

Perkembangan Teknik Hibridoma

Agus Sjahrurachman

Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

PENDAHULUAN

Dalam kurun waktu puluhan tahun sejak Metchnikoff dan Ehrlich mengemukakan teori imunologi sehingga mendapatkan hadiah Nobel 1908, banyak kemajuan yang telah dicapai baik pada imunologi seluler maupun humoral⁽¹⁾.

Sampai tahun 1975 walaupun imunologi khususnya imunokimia telah cukup maju, antibodi yang digunakan untuk mengikat atau mengenali suatu antigen masih dibuat dengan cara yang konvensional yaitu mengimunisasi hewan percobaan, mengambil darahnya dan mengisolasi antibodi dan serum sehingga menghasilkan antibodi poliklonal. Dalam antibodi poliklonal jumlah antibodi yang spesifik sangat sedikit, sangat heterogen karena dapat mengikat bermacam-macam epitop dan antigen yang diimunisasikan. Juga pembuatannya, dan awal pemurnian antigen sampai menghilangkan antibodi yang tidak diinginkan sangat memakan waktu dan sulit⁽²⁾.

Kohler dan Milstein (1975) memperkenalkan cara baru membuat antibodi dengan mengimunisasi hewan percobaan, kemudian sel limfositnya dihibridisasikan dengan biakan sel tertentu sehingga hibrid dapat dibiakkan terus menerus (*immortal*) dan membuat antibodi monoklonal^(2,3). Antibodi monoklonal yang dibuat oleh sel hibrid mempunyai sifat lebih baik dan antibodi poliklonal karena hanya mengikat 1 epitop serta dapat dibuat dalam jumlah tak terbatas⁽²⁾. Terobosan teknik hibridoma yang menghasilkan antibodi monoklonal terhadap antigen, membuka era baru cara identifikasi dan pemurnian suatu molekul pada berbagai disiplin ilmu, juga membuka cakrawala dalam prosedur diagnostik dan pengobatan dan pencegahan alternatif pada keganasan dan berbagai penyakit lain^(4,5,6,7,8).

PRINSIP PEMBUATAN ANTIBODI MONOKLONAL

Tujuannya ialah menciptakan sel pembuat antibody homo-

gen yang dapat dibiakkan terus menerus (*immortal*), melalui :

1) Fusi sel limpa kebal dan sel mieloma

Pada kondisi biakan jaringan biasa, sel limpa yang membuat antibodi akan cepat mati sedangkan sel mieloma dapat dibiakkan terus menerus. Fusi sel dapat menciptakan sel hibrid yang membuat antibodi seperti sel limpa dan dapat dibiakkan terus menerus seperti sel mieloma^(9,10,11).

2) Eliminasi sel induk yang tidak fusi

Frekuensi terjadinya hibrid sel timpa-sel mieloma biasanya rendah, karena itu penting untuk mematikan sel yang tidak fusi yang jumlahnya lebih banyak agar sel hibrid mempunyai kesempatan untuk tumbuh, dengan cara menggunakan:

(i) Sel mieloma mutan yang mempunyai kelainan (*defect*) sintesis nukleotida yaitu sel mieloma yang tidak mempunyai enzim timidin kinase (TK) atau hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HGPRT) sehingga dalam sintesis nukleotida tidak dapat menggunakan *salvage pathway* dan

(ii) Media selektif yang dikembangkan oleh Littlefield, mengandung hypoxanthine, aminopterin dan thymidine (HAT). Aminopterin menghambat jalan biasa biosintesis purin dan pirimidin sehingga memaksa sel menggunakan *salvage pathway*. Sel yang tidak fusi karena tidak mempunyai enzim timidin kinase atau hypoxanthine phosphoribosyl transferase akan mati, sedangkan sel hibrid karena mendapatkan enzim tersebut dan sel mamalia yang difusikan dapat menggunakan *salvage pathway* sehingga tetap hidup dan berkembang^(10,12).

