

Jurnal Veteriner

16(3) : 303-462

INDONESIAN VETERINARY JOURNAL

Kunjungi kami : ojs.unud.ac.id/index.php/jvet

Jurnal Veteriner

Jurnal Veteriner

ISSN : 1411-8327

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN INDONESIA

Vol. 16 No. 3, September 2015

- DWI PRIYOWIDODO, SRI HARTATI, ASMARANI KUSUMAWATI, JOKO PRASTOWO
Diagnosis Toksoplasmosis Kongenital Berdasarkan Gen *Surface Antigen-1 Toxoplasma gondii* Isolat Lokal Menggunakan *Polymerase Chain Reaction*303-309
- ANA SAHARA, JOKO PRASTOWO, RINI WIDAYANTI, KURNIASIH, WISNU NURCAHYO
Kekerabatan Genetik Caplak *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Asal Indonesia Berdasarkan Sekuen *Internal Transcribed Spacer-2*310-319
- ANDRIJANTO HAUFERSON ANGI, FADJAR SATRIJA, DENNY WIDAYA LUKMAN, MIRNAWATI SUDARWANTO, ETIH SUDARNIKA
Seroprevalensi *Trichinellosis* pada Babi di Kota Kupang, Provinsi Nusa Tenggara Timur320-324
- LB. NGURAH SWACITA, I MADE DAMRIYASA, NYOMAN SADRA DHARMAWAN, NYOMAN MANTIK ASTAWA, LA. PASTI APSARI, LB. MADE OKA, I WAYAN MASA TENAYA
Produksi dan Karakterisasi Antibodi Monoklonal Anti-*Cysticercus cellulosae*325-333
- NUR HIDAYATI, RADEN IIS ARIFANTINI, DONDIN SAJUTHI
Preservasi Semen Kambing Peranakan Etawa dalam Pengencer Tris dan Sitrat Kuning Telur dengan Penambahan *Sodium Dodecyl Sulphate*334-342
- ZULKARNAIN, SUTIYONO, ENNY TANTINI SETIATIN
Pemanfaatan Ekstrak Hipotalamus Kambing Sebagai Upaya Optimalisasi Kesuburan Kambing Kejobong Betina343-350
- WIDYA AYU PRASDINI, SRI RAHAYU, MOCHAMMAD SASMITO DJATI
Penentuan Keberhasilan Involusi Uterus Sapi Perah *Friesian Holstein* Berdasarkan Kadar Estrogen Setelah Beberapa Penginjeksian Selenium-Vitamin E351-356
- ANDRIYANTO, RIDI ARIEF, ADI WINARTO, LEO SAPELANI SOINBALA, BONDAN ACHMADI, AULIA ANDI MUSTIKA, DIAH NUGRAHANI PRISTIHADI, AMROZI, WASMEN MANALU
Pemberian *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* Sebelum Perkawinan dan Jamu Selama Kebuntingan untuk Memperbaiki Performa Anak Domba357-363
- SUDARYANTO, TJUT SUGANDAWATI DJOHAN, SATYAWAN PUDYATMOKO, JUSUP SUBAGJA
Behavior of Bali Starling at Bali Barat National Park and Nusa Penida Island364-370
- APRILIA KUSUMASTUTI, SYAMSIDAR, AGUSTIN ZAHARIA PADERI, ARINI NURHANDAYANI, GUSTI AYU YUNIATI KENCANA
Identifikasi Secara Serologi Galur Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Clade 2.1.3 dan Clade 2.3.2 pada Ayam Petelur371-382

- I KOMANG WAHYU YULLANA, GUSTI AYU YUNIATI KENCANA, I NYOMAN SUARtha
Seroprevalensi Penyakit Tetelo pada Peternakan Itik dan Pasar Galiran di Kabupaten Klungkung, Bali383-388
- I NYOMAN DIBIA, BAMBANG SUMIARTO, HERU SUSETYA, ANAK AGUNG GDE PUTRA, HELEN SCOTT-ORR
Faktor-Faktor Risiko Rabies pada Anjing di Bali389-398
- SUTIASUTI WAHYUWARDANI, DEWI RATH AGUNG PRIYONO, WASMEN MANALU
Gambaran Patologi *Bursa Fabricius* Embrio Ayam Pascavaksinasi Gumboro Secara *In Ovo* Menggunakan Vaksin Lokal dan Komersial399-408
- PUTU MEI PURNAMA DEWI, I NENGAH KERTA BESUNG, I GUSTI NGURAH KADE MAHARDIKA
Keragaman Spesies dan Genetik Bakteri *Staphylococcus* pada Ikan Tuna dengan Analisis Sekuen 16s rRNA409-415
- DAUD STEVEN TRIYOMI HARIYANTO, I GUSTI NGURAH KADE MAHARDIKA, I NENGAH WANDIA
Keragaman Spesies Ikan Tuna di Pasar Ikan Kedonganan Bali dengan Analisis Sekuen Kontrol Daerah Mitokondria DNA416-422
- NI LUH MADE IKA YULITA SARI HADIPRATA, I M.B. ARYA PERMANA ARDIANA PUTRA, I GUSTI NGURAH KADE MAHARDIKA, I NENGAH WANDIA, TJOKORDA SARI KINHILIA
Identifikasi Spesies Ikan Kerapu di Pasar Ikan Karangasem dan Kedonganan Bali Menggunakan DNA Mitokondria Gen 16s rRNA423-431
- NI KETUT SUWITI, I PUTU SUASTIKA, IDA BAGUS NGURAH SWACITA, I NENGAH KERTA BESUNG
Studi Histologi dan Histomorfometri Daging Sapi Bali dan Wagyu432-438
- ANA SHOFI ANI, RETNO ISWARIN PUJANINGSIH, WIDIYANTO
Perlindungan Protein Menggunakan Tanin dan Saponin Terhadap Daya Fermentasi Rumen dan Sintesis Protein Mikrob439-447
- SITI NURALIAH, AGUNG PUENOMOADI, LIMBANG KUSTIAWAN NUSWANTARA
Konsentrasi Asam Lemak Terbang dan Glukosa Darah Domba Ekor Tipis yang Diberi Bungkil Kedelai Terproteksi Tanin448-456
- HENING LASWATI, HENDY HENDARTO, DIAH IRAWATI, LABA MAHAPUTRA
Jus Tomat Meningkatkan Kepadatan Tulang Tikus Menopause457-462

