

703
Mk.



LAPORAN PENELITIAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2004

**KARAKTERISASI CELL LINE UDANG WINDU (PENAEUS
MONODON), SUATU UPAYA MENGATASI KERUGIAN
INDUSTRI UDANG WINDU AKIBAT SERANGAN WHITE
SPOT BACULLOVIRUS**

Peneliti:

Ir. Endang Dewi Masithah, MP.
Dr. Hari Suprpto, M.Agr., Ir.
Juni Triastuti, M.Si., S.Pi.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Penelitian Pengembangan Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 002/XXIII/1/--/2004 Tanggal 1 Januari 2004
Kontrak Nomor : 73/P2IPT/DPPM/PID/III/2004
Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 11.

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2004



**LAPORAN PENELITIAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2004**

**KARAKTERISASI CELL LINE UDANG WINDU (PENAEUS
MONODON), SUATU UPAYA MENGATASI KERUGIAN
INDUSTRI UDANG WINDU AKIBAT SERANGAN WHITE
SPOT BACULLOVIRUS**

Peneliti:

**Ir. Endang Dewi Masithah, MP.
Dr. Hari Suprpto, M.Agr., Ir.
Juni Triastuti, M.Si., S.Pi.**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Penelitian Pengembangan Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 002/XXIII/1/--/2004 Tanggal 1 Januari 2004
Kontrak Nomor : 73/P2IPT/DPPM/PID/III/2004
Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 11.

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2004



IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi(5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | Pembangunan (5995719) |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | 10. Puslit / Kesehatan Repro- |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | duksi |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 — Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246

E-mail: Ipunair@rad.net.id — http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR

1. a. Judul Penelitian	: Karakterisasi Cell Line Udang Windu (<i>Penaeus monodon</i>), Suatu Upaya Mengatasi Kerugian Industri Udang Windu Akibat Serangan White Spot Bacullovirus
b. Macam Penelitian	: (V) Fundamental () Terapan () Pengembangan () Institusional
2. Kepala Proyek Penelitian	:
a. Nama	: Endang Dewi Masithah, MP., Ir.
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Gol./NIP	: Penata Muda Tk I / IIIB / 132 158 476
d. Jabatan Sekarang	: Lektor
e. Jurusan/Fakultas	: Anatomi Veteriner / Kedokteran Hewan
f. Universitas	: Airlangga
g. Bidang ilmu yang diteliti	: Budidaya Perairan
3. Jumlah Tim Peneliti	: 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian	: Lab. Fertilisasi In Vitro dan Lab. Budidaya Perairan Universitas Airlangga
5. Kerjasama dengan institusi lain :	:
a. Nama institusi	: Tidak Ada
b. Alamat	: -
6. Jangka Waktu Penelitian	: 6 (enam) bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 15.000.000,- (Lima Belas Juta Rupiah)

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan,

Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh
NIP. 130 687 297

Surabaya, 30 September 2004
Kepala Proyek Penelitian,

Endang Dewi Masithah, MP., Ir
NIP. 132 158 476



Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS., Drh
NIP. 130 701 125

RINGKASAN

Karakterisasi *Cell Line* Udang Windu (*Penaeus monodon*), Suatu Upaya Mengatasi Kerugian Industri Udang Windu Akibat Serangan White Spot Bacullovirus

(Endang Dewi Masithah, Hari Suprpto dan Juni Triastuti, 2004, 32 halaman)

Penelitian ini bertujuan untuk karakterisasi awal terhadap kultur jaringan (*cell line*) udang windu (*Penaeus monodon*). Manfaat penelitian ini diharapkan dapat menjadi penunjang bagi penelitian tentang virus udang, seperti pola penularan, penyebaran inang, pathogenitas ketahanan di alam serta pengembangan ke arah pencegahan. Manfaat lebih lanjut diharapkan dapat dilakukan pencegahan terhadap penyakit ikan khususnya virus sehingga dapat mengatasi kerugian akibat serangan virus terhadap ikan. Selain itu, informasi tentang sifat kultur jairngan udang windu akan dapat menambah khasanah keilmuan.

Pada penelitian ini digunakan larva udang windu berukuran PL-12. Tahap penelitian yang dilakukan adalah kultur jaringan primer, sub kultur jaringan udang windu, pembuatan *cell line*. penghitungan sel, pewarnaan serta penyimpanan beku *cell line*. Medium yang digunakan adalah M16, TCM dan MEM.

Hasil penelitian didapatkan pertumbuhan *cell line* udang windu yang baik pada medium TCM dengan kepadatan sel rata-rata 35×10^4 sel/ml pada kultur primer dan 30 sel /ml pada sub kultur.

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Kontrak Nomor : 73/P21PT/DPPM/PID/III/2004, Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas. No Urut 11

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) CELL LINE, EFFORT TO OVERCOME THE FISHERIES INDUSTRY FAILURE

Endang Dewi Masithah, Hari Suprpto and Juni Triastuti

The aim of this research was to production the tissue culture of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and analysis their characteristic. It's hope can be used to research about fish virus as : the transmission system, host spearding, resistance pathogenity and developing in prevention of disease, especially caused the virus. Furthermore, it's can be used to carry out the diseases prevention in fish culture. Besides of them, the information about characteristic of black tiger shrimp tissue culture was can be increase the science.

Black tiger shrimp larvae was sliced to be surgery. Furthermore, they were cultured in medium M16, TCM and MEM with serum, penicillin and streptomycine added. Some of passage to black tiger shrimp larvae were carried out as far as formed the cell line. Analysis of their characteristic carried out with apply the colour (Giemsa). Counting the cell density with haemocytometer.

The result shows that the black tiger shrimp was developt in the TCM medium with 35×10^4 cell/ml at primary culture and 30×10^4 cell /ml at sub culture.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga pelaksanaan penelitian dan penyusunan laporan penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Ditjen Dikti Depdiknas, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga serta Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan ijin untuk melaksanakan penelitian ini. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada Kepala Laboratorium Fertilisasi In Vitro dan Kepala Laboratorium Budidaya Perairan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin penggunaan fasilitas penelitian serta kepada berbagai pihak yang telah banyak membantu hingga penelitian ini terlaksana dengan lancar.

Kritik dan saran penulis harapkan guna perbaikan laporan ini. Semoga laporan penelitian ini bermanfaat bagi semua.

Surabaya, September 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMARY	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Kultur Sel	3
2.2 Karakterisasi Sel	6
2.3 Penyimpanan Beku	7
2.4 Karakteristik Whitespot Baculovirus (WSBV).....	8
III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1 Tujuan Penelitian	10
3.2 Manfaat Penelitian	10
IV MATERI DAN METODE	11
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
4.2 Materi Penelitian	11
4.3 Metode Penelitian	12
V HASIL DAN PEMBAHASAN	19
5.1 Pemilihan Sel Asal	19
5.2 kultur Sel	19
5.3 Penghitungan Sel	24
5.4 Penyimpanan Beku (Vitrifikasi).....	26

VI	KESIMPULAN DAN SARAN	29
	6.1 Kesimpulan	29
	6.2 Saran	29
	DAFTAR PUSTAKA	30
	LAMPIRAN	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
4.1	Tahap Pemilihan Medium yang Sesuai untuk Kultur.....	17
4.2	Tahap karakterisasi Cell line Udang Windu.....	18
5.1	Kondisi Pertumbuhan Sel Udang Windu pada Hari 1 Sampai 3	23
5.2	Sel yang Telah Mengalami Tripsinasi pada Kotak Hitung Hemositometer	25
5.3	Kontaminasi Oleh Protozoa dan Jamur.....	26
5.4	Kondisi Sel Pasca Pembekuan (Setelah Thawing).....	27

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1	Kultur Sel dari Leukosit dan Jaringan Hematopoetics Ikan.....	3
2.2	Karakteristik Media Kultur Sel yang Biasa Digunakan.....	5
5.1	Hasil Penghitungan Kepadatan Sel	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1.	Prosedur Penghitungan Sel.....	33
2.	Prosedur Preservasi Sel.....	35

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Selama dekade terakhir, industri perikanan telah mengalami kerugian luar biasa akibat serangan penyakit. Sebagai gambaran, kerugian industri perikanan nasional yang diakibatkan oleh penyakit dari tahun 1989 – 1992 adalah 248 juta USD per tahun. Enam tahun kemudian, pada tahun 1998 diperkirakan meningkat menjadi 318 juta USD per tahun. Selain menyebabkan kerugian devisa, bangkrutnya industri perikanan juga menyebabkan pengangguran sebanyak 234.773 orang di tambak dan 2.590.211 orang di laut dan perairan terbuka (Pumomo, 1998)

Kematian udang windu secara besar-besaran banyak diakibatkan oleh virus. Penyakit ini menyebar di beberapa negara Asia misalnya Thailand mulai tahun 1991 (Boonyaratpalin, 1993) dan Taiwan pada tahun yang sama (Wang, 1996). Dalam waktu 3-5 hari pasca penyerangan virus, populasi udang yang mati bisa mencapai 100%.