3) Isotasi Mon yang diinginkan

Sel hibrid dikembangkan biakkan sedemikian sehingga tiap sel hibrid akan membentuk koloni sendiri. Tiap koloni kemudian dipelihara terpisah satu sama lain. Hibridoma yang terbentuk dipilih dengan cara mendeteksi antibodi yang disekresikan dalam

medium. Kadar antibodi biasanya cukup tinggi (\pm 10–100 u/ml), sehingga banyak uji serologi yang dapat digunakan tergantung jumlah antigen spesifik yang tersedia, tetapi yang paling sering digunakan adalah *radioimmunoassay* (RIA) dan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)⁽¹²⁾.

4) Produksi antibodi monoklonal spesifik

Setelah klon hibridoma yang diinginkan dapat diisoiasi, maka produksi antibodi monoklonal dapat dilakukan dengan cara :

- (i) *in vitro*, membiakkan pada medium biakan jaringan dan antibodi dapat dipanen dan supernatan. Kadar pada umumnya 10–100 ug/ml supernatan,
- (ii) *in vivo*, mentransplantasikan intraperitoneal pada binatang, antibodi dipanen dan cairan asites. Kadar pada umumnya 1-25 mg/ml cairan asites^(10,12).

PERKEMBANGAN TEKNIK HIBRIDOMA

Sejak diperkenalkan, teknik hibridoma telah banyak mengalami perkembangan untuk mendapatkan klon secara efisien dan hibridoma yang hidup secara maksimal⁽¹³⁾. Sejalan dengan tujuan maka pengembangan timbul pada cara-cara:

1) Imunisasi

Hibridoma merupakan hasil fusi 2 sel yaitu sel mieloma dan sel B penghasil antibodi. Karena itu supaya memperbanyak sel B spesifik terhadap antigen yang diinginkan penting supaya populasi sel B spesifik jumlahnya lebih banyak sehingga hasil fusi mencapai maksimal. Banyaknya sel B spesifik dipengaruhi antigen baik caranya stimulasi maupun sifat dan antigen sendiri. Sehingga untuk memperbanyak sel B spesifik, dilakukan berbagai cara imunisasi, yaitu:

(i) Konvensional

Cara ini sebenarnya sama dengan cara imunisasi untuk membuat antibodi poliklonal. Antigen berupa protein atau polisakarida dalam volume yang sama diemulsikan dengan *complete Freund's adjuvant*, bila antigen seluler dibuat tanpa adjuvan. Antigen disuntikkan subkutan pada beberapa tempat atau intraperitoneal, setelah 2–3 minggu disusul suntikan antigen tanpa adjuvan secara intravena sekali atau beberapa kali. Mencit dengan tanggap kebal terbaik dipilih, 1–2 hari setelah suntikan terakhir mencit dibunuh dan diambil sel limpanya^(11,12). Cara ini dianggap cukup baik dan secara umum banyak dipakai, walaupun dipengaruhi sifat antigen berupa imunogen kuat atau lemah serta tanggap kebal binatang yang berbeda-beda. Bila informasi antigen yang lengkap tidak bisa didapatkan cara imunisasi ini terbukti memberi hasil cukup baik⁽¹¹⁾.

(ii) Imunisasi sekali suntik intralimpa (*Single-shot intrasplenic immunization*)

Pada imunisasi konvensional, antigen dipengaruhi bermacam-macam faktor. Bila disuntikkan ke dalam darah sebagian besar akan dibuang secara alami, sedangkan melalui kulit akan tersaring kelenjar limfe regional, makrofag dan sel retikuler. Hanya sebagian kecil antigen yang terlibat dalam proses tanggap kebal. Pada hibridoma yang diperlukan adalah sel limpa, karena itu untuk mencegah eliminasi antigen oleh bagian lain dari tubuh dilakukan suntikan imunisasi langsung pada limpa dan ternyata

hasilnya lebih baik dan cara konvensional⁽¹⁴⁾. Selain memberikan hasil klon spesifik yang lebih banyak, imunisasi intralimpa ini memberi keuntungan yang lain : (1) Pemakaian antigen yang sangat hemat, misalnya untuk imunisasi dengan 1gM manusia hanya diperlukan 20 ug, sedangkan untuk antigen berupa sel hanya diperlukan 200.000 sel, sehingga dapat dibuat hibridoma dan antigen yang terbatas jumlahnya. Karena hampir semua binatang percobaan memberi tanggap kebal yang baik, tidak diperlukan binatang dalam jumlah yang besar⁽¹⁴⁾. (2) Fusi dapat dilakukan dalam waktu 3 hari setelah imunisasi⁽¹⁴⁾.

