

**SKRIPSI**

**PENGARUH BERBAGAI MEDIA PADA KULTUR SEL INSANG IKAN  
KOI (*Cyprinus carpio*) TERHADAP VIABILITAS  
DAN PERTUMBUHAN SEL**



Oleh:  
**LATIFAH KURNIAWATI**  
**BANYUWANGI – JAWA TIMUR**

**FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2014**

## Surat Pernyataan Keaslian Karya Tulis Skripsi

Yang bertanda tangan di bawah ini :

N a m a : Latifah Kurniawati  
N I M : 141011091  
Tempat, tanggal lahir : Banyuwangi, 21 April 1992  
Alamat : Jalan Musi 49, RT. 01 RW.04, Welaran Timur, Banyuwangi  
Judul Skripsi : Pengaruh Berbagai Media pada Kultur Sel Insang Ikan Koi (*Cyprinus Carpio*) terhadap Viabilitas dan Pertumbuhan Sel  
Pembimbing : 1. Dr. Endang Dewi Masithah, Ir., M.P.  
                  2. Dr. Widjiati, M. Si., Drh

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa hasil tulisan laporan Skripsi yang saya buat adalah murni hasil karya saya sendiri (bukan plagiat) yang berasal dari Dana Penelitian : Pribadi (mandiri). Hal-hal yang bukan karya saya dalam skripsi tersebut diberi tanda citasi dan ditunjukkan dalam daftar pustaka, serta kami bersedia :

1. Dipublikasikan dalam Jurnal Berkala Ilmiah Perikanan dan Kelautan Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga;
2. Memberikan ijin untuk mengganti susunan penulis pada hasil tulisan skripsi / karya tulis saya ini sesuai dengan peranan pembimbing skripsi / dosen pemilik proyek penelitian;
3. Diberikan sanksi akademik yang berlaku di Universitas Airlangga, termasuk pencabutan gelar kesarjanaan yang telah saya peroleh (sebagaimana diatur di dalam Pedoman Pendidikan Unair 2010/2011 Bab. XI pasal 38 – 42), apabila dikemudian hari terbukti bahwa saya ternyata melakukan tindakan menyalin atau meniru tulisan orang lain yang seolah-olah hasil pemikiran saya sendiri.

Demikian surat pernyataan yang saya buat ini tanpa ada unsur paksaan dari siapapun dan dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 12 Agustus 2014  
Yang membuat pernyataan,

Materei  
Rp. 6.000,-

Latifah Kurniawati  
NIM. 141011091

## SKRIPSI

### PENGARUH BERBAGAI MEDIA PADA KULTUR SEL INSANG IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) TERHADAP VIABILITAS DAN PERTUMBUHAN SEL

Oleh :

LATIFAH KURNIAWATI  
NIM : 141011091

Menyetujui,  
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

Dr. Ir. Endang Dewi Masithah, M.P.  
NIP. 19690912 199702 2 001

Dr. Widjiati, M.Si., drh.  
NIP. 19620915 199002 2 001

## **SKRIPSI**

### **PENGARUH BERBAGAI MEDIA PADA KULTUR SEL INSANG IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) TERHADAP VIABILITAS DAN PERTUMBUHAN SEL**

Oleh :

LATIFAH KURNIAWATI  
NIM : 141011091

Telah diujikan pada

Tanggal : 18 Juli 2014

#### **KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

Ketua : Dr. Gunanti Mahasri, Ir. M.Si.

Anggota : Prof. Dr. Hari Suprapto, Ir., M.Agr

Abdul Manan, S.Pi., M.Si

Dr. Endang Dewi Masithah, Ir. M.P.

Dr. Widjiati, M.Si., drh.

Surabaya, 18 Agustus 2014  
Fakultas Perikanan dan Kelautan  
Universitas Airlangga  
Dekan,

Prof. Dr. Hj. Sri Subekti,drh.DEA  
NIP. 19520517 197803 2 001

## RINGKASAN

**LATIFAH KURNIAWATI. Pengaruh Berbagai Media pada Kultur Sel Insang Ikan Koi (*Cyprinus Carpio*) terhadap Viabilitas dan Pertumbuhan Sel. Dosen Pembimbing I Dr. Ir. Endang Dewi Masithah, M.P. dan Dosen Pembimbing II Dr. Widjiati, M.Si., drh.**

Salah satu jenis ikan air tawar yang pernah dikultur adalah ikan koi (*Cyprinus carpio*). Insang merupakan salah satu organ target dari infeksi KHV. Organ tersebut diduga memiliki prevalensi (populasi virus) lebih tinggi dibandingkan dengan organ lainnya.

Pembuatan kultur sel membutuhkan media yang sesuai untuk pertumbuhan sel dalam kultur. Media kultur yang banyak digunakan untuk menumbuhkan sel yang berasal dari ikan koi adalah *Minimum Essential Medium* (MEM) dan Leibovitz's 15 (L-15) kecuali *Tissue Culture Medium* (TCM) merupakan media kultur yang tidak pernah dipakai untuk kultur sel pada ikan tersebut. Ketiga media tersebut mengandung bahan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. Bahan-bahan tersebut diantaranya adalah asam amino, vitamin, glukosa, garam anorganik, hormon dan faktor pertumbuhan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh berbagai media dan menentukan media terbaik terhadap pertumbuhan sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*). Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif. Parameter utama yang diamati adalah kepadatan dan viabilitas sel insang ikan koi, sedangkan parameter pendukungnya adalah pH dan suhu.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Media MEM, L-15 dan TCM berpengaruh terhadap pertumbuhan sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*). Dari ketiga media tersebut diketahui bahwa media terbaik untuk menumbuhkan sel insang ikan koi adalah L-15. Pembuatan kultur sel insang ikan koi sebaiknya menggunakan media L-15 karena dapat memberikan hasil pertumbuhan sel insang ikan koi yang lebih optimal.

## SUMMARY

**LATIFAH KURNIAWATI. Effect of Different Media on Cell Culture of Koi Fish (*Cyprinus Carpio*) Gills on Viability and Cell Growth. Academic Advisor I Dr. Ir. Endang Dewi Masithah, M.P. and Academic Advisor II Dr. Widjiati, M.Si., drh.**

One of fresh water cultured fish is Koi (*Cyprinus carpio*). Gills are organs which become target of KHV infection. This organ expected having higher prevalence than any other organ.

Establishment of culture cell needs compatible media for cell growth within culture. Culture media usually used for growing cell from Koi is *Minimum Essential Medium* (MEM) and Leibovitz's 15 (L-15) except *Tissue Culture Medium* (TCM) which never used for Koi's cell culture before. Those media contain materials used for cells' growth. The materials needed are amino acid, vitamin, glucose, anorganic salt, hormone and growth factor.

The purpose of this research to know the influence of different media and deciding the best media for gills cell growth of Koi (*Cyprinus carpio*). Method used for this research is descriptive. Main parameter observed is density and viability of gills cells of Koi, as for the supporting parameters are pH and temperature.

The result of research shows MEM medium, L-15 and TCM influence to grow of Koi fish gill cells (*Cyprinus carpio*). From those media, the best media used to grow of Koi fish gill cell is L-15. Establishment cell culture of koi fish gill should use L-15 because it can provide cell growth more optimal.