Vol. 16 No. 3 : 303-462 September 2015

- Diagnosis Toksoplasma Kongenital ●
- Kekerabatan Caplak Asal Indonesia ●
- Trichinellosis pada Babi di Kupang ●
- Antibodi Monoklonal Anti-*C. cellulosae* ●
- Preservasi Semen Kambing Peranakan Etawa ●
- Ekstrak Hipotalamus untuk Menyuburkan Kambing ●
- Involusi Uterus Sapi Perah ●
- Jamu dan PMSG untuk Induk Domba ●
- Prilaku Jalak Bali di Nusa Penida dan Bali Barat ●
- Virus Flu Burung H5N1 Clade 2.1.3 dan Clade 2.3.2 ●
- Tetelo pada Itik di Klungkung ●
- Faktor-faktor Risiko Rabies di Bali ●
- Histopatologi Bursa Fabricius Pascavaksinasi Gumboro ●
- Keragaman Spesies & Genetik *Staphylococcus* pada Ikan Tuna ●
- Keragaman Spesies Ikan Tuna di Bali ●
- Identifikasi Spesies Ikan Kerapu di Bali ●
- Histologi dan Histomorfometri Daging Sapi Bali ●
- Perlindungan Protein dengan Tanin & Saponin pada Ruminansia ●
- Asam Lemak Terbang dan Glukosa Domba yang Diberi Kedelai Terproteksi Tanin ●
- Jus Tomat Memadatkan Tulang Tikus Menopause ●



KANTOR REDAKSI

Jl. Raya Sesetan Gg. Markisa No. 6
Br. Gaduh, Sesetan, Denpasar 80232
Telp. (0361) 8423061

Diakreditasi Dirjen Dikti SK No 81/DIKTI/Kep/2011 Tanggal 15 November 2011

Produksi dan Karakterisasi Antibodi Monoklonal Anti-*Cysticercus cellulosae*

(PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CYSTICERCUS CELLULOSAE)

Ida Bagus Ngurah Swacita¹, I Made Damriyasa²,
Nyoman Sadra Dharmawan², Nyoman Mantik Astawa³,
Ida Ayu Pasti Apsari⁴, Ida Bagus Made Oka⁴, I Wayan Masa Tenaya⁵

¹Lab Kesehatan Masyarakat Veteriner, ²Lab Patologi Klinik Veteriner,
³Lab Virologi Veteriner, ⁴Lab Parasitologi Veteriner,
⁵Balai Besar Veteriner Denpasar
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jln. Sudirman, Denpasar, Bali. Telepon (0361) 223791
Email : ngurah.swacita@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah membuat dan mempelajari karakteristik antibodi monoklonal anti-*Cysticercus cellulosae*. Sampel antigen dibuat dari larva *T. solium* (*C. cellulosae*) kemudian digunakan mengimmunisasi mencit Balb/c. Mencit tersebut diukur respon imunnya dengan uji *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), selanjutnya sel limfosit digunakan untuk pembuatan antibodi monoklonal (AbMo). Limfosit asal mencit yang memproduksi antibodi terhadap antigen *C. cellulosae*, difusikan dengan sel mieloma (NS1). Hasil fusi antara kedua sel ini menghasilkan hibridoma yang selanjutnya diskriminasi dengan uji ELISA. Sel hibridoma yang hanya menghasilkan AbMo dipakai untuk produksi AbMo dalam jumlah besar secara *in vitro*. Karakteristik AbMo anti-*C. cellulosae* diuji dengan ELISA dan *Western blotting*. Mencit yang diimmunisasi dengan antigen *C. cellulosae* menunjukkan respons imun dengan membentuk antibodi terhadap *C. cellulosae*. Berdasarkan hasil fusi, diproduksi sebanyak 51 klon sel hibridoma dan setelah diskriminasi, ternyata hanya tiga klon sel hibridoma yang secara konsisten menghasilkan AbMo anti-*C. cellulosae*. AbMo tersebut diberinama sesuai lubang tempat tumbuhnya pada plat mikro ELISA, yaitu BE6, BE7, dan EE9. AbMo ini mampu melacak antigen *C. cellulosae* dari cairan larva dan mengenali pita protein antigen dengan berat molekul 78 kDa.

Kata-kata kunci : *Cysticercus cellulosae*, mencit, AbMo, karakteristik.

ABSTRACT

The purpose of this study is to make a monoclonal antibody against- *Cysticercus cellulosae* and its characterization. Samples antigen prepared from *T. solium* larvae (*C. cellulosae*) was then used to immunize Balb/c. The immune response of mice assessed by ELISA test, then the lymphocytes of mice used for the production of monoclonal antibodies (MoAb). Origin lymphocytes of mice that produce antibodies against *C. cellulosae* antigen, fused with myeloma cells (NS1). Results fusion of two cells produces hybrid cells called hybridomas; cells are then screened by ELISA test. Hybridoma cells that produce only MoAb, used to produce large quantities *in vitro*. Characterization of MoAb against-*C. cellulosae* was tested by using ELISA and Western blotting. Mice were immunized with *C. cellulosae* antigen showed an immune response producing antibodies to *C. cellulosae*. Based on the results of fusion, produced a total of 51 hybridoma cell clones and after being screened, only three clones of hybridoma cells that produced MoAb against-*C. cellulosae*. MoAb produced, named after the hole where the growth of the ELISA micro plate, the BE6, BE7, and EE9. Characteristics of this MoAb capable of tracking cellulosae of fluid larvae and recognize antigen protein bands with molecular weight 78kDa.