(iii) Imunisasi *in vitro*

Tidak ditemukannya antibodi monoklonal spesifik sering karena kegagalan stimulasi limfosit B pada imunisasi *in vivo*. ini mungkin disebabkan toleransi atau adanya antigen *hierarchy response* (reaksi tanggap kebal hanya terhadap beberapa komponen antigen). Sering terjadi setelah imunisasi dengan antigen yang lemah, walaupun titer antibodinya tinggi ternyata gagal mendapatkan hibridoma spesifik karena rendahnya jumlah sel B spesifik dalam limpa, maka untuk mengatasinya dilakukan imunisasi *in vitro*⁽¹⁵⁾. Pada prinsipnya sel limpa belum imun ditambah antigen dan TCM (*thymocyte culture-conditioned medium*) yaitu medium biakan sel thymus setelah inkubasi 48 jam. Antigen dapat berupa antigen tertarut sebanyak 30–1000 ug atau sel yang difiksasi alkohol atau yang diradiasi 4500 rad dengan Cesium radioaktif. Setelah diinkubasikan 37°C selama 5 hari akan banyak dijumpai sel *blast* yang besar dan pada keadaan ini sel siap untuk dilakukan fusi⁽¹⁵⁾.

Sebagai contoh keberhasilan imunisasi *in vitro* : melalui imunisasi *in vitro* dengan 107 sel *acute myeloid leukemia* (AML) yang difiksasi alkohol, 31 dan 96 sumbu biakan menghasilkan hibridoma spesifik dan antibodi dan 6 dari klon ternyata sangat spesifik karena tidak bereaksi dengan sel darah perifer maupun sel sumbu tulang. Hasil ini berbeda bila dibandingkan melalui imunisasi *in vivo*, antibodi yang dihasilkan sebagian besar bereaksi dengan *major histocompatibility antigen* atau *major myeloid differentiation antigen* yang merupakan bagian terbanyak dari permukaan sel⁽¹⁵⁾.

Perkembangan selanjutnya merupakan penyederhanaan kondisi imunisasi *in vitro* yaitu menggunakan medium yang biasa untuk biakan jaringan yaitu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) atau DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) dan adjuvan peptida yang mudah didapat, N-acetylmuramiyl-L-alany-D-isoglutamine. Cara ini terbukti telah meningkatkan jumlah hibridoma pembuat antibodi serta jumlah hibridoma yang dapat bertahan hidup. Pada prinsipnya cara ini sama dengan di atas, yaitu sel limpa beiumun ditambah antigen dan 20 ug N-acetylmuramiyl-L-alany-D-isoglutamine, diinkubasikan 37°C dengan 5% CO₂ 95% udara selama 4 hari⁽¹⁶⁾. Berhasilnya imunisasi *in vitro* ini telah membuka peluang dilakukannya stimulasi *in vitro* sel B manusia, karena imunisasi *in vivo* tidak dapat dijaikan karena dibatasi etika, yang selanjutnya diikuti fusi dengan sel mieloma manusia atau transformasi dengan virus Epstein-Barr sehingga dapat dibuat antibodi monoklonal manusia⁽¹⁶⁾.

2) Pilihan sel mieloma

Yang menjadi pertimbangan dalam memilih sel mieloma, adalah:

a) Spesies

Sd mieloma yang berasal dari spesies yang sama dengan binatang yang diimunisasi akan mengurangi segregasi kromosom pasca fusi. Contoh yang ekstrim ialah hibridoma sel mieloma mencit dengan sel limpa manusia, kromosom sel manusia dengan cepat mengalami segregasi sehingga hasil hibrid menjadi tidak stabil^(11,17). Dalam perkembangannya, pemilihan sel mieloma yang berbeda spesies dapat dilakukan terutama untuk tujuan tertentu. Hibrid sel mencit dengan tikus telah dibuat dan berhasil baik, tetapi perbedaan spesies yang terlalu jauh dikatakan tidak produktif⁽¹⁸⁾.