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rakhmat, taufiq dan hidayah-Nya, sehingga Skripsi Tentang Pengaruh Berbagai Media Pada Kultur Sel Insang Ikan Koi (*Cyprinus Carpio*) terhadap Viabilitas dan Pertumbuhan Sel dapat penulis selesaikan. Laporan ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan di Laboratorium *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga pada bulan Mei 2014.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan dan kesempurnaan Skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga Karya Ilmiah ini bermanfaat dan memberikan informasi bagi semua pihak, khususnya bagi Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga guna kemajuan serta perkembangan ilmu dan teknologi dalam bidang perikanan, terutama budidaya perairan.

Surabaya, 11 Agustus 2014

Penulis

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Pada kesempatan ini, tidak lupa pula penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Prof. Dr. Hj. Sri Subekti, drh. DEA., selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga Surabaya.
2. Dr. Endang Dewi Masithah, Ir. M.P. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Widjiati, M.Si., drh. selaku Dosen Pembimbing Serta yang telah memberikan arahan, petunjuk dan bimbingan sejak penyusunan usulan hingga selesainya Skripsi.
3. Dr. Gunanti Mahasri., Ir. M.Si., Prof. Dr. Hari Suprapto, Ir., M.Agr dan Abdul Manan, S,Pi., M.Si selaku Dosen Penguji yang telah bersedia meluangkan waktu untuk menguji serta memberikan masukan dan saran atas perbaikan laporan Skripsi.
4. Bapak A. Shofy Mubarak, S.Pi., M.Si. dan Bapak Moch. Amin Alamsjah., Ir. M.Si.,Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberi nasehat dan pengarahan selama masa perkuliahan.
5. Bapak/Tbu dosen dan staf pendidikan di Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga.
6. Kedua orangtua, adik serta keluarga besar atas doa yang selalu terlantun dan nasehat bijak yang menjadi penguat dalam studi.
7. Bude, Pakde serta mbak Ani atas doa dan dukungan yang diberikan.
8. Dyah Sunaring beserta keluarga yang turut membantu dalam penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi.

9. Indra, Nur Faizah dan Arlisa yang telah berjuang bersama dalam penelitian.
10. Ayu Puspitarani, Mervin, Samir, Fila dan Kimbun serta teman-teman Piranha 2010 atas doa dan dukungan yang kalian diberikan.
11. Semua pihak yang telah membantu sehingga Skripsi ini bisa terselesaikan.



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
RINGKASAN.....	v
SUMMARY .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
UCAPAN TERIMA KASIH .....	viii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
<b>I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Balakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
<b>II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Koi .....	4
2.2 Organ Insang.....	5
2.3 Kultur Sel .....	6
2.4 Media Pertumbuhan Kultur Sel .....	6
2.4.1 <i>Minimum Esensial Medium (MEM)</i> .....	7
2.4.2 <i>Leibovitz 15 (L-15)</i> .....	7
2.5.3 <i>Tissue Culture Medium (TCM)/ Medium 199</i> .....	8
2.5 Faktor Pendukung Kultur Sel .....	8
2.5.1 Suhu .....	8
2.5.2 pH .....	9
2.6 Pertumbuhan dan Viabilitas Sel.....	9

<b>III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....</b>	<b>11</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	11
3.2 Hipotesis .....	12
<b>IV METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>14</b>
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
4.2 Materi Penelitian .....	14
4.2.1 Peralatan Penelitian .....	14
4.2.2 Bahan Penelitian.....	14
4.3 Metode Penelitian.....	15
4.3.1 Rancangan Penelitian .....	15
4.4 Prosedur Kerja .....	15
4.4.1 Sterilisasi Peralatan.....	15
4.4.2 Pembuatan Media Kultur Sel .....	16
4.4.3 Pengambilan Eksplan.....	17
4.4.4 Kultur Sel.....	17
4.4.5 Pengamatan Pertumbuhan dan Viabilitas Sel .....	18
4.5 Parameter Penelitian.....	20
<b>V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>21</b>
5.1 Hasil .....	21
5.1.1 Pertumbuhan Sel Insang .....	21
5.1.2 Viabilitas Sel Insang .....	23
5.2 Pembahasan .....	24
<b>VI KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>29</b>
6.1 Kesimpulan .....	29
6.2 Saran .....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>35</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Table</b>	<b>Halaman</b>
1. Rata-rata Jumlah Sel Insang yang Tumbuh di Setiap Media .....	22
2. Viabilitas Sel dari Tiga Media Kultur dalam Tiga Lapang Pandang	25



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Morfologi Ikan Koi .....	5
2. Skema Kerangka Konseptual.....	13
3. Diagram Alir Penelitian .....	20
4. Pertumbuhan Sel Insang pada Ketiga Media Kultur.....	23
5. Viabilitas Sel Insang .....	24



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi Media MEM, TCM dan L-15.....	35
2. Pertumbuhan Kultur Sel Insang pada Media Berbeda .....	36
3. Hasil Analisis Data Viabilitas Sel Insang dengan SPSS.....	44



## I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kultur sel merupakan salah satu cabang dari ilmu biologi molekuler. Kultur sel adalah kultur yang diperoleh dari sel-sel yang diuraikan secara enzimatis, mekanis atau kimiawi dan dapat juga berasal dari kultur primer (Freshney, 1994). Umumnya, teknik kultur sel juga digunakan untuk mempelajari perilaku sel secara invitro (Puspitasari dkk., 2008). Kultur sel primer yang berasal dari ikan cenderung digunakan untuk deteksi penyakit dan studi toksikologi (Shobana *et al.*, 2009).

Salah satu jenis ikan air tawar yang sudah dikultur adalah ikan koi (Neukirch *et al.*, 1999). Ikan koi termasuk jenis ikan hias air tawar yang bernilai ekonomis tinggi, baik di pasar nasional maupun internasional (Firdaus, 2010). Freyer and Lannan (1994) menambahkan pembuatan kultur sel yang berasal dari ikan-ikan bernilai ekonomis tinggi bertujuan untuk mempelajari karakteristik sel dan penyakit serta studi pembuatan vaksin.

Salah satu organ yang dilaporkan pernah berhasil dikultur pada ikan koi adalah insang (Chien Tu *et al.*, 2013). Insang merupakan salah satu pintu masuk serangan patogen karena organ tersebut terhubung langsung dengan lingkungan luar (Lee *et al.*, 2008). Part and Wood (2007) menambahkan sel epitel merupakan sel yang mendominasi hampir 90-95% wilayah insang. Sel tersebut mampu beregenerasi secara cepat sehingga dapat dikultur (Boediono, 2002).

Pada kultur sel, sel dapat berproliferasi dan berdiferensiasi. Proses proliferasi tersebut berhubungan dengan pertumbuhan sel, sehingga faktor yang

berperan dalam pertumbuhan utamanya nutrisi dalam media kultur sangat diperlukan (Puspitasari dkk., 2008). Pada pembuatan kultur sel membutuhkan media yang sesuai untuk pertumbuhan sel dalam kultur (Arora, 2013). Gibco (2011) menambahkan media optimal yang digunakan dalam kultur sel dapat mempertahankan kelangsungan hidup sel yang ditentukan berdasarkan nilai viabilitas sel.

Media kultur yang banyak digunakan untuk menumbuhkan sel yang berasal dari ikan koi adalah *Minimum Essential Medium* (MEM) (Neukirch *et al.*, 1999) dan Leibovitz's 15 (L-15) (Lakra *et al.*, 2010), kecuali *Tissue Culture Medium* (TCM) merupakan media kultur yang tidak pernah dipakai untuk kultur sel pada ikan tersebut. Ketiga media tersebut mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel (Diantiwi, 2010). Nutrisi tersebut diantaranya adalah asam amino, vitamin, glukosa, suplemen organik, hormon dan faktor pertumbuhan (Puspitasari dkk., 2008). Namun, sampai saat ini belum ada referensi khusus perihal media mana yang dapat memberikan hasil terbaik terhadap pertumbuhan sel insang ikan koi yang sedang dikultur. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian tentang jenis media pertumbuhan yang paling baik dalam kultur sel insang ikan koi sangat diperlukan. Dengan begitu, akan didapatkan informasi tentang media terbaik yang dapat dijadikan referensi dalam proses pembuatan kultur sel insang ikan koi.

