

## PEMBUATAN ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP *Salmonella typhimurium* DENGAN TEKNIK HIBRIDOMA

Adria P.M. Hasibuan dan Suharni Sadi

Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Batan



ID0000163

### ABSTRAK

**PEMBUATAN ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP *Salmonella typhimurium* DENGAN TEKNIK HIBRIDOMA.** Pada penelitian ini antigen yang dipakai untuk imunisasi adalah *S. typhimurium* yang telah dimatikan dengan iradiasi gamma yang berasal dari  $^{60}\text{Co}$  dengan dosis 2,5 kGy. Hewan percobaan yang dipakai adalah mencit Balb-C yang berumur sekitar 3 bulan. Imunisasi dilakukan dengan cara sub kutan dan dilakukan 2 minggu sekali, dengan maksud untuk mendapatkan sel limfosit spesifik. Sel hibridoma diperoleh dengan cara melakukan fusi antara sel limfosit spesifik dengan sel mieloma. Dari hasil penelitian terbukti bahwa produksi antibodi monoklonal hewan perlakuan (kombinasi imunisasi dan iradiasi dosis rendah) lebih tinggi (5,15 mg/ml) daripada hewan kontrol (3,25 mg/ml).

### ABSTRACT

**PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST *Salmonella typhimurium* BY HYBRIDOMA TECHNIQUE.** In this research *S. typhimurium* killed by irradiation was used as antigen. The antigen was prepared by exposing the bacteria to gamma rays from  $^{60}\text{Co}$  source with the dose of 2.5 kGy. Specific lymphocyte cells were obtained by immunizing 3 months old Balb-C mice with the antigen. The immunizations were done by subcutaneous route with the interval of 2 weeks. The hybridoma cells were made by fusing the specific lymphocytes cells with the myeloma cells. It was found that the treated animals (immunization + irradiation with a low dose of 1 Gy) yielded monoclonal antibody with higher value (5.15 mg/ml) than the control animals (3.25 mg/ml).

### PENDAHULUAN

*S. typhimurium* adalah salah satu bakteri patogen penyebab keracunan yang sering terdapat pada bahan pangan. Sumbernya adalah bahan pangan hewani dan pada wabah diperkirakan lebih dari 70% disebabkan oleh *S. typhimurium* (1). Bila seseorang memakan makanan yang tercemar bakteri tersebut dan kurang baik pengolahannya maka dapat menimbulkan sakit. Gejala yang ditimbulkannya dapat berupa gastroenteritis dan cepat sekali menyebabkan fatal septicemia (keracunan darah) (2).

Penyakit yang disebabkan Salmonella dinamakan salmonellosis. Penyakit tersebut sebetulnya tergolong zoonosis artinya penyakit diantara hewan, tetapi dapat pula menular ke manusia (3). Hal ini disebabkan oleh endotoksin yang diproduksi yang sangat berbahaya. Semua Salmonella membentuk endotoksin yang dikenal dengan nama liposakarida (LPS), dan terdapat di bagian luar membran sel. Menurut FREEMAN (4), LPS terdiri dari 3 bagian yaitu : bagian inti, bagian spesifik dan lipid A.

JARADAT dan ZAWISTOWSKI (5) telah melakukan percobaan untuk memproduksi dan melakukan karakterisasi monoklonal antibodi terhadap antigen 0-5 dari *Salmonella typhimurium* yang difusikan dengan sel mieloma P3X63-Ag8.

Dahulu, pada pembuatan antibodi monoklonal dianggap tidak perlu menggunakan antigen murni, tetapi kemudian ternyata mendapat kesukaran pada waktu

melakukan seleksi hibridoma. Donor limfosit spesifik, dan teknik hibridoma merupakan salah satu cara terbaik untuk mendapatkan antibodi mono-spesifik atau antibodi monoklonal (6).

Menurut KOHLER dan MILSTEIN (7) teknik hibridoma dilakukan dengan cara menggabungkan sel mieloma dengan sel limfosit spesifik. Sel gabungan tersebut memiliki sifat gabungan dari kedua sel asalnya, yaitu menghasilkan antibodi spesifik yang diturunkan dari sel limfosit spesifik dan mempunyai sifat dapat hidup terus menerus yang didapat dari sel mieloma.

Sel limfosit spesifik didapat dengan cara mengimunisasi mencit Balb-C dengan antigen spesifik, dan pada penelitian ini yang dipakai adalah *S. typhimurium*. Bakteri tersebut sebelumnya diiradiasi gamma dengan sumber  $^{60}\text{Co}$  dengan dosis 2,5 kGy.