Berbagai upaya penelitian tentang penyakit ini sudah banyak dilakukan, namun penelitian tentang virus pada udang di Indonesia masih tertinggal jauh. Kekurangan kultur jaringan udang windu masih terasa merupakan kendala. Kultur jaringan diperlukan untuk penelitian virus yang menyerang udang windu. Pembuatan kultur jaringan benur udang windu dapat membuka arah pada penelitian selanjutnya, terutama untuk mengatasi permasalahan industri udang windu akibat serangan virus.

1.2 Rumusan Masalah

Serangan virus pada udang windu yang merupakan komoditi perikanan unggulan telah mewabah dan menyebabkan kerugian sangat besar. Upaya penelitian untuk mengatasinya masih banyak menemui kendala mengingat masih banyaknya keterbatasan termasuk pengetahuan dasar yang belum memadai.

Kultur jaringan udang windu diperlukan untuk berbagai penelitian yang mengarah pada upaya untuk menanggulangi serangan virus serta kerugian yang diakibatkan. Oleh karena itu, penelitian tentang upaya pembuatan kultur jaringan udang windu perlu dimulai sebagai langkah awal untuk penelitian selanjutnya, serta melengkapi penelitian ke arah pencegahan penyakit yang sudah dilakukan.

Berdasar latar belakang di atas, permasalahan dapat dirumuskan sebagai berikut :

- Apakah cell line udang windu dapat ditumbuhkan pada medium tertentu ?
- Medium apakah yang sesuai untuk pertumbuhan cell line udang windu ?
- Bagaimana kondisi pertumbuhan cell line udang windu ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kultur Sel

Sejak Wolf dan Quimby (1962) sukses megkultur jaringan ikan pertama kali, sampai sekarang kurang lebih sudah lebih dari 80 kultur jaringan ikan (*fish cell line*) telah dilakukan. Sejumlah kultur jaringan dari berbagai macam ikan/udang yang sering dipakai pada penelitian di USA adalah Brown Bullhead, Bluegill Fry, Goldfish, Rainbow Trout. (Blake, 1995). Berikut pada Tabel 2.1 disajikan beberapa kultur jaringan ikan yang telah dilakukan.

Tabel 2.1. Kultur sel dari leukosit dan jaringan hematopoeietics ikan

Spesies ikan	Designation	Jaringan asal	Sumber Pustaka
Ikan Air tawar Common carp, <i>C. carpio</i> Channel catfish, <i>I. punctatus</i> Rainbow trout, <i>O. mykiss</i>	CLC C24 T cell line T cell clone NG	Peripheral blood Peripheral blood Peripheral blood Peripheral blood Spleen	Faisal & Ahne, 1990 Vallejo et al, 1991 Lin et al, 1992 Morimoto et al, 1990
Ikan Air laut Spot, <i>L. xanthurus</i> Black porgy, <i>A. schlegelii</i> Japanese eel, <i>A. japonica</i> Silver Perch, <i>B. chysura</i>	SMS BPS-1 BPS-4 BPK NG NG	Spleen Spleen Kidney Kidney Spleen	Faisal et al., 1992 Tung et al., 1991 Tung et al., 1991 Chen et al., 1982 Ellender et al., 1979

Kultur jaringan ini sangat penting untuk penelitian virus yang diisolasi dari ikan atau udang serta untuk penelitian biologi sel. Kultur jaringan adalah media yang sangat penting untuk penelitian beberapa disiplin ilmu biologi. Selain itu juga penting untuk imunologi karena beberapa penemuan misalnya *phenotype*

marker dan *interleukins* dibuat dengan kultur jaringan dari sel leukocytic (Silverstein, 1989). Selain hal tersebut, kultur jaringan leukosit dapat digunakan untuk model *in vitro* tentang studi mekanisme pertahanan diri.

Kultur jaringan dari sirip ikan *crussian carp* dapat digunakan untuk studi *adaptive transfer* dan *graft rejection* (Hasegawa *et al.*, 1997). Selain itu dapat juga digunakan untuk studi tentang *T cell mediated immunity*, karena *inbreed animal* atau kultur jaringan yang didapatkan dari *crussian carp* sangat penting. Hal ini disebabkan *antigen recognition* oleh T lymphocyte secara *genetic restricted* dengan *major histocompatibility complex* (MHC). Selain itu sangat berguna untuk mendeteksi *T cell mediated immunity*. *Primary cultures* bisa didapatkan dari embrio atau binatang dewasa. Sel yang didapatkan dari embrio cepat membelah dan gampang tumbuh, mudah mengalami disagregasi dan mitosis. Sel yang didapat dari ayam dewasa lebih sulit disagregasi dan tumbuhnya lambat.

Ada berbagai teknik yang dikembangkan untuk isolasi kultur jaringan dari beberapa organ dan dapat diklasifikasikan menjadi :

- a. metode mekanis
- b. metode kimia
- c. digestif enzim

Biasanya kombinasi dari berbagai dari berbagai teknik tersebut dilakukan untuk mendapatkan hasil yang lebih memuaskan. Metode mekanis memiliki kelemahan karena sel menjadi mudah rusak, sehingga biasanya dipakai pada tahap awal (Burleson, 1992).

Serum sering ditambahkan ke dalam medium sebagai sumber faktor pertumbuhan, juga mungkin sebagai sumber kelainan. Misalnya *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) merupakan kontaminan dari fetal bovine serum, yang bisa dicegah dengan pemanasan secara parsial dapat mengurangi virus. Beberapa macam medium yang sering digunakan untuk kultur jaringan dapat dilihat pada Tabel 2.2. Medium yang digunakan untuk kultur jaringan terdiri dari beberapa macam campuran dari garam, asam amino, karbohidrat, hormon dan faktor pertumbuhan untuk reproduksi secara ekstraselluler (Blake, 1999). Masithah dan Suprpto (2002) telah mengkultur *cell line* sirip ikan kakap merah dan mendapatkan bahwa pertumbuhan sel mulai tampak pada hari ke empat

Tabel 2.2. Karakteristik Media Kultur Sel yang Biasa Digunakan

Medium	Tahun dikembangkan	Komponen Khas
Medium 199	1950	- Purine (adenine, guanine, thymine, uracil, xanthine, hypoxantine) - Fat soluble components
BME	1955	
EMEM	1959	- vitamin 2 – 5 kali lebih banyak dari BME - amino acids lebih banyak dari BME
Alpha MEM	1971	- vitamin - sodium pyruvat - ascorbic acid - lipoic acid - non essential amino acid - D-biotin
DMEM	1969	- macam dan jumlah amino acid lebih besar dari MEM - vitamin 4 kali lebih banyak dari MEM - iron (ferric nitrate)
DMEM with high glucose	Unkown	- konsentrasi glucosa paling banyak
NCTC 109	1956	- tween 80 - nucleic acid derivation - vitamin - coenzymes (DPN, CoA, TPN, FAD, UTP dan TPP) - reducing agent

NCTC 135	1964	sama dengan NCTC 109, tanpa L-cystine
MeCoys 5A	1956	asparagine, glucose, amino acid
RPMI	1964	
LeibovitzL-15	1963	<ul style="list-style-type: none"> - arginine, cysteine dan histidine - tyrosine konsentrasi tinggi - galactose - NaHCO₃