Walaupun pembuatan antibodi monoklonal mencit dan tikus sudah berhasil baik, gunanya secara klinis sangat terbatas karena tetap merupakan protein asing untuk manusia. Karena itu dikembangkan hibrid manusia dengan mengembangkan sel mieloma manusia yang sensitif terhadap hypoxanthine-aminopterin-thymidine. Tim dari Stanford University telah berhasil membuat galur sel mieloma tersebut yaitu U-266 AR1 dengan nomor registrasi SKO-007. Sayangnya galur ini masih membuat sendiri IgE⁽¹⁹⁾.

b) Sintesis imunoglobulin

Sel hibridoma mengekspresikan rantai imunoglobulin secara *codominant*, sehingga imunoglobulin dan sel mieloma akan diekspresikan bersama imunoglobulin dan sel limpa dengan kombinasi secara acak⁽¹⁹⁾. Sebagai contoh, bila sel mieloma membentuk rantai berat dan rantai ringan imunoglobulin, seperti juga halnya dengan sel limpa, maka imunoglobulin dan sel hibrid merupakan kombinasi acak dari ke-4 rantai dan antibodi spesifik hanya terdapat 1/16 dari seluruh imunoglobulin yang terbentuk⁽²⁰⁾. Karena itu pengembangan diarahkan untuk membuat sel mieloma yang tidak membuat rantai imunoglobulin tetapi tetap dapat fusi dengan baik. Gatur sel mieloma mencit SP2/O-Ag14 yang merupakan hasil *reclone* SP2/HI-Ag adalah sel mieloma pertama yang tidak membentuk rantai imunoglobulin⁽²⁰⁾. Berbagai jenis mieloma dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Galur sel mieloma

Galur	Spesies asal	Produksi Ig
P3-x63-Ag8	Mencit	IgG 1
P3-NSI/I-A4-I	Mencit	Kappa
P3-x63-Ag8.653	Mencit	-
SP2/O-Ag 14	Mencit	-
FO	Mencit	-
F10-RCY3-Agl	Tikus	Kappa

Sumber 18.

3) Medium biakan

Medium biakan umumnya DMEM atau RPMI 1640 dengan tambahan *fetal calfserum* (FCS) dan aditif lainnya. Yang menjadi masalah adalah FCS harganya mahal, sulit didapat dan kualitasnya sangat bervariasi tergantung sumbernya bahkan juga bervariasi untuk tiap *batch*. Penambahan FCS sangat penting, bahkan pada waktu fusi, seleksi dan *cloning* kadar FCS dalam

medium sering dinaikkan. Dipilih FCS karena kandungan imunoglobulinnya rendah sehingga tidak mempengaruhi assay serta sangat mendukung tumbuh dan kembang biak sel⁽¹¹⁾.

Usaha pengembangan dilakukan untuk mendapatkan medium tanpa serum karena memberi keuntungan:

- memungkinkan penelitian yang tak memperbolehkan adanya protein serum atau bahan-bahan dan serum misatnya hormon, antibodi.
- ekonomis, terutama untuk menumbuhkan sel dalam skala besar.
- mempermudah pemurnian antibodi monoklonal, bahkan pada beberapa keadaan, antibodi monoklonal dapat langsung digunakan tanpa pemurnian⁽²¹⁾. Salah satu dari medium tanpa serum adalah *Serum-free* KSLM medium yang menggunakan medium dasar RPMI 1640 + DMEM + Hams F-12 medium dengan perbandingan 2: 1: 1, ditambah insulin, 2-amino etanol, 2-merkaptotanol, natrium selenit, LDL manusia, asam oleat dalam kompleks dengan albumin serum sapi (BSA)⁽²²⁾. *Serum-free* KSLM medium terbukti sama baiknya untuk menumbuhkan sel mieloma NS-1 dan sel hibridoma (Tabel 2), dibandingkan medium dengan 10% FCS. Harus menjadi perhatian bahwa tidak semua jenis sel mieloma atau hibridoma cocok dengan medium tanpa serum⁽²¹⁾.

Tabel 2. Hasil fusi mieloma dan sel limpa dalam medium KSLM dan Medium dasar + FCS 10%⁽²²⁾

Induk mieloma	Kondisi	(%)	Sumur (+) Ab terhadap A431	
			Koloni/sumur	% sumur (+)
NS-I	KSLM	54	1-2	25
NS-I	KSLM + FCS 10%	51	1-2	33
NS-I-503	KSLM	85	5-10	60
NS-I-503	MD+FCS 10% ⁿ	75	5-10	57

Keterangan :

KSLM = medium tanpa serum

MD = medium dasar

N I-503 = varian dan sel NS-1 yang telah diadaptasikan pada medium tanpa lipid.

4) Fusi sel

Fusi sel diawali dengan fusi membran plasma sehingga menghasilkan sel besar dengan dua atau lebih inti yang berasal dari kedua induk sel yang berbedajenis, disebut heterokaryon, pada waktu tumbuh dan membelah diri terbentuk 1 inti yang mengandung kromosom kedua induk disebut sebagai sel hybrid⁽¹⁷⁾.

Frekuensi fusi dipengaruhi bermacam-macam faktor:

- jenis medium.
- perbandingan jumlah sel timpa dengan sel mieloma.
- jenis sel mieloma yang digunakan.
- bahan yang mendorong timbulnya fusi (fusogen), misalnya polyethylene glycol⁽²³⁾.
- Secara garis besar fusogen dibagi menjadi 2 kategori:
 - Virus berselubung. Yang sering digunakan adalah virus Sendai^(17,24).
 - Reagensia tipofitik atau tipolitik, misal lyssole cithin dan polyethylene glycol⁽¹⁷⁾.

Pada awal penelitiannya Kohier dan Milstein menggunakan virus Sendai yang inaktif sebagai fusogen⁽³⁾, tetapi karena sulit menyiapkannya, efisiensinya sangat bervariasi dan hanya mendorong fusi pada beberapa jenis sel saja, maka fusogen diganti dengan polyethylene glycol yang lebih mudah didapat dan dapat mendorong fusi pada sel dengan jenis yang lebih luas⁽¹⁷⁾. Pengembangan fusi sel banyak diarahkan untuk menaikkan efisiensi fusi yang dianggap masih rendah, antara lain dengan cara:

- mengembangkan fusogen
Polyethyleneglycol (PEG) secara luas sudah digunakan sebagai fusogen, biasanya dengan berat molekul 1000–6000, konsentrasi 50%. Penambahan PEG dengan DMSO (dimethylsulphoxide) ternyata dapat menaikkan efisiensi fusi⁽¹⁷⁾.
- mengembangkan teknik fusi lain, yaitu menggunakan medan listrik pada limfoblas⁽²⁵⁾.

5) Penumbuhan hibndoma

Berdasarkan pengamatan Fazekas de St Groth dan Scheidegger, penumbuhan hibrid pasca fusi yang dilakukan dengan *feeder cell* (sel limpa tidak imun) memberi hasil yang lebih konstan dibanding tanpa *feeder cell*⁽¹⁸⁾. Sebagai *feeder system* dapat digunakan sel limpa tidak imun, thymocyte, makrofag peritoneum, fibroblas manusia yang telah diradiasi⁽¹⁸⁾, lipopolisakarida (LPS), supernatan makrofag, supernatan biakan endotel manusia dan serum darah tali pusat manusia⁽¹³⁾. Dalam *feeder system* terdapat faktor pendorong penumbuhan sel, sebagai contoh:

- mitogen lipopolisakarida (LPS), efeknya diperkuat dengan penambahan dextran sulfat.
- supernatan makrofag mengandung monokin (interleukin-1) menimbulkan aktivasi limfosit.
- supernatan biakan endotel pembuluh darah manusia dapat mendorong proliferasi dan diferensiasi hibridoma sel B, faktor mitogennya sampai sekarang belum diketahui. Demikian juga dengan serum tali pusat manusia yang sampai saat ini belum diketahui faktor yang mendorong tumbuhnya hibridoma⁽¹³⁾. Penambahan *feeder system* terbukti menaikkan frekuensi sel limpa pembentuk klon dan frekuensi terbentuknya klon yang membuat antibodi setelah fusi (**Tabel 3**)⁽¹³⁾.