Keywords : *Cysticercus cellulosae*, mice, monoclonal antibody, characteristics

PENDAHULUAN

Taeniasis adalah infeksi yang disebabkan oleh cacing pita dewasa, sedangkan *cysticercosis* adalah infeksi yang disebabkan oleh larva cacing pita, baik pada hewan maupun manusia. Taeniasis dan *cysticercosis* merupakan penyakit penting pada manusia, dan masih banyak ditemukan di berbagai negara, terutama di negara-negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia (Rajshekhar *et al.*, 2003). Tingkat kejadian infeksi cacing pita pada manusia di Indonesia tergolong tinggi, terutama di daerah miskin dengan tingkat sanitasi lingkungan rendah, tidak tersedianya jamban keluarga, serta adanya akses ternak babi makan tinja manusia (Assa *et al.*, 2012; Dharmawan *et al.*, 2012). Taeniasis atau *cysticercosis* bersifat endemis di beberapa daerah di Indonesia. Di Kabupaten Jayawijaya Papua, dilaporkan tingkat kejadian infeksi taeniasis pada manusia mencapai 8% dan infeksi *cysticercosis* mencapai 32% (Subahar *et al.*, 2001; 2005, Cai *et al.*, 2006). Prevalensi *cysticercosis* pada manusia di Papua saat ini masih menduduki urutan tertinggi di dunia (Rajshekhar *et al.*, 2003; Margono *et al.*, 2006; Suroso *et al.*, 2006; Wandra *et al.*, 2006). Laporan penelitian *cysticercosis working group* di Papua menunjukkan bahwa prevalensi taeniasis atau *cysticercosis* sejak 37 tahun yang lalu tidak terjadi penurunan. Prevalensi tertinggi ditemukan di Jayawijaya dan Panai (Wandra *et al.*, 2006). Assa *et al.*, (2012) melaporkan bahwa rata-rata seroprevalensi *cysticercosis* di Papua 40,54% dengan kasus terbesar ditemukan di Distrik Asolokobal 92,8% dan terendah di Distrik Wamena Kota 5,8%. Demikian pula di daerah lainnya seperti di beberapa desa di Bali, Sumatera Utara, dan Papua merupakan wilayah endemis taeniasis di Indonesia (Sutisna *et al.*, 2000; Morgono *et al.*, 2006; Wandra *et al.*, 2003, 2006; Subahar *et al.*, 2005; Suroso *et al.*, 2006; Sudewi *et al.*, 2008; Assa *et al.*, 2012; Dharmawan *et al.*, 2012). Seroprevalensi *cysticercosis* pada masyarakat Bali relatif tinggi yaitu 5,2-21,0%, sedangkan prevalensi infeksi taeniasis berkisar antara 0,4-23,0% (Wandra *et al.*, 2006). Di wilayah ini, *cysticercosis* selain menyerang babi juga merupakan salah satu penyebab kematian pada manusia akibat migrasi larva *T.solium* (*C.cellulosae*) ke otak yang dikenal dengan nama *neurocysticercosis*. Kejadian *neurocysticercosis* telah banyak dilaporkan di berbagai negara

(Rajshekhar dan Chandy, 1997; Sawhney *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2003; Singhi dan Singhi, 2004; Arimbawa *et al.*, 2004; Towns *et al.*, 2004; Hawk *et al.*, 2005).

Dalam siklus hidupnya, cacing pita pada manusia umumnya disebabkan oleh *Taenia solium*, dan hewan yang berperan sebagai inang antara adalah babi (Galan-Puchades dan Feuntes, 2000). Larva cacing pita yang ditemukan pada babi disebut *cysticercus* (cacing gelembung). Manusia dapat terinfeksi bila makan daging terinfeksi yang tidak dimasak sempurna (Galan-Puchades dan Feuntes, 2000; Suroso *et al.*, 2006; Sudewi *et al.*, 2008; Assa *et al.*, 2012; Dharmawan *et al.*, 2012).

Untuk mencegah penularan penyakit dari ternak ke manusia, maka sangat diperlukan adanya metode pemeriksaan daging yang murah, sensitif, dan spesifik. Pemeriksaan daging yang diterapkan saat ini oleh instansi terkait adalah secara inspeksi (Direktorat Kesmavet, 2005). Metode tersebut mempunyai sensitivitas yang sangat rendah, sehingga peluang memberikan hasil negatif palsu cukup tinggi, terutama pada ternak dengan intensitas infeksi yang rendah. Belakangan ini banyak dikembangkan uji serologi untuk melacak keberadaan *C.cellulosae* dengan mendeteksi keberadaan antibodi terhadap cacing tersebut (Sudewi *et al.*, 2008). Uji tersebut kerap memberikan hasil positif palsu, karena sering terjadinya reaksi silang dengan parasit lain serta keberadaan antibodi akan tetap terdeteksi walaupun parasitnya sudah tidak ada pada ternak tersebut. Oleh karena itu, perlu tersedia metode diagnostik untuk melacak keberadaan *C.cellulosae* dengan menerapkan prinsip imunologis untuk melacak antigen parasit tersebut dengan menggunakan antibodi monoklonal (Artama, 1999; Astawa, 2002; Astawa *et al.*, 2004). Tujuan penelitian ini adalah memproduksi antibodi monoklonal anti-*C.cellulosae* dan mempelajari karakteristiknya.

METODE PENELITIAN

Penyiapan Antigen *C. cellulosae*

Cysticercus cellulosae dibersihkan dari sisa lemak dan daging babi, kemudian dicuci dengan larutan PBS yang mengandung antibiotik (PBS-Ab). Larva ditimbang sebanyak 10 g, digerus sampai halus dengan mortar, kemudian ditambahkan larutan PBS-Ab perlahan-lahan sampai volumenya 100 mL. Suspensi *C.*

cellulosae disentrifus dengan kecepatan rendah (1000 rpm selama lima menit), supernatannya ditampung, kemudian diukur kadar proteinnya, selanjutnya dialiquot, disimpan dalam freezer (-20°C) sampai digunakan untuk imunisasi mencit.

Imunisasi Mencit Balb/c

Imunisasi mencit dilakukan seperti metode yang dilakukan Astawa (2002). Dalam hal ini, mencit diimunisasi empat kali dengan skema berikut. Suspensi antigen *C. cellulosae*, 45 hari sebelum fusi, diemulsikan dalam *Freund's complete adjuvant*, kemudian disuntikkan kepada empat ekor mencit masing-masing dengan dosis 0,2 mL secara intraperitoneal. Antigen yang sama 30 dan 15 hari sebelum fusi diemulsikan dalam *Freund's incomplete adjuvant* kemudian disuntikkan pada empat ekor mencit yang sama masing-masing dengan dosis 0,2 mL secara intraperitoneal. Seminggu setelah penyuntikan ke tiga, mencit kembali diimunisasi dengan antigen yang sama tetapi tidak diemulsikan dalam *adjuvant* pada empat ekor mencit dengan dosis 0,2 mL secara intraperitoneal. Pengambilan serum mencit dilakukan seminggu setelah mencit diimunisasi terakhir, dan pengukuran respons imunnya dilakukan dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Mencit yang menunjukkan respons imun dengan nilai *optical density* (OD) tertinggi digunakan untuk produksi antibodi monoklonal.