## 1.2 RumusanMasalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut :

- 1) Apakah media kultur antara MEM, TCM dan L-15 berpengaruh terhadap pertumbuhan dan viabilitas sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*)?
- 2) Manakah media terbaik yang dapat menumbuhkan sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*)?

### **1.3 Tujuan**

Adapun tujuan penelitian ini adalah :

- 1) Mengetahui pengaruh media kultur yang berbeda antara MEM, TCM dan L-15 terhadap pertumbuhan dan viabilitas sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*).
- 2) Mengetahui media terbaik untuk menumbuhkan sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*).

### **1.4 Manfaat**

Manfaat dari penelitian kultur sel ini adalah memberikan informasi mengenai hasil kultur sel yang berasal dari organ insang ikan koi dan studi tentang biologi sel.

## II TINJAUAN PUSTAKA

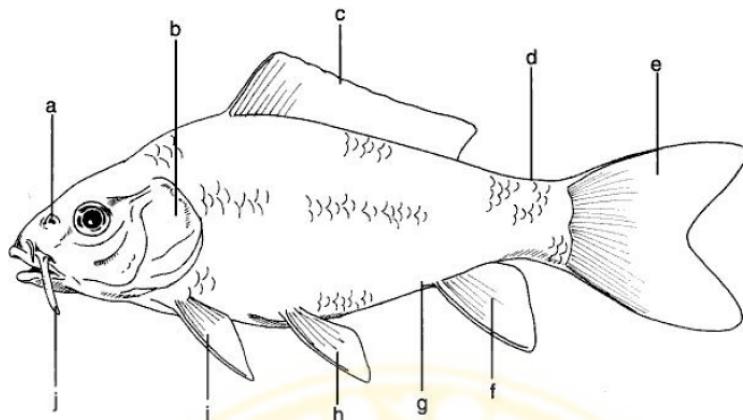
### 2.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Koi

Klasifikasi ikan koi menurut Kottelat *and* Freyhof (2007) adalah :

Phylum	:	Chordata
Sub phylum	:	Vertebrata
Class	:	Osteichthyes
Sub Class	:	Actinopterygii
Ordo	:	Cypriniformei
Sub Ordo	:	Cyprinidae
Genus	:	<i>Cyprinus</i>
Species	:	<i>Cyprinus carpio</i>

Ikan koi merupakan ikan hias air tawar yang memiliki bentuk badan seperti torpedo dengan berbagai variasi warna (Dora, 2007). Ikan koi memiliki alat gerak berupa sirip yaitu sebuah sirip punggung (*dorsal fin*), sebuah sirip anus (*anal fin*), sebuah sirip ekor (*caudal fin*) dan sebuah sirip dada (*pectoral fin*). Sirip-sirip tersebut sangat penting bagi koi untuk berpindah tempat (Prasetya, 2013). Bagian kepala koi dilengkapi dengan satu sungut, sedangkan bagian mulutnya tidak terlalu lebar dan bagian rahang tidak memiliki gigi. Gigi yang digunakan untuk mengunyah makanan terletak pada bagian tenggorokan (Iqbal, 2005).

Ikan koi memiliki ciri khas warna serta variasi jenis yang beranekaragam. Bagian badan koi memiliki pigmen atau warna seperti *xantofora* (kuning), *melanofora* (hitam), *gunofora* (putih kemilauan) dan *eritrofora* (merah) (Iqbal, 2005). Pigmen warna tersebut terdapat pada lapisan dermis kulit ikan koi (Prasetya, 2013).

Gambar 1. Morfologi Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) (Fletcher, 1999)

Keterangan	: 1. Hidung 2. Operkulum 3. Sirip punggung 4. ekor 5. Sirip ekor	6. Sirip Anal 7. Anus 8. Sirip perut 9. Sirip dada 10. Barbel
------------	--	---

## 2.2 Organ Insang

Insang ikan memainkan peran penting, yaitu terlibat dalam proses pertukaran gas, osmoregulasi, mengatur keseimbangan asam-basa serta pembuangan nitrogen (Part *et al.*, 1993). Insang didalamnya terdiri dari *lamella* dan *fillament* yang tersusun atas epitelium (Hughes and Morgan, 1973 *dalam* İşısağ and Karaklış, 1998). Sel epitel merupakan jenis sel yang paling dominan dalam menyusun organ insang. Sel tersebut berfungsi dalam proses respirasi (Part *et al.*, 1993). Freshney (2002) menambahkan sel epitel juga berperan dalam proses transportasi ion dan oksigen.

Umumnya sel epitel memiliki sifat mampu beregenerasi secara cepat sehingga dapat dikultur dalam penelitian (Freshney, 2002). Media kultur yang biasa digunakan dalam kultur sel epitel yang berasal dari organ insang adalah MEM (Neukirch *et al.*, 1999) dan L-15 (Chien Tu *et al.*, 2013).

## 2.3 Kultur Sel

Kultur sel adalah kultur yang diperoleh dari sel-sel yang dikultur (kultur primer, atau *cell line*) berasal dari potongan jaringan, setelah melalui pemisahan atau disagregasi secara enzimatis, mekanik atau kimiawi menjadi suspensi sel yang dapat dikultur sebagai monolayer (satu lapisan sel) diatas substrat solid ataupun suspensi di dalam cairan medium (Djuwita, 2002). Penguraian dengan menggunakan beberapa metode tersebut bertujuan untuk menghasilkan suspensi sel. Suspensi sel selanjutnya dibiakkan secara invitro di atas permukaan yang keras misalnya botol, tabung atau cawan atau menjadi suspense sel dalam media penumbuh (Malole, 1990).

Kultur sel bias diperbanyak dan terbagi menjadi replikasi yang identik. Kultur sel dapat diawetkan dengan pembekuan, dan dapat dimurnikan dengan cara menumbuhkannya pada media selektif, pemisahansel secara fisik atau cloning dilakukan untuk memberikan informasi tentang karakteristik sel (Freshney, 1992).

## 2.4 Media Pertumbuhan Kultur Sel

Media kultur sel umumnya terdiri dari sumber energi yang tepat untuk sel dan berisi komponen untuk regulasi sel (Arora, 2013). Media kultur sel merupakan campuran dari karbohidrat, vitamin, asam amino, hormon, mineral dan beberapa unsur yang lain(ATCC, 2012).

Konsentrasi asam amino berpengaruh pada kelangsungan hidup serta pertumbuhan sel (Heinemann, 1993). Vitamin biasanya dibutuhkan sebagai *co-*

*factor metabolisme.* Serum mengandung sejumlah bahan-bahan yang dibutuhkan sel untuk pertumbuhan yaitu protein, hormon dan *growth factor* (Puspitasaridkk., 2008). Halim dkk. (2010) menambahkan bahwa serum berperan penting sebagai sumber nutrisi sel untuk tumbuh dan berkembang. Berdasarkan kandungan asam amino dan komponen lainnya, media kultur sel terdiri dari beberapa jenis misalnya Eagle's MEM, medium 199 atau *Tissue Culture Medium*(TCM), Leibovitz's L-15 dan sebagainya (Maurer, 1992).