2.2 Karakterisasi Sel

Kultur jaringan untuk kepentingan khusus seperti produksi virus dan enzim perlu dilakukan identifikasi dan karakterisasi *cell line* dengan ketat. Kepentingan karakterisasi *cell line* yang utama adalah untuk mengetahui korelasi antara kultur dan jaringan original, monitoring dan memantau ketidakstabilan serta variasi *cell line* yang mungkin muncul, evaluasi terhadap kemungkinan kontaminasi silang serta identifikasi sub line yang terseleksi atau *cell line* hibrida (Castano, *et al.*, 2004)

Teknik paling mudah dan dapat dilakukan secara langsung untuk identifikasi sel adalah morfologi. Identifikasi berdasarkan morfologi lebih sering dikaitkan dengan *plasticity* morfologi sel yang banyak dipengaruhi kondisi kultur, perubahan substrat dan komposisi medium (Djuwita, 2002)

Karakterisasi kultur sel dilakukan dengan pengamatan langsung di bawah mikroskop yang memberikan gambaran umum dari morfologi sel serta *plasticity*, granulasi dan vacuolisasi sel. Sel yang tidak sehat sering terlihat adanya granulasi dan vacuolisasi. Oleh karena itu pemotretan perlu dilakukan sebagai catatan bila terjadi perubahan morfologi. Pemotretan terhadap hasil pewarnaan juga perlu dilakukan untuk mengetahui morfologi secara kontras (Boediono, 2002)

2.3 Penyimpanan Beku

Pada awalnya penyimpanan beku dipandang hanya akan memperpanjang proses suatu rangkaian kegiatan dalam bioteknologi. Apalagi, dalam proses penyimpanan beku perlu ditentukan pengaturan komposisi zat pelindung sel (krioprotektan) yang membutuhkan perhatian tersendiri. Namun teknik penyimpanan beku dewasa ini semakin berkembang seiring dengan semakin berkembangnya pemikiran manusia dalam bioteknologi untuk mengatasi kebutuhannya. Teknik penyimpanan beku antara lain diterapkan pada penyimpanan sel telur, penyimpanan sel sperma untuk keperluan inseminasi buatan sampai penyediaan embrio untuk keperluan pengaturan stoking populasi di panti-panti pembenihan ikan dan peternakan (Supriatna dan Pasaribu, 1998).

Salah satu zat yang digunakan dalam pembekuan sel adalah etylen glycoll. Zat ini merupakan zat anti pembekuan yang bersifat intraseluler, yang dapat menembus membran sel dan menggantikan air yang keluar meninggalkan sel. Zat anti pembekuan yang bersifat ekstraseluler, yang sering digunakan adalah sukrosa (Djuwita, 2002)

Kultur jaringan dapat disimpan pada suhu yang rendah agar metabolismenya berkurang dan memerlukan sedikit *tissue passage*. Pada suhu yang sangat dingin, proses metabolisme akan terhenti. Sel dapat disimpan pada suhu -70°C dengan campuran glycerol tetapi jika sampai bertahun-tahun akan kehilangan viabilitasnya. Prosedur utama penyimpanan adalah pendinginan pada suhu -196°C dengan nitrogen cair. Metode ini tidak dapat merusak sel walaupun disimpan bertahun-tahun. Sel yang berbeda akan memberikan respon yang

berbeda terhadap perubahan pH, denaturasi protein, dehidrasi dan perubahan konsentrasi elektrolit (Freshsney, 1998).

Hytell (1997) mendapatkan viabilitas 80-90 % dari sel yang dikultur pada pendinginan -180°C . Widjiati (2003) mendapatkan tidak adanya perbedaan nyata dalam lama pemaparan bahan kriopreservasi (40% ethylen glicol dan 0,3 M sukrosa) terhadap viabilitas sel yang dikultur.

2.4 Karakteristik Whitespot Baculovirus (WSBV)

Dewasa ini WSBV bersamaan dengan Yellowhead Virus (YHV) berjangkit bersamaan di tambak Propinsi Jawa Timur. Penyakit ini menyebar di beberapa negara Asia misalnya di Thailand mulai tahun 1991 (Boonyaratpalin, 1993) dan Taiwan pada tahun yang sama (Wang, 1996). Udang yang terserang tubuhnya berbintik putih, ada di dalam karapas. Gejala klinis yang sering dijumpai adalah erratic swimming dan berenang di tepi kolam. Pada hari selanjutnya udang yang terserang menjadi 50 – 60 % dari total populasi dan mortalitas bisa mencapai 100% dalam waktu 3 – 5 hari. Udang akan tumbuh dengan cepat sekali dan makan melebihi normal, kemudian akan berhentio makan tiba-tiba dan dalam waktu satu atau dua hari udang akan mati mengambang di sekitar tepi kolam. Jika karapas diangkat, akan terdapat bintik putih yang homogen.

Pengamatan histologi dengan pengecatan H&E dari udang yang sakit menunjukkan prominent eosinophilic sampai pale basophilic (HE), Feulgen positif intranuclear onclusion bodies pada hyperthrophied nucleus. WSBV adalah dsDNA virus, berbentuk batang dan cytoplasmic. Inang utama adalah *P. monodon* tetapi juga menyerang beberapa udang air tawar yang diduga sebagai inang

perantara yaitu *Palaemon styliferus*, *Acetes sp.* Sedangkan *Penaeus merguensis* dan *Metapenaeus ensis* diketahui resisten terhadap WSBV (Liao, et. al., 1992)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk pembuatan kultur jaringan (*cell line*) dari udang windu dan analisis karakteristiknya.

3.2 Manfaat Penelitian

Kultur jaringan ini diharapkan bermanfaat untuk dapat melakukan penelitian tentang virus udang windu selanjutnya, seperti pola penularan, penyebaran, inang, patogenitas, ketahanan di alam serta pengembangan ke arah pencegahan. Manfaat lebih lanjut diharapkan dapat diterapkan untuk melakukan pencegahan terhadap serangan virus udang. Diharapkan hal ini dapat mengatasi kerugian akibat serangan virus terhadap udang. Selain itu informasi tentang sifat kultur sel udang windu serta morfologi selnya dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan.

BAB IV

MATERI DAN METODE

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di laboratorium Fertilisasi In Vitro dan Laboratorium Budidaya Perikanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, mulai bulan Juli sampai dengan Agustus 2004.

4.2 Materi Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- benur udang windu
- pakan benur untuk pemeliharaan selama penelitian
- serum 20 %
- Media M16
- PBS
- BSA
- Giemsa
- Micropipet otomatis
- Platewell
- Immersion oil
- Ethanol
- Syringe
- Substrat plastik
- Sterptomycin
- Penicillin
- Trypsin
- NaCl
- NaHPO₄
- KH₂PO₄
- Film

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- Bak penampung udang
- Gunting mikro
- Cawan petri
- Centrifuge
- Botol plastik Falcon,
- mikroskop Inverted

- Freezer
- Pinset
- Pipet pasteur
- Inkubator CO₂
- Tabung reaksi

4.3 Metoda Penelitian

4.3.1 Persiapan Penelitian

Sebelum dilakukan penelitian, benur udang dipelihara pada kondisi normal selama 1 minggu untuk menghindari stress. Lingkungan dikondisikan sedemikian rupa, sehingga berada dalam keadaan optimum, seperti pemberian aerasi untuk menjaga kandungan oksigen terlarut, heater untuk menjaga kestabilan suhu dan makanan berkualitas baik. Sebagai asal sel, dipilih benur udang yang sehat dan gesit.

4.3.2 Isolasi Sel Somatik

Tujuan : Untuk mendapatkan kultur jaringan yang tersusun atas sel-sel somatik dengan viabilitas yang tinggi.

- Benur udang yang telah diadaptasi diambil jaringan tubuhnya dengan cara memotong-motong menggunakan gunting, menjadi bagian-bagian kecil (+ 1 mm²)
- Dimasukkan dalam tabung berisi 50 ml fosfat buffer saline (PBS) untuk dilakukan pencucian.
- Jaringan yang telah dicuci dipindahkan ke dalam petridish baru yang berisi PBS selama 10 menit.

4.3.3 Kultur Primer dengan Berbagai Medium

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui medium yang paling sesuai untuk kultur primer sel somatik udang windu.