Pembuatan Antibodi Monoklonal (AbMo)

Mencit yang telah diimunisasi selama 45 hari yang diambil serumnya dan menunjukkan adanya antibodi terhadap *cysticercus* serta memiliki titer tertinggi, di-booster dengan suspensi antigen *cysticercus* yang sama tanpa *adjuvant* berturut-turut pada hari kelima, keempat, dan ketiga sebelum dilakukan fusi dengan sel mieloma. Sel limfosit asal mencit yang kebal (menghasilkan antibodi) terhadap *cysticercus* sebanyak 10^8 difusikan dengan 2×10^7 sel mieloma (NS1) menggunakan *polyethylene glycol* (PEG) 45%. Sel hasil fusi kemudian disuspensikan dengan medium selektif *Dulbecco Modified Essential Medium- Hypoxanthine Aminopterin Thymine* (DMEM-HAT) yang mengandung 10^6 sel feeder/ mL media dan sel selanjutnya dibiakan dalam plat mikro biakan sel 96 sumuran pada suhu 37°C. Media selektif tersebut membunuh sel mieloma, tetapi tidak membunuh sel mieloma yang berfusi dengan limfosit. Sel yang berfusi tersebut menghasilkan

sel *hybrid* yang disebut sel hibridoma. Tujuh hari setelah fusi, sel hibridoma dibiakan dalam media DMEM-HT sampai muncul klon hibridoma yang menghasilkan antibodi terhadap antigen *cysticercus*. Skrining klon hibridoma yang menghasilkan AbMo khas antigen *C. cellulosae* dilakukan dengan ELISA menggunakan antigen *cysticercus*. Hibridoma yang terbukti menghasilkan AbMo terhadap *cysticercus* kemudian diklon ulang dengan cara pengenceran terbatas sesuai dengan prosedur McKearn (1980). Kloning ulang dilakukan agar diperoleh klon hibridoma yang dimulai dari satu sel sehingga antibodi yang diproduksi benar-benar monoklonal, yaitu hanya mengenali satu jenis epitop. Sel hibridoma tersebut kemudian diisolasi (AbMo stok) dan dipakai untuk menyiapkan AbMo dalam jumlah besar.

Karakteristik AbMo Anti-*C. cellulosae*

Penentuan Kekhasan AbMo Anti-*C. cellulosae* dengan ELISA. Antigen *C. cellulosae* dan plasma babi normal (kontrol negatif) diencerkan dalam *coating buffer* (15mM Na_2CO_3 , 35mM NaHCO_3 pH 9,6), selanjutnya sebanyak 100 μL antigen dimasukan ke dalam setiap lubang plat mikro ELISA dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Pencucian dilakukan dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang berisi 0,05% *Tween 20* (PBS-T) sebanyak tiga kali, selanjutnya ke dalam setiap lubang plat mikro ELISA ditambahkan 100 μL *blocking buffer* (5% susu skim dalam PBS-T). Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, susu skim dibuang, kemudian ditambahkan 100 μL AbMo ke dalam setiap lubang plat mikro ELISA dan diinkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 60 menit. Pencucian kembali dilakukan seperti di atas, dan kemudian ditambahkan 100 μL *anti-mouse IgG-horse radish peroksidase* (Bio-Rad USA, pengenceran 1: 2000 dalam PBS-T) ke dalam setiap lubang plat mikro ELISA dan diinkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah pencucian seperti di atas, ditambahkan 100 μL substrat TMB (Bio-Rad, USA) ke dalam setiap lubang plat mikro ELISA. Kepekatan warna substrat kemudian dibaca dengan *multi scan spectrophotometer* menggunakan filter 405nm.

Penentuan Kekhasan AbMo Anti-*C. cellulosae* dengan Westernblotting. Protein *cysticercus* diencerkan dalam *sample reducing buffer* (SDS 2,3%, *mercapto-ethanol*

5%, Tris-HCl 0,0625 M. pH. 6,0, gliserol 10%, *bromophenol blue* 0,001%) dan dianalisis dengan *Sodium Dodecylsulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Protein *cysticercus* yang telah dipisahkan dalam gel kemudian ditransfer ke membran nitroselulosa. Membran nitroselulosa dipotong kecil-kecil dan direaksikan dengan AbMo. Adanya ikatan antara AbMo dengan protein *cysticercus* divisualisasikan dengan penambahan *anti-mouse IgG alkaline phosphatase* dan substrat BCIP/NBT.

Pemurnian AbMo dengan Kolom Agarose Protein A. Kolom *agarose* protein-A dipasang pada statif, kemudian dicuci dengan *wash buffer* 10 mL, selanjutnya dicuci dengan *binding buffer* 10 mL. Antibodi monoklonal yang dimurnikan, dicampur dengan *binding buffer* 1:1, kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 g selama lima menit, selanjutnya AbMo tersebut dimasukkan ke dalam kolom, ditunggu sampai habis menetes pada tanda resin. Kolom dicuci dengan 10 mL *binding buffer*, kemudian kolom diisi 5 mL *Elution buffer* (diencerkan 5 kali dengan PBS). Fraksi elusi (*eluet*) ditampung setiap 1 mL dalam *ependorf* dan segera ditambahkan 50 μ L *neutralisation buffer*. *Eluet* yang mengandung AbMo ditentukan dengan ELISA, dan hasilnya dibaca pada *spectrophotometer* menggunakan filter 450 nm. Kolom dicuci dengan 10 mL *elution buffer* dan diikuti dengan 5 mL akuades yang mengandung 0,02% *sodium azide*. Jika sisa larutan tinggal 2 mL di atas resin, kolom ditutup dan disimpan pada suhu 4°C. Data hasil pembuatan AbMo dan karakteristiknya, dijelaskan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respons Imun Mencit yang Diimunisasi dengan Antigen *C. cellulosae*

Sampel larva cacing pita babi (*C. cellulosae*) diambil dari Kabupaten Karangasem, Provinsi-Bali. Sampel larva dibuat antigen suspensi *C. cellulosae* 10% dalam larutan PBS-Ab, *dialiquot* dalam *ependorf*, kemudian diukur kadar proteinnya dengan *Quibit Fluorometer* dan hasilnya didapatkan sebesar 467 μ g/mL. Program imunisasi pada mencit dilakukan empat tahap dan setelah proses imunisasi selesai, serum mencit diambil, kemudian diukur respons imunnya dengan ELISA.

Uji statistika menunjukkan bahwa rataan

optical density respons imun mencit yang diimunisasi dengan antigen *C. cellulosae* ($1,1001 \pm 0,2478^a$) lebih tinggi bila dibandingkan dengan mencit yang tidak diimunisasi ($0,683 \pm 0,0556^b$), dan secara statistika menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$). Respons imun merupakan aktivasi dari klon limfosit mencit yang dapat mengenali antigen *C. cellulosae* yang telah pernah terpapar sebelumnya karena perlakuan imunisasi secara berulang.

Fase awal dari respons imun adalah mengenali antigen dan ekspansi klon yang diperlukan, fase berikutnya adalah deferensiasi dari sel yang memberi respons dan rekrutmen serta aktivasi sistem efektor (misalnya produksi antibodi), aktivasi dari sel makrofag, dan pembentukan sel sitotoksik. Imunisasi mencit dengan antigen *C. cellulosae* dapat menimbulkan respons imun selular maupun humoral. Limfosit T yang bertanggung jawab untuk respons imun selular, dirangsang untuk memproduksi sejumlah zat yang diperlukan untuk memacu berbagai reaksi, sedangkan aktivasi sel B mengakibatkan sel tersebut berproliferasi dan berdiferensiasi kemudian memproduksi antibodi. Respons imun sekunder pada mencit umumnya timbul lebih cepat dan lebih kuat daripada respons imun primer. Hal ini disebabkan adanya sel T dan sel B memori serta antibodi yang tersisa. Masuknya antigen *C. cellulosae* pada imunisasi berikutnya, sudah dikenali oleh sel B spesifik secara lebih efisien dan dapat bertindak sebagai *antigen-presenting cell* (APC). Karena jumlah sel T dan sel B lebih banyak dibandingkan sel lainnya, maka kemungkinan untuk berinteraksi dengan antigen *C. cellulosae* lebih besar sehingga titer antibodi terhadap *C. cellulosae* juga cepat meningkat.

Hasil Fusi Sel Limfosit yang Telah Diimunisasi dengan Antigen *C. cellulosae* dengan Sel Mieloma (NS1).

Hasil fusi antara sel limfosit mencit dengan sel mieloma membentuk sel hibridoma. Pengamatan pertumbuhan sel hibridoma baru tampak mulai hari ke-10 setelah fusi (Gambar 1). Jumlah sel hibridoma yang diproduksi sebanyak 51 klon, dan selanjutnya diskruining dengan ELISA. Hasil skrining menunjukkan hanya 10 klon yang memberikan hasil reaktivitas kuat.

Skrining dengan ELISA didapatkan 10 klon sel hibridoma yang menghasilkan reaktivitas kuat terhadap *C. cellulosae*. Klon sel hibridoma

tersebut terus ditumbuhkan dalam media DMEM-HT, dan akhirnya hanya tiga yang secara kontinyu tetap menghasilkan AbMo anti-*C. cellulosa*. Semua AbMo yang berhasil diproduksi, bereaksi hanya dengan antigen *C. cellulosa*. Antibodi monoklonal tersebut perlu dikarakteristik lebih lanjut, antara lain meliputi penentuan kekhasan AbMo anti-*C. cellulosa* dengan ELISA, penentuan berat molekul protein antigen *C. cellulosa* yang bereaksi dengan AbMo, dan pemurnian AbMo. Antibodi monoklonal yang dihasilkan oleh sel hibridoma, diberinama sesuai dengan lubang tempat klon sel hibridoma tersebut ditemukan, yaitu BE6, BE7, dan EE9.

Antibodi monoklonal terhadap *C. cellulosa* dapat dibuat dengan cara memfusikan sel mieloma (sel tumor) dengan sel limfosit mencit yang telah dikebalikan dengan antigen *C. cellulosa*. Dalam hal ini mencit Balb/c dikebalikan dengan antigen *C. cellulosa* asal babi. Beberapa faktor penting yang menentukan keberhasilan produksi AbMo antara lain antigen yang dipakai untuk imunisasi mencit, metode skrining yang dipakai untuk melacak sel hibridoma yang menghasilkan antibodi terhadap antigen *C. cellulosa*, dan kualitas pertumbuhan sel mieloma (Astawa, 2002; Tenaya, 1997).

Dalam penelitian ini antigen yang dipakai untuk imunisasi mencit adalah protein *C. cellulosa* yang diekstrak dengan PBS dan digerus dengan mortar. Dengan cara seperti ini diperoleh protein *C. cellulosa* yang larut dalam air, sehingga sebagian besar protein yang diperoleh adalah protein larva. Respons imun mencit yang muncul setelah imunisasi, sebagian besar merupakan antibodi terhadap *C. cellulosa*. Antigen yang sama juga dipakai dalam ELISA untuk melacak sel hibridoma yang menghasilkan antibodi terhadap *C. cellulosa*. Namun, untuk menghindari adanya sel hibridoma yang menghasilkan antibodi terhadap jaringan normal inang (babi) asal larva

cacing itu diperoleh, maka AbMo juga diuji dengan cairan tubuh (plasma/ekstrak jaringan) babi. Banyak peneliti menggunakan antigen yang tidak dimurnikan untuk mengimunisasi mencit dalam pembuatan AbMo (Astawa *et al.*, 2004). Namun, yang lebih penting adalah metode yang dipakai untuk melacak sel hibridoma yang menghasilkan antibodi terhadap antigen yang diinginkan. Banyak peneliti menggunakan uji ELISA untuk skrining AbMo karena sangat sederhana dan dapat dipakai untuk melacak sampel dalam jumlah besar (Ohnishi *et al.*, 2005, Astawa *et al.*, 2004). Setiap hasil positif dengan ELISA, harus diuji lebih lanjut dengan uji yang lain seperti uji *Western blotting* agar semua antibodi yang diperoleh benar-benar bereaksi secara khas terhadap *C. cellulosa*.

Karakteristik AbMo Anti-*C. cellulosa*

Dalam penelitian ini diperoleh tiga AbMo yang bereaksi secara khas dengan antigen *C. cellulosa*. Karakteristik AbMo tersebut disajikan berikut ini.

Penentuan Kekhasan AbMo Anti-*C. cellulosa* dengan ELISA.

Dari 10 klon sel hibridoma yang dikembangkan, ternyata hanya tiga yang menghasilkan antibodi monoklonal (AbMo) khas anti-*C. cellulosa* (Gambar 2). Pada Gambar 2 ditunjukkan bahwa supernatan yang menghasilkan AbMo adalah BE6 dengan titer di atas 2⁷, BE7 dengan titer di atas 2⁷ dan EE9 dengan titer 2³.

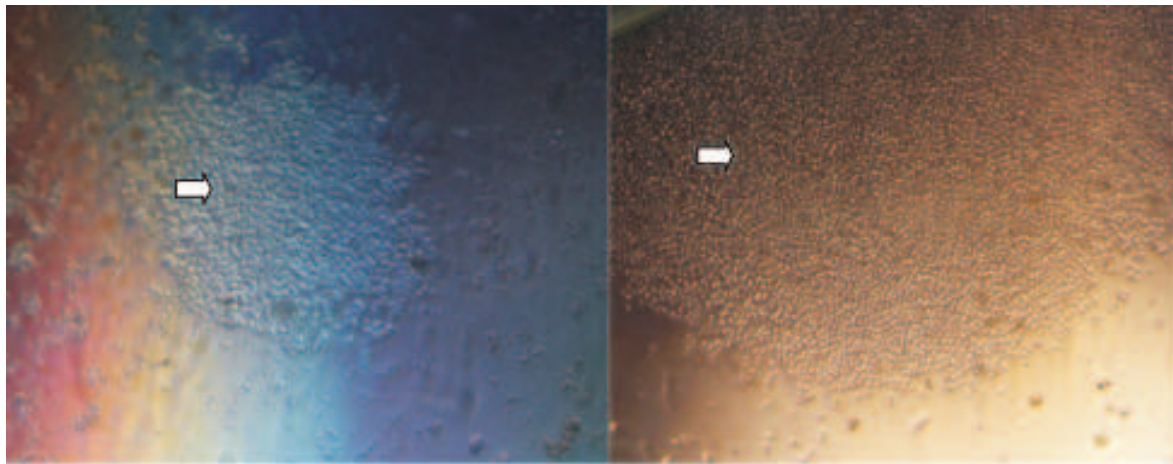
Kemampuan AbMo untuk melacak antigen *C. cellulosa* yang diperoleh dari daging babi terinfeksi, dilakukan dengan ELISA. Dalam hal ini AbMo diencerkan berkelipatan dua. Dua AbMo yaitu BE6 dan BE7 memiliki reaktivitas kuat (+++) dengan titer di atas 2⁷ (OD 405nm) dan satu AbMo (EE9) bereaktivitas sedang (++) dengan titer 2³.

Metode skrining merupakan faktor yang penting bagi seleksi sel hibridoma yang

Tabel 2. Karakteristik antibodi monoklonal anti-*C. cellulosa*.

Nama AbMo	ELISA		<i>Western blotting</i>			
	Antigen <i>C. Cellulosa</i>	Titer	Plasma babi	Antigen <i>C. cellulosa</i>	Plasma babi	Ekstrak daging babi
BE6	+++	2 ⁷	-	78 kDa	-	-
BE7	+++	2 ⁷	-	78 kDa	-	-
EE9	++	2 ³	-	-	-	-

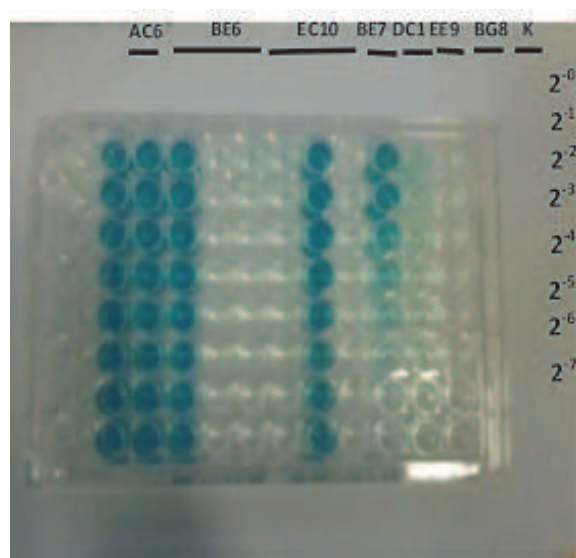
Keterangan : +++ = positif kuat; ++ = positif sedang; — = negatif



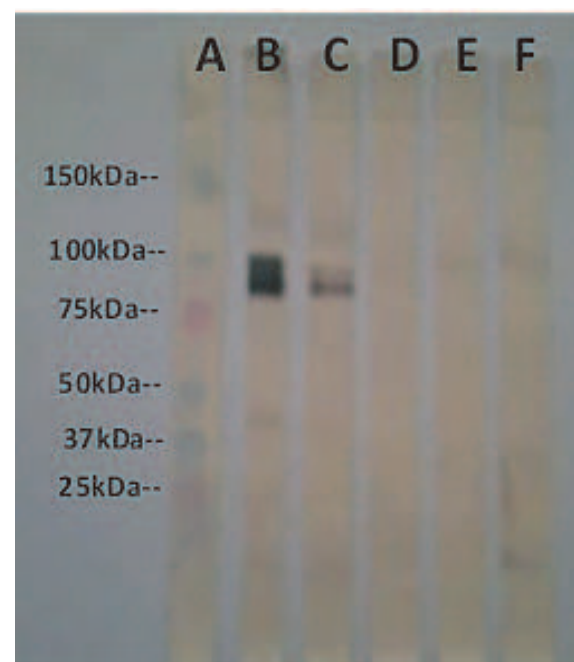
Gambar 1. Pertumbuhan klon sel hibridoma pada media DMEM-HT (Sel hibridoma (→) nampak seperti sekelompok buah anggur umur 10 hari kiri, 20 hari kanan)

menghasilkan antibodi terhadap larva cacing pita *T. solium*. Dalam penelitian ini antigen yang dipakai dalam ELISA untuk skrining hibridoma adalah cairan larva cacing pita *T. solium* yang diperoleh dari daging babi terinfeksi. Dengan antigen tersebut ELISA dipastikan melacak antibodi terhadap antigen larva cacing maupun terhadap antigen daging babi yang secara normal terdapat dalam cairan larva. Hal tersebut karena imunisasi mencit dengan antigen yang juga berasal dari cairan larva yang sudah tentu juga mengandung

antigen asal babi. Namun, dengan ELISA menggunakan plasma babi normal, hibridoma yang menghasilkan antibodi terhadap cairan daging babi dapat disingkirkan.



Gambar 2. Pengukuran Titer AbMo Anti-*C. Cellulosa*. Titer AbMo BE6 dan BE7 di atas 2^7 ; EE9 2^3 ; AC6, EC1, DC1, BG8 negatif



Gambar 3. Reaktivitas AbMo dengan cairan larva (*C. cellulosa*) dan cairan plasma, serta ekstrak daging normal asal babi. (Marker (A); AbMo BE6 dan BE7 (B, C) bereaksi dengan pita protein 78 kDa; AbMo EE9 (D); cairan plasma babi sehat (E); ekstrak daging babi sehat (F) menunjukkan reaksi negatif).