#### **A. Minimum Esensial Medium (MEM)**

*Minimum Esensial Medium (MEM)* merupakan media yang umum digunakan dalam kultur sel (Heinemann, 1993). Penggunaan media MEM dinilai memiliki beberapa keuntungan, diantaranya mudah disterilkan dan sedikit kemungkinan terjadinya kontaminasi pada saat kultur. Kultur pada medium MEM tumbuh pada 5% CO<sub>2</sub> (Butler, 2004).

Media MEM berisi 13 asam amino, 8 vitamin dan glukosa sebagai sumber energi (Suchman and Blair, 2013). Media MEM juga digunakan pada kultur sel insang ikan koi. Insang ikan koi yang dikultur dengan media tersebut membentuk lapisan sel monolayer pada hari ke-5 setelah dilakukan inokulasi dengan tipe sel yang dihasilkan adalah sel epitel (Neukirch *et al.*, 1999). Komposisi nutrisi media MEM dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### **B. Leibovitz's 15 (L-15)**

Media Leibovitz's berisi 17 asam amino, 8 vitamin, 1 glukosa, 4 mineral dan sodium piruvat (Leibovitz, 1963). Media L-15 mengandung arginin, cistin,

histidin dalam bentuk basa bebas, tirosin dalam konsentrasi tinggi dan galaktosa yang merupakan jenis galaktosa yang baik (Nagai *et al.*, 1998). Menurut Nuryati dkk. (2004), media L-15 mengandung sodium piruvat tertinggi diantara media yang ada. *Power of Hidrogen* (pH) dari media ini relatif stabil atau optimal sehingga media ini cocok untuk kultur invitro (ATCC, 2012). Komposisi nutrisi media L-15 dapat dilihat pada Lampiran 1.

### C. Media 199 atau *Tissue Culture Media* (TCM)

Media TCM mengandung asam amino, glukosa, molekulorganik, vitamin dan garam-garaman yang mendukung kelangsungan hidup sel (Tamyis, 2008 *dalam* Christie, 2010). Kalanjati (2006) menambahkan bahwa media TCM mengandung asam amino yang lebih lengkap serta cocok digunakan untuk pembuatan *cell line* dalam *long term culture*. Media 199 juga digunakan untuk pemeliharaan sel, vaksin dan produksi virus dan eksplan primer sel epitel (Himelab, 2011). Komposisi nutrisi media TCM dapat dilihat pada Lampiran 1.

## 2.5 Faktor Pendukung dalam Kultur Sel

### A. Suhu

Suhu optimal untuk kultur sel tergantung pada suhu tubuh hewan dimana sel tersebut diisolasi (Djuwita, 2002). Ikan merupakan hewan poikiloterm yang memiliki kisaran suhu sebesar 15-26°C (Fresney, 2005). Suhu optimal yang digunakan dalam kultur sel insang ikan koi adalah 25°C (Neukirch *et al.*, 1999). Hediger (2002) menambahkan bahwa sel epitel dapat tumbuh pada media kultur dengan suhu maksimal sebesar 37°C.

## B. pH

Stabilitas pH pada media sangat penting untuk pertumbuhan dan metabolisme sel (Gibco, 2011). pH optimal yang digunakan dalam pembuatan sel epitel adalah 6,9-7,4 (Grajek *and* Olejnik, 2004). pH optimal yang digunakan dalam kultur sel dapat membantu proses metabolisme sel terutama dalam produksi CO<sub>2</sub>(Yang *and* Xiong, 2012) yang diketahui berfungsi dalam pembentukan purin dan pirimidin (Grajek *and* Olejnik, 2004).

## 2.6 Pertumbuhan Sel dan Viabilitas Sel

Secara umum, pertumbuhan sel dalam kultur terbagi menjadi tiga fase, yaitu lag fase, log fase dan plateau fase (Djuwita, 2002). Lag fase merupakan periode perlekatan dan penyebaran sel pada substrat karena sel mengalami proses adaptasi. Pada fase ini belum terjadi peningkatan jumlah sel (Butler, 2004). Log fase merupakan periode peningkatan jumlah sel secara eksponensial pada saat pertumbuhan. Plateau fase ditandai dengan kultur menjadi konfluen yaitu permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah terpakai dan sel saling berhubungan dengan lingkungan. Pada fase ini pertumbuhan sel akan menurun hingga mencapai 10% (Djuwita, 2002)

Faktor penting yang berpengaruh terhadap pertumbuhan sel adalah nutrisi yang terdapat pada media kultur (Freshney, 1992). Nutrisi yang terkandung dalam media kultur terdiri dari karbohidrat, vitamin, asam amino, hormon, mineral dan beberapa unsur yang lain (Butler, 2004). Pembuatan kultur sel epitel

membutuhkan nutrisi berupa karbohidrat, asam amino, vitamin hormon, garam mineral dan *growth factor* yang terkandung didalam media kultur (Grajek and Olejnik, 2004).

Viabilitas sel merupakan ukuran yang digunakan dalam menentukan kemampuan sel untuk hidup dalam suatu populasi (Butler, 2004). Penentuan viabilitas dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan (Mothersill and Austin, 2003). Pada sel epitel, penentuan viabilitas menggunakan *trypan blue* (Grajek and Olejnik, 2004). *Trypan blue* digunakan untuk mengetahui perbedaan antara sel hidup dan mati (Freshney, 1992).

Pada pewarnaan dengan *trypan blue*, sel yang hidup ditandai dengan warna bening dan sel yang mati berwarna biru (Butler, 2004). Hal tersebut dikarenakan pada sel yang mati kehilangan kemampuan dalam mempertahankan integritas dan permeabilitas membran plasma sehingga *typan blue* terserap kedalam sel (Freshney, 1992). Rusaknya permeabilitas sel umumnya dipengaruhi oleh pH, aktivitas ionik di dalam sel serta proses *freezing* dan *thawing* (Mothersill and Austin, 2003).

Media kultur berperan penting dalam mempertahankan kelangsungan hidupsel. Media kultur optimal dapat mempertahankan kelangsungan hidup sel dengan viabilitas minimal sebesar 95% (Gibco, 2011). Part *et al.*, (1993) menambahkan bahwa viabilitas sel epitel ikan air tawar *rianbow trout* yang dikultur pada media L-15 sebesar 80%.

### III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Konseptual

Ikan koi merupakan jenis ikan air tawar yang dapat dikultur untuk studi penelitian mengenai virus, pembuatan bahan imunologi dan vaksin (Lakra *et al.*, 2010). Organ yang berhasil dikultur pada ikan tersebut salah satunya adalah insang (Neukirch *et al.*, 1999). Organ insang diketahui memiliki sel dominan yaitu sel epitel (Mothersill *and* Austin, 2003) yang diketahui memiliki kemampuan beregenerasi secara cepat (Freshney, 2002).

Salah satu faktor penentu keberhasilan kultur adalah media kultur yang berpengaruh terhadap pertumbuhan sel selain faktor-faktor seperti CO<sub>2</sub>, pH, suhu. Pembuatan kultur sel membutuhkan media yang sesuai untuk pertumbuhan sel (Arora, 2013). Kultur sel epitel membutuhkan nutrisi berupa karbohidrat, asam amino, vitamin hormon, garam mineral dan *growth factor* yang terkandung didalam media kultur (Grajek *and* Olejnik, 2004).

Media kultur yang banyak digunakan untuk menumbuhkan sel yang berasal dari ikan koi adalah *Minimum Essential Medium* (MEM) (Neukirch *et al.*, 1999) dan *Leibovitz-15* (L-15) (Lakra *et al.*, 2010), kecuali *Tissue Culture Medium* (TCM) merupakan media kultur yang tidak pernah dipakai untuk kultur sel pada ikan tersebut. Ketiga media yang digunakan tersebut mengandung bahan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel (Diantiwi, 2010).

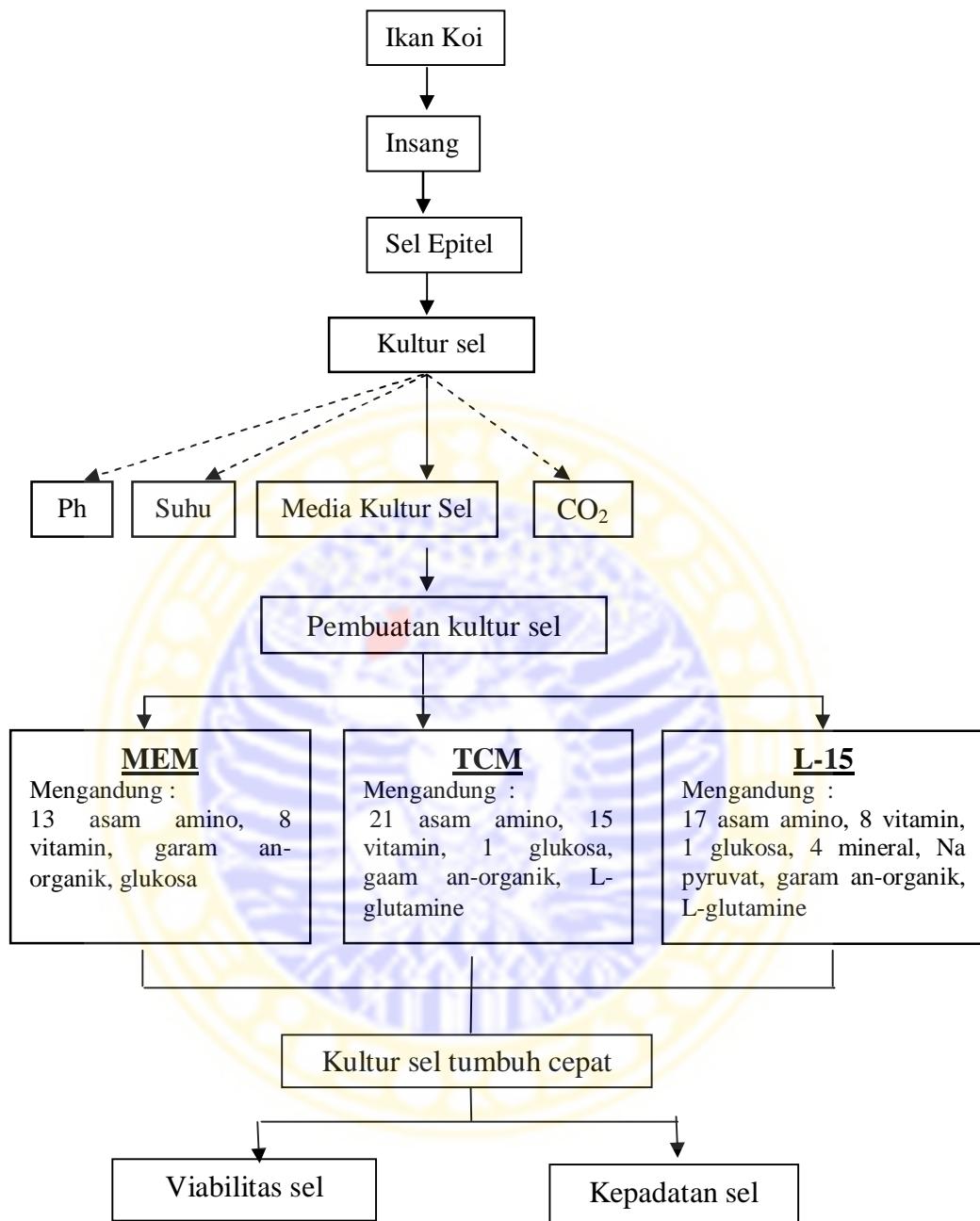
Konsentrasi asam amino berpengaruh pada kelangsungan hidup serta pertumbuhan sel (Heinemann, 1993). Vitamin biasanya dibutuhkan sebagai *co-factor* metabolism sel. Faktor pertumbuhan sel terdapat dalam serum. Serum

mengandung sejumlah bahan-bahan yang dibutuhkan yaitu sumber protein, hormon, dan *growth factor* (Puspitasari dkk., 2008). Halim dkk. (2010) menambahkan bahwa serum berperan penting sebagai sumber nutrisi sel untuk tumbuh dan berkembang.

Konsentrasi bahan yang terkandung dalam ketiga media tersebut berbeda-beda sehingga berpengaruh terhadap kepadatan sel yang tumbuh serta sel hidup (viabilitas sel), serta untuk mengetahui media terbaik untuk menumbuhkan sel insang ikan koi.

### 3.2 Hipotesis

1. Penggunaan media kultur yang berbeda berpengaruh terhadap pertumbuhan dan viabilitas sel ikan insang ikan koi (*Cyprinus carpio*).
2. Terdapat media terbaik untuk menumbuhkan sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*).



**Gambar 2.** Skema Kerangka Konseptual

Keterangan : —→ aspek yang diteliti  
- - - → aspek yang tidak diteliti

## IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Mei 2014.

### 4.2 Materi Penelitian

#### 4.2.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain berupa gunting, pinset, substrat, petri disk, gelas ukur, pipet, pipet pasteur, mikrotip, mikropipet, botol 250 ml, *beaker glass*, *filter miliphore*, *alumunium foil*, sputit, timbangan digital, *centrifuge*, *Laminar Air Flow* (LAF), oven, inkubator CO<sub>2</sub>, *haemocytometer*, mikroskop inverter, kertas pH dan kamera.

#### 4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang memiliki bobot rata-rata ± 10 gr/ekor (Tauhid dkk., 2010). Ikan koi tersebut diperoleh dari pasar ikan hias Gunungsari, Surabaya. Media kultur yang digunakan meliputi media *Minimum Essential Medium* (MEM), *Tissue Culture Medium* (TCM) dan *Leibovitz-15* (L-15). Serum yang digunakan adalah *Fetal Bovine Serum* (FBS). Antibiotik *Penicillin* dan *Streptomycin* digunakan untuk mencegah tumbuhnya bakteri. *Amphotericin* digunakan untuk mencegah tumbuhnya jamur. Natrium karbonat (NaHCO<sub>3</sub>) sebagai larutan penyanga untuk menjaga kestabilan pH pada media kultur. *Trypan blue* guna penentuan viabilitas

sel. NaCl fisiologis digunakan untuk membersihkan darah serta lendir yang menempel pada insang koi. Etanol 70% digunakan untuk menghilangkan sumber kontaminan serta membersihkan lendir yang menempel pada tubuh ikan koi.

### **4.3 Metode Penelitian**

#### **4.3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan asumsi media dan bahan percobaan sama dari pengambilan sampel sampai dengan penggerjaan serta kondisi laboratorium. Perlakuan yang digunakan sebanyak 3 perlakuan dengan 3 kali ulangan.

Perlakuan A : menggunakan media kultur Leibovitz L-15

Perlakuan B : menggunakan media kultur MEM

Perlakuan C : menggunakan media kultur TCM

Variabel penelitian ini adalah:

Variabel bebas : media kultur Leibovitz L-15, MEM dan TCM

Variabel tergantung : jumlah sel insang ikan koi dan viabilitas

Variabel kendali : inkubator anaerob, alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

### **4.4 Prosedur Kerja**

#### **4.4.1 Sterilisasi Peralatan**

Tahap awal dalam melakukan sebuah kultur adalah adanya proses sterilisasi. Sterilisasi adalah suatu proses yang efektif untuk membunuh atau

menghilangkan agen penular atau kontaminan (seperti jamur, bakteri dan virus) dari permukaan, peralatan, makanan, obat-obatan, atau media kultur biologis (Sultana, 2007). Sterilisasi dilakukan dengan tujuan membebaskan peralatan dan media dari mikroorganisme yang tidak diinginkan (Ma`at, 2009).

Peralatan yang tahan panas seperti pipet, gelas ukur dan botol 250 ml disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama satu jam. Pinset dan gunting dicuci bersih dengan menggunakan sabun kemudian disemprot dengan alkohol 70%. Media kultur disterilkan secara mekanik yaitu menggunakan filter dengan ukuran pori  $2\mu\text{m}$  untuk memisahkan bakteri. Penyaringan dilakukan menggunakan *filter miliphore* dengan bantuan *syringe injeksi*. Tempat kerja juga disterilkan dengan menyemprot meja menggunakan alkohol 70% kemudian dilap dengan *tissue*. Teknik aseptis diterapkan selama proses pengerajan kultur sel seperti mencuci tangan dengan sabun kemudian menyemprot dengan alkohol 70% pada tangan setiap sebelum dan sesudah melakukan tahapan kultur.

#### 4.4.2 Pembuatan Media Kultur Sel

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Minimal Essential Medium* (MEM), *Tissue Culture Medium* (TCM) dan *Leibovitz 15* (L-15) yang terdiri dari asam amino, vitamin dan *growth factor* yang berbeda. Kandungan nutrisi media secara lengkap dapat dilihat di Lampiran 1.

Masing-masing stok media kultur sel baik MEM, TCM dan L-15 dibuat dengan cara mencampur 100 ml stok media dengan 0,2 gram natrium karbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), 200  $\mu\text{l}$  *penicillin* dan *streptomycin*, 200  $\mu\text{l}$  *amphoterycim* serta *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak 10%. Semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam

botol 250 ml kemudian dikocok hingga seluruh bahan tercampur. Media yang telah tercampur selanjutnya disterilisasi menggunakan filter *miliphore* berukuran 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.3 Pengambilan eksplan

Sel yang akan ditanam sebagai explan berasal dari organ insang ikan koi yang memiliki berat kira-kira 10 gr/ekor (Tauhid dkk., 2010). Ikan koi tersebut diperoleh dari pasar ikan hias Gunungsari, Surabaya.

Ikan dibersihkan seluruh bagian permukaan tubuhnya dengan cara disemprot etanol 70% kemudian diusap dengan tisu. Hal tersebut bertujuan untuk menghilangkan sisa lendir yang menempel pada tubuh ikan. Selanjutnya, bagian operkulum dibuka dan insang diambil dengan cara dipotong menggunakan gunting dan pinset steril.

Lembaran insang yang telah dipotong, selanjutnya diletakkan kedalam petri dish dan dicuci sebanyak tiga kali dengan NaCl fisiologis selama 1-2 menit. Hal tersebut bertujuan untuk menghilangkan sisa lendir dan darah yang masih menempel pada permukaan insang. Insang yang telah dicuci dengan NaCl, kemudian dicuci kembali dengan menggunakan media kultur sebanyak 2 ml selama  $\pm 1$  menit dan selanjutnya dipindah kedalam petri dish baru untuk dicacah.

#### 4.4.4 Kultur Sel

Insang dipotong kecil-kecil dengan ukuran  $\pm 1 \text{ mm}^3$  menggunakan gunting dan selanjutnya diberi media kultur sel sebanyak  $\pm 2$  ml. Potongan insang lalu dimasukkan kedalam tabung sentrifus dan selanjutnya disentrifus selama 10 menit

dengan kecepatan 2.500 rpm. Tahapan ini bertujuan untuk memisahkan sel dan supernatan. Setelah disentrifus, supernatan dibuang dan disisakan bagian endapan untuk kemudian ditambah media kultur sebanyak 2 ml. Endapan yang bercampur dengan media kultur selanjutnya disentrifus lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifus selanjutnya dibuang dan disisakan endapan potongan organ.

Substrat yang akan digunakan bagian tutupnya diberi label sesuai dengan nama masing-masing media (L-15, MEM dan TCM). Potongan organ insang ikan koi yang telah disentrifus sebanyak 2 kali kemudian diberi media kultur sebanyak 2 ml dan dicampur dengan cara pemipatan menggunakan sputit berukuran 1 ml. Setelah *dipipeting*, campuran potongan organ dan media selanjutnya dimasukkan kedalam *multi-well plate* dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 25°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%.

#### 4.4.5 Pengamatan Pertumbuhan dan Viabilitas Sel

Pengamatan sel insang ikan dilakukan setiap 3-4 hari sekali hingga hari ke-24 kultur (Neukirch *et al.*, 1999). Sel diamati dibawah mikroskop inverted dengan perbesaran 400 kali. Selama kultur dilakukan pasase sebanyak empat kali, untuk menambah nutrisi dalam media kultur.

Pengamatan pertumbuhan sel dilakukan sebelum pasase. Penghitungan jumlah sel dilakukan dengan cara memindah kultur pada petri dish kedalam tabung sentrifuse kemudian diberi 2 ml media baru untuk membersihkan sel yang masih menempel pada petri. Sel disentrifus selama 10 menit kemudian supernatannya dibuang. Pelet yang tersisa selanjutnya diberi media baru sebanyak

1 ml dan dilakukan *pipeting* dengan pipet pasteur agar sel dan media tercampur merata.

Bilik *haemocytometer* yang digunakan untuk penghitungan sel insang adalah *small block* karena sel berukuran kecil dan padat. Sel yang dihitung berada didalam lima kotak kecil *small block*. Jumlah sel yang telah didapat dihitung menggunakan rumus penghitungan pertumbuhan sel yang direkomendasikan oleh Phelan (1998).

$$\text{Cells/ml} = \text{average count per square} \times \text{dilution factor} \times 10^4$$

Viabilitas sel insang ikan koi dihitung pada hari terakhir kultur sel yakni hari ke-25. Viabilitas sel ditentukan dengan menggunakan pewarnaan *trypan blue* 0,1 %. *Trypan blue* digunakan untuk mengetahui perbedaan sel hidup dan mati. Penghitungan viabilitas sel dilakukan dengan *handlycounter*. Sel yang hidup bewarna bening dan yang mati bewarna biru (Patterson, 1979 dalam Butller, 2004).

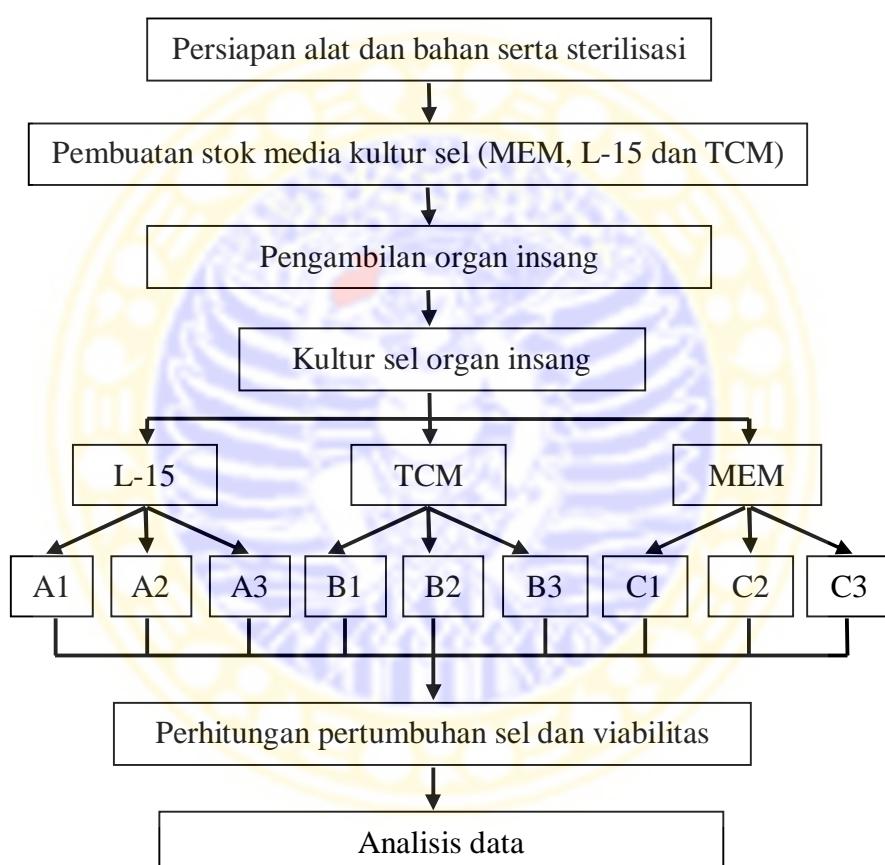
Semua sel dalam satu lapang pandang dihitung baik sel berwarna bening maupun sel berwarna biru. Sel bening menunjukkan sel masih bertahan hidup sedangkan sel berwarna biru menunjukkan sel tersebut mati. Viabilitas sel dihitung dengan menggunakan rumus (Freshney, 2000 dalam Kalanjati, 2006).

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{Total sel hidup}}{\text{Total jumlah sel (hidup + mati)}} \times 100 \%$$

Pada tahap ini selain dilakukan pengamatan pertumbuhan sel juga dilakukan pengecekan ada tidaknya kontaminasi kultur didalam *Laminar Air Flow* (LAF).

#### 4.5 Parameter Penelitian

Pada penelitian ini parameter utama yang diamati adalah pertumbuhan pada media kultur (sel mampu memperbanyak diri) serta viabilitas yang tinggi. Parameter pendukung yang diamati dalam penelitian ini adalah suhu dan pH. Bagan alir pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Diagram Alir Penelitian

## V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil

#### 5.1.1 Pertumbuhan Sel Insang

Kepadatan sel diukur berdasarkan hasil penghitungan pertumbuhan sel sebelum dilakukan pasase, yaitu pada hari ke-6, 12, 18 dan 24. Hasil penelitian kultur sel insang ikan koi pada media MEM, L-15 dan TCM menunjukkan pertumbuhan yang berbeda pada setiap media. Hasil analisis data pertumbuhan sel dapat dilihat pada Lampiran3.

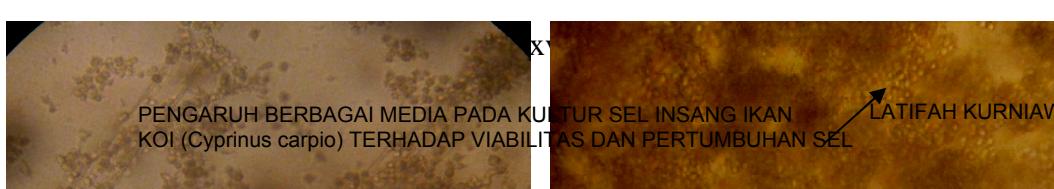
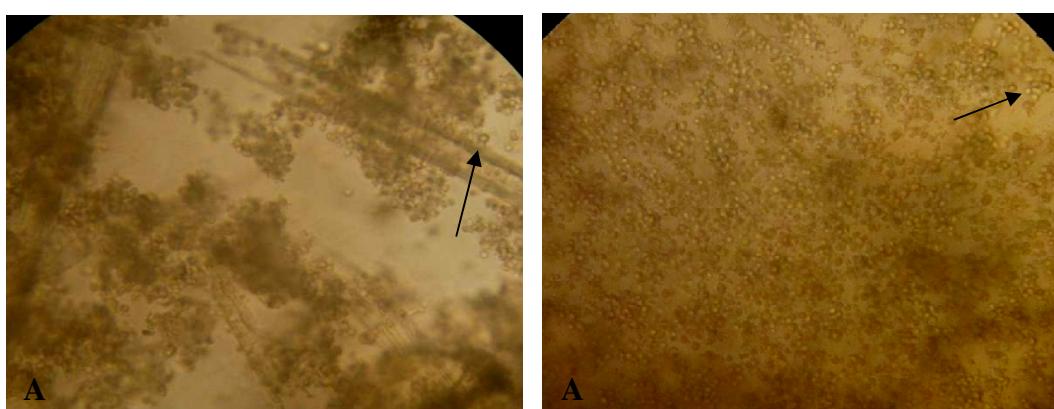
Hasil statistik *Analisis of Varian* (ANOVA) terhadap pertumbuhan sel insang ikan koi yang dikultur pada media MEM, L-15 dan TCM hingga hari ke-25 kultur menunjukkan bahwa perlakuan media memberikan pengaruh yang berbeda nyata ( $p<0,05$ ) terhadap jumlah sel insang ikan koi (Tabel 1). Uji statistika tersebut selanjutnya diuji dengan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan. Hasil Uji Jarak Berganda Duncan pada hari ke-6, ke-12, ke-18 dan ke-24 kultur disimpulkan bahwa perlakuan A (media L-15) memberikan hasil kultur sel insang tertinggi yang berbeda nyata dengan perlakuan B (media TCM) dan perlakuan C (media MEM). Pada penelitian ini juga diperoleh hasil kultur insang ikan koi terendah yaitu pada perlakuan C. Pada perlakuan B dan perlakuan C juga diketahui terdapat hasil yang berbeda nyata.

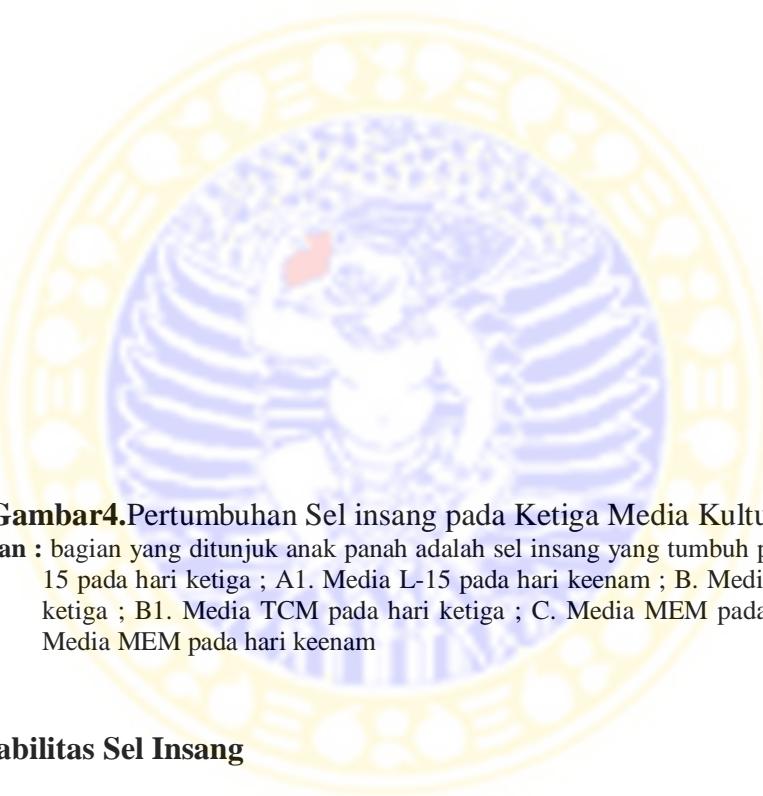
**Tabel 1.** Rata-Rata Jumlah Sel Insang yang Tumbuh di Setiap Media

