoma yang belum dikloning.

Fig. 2. Uncloned hybridoma cell.

didasarkan pada perbandingan ukuran antara sel mieloma dengan sel limfosit sebesar 1 : 10.

Dari uji sekresi antibodi supernatan setiap hibridoma yang tumbuh normal diperoleh sebanyak 66 (97%) hibridoma positif menghasilkan antibodi spesifik (antibodi monoklonal). Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa hibrid-hibrid pada TC no. 1 ternyata memproduksi antibodi monoklonal lebih tinggi, terbukti dari nilai rata-rata DO dari TC no. 1 (H₁-H₂₀) yaitu sebesar 1,34 dibanding dengan TC no. 2 (H₂₁-H₄₄) sebesar 1,01 dan TC no. 3 (H₄₅-H₆₈) sebesar 1.01. Hibrid potensial juga lebih banyak terdapat pada TC no. 1 yaitu sebanyak 5 hibrid, sedangkan pada TC no. 2 ada 3 hibrid dan pada TC no. 3 hanya ada 2 hibrid. Setelah seleksi, 10 klon diambil dan disimpan sebagai bank hibridoma serta untuk keperluan produksi dan aplikasi antibodi monoklonal. Penentuan 10 klon hibridoma tersebut didasarkan pada pertimbangan produktivitas klon-

Tabel 1. Nilai densitas optikal (DO) dari supernatan hibridoma yang diuji dengan teknik ELISA.

Table 1. Optical density values of supernatant from hybridoma tested by ELISA technique.

H1 1.23	H3 0.91	H5 1.24	H21 0.46	H23 0.61	H25 0.79	H45 0.66	H47 0.45	H49 0.55
H6 1.62	H8 1.67	H10 0.68	H27 1.23	H29 1.04	H31 1.07	H51 0.88	H53 0.73	H55 0.85
H11 1.32	H13 1.52	H15 0.89	H33 1.71	H35 0.70	H37 0.30	H37 1.84	H59 1.10	H61 0.67
H16 1.00	H18 1.25	H20 1.59	H39 1.39	H41 0.58	H43 0.79	H43 1.71	H65 0.86	H67 0.60
H2 1.46	H4 1.06	K1 0.05	H22 1.09	H24 1.03	H26 0.90	H46 1.28	H48 2.10	H50 0.91
H7 1.17	H9 2.11	K2 0.05	H28 1.13	H30 1.88	H32 0.63	H52 1.13	H54 1.06	H56 0.37
H12 1.34	H14 1.26	K3 0.05	H34 1.00	H36 0.92	H38 0.74	H58 1.14	H60 1.33	H62 0.64
H17 2.82	H19 1.21	K4 0.05	H40 2.01	H42 1.04	H44 1.15	H64 1.41	H66 1.06	H68 0.90

Ket.:

- H adalah hibridoma, sedangkan angka yang mengikutinya merupakan nomor hibrid tersebut, dan K adalah Kontrol.
- Angka di bawah huruf H adalah nilai OD *supernatant* yang disekresikan oleh setiap hibridoma.
- Kotak yang dicetak tebal dan berbayang (shadow) merupakan hibridoma yang potensial.

Notes:

- H is hybridoma, whereas the followed number are the hybrid number, and K as control.
- The number below H are optical density values of *supernatant* secreted by each hybridoma.
- Shadow and bold blocks are potential hybridoma.

klon dalam menghasilkan antibodi monoklonal. Hasil uji produksi antibodi dengan metode ELISA terhadap setiap hibridoma serta kesepuluh klon hibridoma potensial hasil seleksi disajikan pada Tabel 1.

Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa supernatan yang disekresi setiap hibridoma yang ditumbuhkan memiliki nilai *absorbant* yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Makin tinggi nilai *absorbant* sekresi hibridoma, semakin tinggi pula konsentrasi antibodi monoklonal yang dihasilkannya. Namun hal ini masih belum menggambarkan kemurnian dari antibodi monoklonal sebelum hibridoma-hibridoma produktif tersebut dikloning.

Kesepuluh hibridoma yang potensial dikloning melalui pengenceran terbatas. Hingga akhir percobaan, telah diperoleh klon-klon hibridoma produktif dan telah disimpan dalam tank nitrogen cair sebagai bank hibridoma bakteri *A. hydrophila* galur 26.

Penelitian ini baru mencapai tahapan penyediaan hibridoma yang mensekresikan antibodi monoklonal. Antibodi monoklonal dapat digunakan sebagai alat untuk diagnostik secara imunologi (*immunodiagnostic tool*) dan untuk imunisasi pasif pada ikan.

Kesimpulan

Hibridoma yang dihasilkan dari fusi antara sel limfosit mencit yang telah diimunisasi dengan antigen *A. hydrophila* galur 26 dengan sel mieloma Sp2/O-Ag dapat memproduksi antibodi monoklonal.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balitvet atas kerjasamanya, serta kepada Saudara Zaenal Islam atas bantuannya selama penelitian ini berlangsung.

Daftar Pustaka

Campbell, A. M. (1986). Monoclonal Antibody Technology. Laboratory Techniques. In R.H. Burton and P.H. Van

- Knippenberg (Eds.). Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier-Amsterdam. The Netherlands.
- DeLuca, D., M. Wilson, and G.W. Warr. (1983). Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgN. Eur. J. Immunol. 13: 546-551.
- Kaatari, S., R. Getchell, P. Turaga, and M. Irwin. (1986). Development of vaccine for Bacterial Kidney Disease in Salmon. U.S. Department of Energi Bonneville Power Administration Div. of Fish and Wildlife.
- Kohler, G. and C. Milstein. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256: 495-497.
- Lobb, C.J. and L.W. Clem. (1982). Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. Dev. Comp. Immunol. 6:473-479.
- Lawry, O. H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randal. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265.
- Moekti, G.R. (1992). The production and characterization of monoclonal antibodies directed against *Leptospira interrogans* Serovar Pomona. Workshop on Agricultural Biotechnology in Bogor.
- Pardede, L. dan R. Indriani. (1991). Pembuatan antibodi monoklonal virus ND strain ITA Velogenic Viscerotropic (NDV). Penyakit Hewan 23 (41): 29-32.
- Schots, A., R. Pomp, and W.B. van Muiswinkel. (1992). Production of monoclonal antibodies. 1-18. In J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, S.L. Kaattari and A.F. Rowley (Eds.). Fish Immunology Technical Communication. SOS Publications, 43 DeNormandie Ave., Fair Haven, NJ, USA.
- Secombes, C.J., J.J.M. Van Groningen, and E. Egberts. (1983). Separation of lymphocyte subpopulations in carp, *Cyprinus carpio*, by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies. Immunology 48: 165-175.
- Supriyadi, H. dan P. Taufik. (1981). Identifikasi dan cara penanggulangan penyakit bakterial pada ikan lele (*Clarias batrachus*). Bulletin Perikanan I (3): 447-454.
- Supriyadi, H. dan A. Rukyani. (1990). Immunopropilaksis dengan cara vaksinasi pada usaha budidaya ikan. Seminar Nasional Ke II, Penyakit Ikan dan Udang. Bogor. 16-18 Januari 1990.
- Taufik, P. (1992). Penyakit pada ikan gurame (*Osporonemus gouramy* Lac.) dan penanggulangannya. Makalah pada Pertemuan Aplikasi Teknologi Budidaya Ikan Gurame. Yogyakarta. 24-26 Agustus 1992.
- Thorns, C. and J. Morris. (1983). Production of monoclonal antibodies. Bacteriology Department. James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia.