

682
M.p.



LAPORAN PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2002

**PEMBUATAN KULTUR JARINGAN (Cell Line) DARI
SIRIP IKAN KAKAP MERAH LUTJANUS SP SERTA
ANALISIS KARAKTERISTIKNYA**

Oleh:

Ir. ENDANG DEWI MASITHAH, MP.
Dr.Ir. HARI SUPRAPTO, M.Agr.
Drh. BUDIARTO, MP.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi
DIP Nomor : 019/XXIII/1--/2002 Tanggal 1 Januari 2002
Kontrak Nomor : 024/P2IPT/DPPM/IV/2002
Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 8

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

September, 2002



LAPORAN PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2002

**PEMBUATAN KULTUR JARINGAN (Cell Line) DARI
SIRIP IKAN KAKAP MERAH LUTJANUS SP SERTA
ANALISIS KARAKTERISTIKNYA**

Oleh:

Ir. ENDANG DEWI MASITHAH, MP.
Dr.Ir. HARI SUPRAPTO, M.Agr.
Drh. BUDIARTO, MP.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi
DIP Nomor : 019/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002
Kontrak Nomor : 024/P2IPT/DPPM/IV/2002
Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 8

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

September, 2002



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

1. Puslit Pembangunan Regional
2. Puslit Obat Tradisional
3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584)
4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718)
5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720)
6. Puslit/Studi Wanita (5995722)
7. Puslit Olah Raga
8. Puslit Bioenergi
9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719)
10. Puslit Kesehatan Reproduksi

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223


IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR

I.a. Judul Penelitian :	Pembuatan Kultur Jaringan (<i>Cell Line</i>) Dari Sirip Ikan Kakap Merah (<i>Lutjanus sp</i>) Serta Analisis Karakteristiknya
b. Macam Penelitian :	(<input checked="" type="checkbox"/>) Fundamental (<input type="checkbox"/>) Terapan (<input type="checkbox"/>) Pengembangan (<input type="checkbox"/>) Institusional
2. Kepala Proyek Penelitian :	
a. Nama :	Endang Dewi Masithah, MP., Ir.
b. Jenis Kelamin :	Perempuan
c. Pangkat/Gol./NIP :	Penata Muda / IIIA / 132 158 476
d. Jabatan sekarang :	Asisten Ahli
e. Jurusan/Fakultas :	Reproduksi dan Kebidanan / Kedokteran Hewan
f. Universitas :	Airlangga
g. Bidang ilmu yang diteliti :	Budidaya Peraian
3. Jumlah Tim Peneliti :	3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian :	Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga
5. Kerjasama dengan institusi lain :	
a. Nama institusi :	-
b. Alamat :	-
6. Jangka Waktu Penelitian :	6 (enam) bulan
7. Biaya yang diperlukan :	Rp. 10.000.000,- (Sepuluh Juta Rupiah)


Mengetahui,
Dekan Fakultas.


Dr. Ismudiono, M.S., Drh
NIP. 130 687 297

Surabaya, 30 September 2002
Kepala Proyek Penelitian,


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

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga


Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., Drh
NIP. 130 701 125

RINGKASAN

PEMBUATAN KULTUR JARINGAN (*CELL LINE*) DARI SIRIP IKAN KAKAP MERAH (*Lutjanus sp*) SERTA ANALISIS KARAKTERISTIKNYA (Endang Dewi Masithah, Hari Suprpto dan Budiarto 2002, 24 halaman)

Penelitian ini bertujuan untuk membuat kultur jaringan (*cell line*) dari sirip ikan kakap merah (*Lutjanus sp*) dan analisis karakteristiknya. Manfaat penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk menunjang penelitian tentang virus ikan, 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 jaringan ikan kakap merah akan dapat menambah khasanah keilmuan.

Pada penelitian ini digunakan ikan kakap merah dengan berat 300 gr. Tahap yang dilakukan adalah kultur jaringan primer, sub kultur sel sirip ikan kakap merah, *tissue passage*, pewarnaan dan karakterisasi sel serta penyimpanan sel. Media yang digunakan adalah L-15 dengan penambahan serum, penicilline dan strptomycine.

Hasil penelitian didapatkan pertumbuhan kultur sel sirip ikan kakap merah kurang baik. Kegagalan kemungkinan disebabkan kurang sempurnanya sterilisasi serta fasilitas peralatan kurang memadai, seperti inkubator CO² yang tidak stabil.

(Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Dibiayai oleh Proyek Penelitian Pengembangan Ilmu Pengetahuan Terapan, DIP Nomor : 019/XXIII/1/--/2002/ Tanggal 1 Januari 2002, kontrak Nomor : 024/P2IPT/DPPM/IV/2002 Dirbinlitabmas Ditjen Dikti, Depdiknas.

SUMMARY

PRODUCTION TISSUE CULTURE (CELL LINE) OF RED KAKAP FISH FIN (*Lutjanus sp*) AND ANALYSIS THEIR CHARACTERISTIC

Endang Dewi Masithah, Hari Suprpto and Budiarto

The aim of this research was to production the tissue culture of red kakap fish fin 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 red kakap fin tissue culture was can be increase the science.

Red kakap fin was sliced to be surgery. Furthermore, fin fish surgery were cultured in medium L-15 with serum, penicillin and streptomycine. Some of passage to fish fin surgery were carried out as far as formed the cell lline. Analysisi of their characteristic carried out with apply the colour (Giemsa). The observation carried out with electron microscope.

The result of research find that there was less growth of red kakap fin tissue culture. This failure was possibility caused the damage of CO2 incubator and instrumentation that less sufficient.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah S.W.T. atas rahmat dan hidayah-Nya hingga penyusunan laporan penelitian dengan judul PEMBUATAN KULTUR JARINGAN (*CELL LINE*) DARI SIRIP IKAN KAKAP MERAH (*Lutjanus sp*) SERTA ANALISIS KARAKTERISTIKNYA 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 izin untuk melaksanakan penelitian ini. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada Kepala Tropical Disease Centre yang telah memberi bantuan fasilitas penelitian serta kepada berbagai pihak yang telah banyak membantu pelaksanaan penelitian ini hingga selesai.

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

Surabaya, September 2002

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	ii
SUMMARY.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Hipotesis	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	7
3.1 Tujuan Penelitian	7
3.2 Manfaat Penelitian	7
IV MATERI DAN METODE	8
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	8
4.2 Materi Penelitian	8
4.3 Metode Penelitian	10
V HASIL DAN PEMBAHASAN	14
VI KESIMPULAN DAN SARAN	22
6.1 Kesimpulan	22
6.2 Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	23

DAFTAR GAMBAR

Gambar		halaman
1.	Eksplan jaringan sirip ekor kakap merah	21
2.	Kondisi pertumbuhan sel ekor kakap merah yang terkontaminasi	21

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penelitian tentang penyakit ikan terutama virus di Indonesia masih tertinggal jauh. Sementara serangan penyakit utamanya virus dewasa ini merajalela baik pada ikan budidaya maupun jenis komoditi perikanan lainnya seperti udang. Virus yang menyerang organisme perikanan telah mengakibatkan kerugian sangat besar. Sebagai gambaran, kerugian industri perikanan nasional yang diakibatkan oleh penyakit dari tahun 1989 – 1992 adalah 248 juta USD per tahun dan 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. Jika satu orang mempunyai 3 anggota keluarga, jumlah total yang menjadi tanggungan mereka adalah 11.299.936. Sedangkan jumlah nelayan pada tahun 1997 sebanyak 4.652.786 orang dan industri budidaya sebanyak 234.773 orang.

Untuk mengatasi serangan virus yang semakin merajalela dan untuk mencegah kerugian lebih lanjut, kiranya perlu dimulai langkah yang mengarah pada berbagai upaya pencegahan. Namun permasalahan mendasar dalam upaya pengendalian virus belum tersentuh. Kesulitan utamanya adalah kurang adanya kultur jaringan ikan tropis atau ikan asli Indonesia. Tanpa adanya kultur jaringan, penelitian mendasar tentang virus tidak mungkin dilakukan.

Salah satu komoditi bernilai ekonomis tinggi dan laku di pasaran ekspor adalah kakap merah (*Lutjanus sp.*). Dewasa ini, kakap merah sudah mulai banyak terserang

berbagai macam virus, namun penelitian tentang virus yang menyerang kakap merah belum banyak dilakukan. Pembuatan kultur jaringan dari sirip kakap merah ini diharapkan bisa membuka arah pada penelitian-penelitian tentang virus ikan, selanjutnya diharapkan dapat mengatasi kematian massal akibat serangan virus.

1.2 Rumusan Masalah

Serangan virus pada kakap merah yang merupakan komoditi unggulan perikanan telah mewabah dan menyebabkan kerugian yang besar. Upaya penelitian untuk mengatasinya masih banyak menemui kendala mengingat banyaknya keterbatasan termasuk fasilitas serta pengetahuan yang belum memadai.

Kultur jaringan ikan 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 dari sirip kakap merah perlu dimulai sebagai langkah awal untuk penelitian selanjutnya.

1.3 Hipotesis

Jaringan sirip ikan kakap merah dapat dikultur untuk membuat sediaan kultur jaringan .

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

Sejak Wolf dan Quimby (1962) sukses mengkultur jaringan ikan pertama kali, sampai sekarang kurang lebih sudah lebih dari 80 kultur jaringan ikan (*fish cell line*) telah bisa dikultur. Namun yang sering digunakan untuk penelitian ada beberapa jenis seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Kultur sel dari leukosit dan jaringan hematopoeietics ikan

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

Sejumlah kultur jaringan dari berbagai macam ikan yang sering dipakai dalam penelitian di USA dan tersedia di ATCC antara lain *brown bullhead*, *bluegill fry*, *goldfish*,

rainbow trout (Blake, 1993). 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 *inbred 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). Tetapi 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. Sedangkan sel yang didapat dari ayam dewasa lebih sulit disagregasi dan tumbuhnya lambat.

Ada beberapa 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 teknik tersebut dikombinasi. Metode mekanis memiliki kelemahan karena sel menjadi mudah rusak, sehingga biasanya dipakai pada tahap awal (Burlison, 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. 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, 1993)

Kultur jaringan dapat disimpan pada suhu yang rendah agar metabolisahnya 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.

Tabel 2. Berbagai media Yang Sering Digunakan Dalam Kultur Sel beserta Komponen Penyusunnya

Medium	Tahun dibuat	Komponen utama
Medium 199	1950	<ul style="list-style-type: none"> - Purine (adenine, guanine, thymine, uracil, xanthine, hypoxantine) - Fat soluble components
BME	1955	
EMEM	1959	<ul style="list-style-type: none"> - vitamin 2 – 5 kali lebih banyak dari BME - amino acids lebih banyak dari BME
Alpha MEM	1971	<ul style="list-style-type: none"> - vitamin - ascorbic acid - non essential amino acid - sodium pyruvat - lipoic acid - D-biotin
DMEM	1969	<ul style="list-style-type: none"> - macam dan jumlah amino acid lebih besar dari MEM - vitamin 4 kali lebih banyak dari MEM - iron (ferric nitrate)
DMEM with high glucose	Unkown	<ul style="list-style-type: none"> - konsentrasi glucosa paling banyak
NCTC 109	1956	<ul style="list-style-type: none"> - tween 80 - nucleic acid derivation - vitamin - coenzymes (DPN, CoA, TPN, FAD, UTP dan TPP) - reducing agent
NCTC 135	1964	<ul style="list-style-type: none"> - sama dengan NCTC 109, tanpa lesytine
McCoys 5A	1956	<ul style="list-style-type: none"> - asparagine - glucose - amino acid
RPMI	1964	
LeibovitzL-15	1963	<ul style="list-style-type: none"> - arginine, cysteine dan histidine - tyrosine konsentrasi tinggi - galactose - No NaHCO₃

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk pembuatan kultur jaringan (cell line) dari sirip ikan kakap merah (*Lutjanus sp.*) dan analisis karakteristiknya.

3.2 Manfaat Penelitian

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

BAB IV

MATERI DAN METODE

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di *Tropical Disease Centre*, Universitas Airlangga, mulai bulan Juli sampai dengan September 2002.

4.2 Materi Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- Ikan kakap merah, dibeli dari Loka Perikanan Situbondo, Jawa Timur. Kakap yang digunakan berukuran besar (300 g).
- Pakan ikan buatan / pellet, untuk memelihara ikan selama penelitian
- MS-222 untuk membius ikan.
- Serum 20 %
- Media L-15
- 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 ikan kakap merah
- Gunting mikro
- Cawan petri
- Centrifuge
- Botol plastik Falcon
- Mikroskop elektron
- Mikroskop Inverted
- Freezer
- Pinset
- Pipet pasteur
- Inkubator CO₂
- Tabung reaksi

4.3 Metode Penelitian

a. Persiapan

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan kultur jaringan sel yang sehat dan mempunyai viabilitas yang tinggi

Ikan kakap merah dengan berat 300 g yang dibeli dari Loka Perikanan Situbondo dipelihara beberapa lama di bak besar di Laboratorium Budidaya Ikan, fakultas Kedokteran Hewan. Lingkungan dikondisikan sedemikian hingga dalam keadaan optimum seperti pemberian aerasi, heater dan makanan yang cukup. Sebagai ikan asal sel dipilih yang gesit dan sehat. Sebelum digunakan ikan dibius dengan MS-222.....

b. Kultur primer

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan kultur primer dari sirip ikan kakap merah.

- Sirip ikan dipotong sebesar 1 cm^2
- Dicuci bersih dengan medium PBS+ (PBS + BSA) sampai bersih
- Dipindahkan pada tempat / disk yang baru
- Dengan menggunakan gunting mikro, sirip ikan dipotong kecil-kecil $\pm 1 \text{ mm}^3$
- Dengan menggunakan pipet, jaringan dipindahkan ke dalam tabung centrifuge, kemudian ditambahkan PBS⁺ (dicuci)
- Jaringan dibiarkan mengendap, supernatan dibuang. Langkah ini diulang sebanyak tiga kali.
- Dengan pipet steril, jaringan diambil beberapa potong, diletakkan pada botol plastik Falcon
- Ditambahkan 1 ml medium L-15 yang telah ditambah serum 20 %, pennisillin dan sterptomycin
- Botol Falcon dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ 5 %, suhu 31⁰C, selama 24 jam

c. Sub Kultur

- Setelah 24 jam jaringan dikultur, dilakukan penggantian medium (*passage*)

- Botol Falcon dimiringkan, selanjutnya cairan diambil dengan pipet steril dan dibuang.
- Ditambahkan medium baru yang telah ditambah serum 20 % (medium diganti)
- Masukkan inkubator CO₂ 5 %, suhu 31^oC, selama 24 jam
- Demikian *passage* dilakukan seterusnya tiap 24 jam sampai diperoleh *cell line*

d. Karakterisasi Sel

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui karakter dan morfologi sel yang telah dapat dikultur dengan berbagai macam sifat sel.

- Cell line hasil kultur dicuci dengan PBS 2 – 3 kali
- Pada saat pencucian terakhir, medium disisakan ± 1 ml.
- Tambahkan methanol perlahan – lahan sampai 50 % dari sisa PBS (0,5 ml)
- Diamkan selama 10 menit
- Methanol dan PBS sisa dibuang, diganti dengan methanol anhydrous (pure)
- Diamkan selama 5 menit, sampai methanol habis menguap
- Tetesi giemsa 5 % (pH 6,8)

Komposisi giemsa :

Na₂HPO₄ : 0,0049 g

KH₂PO₄ : 0,0020 g

DW : 2,5 ml

Giemsa : 47,5 ml

- Biarkan selama 20 menit
- Cuci dengan air kran secara perlahan

- Amati dalam kondisi basah (1 ml DW) dengan mikroskop untuk mengetahui morfologi sel

Selanjutnya dilakukan berbagai perlakuan seperti macam-macam konsentrasi serum, macam – macam medium serta perbedaan inkubasi suhu dan diamati perubahan yang terjadi terhadap morfologi sel.

(i) Berbagai konsentrasi Fetal Calf Serum (FCS)

Kecepatan pertumbuhan sel dapat dilakukan dengan menambah atau mengurangi konsentrasi FCS, sehingga konsentrasi FCS sangat mempengaruhi laju pertumbuhan kultur jaringan.

(ii) Efek inkubasi suhu

Suhu mempunyai pengaruh yang besar terhadap pertumbuhan kultur jaringan. Suhu ideal adalah yang mendekati keadaan alami dimana ikan hidup. Suhu optimum kultur jaringan ada disekitar 20 – 30 °C.

(iii) Berbagai macam media

Media kultur sangat besar pengaruhnya terhadap pertumbuhan kultur jaringan kakap merah, karena adanya perbedaan berbagai macam komposisi dan enzyme pertumbuhan yang ada di dalam media.

Jika terjadi pertumbuhan sel, maka dilanjutkan dengan melihat gambaran ultrastruktur sel dengan metode Scanning Electron Microscope (SEM)

e. Scanning elektron microscopy (SEM)

Tahap ini bertujuan untuk melihat ultrastruktur sel ikan kakap merah, karena bentuk setiap sel ikan berbeda antara satu dengan lainnya. Untuk proses SEM, sel dimasukkan ke dalam tabung Leighton dengan coverslip berukuran 9 x 35 mm

dengan kepadatan 5×10^5 cells/ml, kemudian diinkubasi. Coverslip diangkat dari tabung Leighton dan secepatnya dicuci dengan 0,1 M PBS (pH 7,2) dan difiksasi dengan 2,5 % glutaraldehyde dalam 0,1 M PBS selama 50 menit. Kemudian dicuci lagi dengan 0,1 M PBS dan difiksasi akhir dengan 1 % osmium tetroxide dalam 0,1 M PBS selama 10 menit, kemudian dehidrasi dengan berbagai macam konsentrasi ethanol selama 10 menit. Coverslip secepatnya dikeringkan dengan isoamyl acetate. Specimen kemudian dibingkai pada aluminium stubs dan dilapisi dengan paladium. Terakhir diamati dengan mikroskop elektron.

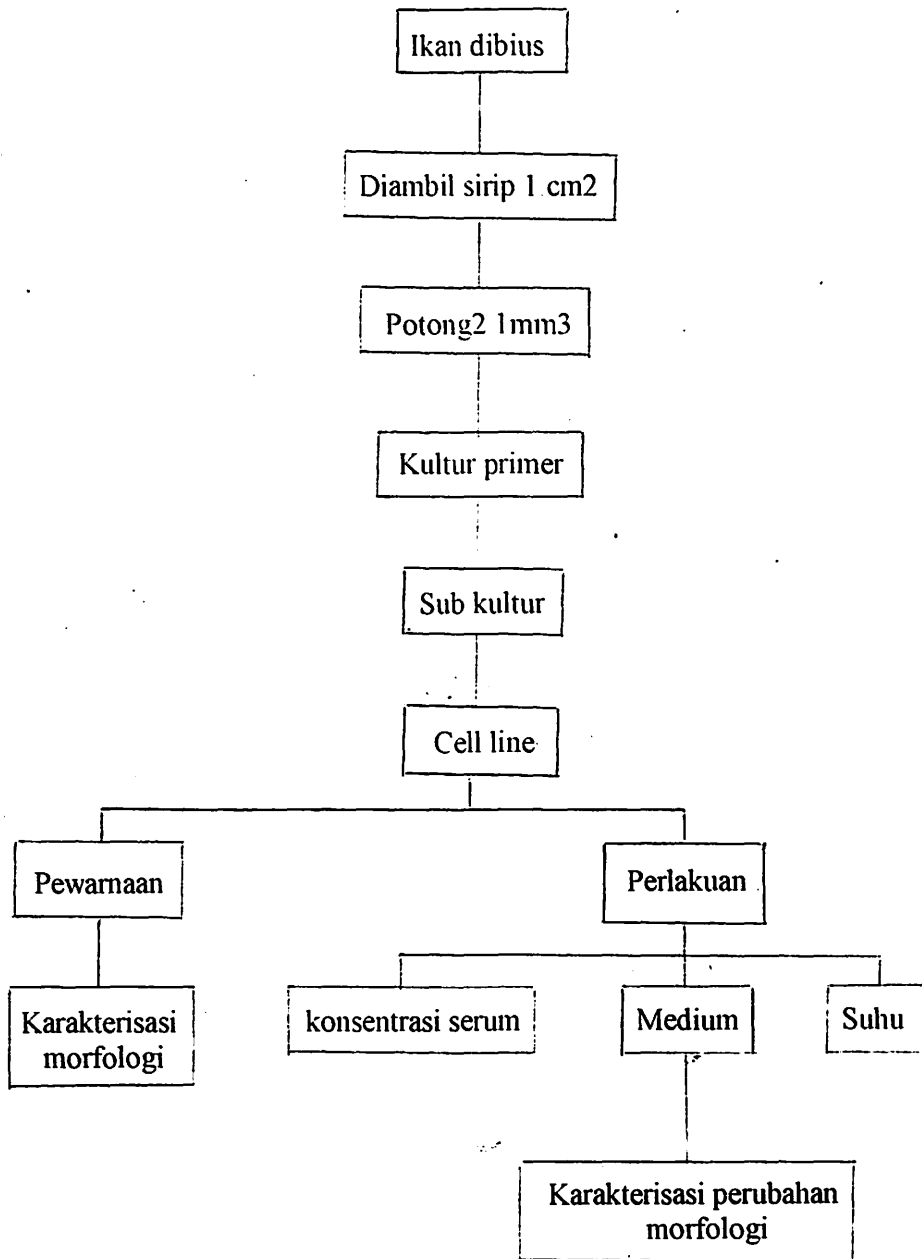
Selanjutnya dilakukan penyimpanan cell line dengan metode pembekuan

f. Penyimpanan Kultur Jaringan Kakap Merah

Kultur jaringan kakap merah yang sudah jadi siap disimpan untuk keperluan penelitian sewaktu-waktu. Prosedur yang sering dilakukan untuk menghindari kerusakan sesedikit mungkin adalah sebagai berikut :

- Penambahan glyserol atau DMSO terhadap sel untuk memperlambat titik beku dan pecahnya sel.
- Memperlambat cooling rate agar air keluar sebelum sel beku
- Menyimpan sel dibawah suhu -130°C untuk memperlambat pembentukan kristal es
- Sel harus dithawing secepatnya jika telah dikeluarkan dari freezer untuk mengurangi kerusakan sel oleh sebab itu harus dilakukan pada suhu -50 sampai 0°C .

Alur penelitian dapat digambarkan sebagai berikut :



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur sel hewan dapat dikelompokkan kedalam tiga golongan yaitu *primary cells*, *cell strains* dan *cell lines*. Sel dapat diperoleh dari berbagai macam organ dan jaringan embrio, anak dan dewasa. Berdasarkan asal kultur, sel yang diperoleh langsung dari hewan disebut dengan *primary cell*. Kultur sel primer mewarisi sifat-sifat asalnya dan biasanya terdiri lebih dari satu macam sel. Kultur sel primer mempunyai masa hidup 5-10 pembelahan *in vitro*.

Berdasarkan sifatnya pelekatannya, ada dua macam sel yaitu sel yang membutuhkan permukaan untuk menempel serta sel yang tidak membutuhkan tempat untuk menempel. Sel yang membutuhkan tempat menempel disebut dengan *anchorage dependent*. Sesudah beberapa lama sel suspensi dimasukkan kedalam medium yang cocok, sel akan melekat pada dasar flask sampai terbentuk monolayer. Beberapa sel misalnya sel lymphocyte bukan *anchorage dependent* sehingga bisa dikultur pada suspensi medium. Kultur sel dapat dibagi menjadi dua macam berdasarkan morfologinya yaitu *fibroblast like-cells* yang berbentuk pipih panjang dan *epithelial like-cells* yang berbentuk polygonal. Dalam suatu flask yang mempunyai banyak bentuk sel sangat rentan terhadap kontaminasi oleh virus atau beberapa kontaminan lain seperti jamur dan bakteri.

Kultur sel dilakukan pada sirip ikan kakap untuk mendapatkan kultur primer (*primary cell*) kakap. Sel tersebut didapatkan dengan cara memotong sedikit sirip kakap dan selanjutnya dilakukan treatment dengan enzim. Sel memerlukan nutrisi kompleks yang dibutuhkan untuk berkembang biak secara *in vitro*. Tiap jenis sel mempunyai kebutuhan nutrisi yang berbeda untuk pertumbuhannya. Beberapa formulasi media telah

dibuat secara spesifik untuk menyokong pertumbuhan suatu jenis sel. Pada penelitian ini media yang dipakai untuk kultur sirip ikan kakap adalah L-15 yang diketemukan pada tahun 1963. Media ini telah banyak digunakan untuk kultur sel seperti EPC, FHM dan beberapa sel lain dengan hasil memuaskan. L-15 diformulasikan bebas dari basa arginine, cysteine dan histidine, mempunyai konsentrasi tyrosine tinggi, menggunakan glucose dan tanpa NaHCO_3 . L-15 dapat digunakan tanpa incubator CO_2 sehingga lebih praktis dan gampang dilakukan. Namun, dalam penggunaan untuk kultur sel ikan kakap pada penelitian ini tidak memberikan pertumbuhan yang bagus walaupun media tersebut sebenarnya bebas serum. Dimungkinkan medium tersebut kurang cocok untuk kultur sel ikan kakap atau karena banyaknya faktor lain yang mempengaruhi kultur menjadi kurang berhasil.

Kebanyakan kultur sel membutuhkan 5-10% suplemen untuk perkembangbiakannya. Kultur sel ikan kakap ini menggunakan Fetal Calf Serum (FCS) sebanyak 10% tetapi pertumbuhannya tidak sempurna. Kemungkinan konsentrasi tersebut belum mencukupi, tetapi sebenarnya sel ikan kakap bisa tumbuh dengan bagus hanya kurang banyak berkembang biak. Konsentrasi suplemen (FCS) yang terlalu tinggi ataupun terlalu rendah menyebabkan hasil yang diperoleh kurang baik atau pertumbuhan sel yang kurang optimal. Suplemen Fetal Bovine Serum (FBS) seringkali memberikan hasil yang paling bagus tetapi hal tersebut tergantung pada jenis sel yang dilakukan kultur. Pemberian indikator phenol merah dimaksudkan untuk melihat perubahan pH yang terjadi

Walaupun setiap sel mempunyai kekhususan medium untuk pertumbuhannya, tetapi medium yang ada sebenarnya telah cukup untuk menyokong pertumbuhan dari kultur sel ikan kakap. Suhu inkubasi, pH, osmolaritas dan kelembaban harus dijaga pada kondisi yang minimum yang dibutuhkan sel untuk

tumbuh. Selanjutnya media harus diganti maksimal seminggu sekali untuk membuang hasil metabolisme sel agar tidak meracuni pertumbuhan sel yang akan menyebabkan sel lysis (pecah) dan akhirnya menjadi mati.

Kultur primer sel ikan kakap pada penelitian ini dapat tumbuh tetapi tidak sempurna. Beberapa kemungkinan yang menyebabkan terjadinya hal ini adalah :

1. Sterilisasi kurang sempurna.

Kultur sel masih terkontaminasi oleh jamur dan bakteri. Walaupun telah diberi antibiotik dan antijamur tetapi kontaminasi masih terjadi. Hal ini kemungkinan bersumber dari lingkungan. Pada umumnya kultur jaringan, kendala utamanya adalah kontaminasi dari berbagai macam bakteri atau jamur. Streptomycin diberikan dalam jumlah 1000 IU. Tetapi walaupun diberikan dalam dosis lebih besar, hasilnya tidak akan efektif tanpa sterilisasi lingkungan yang mendukung. Upaya ini akan sia-sia dan kontaminasi masih akan terjadi.

Antijamur pun telah diberikan tetapi juga tidak efektif, dan masih terkontaminasi dengan jamur, ditandai dengan adanya serabut panjang atau mycelia yang terlihat pada media dan kultur jaringan. Bahkan jamur tumbuh dengan lebat dan kelihatan seperti serabut berserakan.

Kultur jaringan membutuhkan ruangan khusus yang jika tidak terpakai lampu Ultraviolet (UV) harus menyala untuk mencegah kontaminasi. Bahkan jas yang dipakaipun seharusnya tidak boleh dipakai diluar ruangan kultur jaringan agar tidak terkontaminasi. Pada penelitian ini, karena keterbatasan fasilitas, maka sterilisasi dengan UV hanya dapat dilakukan beberapa saat menjelang pekerjaan kultur sel.

2. *Clean bench* yang tidak kurang memenuhi persyaratan. *Clean bench* yang dipakai pun harus disinari dengan UV dan bisa menutup sempurna supaya tidak

ada kontaminasi. Cleanbench yang tersedia, hanya didisain untuk pekerjaan dengan bakteri, bukan dengan kultur sel atau penelitian dengan virus. Sehingga bagaimanapun telitinya kita bekerja, tetap akan terjadi kontaminasi. Ditambah, peralatan yang digunakan banyak terbuat dari plastik. Disebutkan bahwa bakteri lebih mudah dan lebih lama menempel pada plastik atau peralatan dari plastik dibanding pada kayu.

3. Kemungkinan kontaminasi bisa disebabkan dari tidak bersihnya ikan atau jaringan yang digunakan atau dengan kata lain, jaringan yang digunakan masih tersemar kontaminan. Untuk mengeceknya, sedikit jaringan tadi dimasukkan dalam medium agar dan ditunggu seelama 24-48 jam. Bila ternyata tidak tumbuh bakteri atau jamur, bisa dikatakan bahwa pencemar datang dari lingkungan sekitar atau karena sterilisasi yang kurang sempurna. Beberapa peneliti yang menggunakan Fathead minnow (FHM) dan EPC untuk subkultur dengan standar yang ketat juga masih mengalami kontaminasi bakteri dan jamur.

4. Suhu inkubasi tidak stabil

Kestabilan suhu merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan keberhasilan kultur sel. Pada penelitian ini kondisi inkubator sudah tidak sempurna, baik dari kestabilan suhu, maupun suplai oksigen (O_2) dan karbondioksida (CO_2). Akibatnya sel yang dikultur mudah terkontaminasi, mengalami keterlambatan pertumbuhan dan bahkan kematian.

5. Minimnya informasi sifat sel sirip ikan kakap

Penelitian ini masih merupakan penelitian tahap awal, sehingga sifat-sifat sel ikan kakap belum banyak diketahui. Kultur sirip ekor ikan kakap ini telah

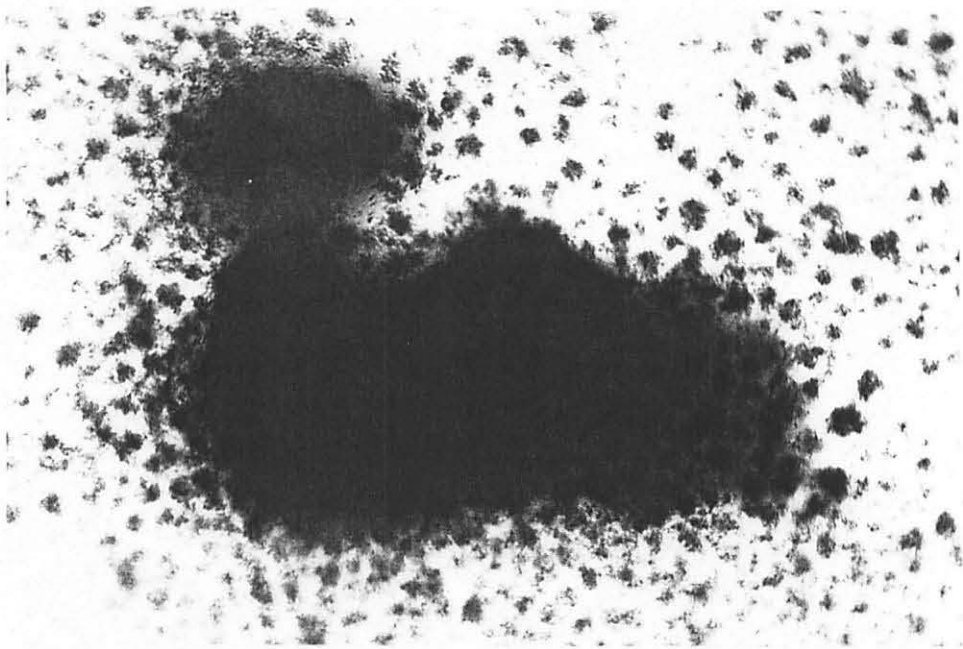
dilakukan beberapa kali, namun belum memperlihatkan pertumbuhan sel primer yang baik, terutama bentuk sel monolayer (melekat pada permukaan) seperti yang diharapkan. Setelah mengalami beberapa kali kegagalan, pada kultur selanjutnya, mulai menunjukkan adanya pertumbuhan sel primer pada kultur hari keempat, walaupun terjadi kematian pada hari selanjutnya (Gambar 1). Penelitian Lakra dan Bhonde (1996) dengan ikan *Labeo rohita*, berhasil memperlihatkan kultur primer dari eksplan sirip ekor ikan pada hari keempat. Namun ia juga mengalami kegagalan dalam membuat kultur primer beberapa spesies ikan seperti ikan mas (*Cyprinus carpio*), ikan lele (*Clarias batrachus*), ikan mujahir (*Oreochromis mossambicus*) dan *Anabas testideni*.

Minimnya informasi tentang sifat-sifat sel ikan kakap ini menyebabkan belum diketahuinya perlakuan optimal yang harus diterapkan untuk menunjang kehidupan dan pertumbuhan sel. Misalnya, belum diketahui umur masa hidup dan kecepatan pertumbuhan sel, sehingga waktu penggantian medium secara periodik menjadi kurang tepat. Selanjutnya kemungkinan racun atau substansi penghambat pertumbuhan seperti sisa metabolisme sel dapat menghambat pertumbuhan.

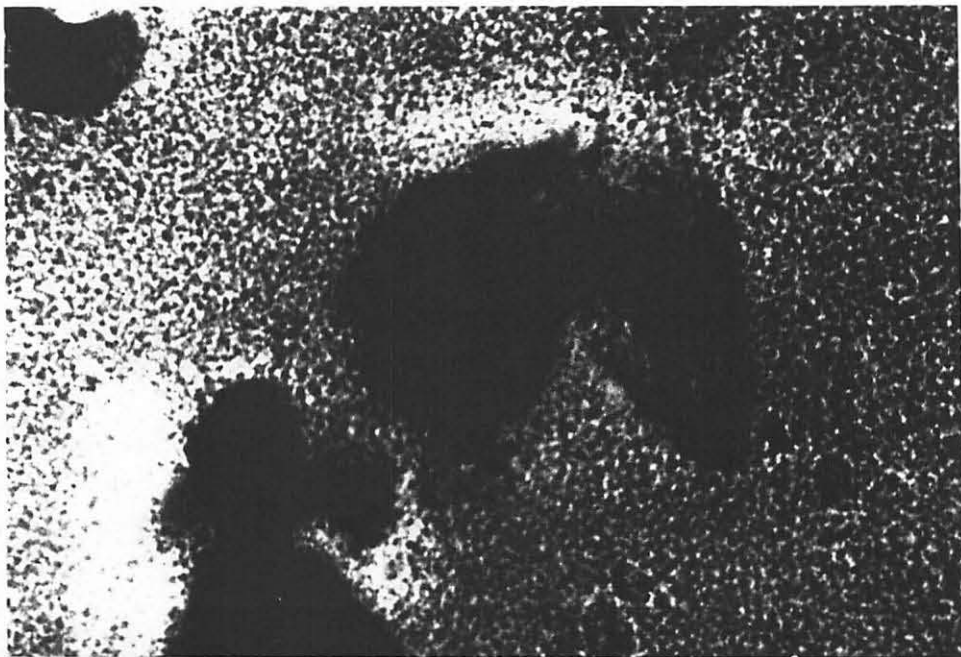
Selain itu, juga belum diketahui secara pasti, apakah sifat sel kakap membutuhkan pelekatan atau tidak. Sehingga belum dilakukan upaya perlakuan khusus untuk pelekatannya pada wadah kultur. Perilaku tersebut dapat diupayakan dengan penambahan muatan negatif pada permukaan wadah atau pemberian glikoprotein dan kollagen.