Penentuan Kekhasan AbMo Anti-*C. cellulosa* dengan *Western blotting*

Pada uji *Western blotting*, tidak semua AbMo yang diproduksi bereaksi dengan antigen *C. cellulosa* asal babi. Dua AbMo yaitu BE6 dan BE7 mengenali pita protein *C. cellulosa* dengan bobot molekul 78 kDa, sedangkan satu AbMo (EE9) tidak mengenali pita protein *C. cellulosa*. Ketiga AbMo tidak bereaksi dengan cairan plasma dan ekstrak daging babi normal (Gambar 2). Satu AbMo yang tidak bereaksi pada uji *Western blotting* mungkin disebabkan oleh tidak dikenalnya antigen larva cacing pita yang telah mengalami denaturasi pada penyiapan antigen untuk uji *Western blotting*. Dalam penyiapan antigen untuk uji *Western blotting*, antigen larva cacing pita telah mengalami denaturasi dengan SDS dan *mercapto ethanol*. Ini berbeda dengan ELISA yang menggunakan antigen tidak didenaturasi dengan senyawa tersebut. Belum diketahui spesifisitas pita protein yang dikenali oleh AbMo yaitu 78 kDa. Uji masih harus dilakukan untuk menentukan apakah pita protein tersebut khas larva cacing pita *T. solium*, atau juga ditemukan pada larva cacing pita lainnya, seperti larva cacing pita *T. hidatigena* yang sering dijumpai pada babi dan larva cacing pita *T. saginata* yang umum ditemukan pada sapi.

Dengan *indirect* ELISA, AbMo mampu melacak antigen larva cacing pita *T. solium* dengan reaktivitas kuat (BE6 dan BE7). Satu AbMo (EE9) menunjukkan reaktivitas sedang. Reaktivitas AbMo dalam ELISA yang hasilnya beraneka ragam menunjukkan bahwa kemampuan sel hibridoma untuk mensekresi AbMo juga berbeda-beda. Dalam beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa AbMo yang dihasilkan oleh klon hibridoma juga mempunyai reaktivitas, afinitas, dan titer yang berbeda-beda.

Pemurnian AbMo dengan Kolom *Agarose Protein-A*

Antibodi monoklonal dimurnikan menggunakan kolom *agarose protein-A* dan hasil pemurniannya (*eluet*) ditampung dalam *ependorf* yang berisi masing-masing 1 mL. *Eluet* tersebut kemudian diuji ELISA untuk mengetahui *eluet* ke berapa AbMo muncul dan berapa titernya?

Pemurnian AbMo dilakukan terhadap BE6 dan BE7, karena hanya kedua AbMo tersebut yang memberikan reaksi spesifik pada uji *Western blotting* untuk pengembangan uji

selanjutnya. Pada uji *Western blotting*, kedua AbMo tersebut bereaksi secara spesifik hanya dengan antigen *C. cellulosa*, dan keduanya tidak bereaksi dengan cairan plasma maupun sel normal. Hasil ini menunjukkan bahwa AbMo anti-*C. cellulosa* dapat dihasilkan melalui imunisasi pada mencit menggunakan antigen yang relatif tidak dimurnikan. Penggunaan antigen kasar bagi keperluan imunisasi untuk memproduksi antibodi juga telah dilaporkan oleh Pantophlet *et al.* (2001). Isotipe antibodi yang terbentuk akibat imunisasi atau infeksi agen penyakit dipengaruhi oleh jenis antigen, frekuensi imunisasi, dan jumlah pengulangan imunisasi. Secara umum antigen berupa molekul protein lebih mampu menginduksi antibodi tipe IgG terutama jika dilakukan imunisasi berulang (*booster*). Namun, pada imunisasi primer, antigen protein dapat juga menghasilkan antibodi dengan klas IgM (Chauvin *et al.*, 1995). Imunisasi yang terlalu sering dan dalam waktu lama dengan imunogen protein yang memiliki imunogenitas sedang atau rendah, umumnya menghasilkan antibodi klas IgG1 (Zang *et al.*, 2004). Pemurnian AbMo dilakukan dengan teknik kromatografi afinitas menggunakan kolom yang berisi matriks protein-A *agarose*. Protein-A merupakan protein permukaan bakteri yang mempunyai afinitas kuat dengan bagian Fc molekul antibodi. Namun afinitas protein terhadap IgG berbeda di antara subklas IgG dan di antara spesies hewan (Yamamoto *et al.*, 1995). Menurut Nagaoka dan Akaike, (2003), protein A umumnya memiliki afinitas tinggi terhadap IgG2a dan IgG2b mencit dan memiliki afinitas sedang sampai rendah terhadap IgG1 mencit. Dengan kolom tersebut AbMo (IgG) yang berikatan dengan protein A tertahan dalam matriks, sedangkan yang bukan IgG dan tidak berikatan dengan protein A akan lewat bersama *eluet*. Molekul IgG dalam matriks kemudian dielusi dengan larutan asam. *Eluet* diambil lima kali setiap satu mL dan diuji dengan ELISA. Hasil pemurnian menunjukkan bahwa kedua AbMo (BE6 dan BE7) dapat dimurnikan dengan protein-A *agarose* dengan titer paling tinggi pada *eluet* I dan II (2⁷), sedangkan pada *eluet* III sedikit mengandung AbMo; *eluet* IV dan V tidak mengandung AbMo. Antibodi monoklonal yang belum dimurnikan memiliki *optical density* lebih tinggi (1,440-1,800) bila dibandingkan dengan *eluet* 1 dan 2 (1,255-1,651). Hal tersebut terjadi karena AbMo masih mengandung fraksi protein lainnya yang berasal dari *fetal calf serum*