Tabel 3. Efek berbagai Feeder system pada hibridoma

Stimulator	Jumlah sumur biakan (jumlah fusi)	% jumlah biakan membentuk klon	Sumur dengan klon Klon Ab (+)		
			Frekuensi sel limps	% jumlah biakan membentuk klon	Frekuensi set limps
CS	384 (4)	65	1.05	12	1.3
LPS + D x S	384 (4)	99	4.61	33	4.0
p. Makrofag	384 (4)	98	3.91	42	5.4
S	288 (3)	99	4.61	34	4.2
CA	384 (4)	99	4.61	33	4.0

Keterangan :

- FCS = fetal calf serum
- LPS + D x S = lipopolisakaridu + dextran cuffat
- HECS = supernatan biakan endotel, manusia
- HUCA = serum darah tali pusat manusia

KESIMPULAN

Hibridoma merupakan fusi sel limfosit B dengan sel mieloma, yang dapat dibiakkan terus menerus. Karena hibridoma sel limfosit B tetap mempertahankan ekspresi gen imunoglobulin maka dimanfaatkan untuk membuat antibodi monoklonal. Frekuensi timbulnya hibrid setelah fusi sangat rendah, karena itu pengembangannya banyak diarahkan untuk menaikkan frekuensi fusi dan mendapatkan klon hidup secara maksimal.

Cara imunisasi konvensional memberi hasil cukup baik, tetapi cara imunisasi sekali suntik intratimpa dan *in vitro* memberi hasil lebih baik, lebih hemat antigen serta waktunya lebih singkat, bahkan imunisasi *in vitro* membuka peluang dilakukannya imunisasi limfosit B manusia, dimana imunisasi *in vivo* tidak dapat dilakukan karena dibatasi etika.

Pilihan sel mieloma makin beragam, baik spesies (mencit, tikus, manusia) maupun sifatnya, makin ideal untuk membuat antibodi monoklonal dengan dikembangkannya galur sel mieloma yang tidak membentuk rantai imunoglobulin. Medium dasar ditambah FCS (*fetal calf serum*) secara umum cukup baik, tetapi FCS merupakan hambatan karena harganya mahal, sulit didapatkan serta hasilnya bervariasi. Karena itu dikembangkan medium tanpa serum sehingga penelitian yang perlu keadaan tanpa serum dapat dilakukan dan biaya pemeliharaan sd dalam skala besar akan lebih murah.

Untuk mendorong timbulnya fusi sel banyak digunakan *polyethyleneglycol* (PEG) yang mudah didapat dan cukup efektif. Pengembangan dilakukan untuk memperbaiki frekuensi fusi dengan menambahkan DMSO bersama PEG dan penggunaan medan listrik. Penambahan bermacam-macam *feeder system*, terbukti dapat mendorong penumbuhan hibridoma.