A. Kultur Primer

- jaringan somatik dipindahkan ke dalam petridish baru berisi PBS steril.
- lemak dan bahan-bahan nekrotik dibuang.
- potongan jaringan dipindahkan ke dalam tabung centrifuge ukuran 15 ml, dibiarkan sampai mengendap.
- cuci potongan jaringan 3 kali dengan cara mengendapkan dan membuang supernatan.
- 20 – 30 potongan jaringan selanjutnya dimasukkan dalam botol kultur / petridish dan diberi medium.
- Medium kultur yang digunakan ada 3 macam, yaitu :
 1. TCM
 2. MEM
 3. M16
- Selanjutnya dikultur dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 36,5°C selama 24 jam

B. Pergantian Medium

- Setelah 24 jam kultur, dilakukan pergantian medium dengan cara membuang medium lama secara hati-hati dengan pipet Pasteur
- Masing-masing medium diganti dengan medium yang sama.
- Tambahkan medium segar dalam volume sama

- Selanjutnya dilakukan kultur kembali dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 36,5°C selama 24 jam
- Pertumbuhan sel jaringan diamati
- Medium yang memberikan hasil pertumbuhan jaringan paling baik, kemudian digunakan pada langkah penelitian selanjutnya.
- Dari tahapan penelitian ini diperoleh medium TCM memberikan hasil paling baik, disusul MEM dan M16. Untuk tahapan selanjutnya dipilih medium MEM dan TCM dalam kultur sel udang windu.

4.3.4 Kultur Primer dengan Medium Terpilih

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan kultur primer jaringan udang windu pada medium yang paling sesuai.

A. Kultur Primer

- Isolasi sel somatik dilakukan dengan memilih benur yang sehat sebagai sel asal. Selanjutnya dipotong-potong (+ 1 mm²) dan dicuci dengan PBS.
- jaringan somatik dipindahkan ke dalam petridish baru berisi PBS steril
- lemak dan bahan-bahan nekrotik dibuang
- potongan jaringan dipindahkan ke dalam tabung centrifuge ukuran 15 ml, dibiarkan sampai mengendap
- potongan jaringan dicuci 3 kali dengan cara mengendapkan dan membuang supernatan
- 20 – 30 potongan jaringan selanjutnya dimasukkan dalam botol kultur / petridish, yang sudah berisi medium MEM serta petridish lain yang berisi medium TCM
- Selanjutnya dikultur dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 36,5°C selama 24 jam

B. Pergantian Medium

- Setelah 24 jam kultur, dilakukan pergantian medium dengan cara membuang medium secara hati-hati dengan pipet Pasteur
- Medium segar ditambahkan dalam volume sama
- Selanjutnya dilakukan kultur kembali dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 36,5°C selama 24 jam
- Setelah sel konfluen, dilakukan tripsinasi untuk menghitung kepadatan sel dan pembedahan sub kultur

4.3.5 Tripsinasi dan Sub kultur / cell line

- kultur sel yang sudah mencapai keadaan konfluen dilakukan pergantian medium
- selanjutnya dilakukan pembilasan dengan cara menambah PBS pada satu sisi
- kemudian tambahkan larutan PBS yang mengandung 0,25% tripsin
- biarkan selama 5 – 10 detik namun jangan sampai perlekatan sel lepas
- tripsin dibuang dan inkubasi kembali dalam medium PBS sampai sel tampak terpisah
- Selanjutnya konsentrasi sel dihitung dengan menggunakan kamar hitung Neubauer atau haemocytometer
- Sel yang telah terpisah satu-persatu diambil sebagian dan dikultur kembali pada medium yang baru
- Diinkubasi pada CO₂ 5%, suhu 36,5°C selama 24 jam
- Pertumbuhan sel diamati dan dihitung kembali kepadatannya.

4.3.6 Staining/pewarnaan

- monolayer dicuci dengan PBS 3 kali dan sisakan 1 ml
- ditambahkan methanol perlahan-lahan sampai 50% dalam PBS
- buang dan ganti dengan anhydrous methanol
- warnai dengan Giemsa 5%

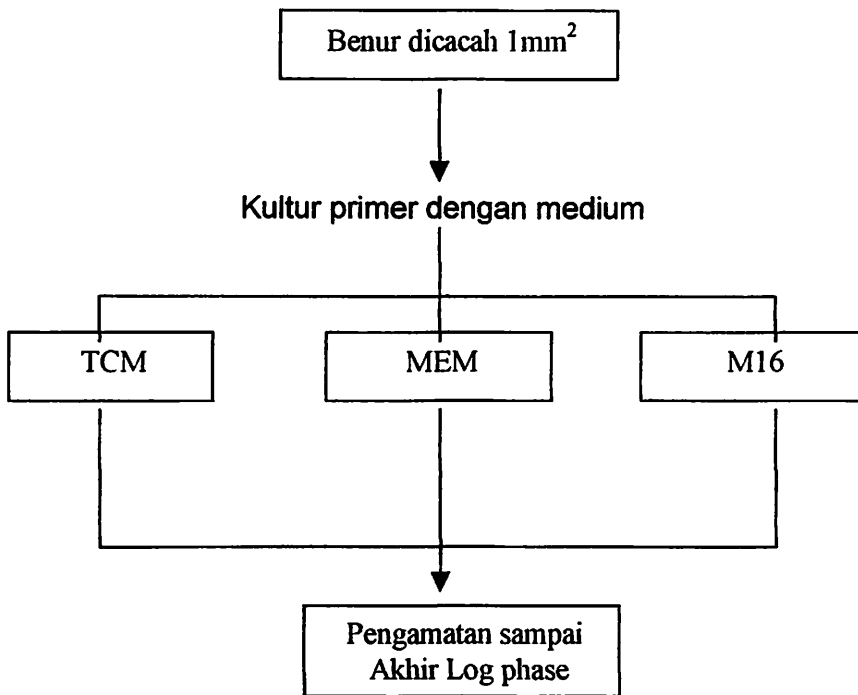
- cuci dengan air kran dan Diones Water pelan-pelan dengan pipet
- evaluasi morfologi / karakter sel dalam bentuk basah

4.3.7 Penyimpanan Beku (Vitrifikasi)

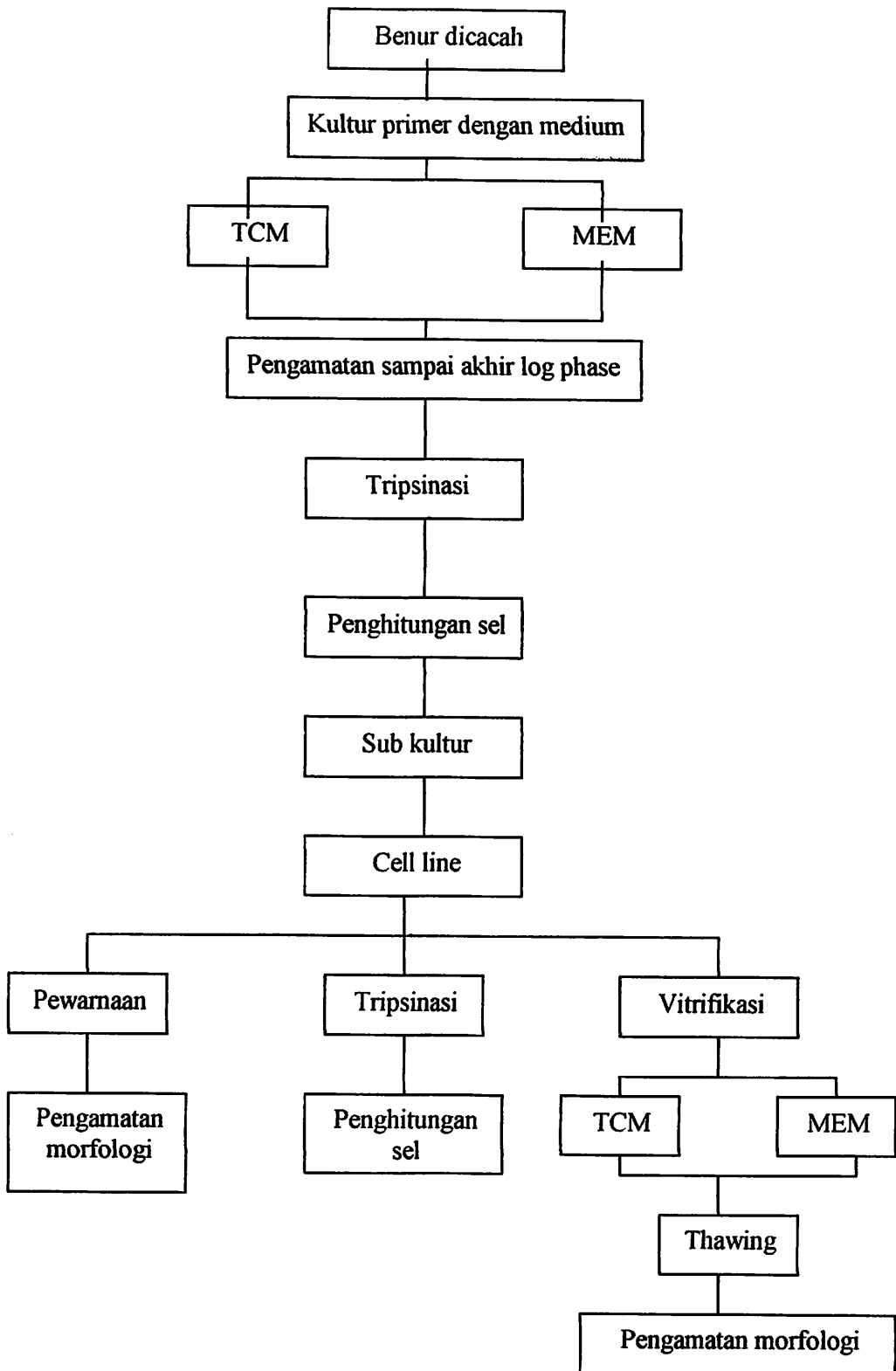
Tahap ini bertujuan untuk mengetahui efek penyimpanan beku dengan bahan krioprotektan pada berbagai medium

- medium yang digunakan pada tahap ini adalah TCM dan MEM
- cell line difiksasi
- perlakuan kriopervasi dengan pemaparan krioprotectan berupa 10% Ethylen glycol + 1 M Sukrosa.
- letakkan dalam ministraw dan diuapkan
- masukkan dalam nitrogen cair untuk penyimpanan beku (sediaan cell line) pada suhu -80°C
- Setelah 1 hari penyimpanan, sediaan cell line *dithawing* dan diamati kondisi selnya.

Diagram alur penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1 berikut ini :



Gambar 4.1 Tahap Pemilihan Medium yang Sesuai untuk Kultur



Gambar 4.2 Tahap karakterisasi cell line udang windu

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pemilihan Sel Asal

Sebagai sel asal untuk kultur dipilih benur yang sehat dan gesit. Hal ini dimaksudkan agar diperoleh sel dengan pertumbuhan yang baik. Pemilihan benur sebagai bahan penelitian, bukan udang dewasa, dimaksudkan agar :

- a. Diperoleh sel asal yang masih muda sehingga pertumbuhannya cepat.
- b. Lebih bebas dari kontaminan.

Pada penelitian pendahuluan telah dicoba menggunakan udang dewasa. Sebagai sel asal, dipisahkan sel hemolimph, daging, saluran pencernaan, sungut, kaki dan ekor. Walaupun sebelum kultur sudah dilakukan pencucian dan pemberian antibiotik pada medium kultur, namun masih saja terdapat kontaminan. Hal ini diduga karena udang dewasa sudah membutuhkan media hidup lebih luas dan pakan dari luar selama masa adaptasi. Apalagi udang cenderung hidup di dasar perairan, sehingga memungkinkan bertambahnya sumber kontaminan. Pada tahapan selanjutnya dipakai benur dengan pertimbangan lingkungan lebih mudah dikendalikan sehingga lebih bebas dari kontaminan. Air yang digunakan untuk adaptasi sudah disaring terlebih dahulu dan selama satu hari sebelum digunakan, benur sudah tidak diberi pakan.

5.2 Kultur Sel

Kultur primer menggunakan berbagai medium dimaksudkan untuk mencari medium yang paling sesuai untuk digunakan dalam kultur jaringan udang windu. Hal ini diperlukan sebab tidak semua medium cocok untuk kultur jaringan suatu

spesies organisme. Tiap spesies memiliki kesesuaian yang bisa berbeda dengan spesies lain untuk kultur jaringan. Tiap spesies memiliki komposisi spesifik susunan kimia selnya. Hal ini berpengaruh pada kebutuhan nutrisi dari sel untuk mempertahankan diri dan berkembang biak, sesuai dengan komposisi khas selnya. Parwadi (2004) memperoleh hasil yang berbeda terhadap pertumbuhan sel chinese hamster ovary dalam medium MEM dengan TCM.

Berdasarkan pengamatan kultur primer diperoleh hasil sebagai berikut :

- Hari pertama, belum menampakkan pertumbuhan yang berarti pada ketiga medium.
- Hari ke dua, medium MEM memberikan pertumbuhan lebih baik dibanding medium TCM dan M16.
- Hari ke tiga, medium TCM memberikan pertumbuhan lebih baik, disusul medium MEM dan M16. Namun pada medium TCM terdapat kontaminan berupa jamur dan protozoa.

Dibandingkan kultur jaringan sirip kakap merah yang pernah dilakukan Masithah, dan Suprpto (2002), pertumbuhan sel jaringan udang windu ini tergolong cepat. Pada kultur jaringan sirip ikan kakap merah dengan medium yang sama, pertumbuhan sel baru tampak setelah hari ke empat. Sedangkan sel benur udang windu ini sudah menampakkan pertumbuhan pada hari ke dua. Hal ini mungkin disebabkan sel asal yang digunakan pada penelitian ini masih muda yaitu dari benur PL 12 (usia 12 hari). Sedangkan kakap merah yang digunakan pada penelitian terdahulu sudah berukuran 300 gram (usia 3 - 4 bulan). Hal ini sesuai dengan pendapat Hasegawa *et al.* (1999), bahwa sebagai sel asal untuk

kultur primer dapat digunakan sel dari embrio maupun binatang dewasa, tetapi sel yang didapat dari embrio cepat membelah dan gampang tumbuh, mudah mengalami disagregasi dan mitosis. Sedangkan sel yang didapat dari ayam dewasa lebih sulit disagregasi dan tumbuhnya lambat. Boediono (2002) mendukung pernyataan tersebut bahwa fibroblas embrio sering digunakan sebagai materi kultur sel asal hewan karena sel tersebut dapat tumbuh dengan cepat pada kondisi in vitro dengan komposisi medium yang sesuai. Fahrudin (2002) semakin memperkuat pernyataan ini dengan menambahkan bahwa tingkat kesulitan untuk mendapatkan sel yang relatif mudah berproliferasi biasanya meningkat sejalan dengan meningkatnya umur hewan. Hal ini antara lain disebabkan terjadinya peningkatan bahan jaringan ikat fibrosa dan bahan ekstraselular.

Dibanding dengan tipe-tipe pertumbuhan sel yang lain secara umum, pertumbuhan sel udang pada penelitian ini tergolong cepat karena membutuhkan pergantian medium kurang dari 4 hari. Menurut Djuwita (2002), cell line yang pertumbuhannya cepat biasanya memerlukan pergantian medium tiap 4 hari dan subkultur sekali seminggu. Sedangkan cell line yang pertumbuhannya agak lambat memerlukan subkultur tiap 2,3 atau 4 minggu dan pergantian medium seminggu sekali.