Tujuan pembuatan antibodi monoklonal terhadap *S. typhimurium* adalah untuk bahan uji *in vitro* secara cepat (beberapa jam) tentang adanya pencemaran bakteri tersebut pada bahan pangan. Pemeriksaan dengan metode konvensional (bakteriologi) membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu sekitar seminggu.

### BAHAN DAN METODE

**Bahan Percobaan.** Pada penelitian ini dipakai mencit Balb-C yang berumur sekitar 3 bulan. Hewan percobaan tersebut mula-mula diobservasi yaitu dibebaskan

dari pengaruh bakteri *Enterobacteriaceae* dengan menyuntiknya dengan antibiotika. Setelah bebas dari bakteri tersebut berdasarkan hasil pemeriksaan serum dan faeces, maka dilakukan penimbangan berat badan, dan diadakan analisis darah. Hewan diimunisasi dengan antigen iradiasi secara subkutan. Setelah interval 2 hari, hewan tersebut diiradiasi dengan dosis rendah 1 Gy. Imunisasi dilakukan 2 minggu sekali, dan analisis darah dan penimbangan berat badan dilakukan setiap minggu. Setelah selesai imunisasi (sekitar 2 bulan) hewan diseksi dan diambil limpanya secara aseptis. Setelah itu dibuat suspensi limfosit.

**Pembuatan Sel Limfosit Spesifik.** Limpa mencit dipotong-potong dan dicuci dengan larutan Hank yang mengandung antibiotika. Kemudian digerus diatas kasa stainless steel steril dan dituangi MEM, lalu diputar dengan putaran 1000/menit selama 5 menit. Supernatan yang didapat dibuang dan endapan selnya dicuci lagi dengan MEM dan diputar lagi. Endapan sel kemudian dituangi dengan penghancur eritrosit yang terdiri dari  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$  dan EDTA, dibiarkan selama 1 menit, lalu cairannya dibuang. Endapan sel kemudian dicuci dengan MEM 3X berturut-turut. Suspensi sel dibuat  $2-3 \times 10^6$  sel/ml.

**Pembuatan Antigen.** Suspensi bakteri *S. typhimurium* dengan kepekatan  $2 \times 10^9$  sel/ml diiradiasi dengan sumber radiasi  $^{60}\text{Co}$  dengan dosis 2,5 kGy dan laju dosis 2,5 kGy/jam. Maksud penggunaan dosis tersebut ialah untuk inematikan bakteri tersebut. Hal ini dibuktikan dengan pemeriksaan TPC (*total plate count*) dari percobaan dengan 5 X ulangan ternyata tidak ada lagi bakteri yang hidup.

**Teknik Hibridoma.** Sel mieloma dibiak ulang (*passage*) terus menerus hingga pertumbuhannya stabil. Setelah pertumbuhannya baik, dibiakkan dalam media yang mengandung azaguanin 2X berturut-turut. Satu hari menjelang fusi, sel tersebut dibiakkan dalam media yang mengandung merkaptoetanol, lalu dicuci dengan MEM 2X berturut-turut. Suspensi sel mieloma dibuat  $10^7$  sel/ml dalam media RPMI 1640. Suspensi mieloma kemudian dicampur dengan suspensi sel limfosit spesifik untuk dilakukan fusi. Perbandingan sel mieloma dan sel limfosit spesifik adalah 1 dan 10. Campuran kemudian diputar dengan kecepatan 1000 putaran/menit selama 5 menit. Endapan sel yang didapat diratakan didasar tabung sentrifus, sambil dihangatkan pada temperatur  $37^\circ\text{C}$  dan dituangi larutan PEG (polietilen glikol) secara perlahan-lahan sebanyak 0,2-0,3 ml. Setelah itu diangkat dari penangas air dan dituangi MEM 10 ml mula-mula perlahan-lahan, kemudian dituangi lagi dengan media tersebut secara cepat hingga mencapai volume 50 ml. Campuran tersebut diputar dengan kecepatan 1000 putaran/menit selama 5 menit. Suspensi hibridoma yang didapat dibuat kepekatan  $10^6$  sel/ml, dan dimasukkan ke dalam *multiwell-plate* sebanyak 0,1 ml, ditambahkan media selektif HAT sebanyak 0,9 ml lalu dieram dalam inkubator  $\text{CO}_2$  pada temperatur  $36^\circ\text{C}$ . Dua hari kemudian media diganti dengan media RPMI 1640 yang biasa. Selanjutnya dilakukan seleksi dan *cloning*.