Jika sel tumbuh dengan baik semestinya dilakukan subkultur seminggu sekali untuk mengurangi kepadatan dan membuang sisa hasil metabolisme. Sel yang padat (*confluent*) akan menyebabkan sel cepat menjadi mati karena tidak bisa tumbuh dengan sempurna disebabkan selain adanya sisa metabolisme juga tidak adanya ruang untuk pertumbuhan lagi. Sub kultur dapat dilakukan dengan metode mekanis dan

chemis. Pada metode mekanis, sel bisa discrap dengan rubber policeman, tetapi harus dengan hati-hati agar tidak merusak sel yang akhirnya menyebabkan kematian. Pada penelitian sekarang ini tidak dilakukan scrapping karena jumlah sel yang sedikit, scrapping bisa juga dilakukan dengan enzyim yang bebas kalisum dan magnesium. Enzym yang paling sering digunakan adalah trypsin. Collagen dan pronase juga dapat digunakan. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) sebagai chelating agent dapat dipakai sendiri atau dikombinasikan dengan trypsin.. Pemakaian enzyme juga dapat merusakkan permukaan sel jika dilakukan terlalu lama.



Gambar 1. Eksplan jaringan sirip ekor kakap merah



Gambar 2. kondisi pertumbuhan sel yang terkontaminasi

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil diatas dapat disimpulkan bahwa kultur sel sirip ikan kakap dapat tumbuh walaupun tidak terlalu bagus. Beberapa hal yang kemungkinan mempengaruhi adalah : kukrang sempurnanya sterilisasi peralatan dan lingkungan serta fasilitas peralatan yang kuraang memadai. Akibatnya masih banyak kontaminan yang masuk kedalam flask dan mencemari kultur sel.

6.2 Saran

Untuk memperbaiki hasil yang akan didapatkan harus diperhatikan beberapa hal sebagai berikut :

- fasilitas sterilisasi seperti sinar UV, termasuk kesempatan menggunakannya.
- Peralatan yang memadai dan kondisinya dalam keadaan sempurna.

DAFTAR PUSTAKA

- Blake, K. (1993). Cell culture In Virology Labfax. Ed by D.R Harper. Blackwell Scientific Publication. Pp 51 – 76.
- Burleson, F.G., T.M. Chambers and D.L. Wiedbrauk. 1992. Virology : a laboratory manual. Academic press. Pp 25 – 32
- 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.
- Coriel, L.L. 1979. preservation, storage and shipment. *In* Methods in ensymology. Vol 58. Acadeamic Press. Inc. New York. Pp29 – 36
- Direktorat Jenderal perikanan. 1977. Makalah Direktur Bina Program Pada Pertemuan koordinasidan Pemantapan Rekayasa Tcknologi Pembenihan IlintasUnit Pelaksana Teknis, Direktorat Jenderal perikanan di yogyakarta, 8 – 12 juni 1977.
- Hasegawa, S.T., Somamoto, C., Nakayasu, T. nakanishi and N. okamoto. 1997. A cell line (CFK) from fin of isogenic ginbuana crussian carp. Fish pathol 32 : 127 – 128.
- Hayashi, M., Y. Ojima and N. Asano. 1976. A cell line from telcost fish : establishment and cytogenetical characterization of the sells. Japan J. Genet. 51 : 65 – 68
- Huet, M. 1986. Texbook of fish culture : breeding and cultivation of fish. Fishing News Book. Survey England. Pp 192 – 199.
- Main, K.L. and C. Rosenfeld. 1994. Cultured of high value marine fishes in asiaand the united states. The Oceannic Institute, Hawai. Pp 3 – 44.
- Malole, M.B.M., 1990. Kultur sel dan jaringan hewan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dikertorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antaar Universitas. IPB. Bogor.
- Perkin, B.A.W., N. Chansue and D.W. Verelle. 1995. Assay of immune function in shrimp phagocytocytes : technique used as indicator of pesticide exposure. *In* techniques in fish immunology. SOS Publication. Fair Haven. USA.
- Shanon, J.E. and M.L. macy. 1973. Freezing, storage and recovery of cell stodks. *In* tissue culture : methods and applications. Academic Press-Inc. new York. Pp 712 – 718.

- Silverstein, A.M. 1989. A history of immunology. Academic Press inc. Harcourt Brace Jovanovich Publisher. New York.
- Takashi, Y., T. Itami and M. Kondo. 1985. Immunodefense system of crustacea. Fish Pathology. 30 : 141 – 150.
- Wang, C.S., K.F.J. Tang, G.H. Kou and S.N. Chen. 1993. Yellowhead disease like virus infection in the kuruma shrimp *penaeus japonicus* cultured in Taiwan. Fish Pathol. 31 : 177 – 182.
- Wolf, K. and M.C. Quimby. 1962. Establishment of eurythermic line of fish cell line in vitro. Science. 135 : 1065 – 1066.