Bila dibandingkan dengan penelitian pendahuluan yang menggunakan udang dewasa, sepertinya tidak terdapat perbedaan pertumbuhan. Keduanya nampak mulai tumbuh pada hari ke dua dengan kondisi hampir sama. Namun bila diamati lebih lanjut, sebenarnya sel benur udang lebih cepat pertumbuhannya dibanding udang dewasa. Hal ini disebabkan permukaan

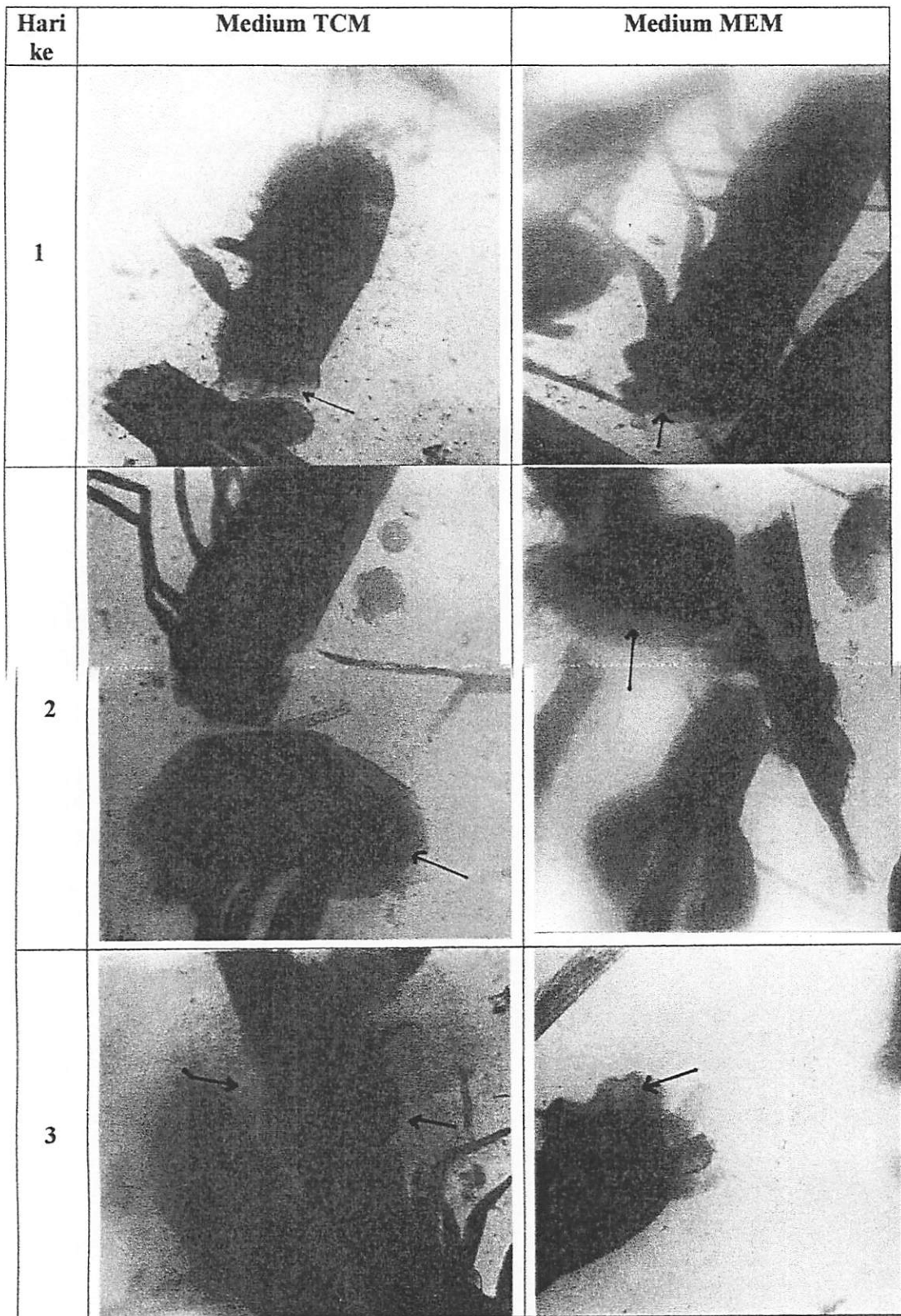
jaringan yang dapat tumbuh pada benur lebih sedikit, sebab benur tidak dikuliti. Sehingga permukaan lain, masih banyak tertutup kulit udang yang terdiri dari chitin. Sedangkan pada penggunaan udang dewasa, udang terlebih dahulu dikuliti sehingga seluruh permukaan jaringan mempunyai kesempatan sama untuk tumbuh.

Pada pengamatan hari ketiga, terlihat adanya kontaminan berupa jamur dan protozoa pada medium TCM. Kontaminan ini masih dapat tumbuh walaupun sudah dilakukan upaya pencegahan, yaitu penyaringan air untuk adaptasi benur, penghentian pemberian pakan menjelang digunakan untuk bahan penelitian serta pemberian antibiotik pada medium kultur. Hal ini dimungkinkan karena TCM merupakan medium yang memiliki komposisi paling lengkap dibanding MEM dan M16.

Secara keseluruhan, pertumbuhan *cell line* udang windu ini adalah sehat, tidak tampak adanya vakuolisasi ataupun granulasi pada kultur primer maupun sub kultur. Hal ini dimungkinkan karena kondisi pemeliharaan berada pada keadaan optimal. Inkubator berfungsi dengan baik, yaitu suhu stabil ($36,6^{\circ}\text{C}$) dan CO_2 stabil (5%).

Hasil kultur primer dapat dilihat pada gambar-gambar berikut ini :

Gambar 5.1 Kondisi Pertumbuhan Sel Udang Windu pada Hari 1 Sampai 3



Keterangan :

Tanda panah menunjukkan sel-sel yang tumbuh dari potongan jaringan tubuh udang.

5.3 Penghitungan Sel

Penghitungan sel dilakukan dengan menggunakan metode Hemositometer dan didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 5.1. Hasil Penghitungan Kepadatan Sel

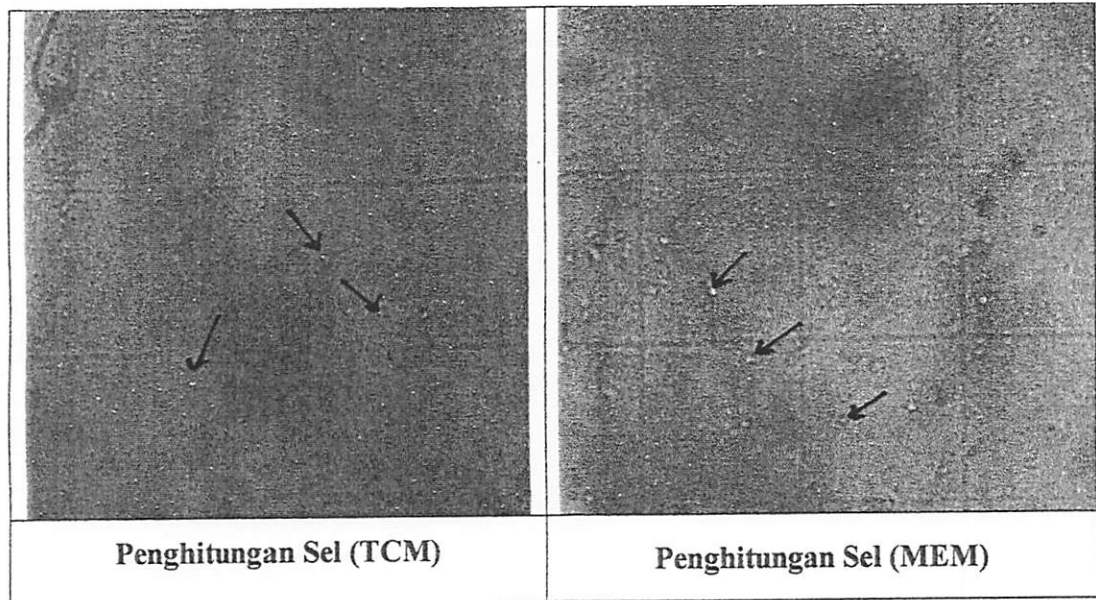
	Jumlah Sel (10^4 sel / ml)											
	Medium TCM						Medium MEM					
Ulangan	1	2	3	4	5	x	1	2	3	4	5	x
Kultur Primer	42	49	56	37	58	48,4	28	30	34	38	43	34,6
Sub Kultur	35	50	38	27	46	39,2	29	31	25	26	38	29,8

Keterangan :

Kepadatan sel yang dihitung dalam 1 kotak penghitungan kurang dari 100 sel, sehingga penghitungan dilakukan pada kotak 1 mm^2 yang lain.

Dari hasil penghitungan sel terlihat bahwa kultur sel menggunakan medium TCM memberikan hasil pertumbuhan sel lebih padat dibanding menggunakan medium MEM, baik pada kultur primer maupun pada sub kultur. Hal ini menunjukkan medium TCM lebih sesuai untuk pelaksanaan kultur sel udang dibanding medium MEM. Hasil penghitungan sel ini mendukung hasil pengamatan perkembangan pertumbuhan jaringan seperti terlihat pada foto. Walaupun pada awal perkembangan (hari pertama dan kedua), medium MEM terlihat memberikan hasil lebih baik, namun sebaliknya, pada hari selanjutnya medium TCM memberikan pertumbuhan lebih baik.