KEPUSTAKAAN

1. Abba.s AK, Lichtman AH, Parker IS. (eds). Cellular and Molecular Immunology. New York: WB. Saunders Co. 1991.
2. Mason DY, Cordell JL, Pulford KAF. Production of Monoclonal Antibodies for Immunocytochemical Use. Dalam Techniques in Immunocytochemistry. ed. W.R. Bullock, Vol. 2. London: Academic Press 1983: hal. 175.-180.
3. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495–97.
4. Di VT, Morrison SL. Chimeric antibodies. Biotechniques. 1986; 4(3): 217–20.
5. Cotton RGH, Milstein C. Fusion of Two Immunoglobulin-producing Myeloma cells. Nature 1973; 244: 42–3.
6. Winter G, Harris WI. Humanized antibodies. Immunology Today 1993; 14: 243–46.
7. Waldman H, Colbold S. The use of monoclonal antibodies to achieve immunological tolerance. Immunology Today 1993; 14: 247–51.
8. Vitetta ES, Thorpe PE, Uhr JW. Immunotoxins: Magic bullets or misguided missiles. Immunology Today 1993; 14: 252–59.
9. Harlow E, Lane ED. (eds). Antibodies A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Publ. 1988; hal 139–281.
10. Cuello AC, Milstein C, Galfre G. Preparation and Application of Monoclonal Antibodies for Immunohistochemistry and Immunocytochemistry. Dalam Methods in the Neurosciences. IBRO handbook series. 1983: Vol. 2. hal. 215–223.
11. Galfre G, Milstein C. Preparation of Monoclonal Antibodies : Strategies and Procedures. Paper presented at WHO training course. Singapore. 1981.
12. Kearney IF. Hybridomas and Monoclonal Antibodies. Dalam Fundamental Immunology. ed. W.E. Paul. New York: Raven Press. 4th ed. 1986: hal

751-754.

13. Westerwoudt Ri. Factors Affecting Production of Monoclonal Antibodies. Dalam Methods in Enzymology, ed. J.J. Lanone, H.V. Vunakis, Vol. 121. Orlando: Academic Press. 1986; hal. 3-18.
14. Spitz M. "Single-Shot" Intrasplenic Immunization for the Production of Monoclonal Antibodies. Dalam Methods in Enzymology, ed. J.J. Lanone, H.V. Vunakis, Vol. 121. Orlando: Academic Press. 1986; hal. 33-41.
15. Reading CL. In Vitro Immunization for the Production of Antigen-Specific Lymphocyte Hybridomas. Dalam Methods in Enzymology, ed. J.J. Lanone, H.V. Vunakis, Vol. 121. Orlando: Academic Press. 1986; hal. 19-27.
16. Boss BD. An Improved In Vitro Immunization Procedure for the Production of Monoclonal Antibodies. Dalam Methods in Enzymology, ed. J.J. Lanone, H.V. Vunakis, Vol. 121. Orlando: Academic Press. 1986; hal. 27-33.
17. Kennett RH. Cell fusion. Dalam Methods in Enzymology. ed. W.B. Jakoby. Vol. LVIII. Orlando: Academic Press. 1979; hal. 345-59.
18. Hurrell JGR. Monoclonal Hybridoma Antibodies : Techniques and Applications. Boca Raton: CRC Press Inc. 1985; 4-29.
19. Olsson L, Kaplan HS. Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980; 44: 5429-31.
20. Shulman M, Wilde CD, Kohler. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature. 1978; 276: 269-70.
21. Kovar J, Franek F. Serum-Free Medium for Hybridoma and Parental Myeloma Cell Cultivation. Dalam Methods in Enzymology, ed. J.J. Lanone, H.V. Vunakis, Vol. 121. Orlando: Academic Press. 1986; hal. 277-92.
22. Kawamoto T, Sato JD, McClure DB, SatoGH. Serum-Free Medium for the Growth of NS-1 Mouse Myeloma Cells and the Isolation of NS-1 Hybridomas. Dalam Methods in Enzymology, ed. J.J. Lanone, H.V. Vunakis, Vol. 121. Orlando: Academic Press. 1986; hal. 266-277.
23. Mourik PV, Zeijemaker WP. Improved Hybridoma Technology: Spleen Cell Separation and Soluble Growth Factors. Dalam Methods in Enzymology, ed. J.J. Lanone, H.V. Vunakis, Vol. 121. Orlando: Academic Press. 1986; hal. 174-175.
24. Joklik WK, Willett HP, Amos DB. Zinsser Microbiology. New York: Appleton-Century-Croft 18th. ed. 1984; hal. 895-896.
25. Lane RD, Crissman RS, Ginn S. High Efficiency Fusion Procedure for Producing Monoclonal Antibodies against Weak Immunogen. Dalam Methods in Enzymology, ed. J.J. Lanone, H.V. Vunakis, Vol. 121. Orlando: Academic Press. 1986; hal. 183-184.