(FCS) pada saat ditumbuhkan dalam media DMEM-HT yang mengandung FCS 20%.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa telah berhasil diproduksi antibodi monoklonal anti- *C.cellulosae* yang diberi nama BE6, BE7 dan EE9. Karakterisasi AbMo ini mampu melacak antigen *C.cellulosae* pada cairan larva dan dapat mengenali protein antigen *C.cellulosae* dengan bobot molekul 78 kDa.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan apakah pita protein khas *C. cellulosae* juga ditemukan pada larva cacing pita lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Dikti/Rektor Universitas Udayana atas bantuan dana penelitiannya dan Kepala BBV Denpasar-Bali atas bantuan dan fasilitas laboratoriumnya untuk tempat penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Arimbawa M, Kari IK, Laksmningsih NS. 2004. Neurocysticercosis. *Pediatrica Indonesiana* 44 (7-8): 165 - 170.
- Artama WT. 1999. Antibodi Monoklonal dan Rekombinan Antibodi serta Aplikasinya dalam Immunoterapi. *Prosiding Seminar Bioteknologi*, Bogor. Hal. 79 - 95.
- Assa I, Satrija F, Lukman DW, Dharmawan NS, Dorny P. 2012. Faktor Risiko Babi yang Diumbar dan Pakan Mentah Memper-tinggi Prevalensi Sistiserkosis. *J Veteriner* 13(4): 345-352.
- Astawa NM. 2002. Antibodi monoklonal sebagai reagen diagnostik yang spesifik untuk infeksi avian reovirus. *J Veteriner* 3: 133-139.
- Astawa NM, Hartaningsih N, Dharma DMN, Supartika E, Tenaya IWM. 2004. Antibodi Monoklonal dan Diagnosis Immunopatologi Penyakit Jembrana pada Sapi Bali. *Lokakarya Upaya Pencegahan Dan Diagnosis Penyakit Jembrana Pada Sapi Bali*, 1 Des 2004. Hotel Patra Jasa, Kuta, Bali.
- Cai X, Zheng Y, Lou Z, Jing Z, Hu Z, Lu C. 2006. Immunodiagnosis of Taeniasis in China. *The Journal of Applied Research* 6: 69-76.
- Chouvin A, Bouvet G, Boulard C. 1995. Humoral and Cellular Immune Response to *Fasciola hepatica* Experimental Primary and Secondary Infection in Sheep. *Int J Parasitol* 25(10): 1227-1241.
- Cruz ME, Schantz, PM, Cruz I, Preux PM, Banitez W, Tsang VC, Feroso DM. 1999. Epilepsi and neurocysticercosis in an Andean community. *Int J Epidemiol* 29: 799-803.
- Dharmawan NS, Swastika K, Putra I M, Wandra T, Sutisna P, Okamoto M, Ito A. 2012. Present situation and problem of cysticercosis in animal in Bali and Papua. *J Veteriner* 13(2): 154-162.
- Direktorat Kesmavet. 2005. *Pedoman Teknik Pemeriksaan Antemortem dan Postmortem di Rumah Pemotongan Hewan*. Jakarta. Ditjen Bina Produksi Peternakan, Deptan. Hal 1-16
- Galan-Puchades MT, Feuntes MV. 2000. The Asian taenia and the possibility of cysticercosis. *The Korean Journal of Parasitology* 28: 1-7.
- Hawk MW, Shahlaie K, Kim KD, Theis JH. 2005. Neurocysticercosis: a review. *Surg Neurol* 63: 123-32.
- Ito A, Nakao M, Wandra T. 2003. Human taeniasis and cysticercosis in Asia. *Lancet* 362: 1918-1920.
- Margono SS, Wandra T, Swasono MF, Murni S, Craig, PS, Ito A. 2006. Taeniasis/ cysticercosis in Papua (Irian Jaya), Indonesia. *Parasitol Inter* 55: S 143-148.

- McKearn TJ. 1980. Cloning hybridomas by limiting dilution in liquid phase. In *Monoclonal antibodies : new dimension in biological analysis*. (Kennet RH, McKearn TJ, Bectol KB Eds). New York. Plenum Press. P 374.
- Nagaoka M, Akaike T. 2003. Single Amino Acid Substitution in the Mouse IgG1 Fc Region Induce Drastic Enhancement of the Affinity to Protein A. *Oxford Journal* 16 (4): 243-245.
- Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji Tohiro. 2005. Immunological Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus by Monoclonal Antibodies. *Jpn J Infect Dis* 58: 88-94.
- Pantophlet R, Brade L, Brade H. 2001. Generation and Serological Characterization of Murine Monoclonal Antibodies Against O Antigens from Actinobacter Reference Strains. *Clin Diag Lab Immunol* 8: 825-827.
- Rajshekhar V, Chandy MJ. 1997. Validation of diagnostic criteria for solitary cerebral cysticercus granuloma in patients presenting with seizures. *Acta Neurol Scand* 96: 76-81.
- Rajshekhar V, Joshi DD, Doanh NQ, Ven De N, Xiaonong Z. 2003. *Taenia solium* taeniasis/ cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Asia Trop* 87: 53-60
- Sawhney IM, Singh G, Lekhra OP, Mathuriya SN, Parihar PS, Prabhakar S. 1998. Uncommon presentations of neurocysticercosis. *J Neurol Sci* 154: 94-100.
- Singhi P, Singhi S. 2004. Neurocysticercosis in children. *J Child Neurol* 19: 482-492.
- Subahar R, Hamid A, Purba W, Wandra T, Karma C, Sako Y, Margono SS, Craig PS, Ito A. 2001. *Taenia solium* infection in Irian Jaya (West Papua), Indonesia: a pilot serological survey of human and porcine cysticercosis in Jayawijaya District. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 388-390.
- Subahar R, Hamid A, Purba F, Widarso, Ito A, Margono SS. 2005. *Taeniasis/sistiserkosis di antara beberapa anggota keluarga di beberapa Desa di Kabupaten Jaya Wijaya, Papua*. *Jurnal Ilmiah Makara* vol. 9 Online : <http://www.research.ui.ac.id/> Diakses Januari 2008.
- Sudewi AAR, Wandra T, Artha A, Nkouawa A, and Ito A. 2008. *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia : Serology and mtDNA analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 96-98
- Suroso T, Margono SS, Wandra T, Ito A. 2006. Challenges for Control of Taeniasis/Cysticercosis in Indonesia. *Parasitol Inter* 55: 161-165
- Sutisna P, Kapti IN, Allan JC, Rodriguez RC. 2000. Prevalensi taeniosis dan sistiserkosis di Banjar Pamesan, Desa Ketewel, Gianyar, Bali. *Majalah Kedokteran Udayana* 31: 226-234.
- Tenaya I WM. 1997. Production and Characterization of Monoclonal Antibody Against a 72 kDa Protein of *Serpulina pilosicoli* Strain 1648. Thesis. Perth. Murdoch University. Pp: 90-101.
- Towns JM, Hoffman CJ, Kohn MA. 2004. Neurocysticercosis in Oregon 1995-2000. *J of Emerg Infec Dis* 10(3): 508-510.
- Wandra T, Ito A, Yamasaki H, Suroso T, Margono SS. 2003. *Taenia solium* cysticercosis, Irian Jaya, Indonesia. *J of Emerg Infec Dis* 9(7): 884-885.
- Wandra T, Depary AA, Sutisna P, Margono SS, Suroso T, Okamoto M, Craig PS, Ito A. 2006. Taeniasis in cysticercosis in Bali and North Sumatera, Indonesia. *Parasitol Inter* 55: S155-S160.
- Yamamoto S, Omura M, Hirata H. 1995. Isolation of Porcine, Canine, and Feline IgG by Affinity Chromatography Using Protein A. *Vet Immunol Immunopathol* 9(2): 195-200.
- Zang W, Moreau E, Huang W, Chauvin A. 2004. Comparison of Humoral Response in Sheep to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Experimental Infection. *Parasite* 11: 153-159.