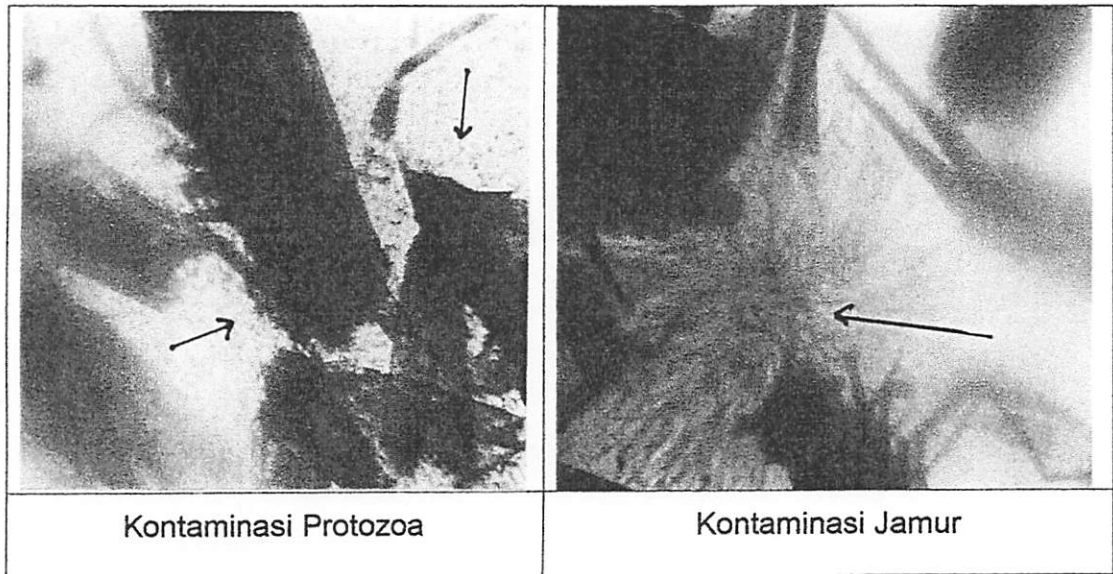
Selain itu pada hari keempat kultur, pada medium TCM terlihat mulai tumbuh kontaminan, baik berupa jamur maupun protozoa. Sedangkan pada medium MEM tidak terlihat. Menurut Djuwita (2002), medium yang lebih kompleks komposisinya, lebih rentan terhadap tumbuhnya kontaminan, karena medium ini lebih mudah memberikan daya dukung bagi tumbuhnya organisme.



Gambar 5.2 Sel yang Telah Mengalami Tripsinasi pada Kotak Hitung Hemositometer

Keterangan :

- Tanda panah menunjukkan butiran sel yang telah mengalami tripsinasi sehingga terpisah tiap sel.
- Bidang kotak-kotak adalah kotak hitung pada hemositometer



Gambar 5.3 Gambar Kontaminasi oleh Protozoa dan Jamur

Keterangan :

Tanda panah menunjukkan kontaminan oleh protozoa dan oleh jamur.

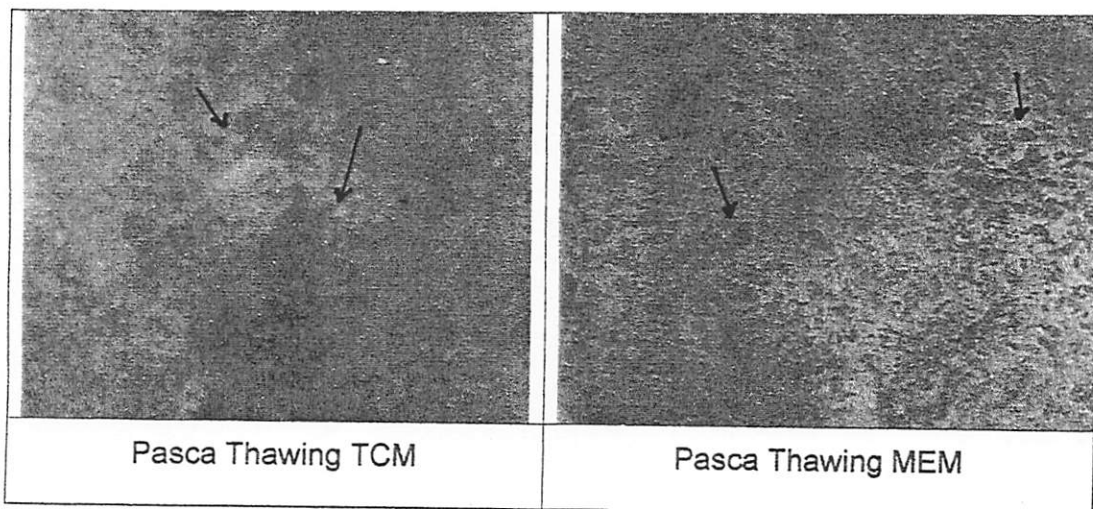
5.4 Penyimpanan Beku (Vitrifikasi)

Penyimpanan beku yang dilakukan menggunakan medium TCM dan MEM menunjukkan perbedaan hasil, seperti terlihat pada gambar. Setelah dithawing, terlihat bahwa seluruh sel yang dibekukan dalam medium MEM mengalami kerusakan. Sel terlihat dalam keadaan pecah semua. Sedangkan pada pembekuan menggunakan medium TCM, terlihat masih ada sel dalam keadaan baik. Hal ini menunjukkan medium TCM lebih baik untuk digunakan dalam pembekuan / penyimpanan sel. Namun hal ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut, karena terlihat jumlah sel yang masih baik/hidup pasca thawing relatif sedikit.

Kerusakan yang terjadi pada sel akibat pembekuan dimungkinkan karena penggunaan krioprotektan yang kurang tepat. Kerusakan sel yang terjadi dapat

disebabkan karena penyebab mekanis maupun karena medium krioprotektan yang bersifat toksik. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1998), kerusakan sel secara mekanik dapat terjadi karena perbedaan konsentrasi cairan sel dengan bahan krioprotektan yang berpengaruh terhadap laju kecepatan masuk dan keluarnya cairan dalam sel. Hal ini menyebabkan sel mengembang dan pecah sehingga mengalami kerusakan permanen atau letal. Otoi (1998) menambahkan kerusakan karena sifat toksik bahan krioprotektan disebabkan tinggi rendahnya konsentrasi larutan krioprotektan. Sedangkan menurut Setiawan (2002), konsentrasi yang tinggi dari bahan krioprotektan akan menyebabkan terjadinya pengerutan dan pengembangan sel.

Pemilihan bahan krioprotektan yaitu Sukrosa 1M dan Etylen glycol 10% yang dilakukan pada penelitian ini hanya berdasarkan acuan bahan yang sering digunakan untuk kultur sel telur mencit di lingkungan peneliti. Oleh karena itu, untuk mendapatkan bahan krioprotektan yang lebih tepat bagi penyimpanan cell line udang windu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penggunaan berbagai bahan krioprotektan terhadap viabilitas sel pasca thawing.