**Analisis Antibodi.** Media sel dikumpulkan dan dianalisis antibodi yang terbentuk didalamnya dengan menggunakan reagen ST albumin dan protein, lalu diperiksa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.

Nilai antibodi diperoleh dengan cara mengurangi nilai total protein dengan nilai albumin sesuai prosedur.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada tabel dapat dilihat hasil yang diperoleh. Tabel 1 adalah hasil pengamatan berat badan hewan percobaan. Pada Kontrol perubahan berat pada analisis I-VI berkisar antara 23,25 g dan 27,50 g. Pada hewan perlakuan (imunisasi + iradiasi) perubahan berat pada analisis I-VI berkisar antara 26,25 g dan 29,00 g. Terlihat disini bahwa baik pada pada hewan kontrol maupun pada hewan perlakuan, makin lama berat badan makin bertambah. Hal ini disebabkan hewan tersebut makin bertambah lekasit.

Tabel 2 adalah hasil pengamatan jumlah lekosit pada hewan percobaan. Pada Kontrol, dari analisis I-VI jumlah lekosit berkisar antara 8.875 - 15.125 sel/ $\text{mm}^3$ . Terlihat disini jumlah sel lekosit makin meningkat. Hal ini disebabkan hewan tersebut makin dewasa hingga sel imun makin responsif. Pada hewan perlakuan (imunisasi + iradiasi) pada analisis I terjadi penurunan jumlah sel lekosit, tetapi pada analisis selanjutnya terjadi kenaikan sel lekosit. Seperti diketahui hewan percobaan tersebut mula-mula diimunisasi, lalu setelah interval 2 hari diiradiasi dengan dosis rendah (1 Gy). Menurut KOZINETS (8) iradiasi dosis rendah pada seluruh tubuh hewan mempengaruhi darah perifer (stem sel). Dalam waktu 1-5 hari setelah iradiasi sel-sel mengalami kerusakan, tetapi setelah itu terjadi *recovery* (pemulihan), yaitu terjadi proliferasi sehingga jumlah sel meningkat. Antigen yang disuntikkan adalah protein, dan seperti diketahui protein bersifat protektor terhadap kerusakan sel akibat radiasi. Jadi dengan demikian masih dapat menghalangi atau mengurangi kerusakan sel akibat radiasi.

Tabel 3 adalah pengamatan terhadap jumlah limfosit pada hewan percobaan. Pada kontrol, hasil analisis I-VI jumlah limfosit berkisar antara 63 % dan 72 %. Terlihat dengan jelas jumlah sel tersebut makin meningkat. Hal ini disebabkan sel imunnya makin bekerja dengan aktif. Pada hewan perlakuan (imunisasi + iradiasi), pada analisis I jumlah limfosit agak menurun (68 %), tetapi meningkat lagi pada analisis berikutnya. Keadaan tersebut sama halnya dengan jumlah lekosit, yaitu seperti telah diterangkan diatas.

Tabel 4 adalah hasil pengamatan terhadap pembentukan antibodi monoklonal pada hewan percobaan. Pada kontrol, antibodi tersebut nilainya adalah 3,25 mg/ml. Pada hewan yang diperlakukan dengan imunisasi dan iradiasi antibodi yang dihasilkan adalah 5,15 mg/ml. Terlihat bahwa antibodi pada hewan kontrol lebih rendah daripada hewan perlakuan (imunisasi + iradiasi). Pada hewan kontrol, antibodi yang terbentuk adalah antibodi bawaan atau alami karena hewan kontrol tidak diimunisasi. Pada hewan yang diperlakukan (imunisasi + iradiasi) antibodi yang terbentuk adalah antibodi spesifik. Hal ini disebabkan karena hewan perlakuan diimunisasi dengan antigen spesifik (*S. typhimurium*). Bila hewan diimunisasi dengan antigen, berarti benda asing memasuki tubuh hewan tersebut dan hal ini menyebabkan respon imun pada sel imun pembentuk antibodi (*antibody forming cells*) yaitu

terjadinya sekresi sel imun untuk membentuk antibodi. Menurut MILSTEIN (7) bila hewan diimunisasi akan terjadi respon primer, yang akan berlangsung selama 5- 14 hari. Pada percobaan ini dilakukan imunisasi beberapa kali, maksudnya supaya respon primer berlangsung lebih lama sehingga antibodi yang terbentuk nilainya lebih tinggi. Pada respon primer yang akan terbentuk mula-mula adalah imunoglobulin M (Ig M) dengan nilai tinggi, sedang imunoglobulin G (Ig G) nilainya masih rendah. Pada imunisasi berikutnya Ig G nilainya makin meningkat (9). Pada penelitian ini hewan diberi perlakuan kombinasi imunisasi dan iradiasi dengan maksud agar antibodi yang dihasilkan tinggi nilainya. Iradiasi dengan dosis rendah akan menstimulasi sel untuk berproliferasi, dan hal ini berkaitan dengan pembentukan antibodi (10).

Antibodi monoklonal dihasilkan dari sel hibridoma. Sel hibridoma didapat dengan cara menggabungkan sel limfosit spesifik dengan sel mieloma. Sel limfosit spesifik mempunyai enzim HPRT (hipoksantin fosforibose transferase). Sel mieloma hidupnya baka, atau hidup terus menerus tapi tidak mempunyai enzim HPRT. Enzim tersebut penting peranannya pada waktu terjadi fusi antara sel limfosit spesifik dan sel mieloma. Enzim tersebut berfungsi sebagai jalan terbentuknya metabolisme asam nukleat yang berguna supaya sel hibridoma berkembang terus. Aminopterin yang terdapat dalam media selektif HAT dapat memblokir terjadinya sintesis nukleotid. Sel yang bergabung (hibridoma) tahan terhadap aminopterin, sehingga dengan demikian dapat hidup terus dalam media selektif. Hal tersebut terjadi karena sel hibridoma mengandung enzim HPRT yang didapat dari sel limfosit spesifik. Sebaliknya sel induk yang tidak bergabung (sel mieloma dan sel limfosit spesifik) akan mati dalam media selektif tersebut (7).

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini terbukti bahwa hewan yang diperlakukan dengan kombinasi imunisasi (imunisasi dengan interval 2 minggu sekali) dan iradiasi menghasilkan antibodi monoklonal spesifik lebih tinggi daripada hewan tanpa perlakuan atau kontrol yang antibodinya adalah antibodi bawaan atau alami.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami tujukan pada Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

yang telah memberikan *Salmonella typhimurium*. Terima kasih kami sampaikan juga pada Sdri. Sri Utami yang membantu penelitian ini hingga berhasil dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

1. MACKIE and MC CARTNEY, Handbook of Bacteriology, ed. by Robert Cruickshank, E. & S. LIVINGSTONE LTD., Edinburg and London, (1960).
2. MIKAT, D.M., and MIKAT, K.W., A clinician's Dictionary Guide to Bacteria and Fungi, 4<sup>th</sup> ed. dist. by ELI LILY and Co., Indianapolis, Indiana 46285, USA and PT DARYA-VARIA LABORATIA, Gunung Putri, Bogor, Indonesia, (1980).
3. MURRAY, C.J., Salmonellae in the environment, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 10 3, (1991) 765.
4. FREEMAN, B.A., Texbook of Microbiology, W.B. SAUNDERS COMPANY, 22<sup>nd</sup>ed., Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, (1985).
5. JARADAT, Z.W., and ZAWISTOWSKI, J., Applied and Environment Microbiology, Universitas Manitoba, Dept. Food Sci., Canada, 62 1 (1996).
6. CAMELL, A.M., Monoclonal Antibody Technology, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1987) 4.
7. MILSTEIN, C., Monoclonal Antibodies, Scien. Ann. 243 4 (1980).
8. KOZINETS, G., Manual on radiation haematology (Technical Reports Series no.123) IAEA, Vienna, (1971) 129.
9. ROITT, I.M., Essential Immunology, 4th ed., Blackwell Scientific Publication Oxford, (1973).
10. DUPLAN, J.F., Manual on radiation haematology (Technical Reports Series no.123) IAEA, Vienna, (1971) 135.