Gambar 5.4 Kondisi Sel Pasca Pembekuan (Setelah Thawing)

Keterangan :

- Tanda panah menunjukkan sel udang pasca pembekuan
- Terlihat kondisi sel pada medium TCM masih bulat (hidup), sedangkan pada medium MEM sel terlihat pecah.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

- Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa medium TCM memberikan kondisi pertumbuhan lebih baik dan kepadatan sel lebih tinggi dibanding pada medium MEM dan M16.
- Pada pembekuan cell line udang windu dalam medium TCM masih terdapat sel yang hidup pasca thawing, sedangkan dalam medium MEM menghasilkan sel yang rusak pasca thawing

6.2 Saran

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memperoleh medium yang lebih spesifik bagi kulturscel udang windu, misalnya kombinasi medium dengan antibiotik tertentu, sehingga diperoleh medium yang memberikan hasil pertumbuhan baik namun tidak rentan terhadap kontaminan.
- Penelitian juga perlu dilakukan untuk memperoleh kombinasi bahan krioprotektan dalam proses penyimpanan beku, agar diperoleh viabilitas sel yang tinggi pasca thawing.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B, D. bary, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson, 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Gerland publ. New York. London.
- Blake, K. (1995). *Cell culture In Virology Labfax*. Ed by D.R Harper. Blackwell Scientific Publication. Pp 51 – 76.
- Boediono, A., 2002. *Identifikasi dan Karakterisasi Sel. Modul Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis*. Kerjasama Dirjen Dikti dengan Fakkultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Boonyaratpalin, S., K.Supamattaya, J. Kasomchandra, S. Direkbusaracom, U.Aekpathitanpong and C. Chantanachooklin, 1993. *Occluded Baculolike Virus, The Causative Agent of Yellow head Disease in The Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon**. *Fish Pathology*, 28 : 103 – 109.
- Cestano, A., N. Bols and T. Braurbeck, 2004. *The Use of Fish Cells in Ecotoxicology*. The Johns Hopkins Centre For Alternatives to Animal Testing. http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam_97.htm.
- Chang, S.F., G.H. Ngoh, L.F.S. Kueh, Q.W. Qin, C.L. Chen, T.J. Lam and Y.M. Sin., 2001. *Development of A Tropical marine Fish Cell Line From Asian Seabass (*Lates calcarifer*) for Virus isolation*. *Aquaculture vol. 192*
- Chen, J.H., S.N. Chen, H.H. Shih and G.H.Kou. 1982. *A cell line deerived from common carp *Cyprinus carpio* Lin. Proceeding of seminar on fish diseases. Republic China-Japan Cooperation Science. National Science Council. ROC. Pp 93-101.*
- Chen, S.N., Y. Ueno and G.H. Kou. 1982. *A cell line derived from japanese eel *Anguilla japonica* kidney. Proc/Natl. Counc. B. ROC, 6: 93 – 100.*
- Djuwita, I., 2002. *Pemeliharaan Kultur dan Preservasi Sel. Modul Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis*. Kerjasama Dirjen Dikti dengan Fakkultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Fahrudin, M. 2002. *Pembuatan (Inisiasi) Kultur Primer. Modul Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis*. Kerjasama Dirjen Dikti dengan Fakkultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Freshsney, R.I.,1998. *Animal Cell Culture. A practical Approach*. IRL Press. Oxford.

- Huet, M. 1986. *Textbook of fish culture : breeding and cultivation of fish*. Fishing News Book. Survey England. Pp 192 – 199.
- Humason, G.I., 1972. *Animal Tissue Technique*. W.H. Freeman and Company. San Fransisco. London.
- Hytell, P., I. Fair, H. Callesen and I. Greve, 1998. Oocyte Growth, Capacitation and Final Maturation in Cattle, *J. Theriogenology* 47:23-32.
- Malole, M.B.M., 1999. *Kultur sel dan jaringan hewan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dikertorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antaar Universitas. IPB. Bogor.
- Masithah, E.D. dan H. Suprpto, 2002. *Pembuatan Kultur Jaringan dari Sirip Kakap Merah dan Analisis Karakteristiknya*. Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga. Surabaya
- Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama, S. Tachikawa and T. Suzuki., 1998. Cryopreservation of Mature Bovine Oocytes by Vitrification in Straw. In *Cryobiology* 37.
- Roberts, E.D.P. and E.M.F de Roberts. 1981. *Essential of Cell and Molecular Biology*. Saunders College Philadelphia.
- Setiawan, H. 2002. *Pengaruh Krioprotektan propandiol dan Sukrosa Pada Proses Vitifikasi Sel Telur menciit (Mus musculus) Terhadap Tingkat Fertilisasi In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Silverstein, A.M. 1989. *A history of immunology*. Academic Press inc. Harcourt Brace Jovanovich Publisher. New York.
- Steel, R.G.B. dan J.H. Torrie, 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistik*. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Supriatna, S dan F.H. Pasaribu, 1998. *In Vitro Vertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Penelaah : Jusuf, T.L., Depdikbud. Dirjen Dikti. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Tarwadi, 2004. *Pengaruh Tansferin terhadap Pertumbuhan Sel Chinese Hamster Ovary (CHO) dan CHO Pengeksresi protein IGF-1*. <http://www.r1.fws.gov/canvthc/wF3M/CHP10/pdf>.
- Wang, C.S., K.F.J. Tang, G.H. Kou and S.N. Chen, 1993. yellow Head Disease – like Virus infection in The kuruma Shrimp *Penaeus japonicus* Cultured in Taiwan. *Fish Palology*, 31 : 177 – 182.

Widjiati, 2003. *Maturasi Oocyte Mencit Pasca Vitrifikasi Lembaga Penelitian*. Universitas Airlangga. Surabaya.

Wolf, K. and M.C. Quimby. 1962. *Establishment of eurythermic line of fish cell line in vitro*. *Science*. 135 : 1065 – 1066.

Lampiran1. Prosedur Penghitungan Sel

Penghitungan Sel dengan Menggunakan Hemositometer

Bahan : Hemositometer (Neubauer)

PBSA

Trypsin 0,25 %

Medium Kultur

Tally Counter

Pipet Pasteur

Mikroskop

Cara :

1. Slide disiapkan dan dibersihkan permukaannya dengan alkohol 70 %. Setelah coversliple dibersihkan dengan alkohol 70%, dibasahi ujungnya dan ditekan diatas permukaan slide smapai menutupi area untuk menghitung
2. monolayer ditripsinase dan suspensi sel diambil, disentrifugasi dengan kecepatan 100 g selama 2 menit. Sel diresuspensi sampai mencapai konsentrasi 10^5 sel/ml
3. Suspensi sel diambil sebanyak 20 μ l dengan menggunakan mikropipet
4. Dimasukkan ke dalam hemositometer pada salah satu tepinya, sampai suspensi msuk dan memenuhi area penghitungan
5. Mikroskop difokuskan untuk dapat mengamati garis-garis hemositometer dengan pembesaran 10X

6. Sel yang ada dalam kotak dihitung, sampai sebanyak 5 kotak. Kotak yang dipilih adalah kotak-kotak didalam luas 1 mm^2
7. Jika jumlah sel $< 100/ \text{mm}^2$, penghitungan dilakukan pada kotak 1 mm^2 lainnya
8. Jika jumlah sel $> 100/ \text{mm}^2$, penghitungan dilakukan hanya pada 5 kotak kecil (secara diagonal) yang ada diantara 1 mm^2
9. Penghitungan jumlah sel :

$$C = N/V$$

- C : konsentrasi
N : jumlah sel
V : volume yang dihitung ($0,1 \times 10^3$ atau 10^4)

Lampiran 2. Prosedur Preservasi Sel

Preservasi Sel

Bahan: Suspensi sel

Ampul atau Cryovial

Nitrogen Cair

Medium yang mengandung DMSO 10%

Deep freezer (-70°C) atau Freezing programmer

Etanol Absolut

Cara :

(1) Pembekuan Sel

1. Suspensi sel yang diambil dari pertumbuhan fase log disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit, kemudian diresuspensi dalam larutan vitrifikasi dengan konsentrasi $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ sel/ml
2. Suspensi sel tersebut didistribusikan ke dalam ampul / cryovial masing-masing sebanyak 1 ml, kemudian diberi label
3. Ampul yang telah berisi suspensi sel disisipkan pada canes
4. canes diletakkan diatas cotton wool dalam kotak polysterene, kemudian dimasukkan ke dalam deep freezer – 70°C
5. Setelah kurang lebih 2 jam, canes dimasukkan ke dalam nitrogen cair

(2) Thawing

- 1. Ampul yang telah dikeluarkan dari tanki nitrogen cair dipegang kemudian diresuspensi dalam larutan g di udara selama 10 detik, kemudian langsung dimasukkan ke dalam penangas air suhu 37° C**
- 2. Isi ampul dituang ke dalam cawan petri, kemudian ditambahkan medium kultur sedikit demi sedikit**
- 3. Medium kultur ditambahkan sebanyak 10 ml, sehingga suspensi sel diencerkan kembali dengan perbandingan 1 : 1. Dengan demikian konsentrasi sel menjadi 105 sel/ml, sedangkan volume cairan menjadi 20 ml.**