Tabel 1. Hasil pengamatan berat badan hewan percobaan (g)

Sampel	Periode analisis						
	Observasi	I	II	III	IV	V	VI
H.Kontrol	23	23,25	23,75	26,25	26,25	26,25	27,50
H.Perlakuan*	23,75	26,25	26,25	28,00	28,00	28,75	29,00

\*) Hewan perlakuan = hewan diperlakukan dengan kombinasi imunisasi + iradiasi

Tabel 2. Hasil pengamatan jumlah sel lekosit (sel/mm<sup>3</sup>)

Sampel	Periode analisis						
	Observasi	I	II	III	IV	V	VI
H.Kontrol	8500	8875	9975	11.300	11.400	11.875	15.125
H.Perlakuan*	8850	8700	9500	10.950	11.300	12.875	15.280

\*) Hewan perlakuan = hewan diperlakukan dengan kombinasi imunisasi + iradiasi

Tabel 3. Hasil Pengamatan jumlah sel limfosit (%)\*\*

Sampel	Periode analisis						
	Observasi	I	II	III	IV	V	VI
H.Kontrol	63	69	69	71	71	71	72
H.Perlakuan*	69	68	69	71	71	72	73

\*) Hewan perlakuan = hewan diperlakukan dengan kombinasi imunisasi + iradiasi

\*\*\*) % = Jumlah sel limfosit dibandingkan dengan jumlah sel-sel eosinofil, netrofil batang, netrofil segmen dan monosit.

Tabel 4. Hasil analisis antibodi dalam hewan percobaan

Sampel	Kadar antibodi (mg/ml)
H. Kontrol*	3,25
H. Perlakuan**	5,15

\*) antibodi bawaan/alami

\*\*\*) antibodi monoklonal spesifik

## DISKUSI

K. DEWI

1. Bagaimana mekanisme kombinasi imunisasi + iradiasi dosis rendah dapat meningkatkan produksi antibodi monoklonal hewan percobaan ?
2. Apakah berarti bahwa kombinasi imunisasi + iradiasi dosis rendah meningkatkan imunisasi terhadap *Salmonella* ?

ADRIA P.M. HASIBUAN

1. Menurut DUPLAN (1971) pembentukan antibodi terdiri dari 2 periode, yaitu periode lain dan periode produksi. Iradiasi dosis rendah akan mempengaruhi periode produksi, sehingga antibodi yang terbentuk tinggi nilainya. Dengan demikian antibodi spesifik monoklonal yang terbentuk juga tinggi nilainya.
2. Maksud penelitian ini adalah untuk mendapatkan antibodi spesifik monoklonal dengan nilai tinggi. Bila sudah didapat antibodi spesifik monoklonal tersebut, maka akan digunakan untuk deteksi secara cepat diagnosa secara cepat adanya pencemaran bakteri tersebut pada bahan pangan, yaitu secara imunologik-reaksi Ab-Ag.

MARIA LINA

Dari hasil percobaan, antibodi monoklonal pada hewan yang mendapat imunisasi + radiasi > tinggi dari hewan, kontrol yaitu 5,15 mg/ml dan 3,25 mg/ml.

1. Apakah dari hasil tersebut sudah dapat nantinya diterapkan/digunakan untuk diagnostik karena jika dilihat kenaikan produksinya Abm, tidak terlalu tinggi dibanding dengan kontrol.

2. Apakah ada standar untuk antibodi monoklonal yang dapat digunakan untuk diagnostik adanya kontaminasi bakteri *S. typhimurium* pada makanan dan juga pada spesimen ?

ADRIA P.M. HASIBUAN

1. Antibodi spesifik monoklonal yang didapat 5,15 mg/ml. Untuk tujuan deteksi dini, antibodi sfesifik monoklonal yang didapat ini harus diperlakukan dengan cara lain, yaitu untuk meningkatkan kadarnya, misalnya dengan pasase berulang-ulang sel hibidoma tersebut, dengan media yang diberi tambahan glutamic.
2. Bila ada kontaminasi pada bahan makanan, maka sampel tersebut diperlakukan dulu untuk meningkatkan konsentrasi bakterinya dalam media penyubur. Karena reaksi aglutasi anbibodi monoklonal dengan antigen membutuhkan konsentrasi antigen tertentu. Bila ada pencemaran, maka akan terjadi reaksi argumentasi, yaitu terjadi penggumpalan

HARSOJO

Apakah penelitian ini sudah diaplikasikan karena cara pendeteksiannya memerlukan waktu yang singkat. Kalau belum diaplikasikan mohon penjelasan ?

ADRIA P.M. HASIBUAN

Penelitian ini dipakai untuk deteksi dini secara cepat adanya pencernaan bakteri *S. typhimurium* pada bahan pangan. Tetapi belum diaplikasikan karena adanya kebijakan, dari pimpinan maka penelitian ini tidak dapat diteruskan/dilanjutkan meskipun sudah ada titik-titik terang pada penelitian ini.