Hari ke-	Media		
	MEM± SD ( $\times 10^6$ sel/ml)	TCM± SD ( $\times 10^6$ sel/ml)	L-15± SD ( $\times 10^6$ sel/ml)
6	7± 1,000 <sup>c</sup>	11± 1,000 <sup>b</sup>	14± 1,000 <sup>a</sup>
12	13± 2,000 <sup>c</sup>	19± 2,000 <sup>b</sup>	24± 1,732 <sup>a</sup>
18	18± 2,000 <sup>c</sup>	27± 2,646 <sup>b</sup>	33± 2,646 <sup>a</sup>
24	25± 1,732 <sup>c</sup>	36± 2,646 <sup>b</sup>	43± 2,000 <sup>a</sup>

**Keterangan:** perbedaan notasi pada kolom yang berbeda menunjukkan bahwa setiap perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda signifikan ( $p<0,05$ ).

Berdasarkan hasil penelitian, sel insang yang tumbuh berbentuk bulat kecil dan tumbuh di sekitar eksplan. Sel insang kian koi yang dikultur baik pada ketiga media kultur yaitu MEM, TCM dan L-15 pada hari ketiga menunjukkan hasil yaitu sel telah menempel di dasar *plate* dan mulai menyebar disekitar eksplan (Gambar 4). Pada pengamatan selanjutnya yaitu hari keenam setelah inokulasi, sel insang yang tumbuh dalam media MEM, L-15 maupun TCM menunjukkan pertumbuhan sel yang lebih padat dibandingkan saat pengamatan hari ketiga (Gambar 4). Beberapa sel tersebut juga terlihat bertumpukan sehingga tidak jelas ketika diamati.





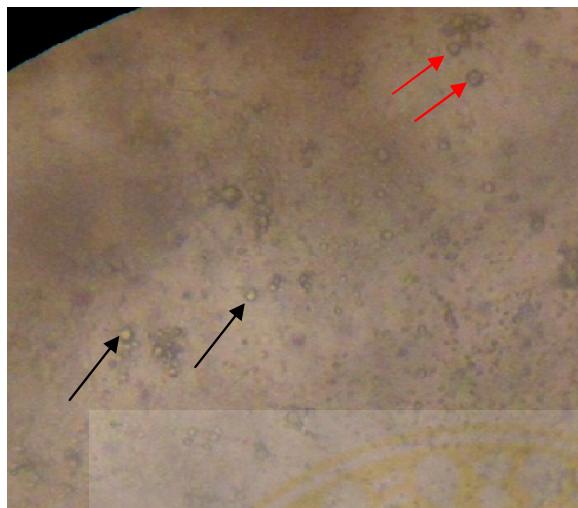
**Gambar4.**Pertumbuhan Sel insang pada Ketiga Media Kultur

**Keterangan :** bagian yang ditunjuk anak panah adalah sel insang yang tumbuh pada A. Media L-15 pada hari ketiga ; A1. Media L-15 pada hari keenam ; B. Media TCM pada hari ketiga ; B1. Media TCM pada hari ketiga ; C. Media MEM pada hari ketiga; C1. Media MEM pada hari keenam

### 5.1.2 Viabilitas Sel Insang

Viabilitas menggambarkan kemampuan daya hidup dari sel yang dikultur.

Penentuan viabilitas sel menggunakan pewarnaan dengan *trypan blue*. Pada pewarnaan dengan *trypan blue*, sel yang hidup ditandai dengan warna bening dan sel yang mati berwarna biru.



Keterangan :  
Bagian yang ditunjuk anak panah ( $\longrightarrow$ ) adalah sel yang hidup, dengan ciri sel berwarna bening.

( $\longrightarrow$ ) adalah sel yang mati, dengan ciri sel berwarna gelap.

**Gambar 5.** Viabilitas sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*)

Penghitungan viabilitas sel insang ikan koi dilakukan pada hari terakhir pemeliharaan sel yaitu pada hari ke-24. Berdasarkan pengamatan selama 24 hari pemeliharaan dapat diketahui prosentase viabilitas sel pada ketiga media (Tabel 2). Hasil statistik *Analisis of Varian* (ANOVA) terhadap viabilitas sel insang ikan koi yang dikultur pada ketiga media yaitu MEM, L-15 dan TCM menunjukkan pengaruh yang nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap viabilitas sel (Lampiran4).

**Tabel 2.** Viabilitas Sel insang pada Media Berbeda

Ulangan ke-	Media		
	MEM (%)	TCM (%)	L-15 (%)
1	89,89	91,58	97,29
2	91,39	93,61	95,72
3	90,62	92,92	96,49
Rata-rata $\pm$ SD	$90.633 \pm 0,75^c$	$92.703 \pm 1,032^b$	$96.71 \pm 1,116^a$

**Keterangan:** perbedaan notasi pada kolom yang berbeda menunjukkan bahwa setiap perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda signifikan ( $p<0,05$ )

## 5.2 Pembahasan

Hasil pengamatan pertumbuhan sel menunjukkan bahwa sel insang ikan koi mampu tumbuh pada ketiga media, yaitu MEM, TCM dan L-15. Pada kultur sel insang ikan koi diketahui jenis sel yang tumbuh adalah sel epitel (Neukirch *et al.*, 1999). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Part *et al.* (1993) bahwa jenis sel yang mendominasi insang yaitu sel epitel. Fresney (2002) menambahkan sel epitel diketahui memiliki prekusor proliferasi sehingga mampu beregenerasi sendiri secara cepat.

Dalam proses pertumbuhan sel epitel diperlukan nutrisi cukup untuk memenuhi kebutuhan hidup sel. Kandungan nutrisi dari ketiga media yang digunakan dalam kultur sel insang ikan koi terdiri vitamin, garam anorganik, glukosa dan asam amino yang dibutuhkan oleh sel untuk tumbuh (Hediger, 2002). Yang *and* Xiong (2012) menyatakan asam amino dalam media kultur digunakan sebagai bahan dasar untuk proses sintesis protein dalam sel. Vitamin juga dibutuhkan sel epitel sebagai kofaktor yang berperan dalam proses metabolisme sel (Grajek *and* Olejnik, 2004). Garam anorganik dari ketiga media kultur berupa  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  dan  $\text{KCl}$  dibutuhkan sel epitel untuk proses transportasi ion didalam membran plasma (Hediger, 2002). Glukosa dalam bentuk D-Glucose diketahui sebagai sumber energi untuk metabolisme sel epitel (Grajek *and* Olejnik, 2004).

Hasil penelitian juga didapatkan bahwa rata-rata pertumbuhan sel insang ikan koi pada media L-15 lebih tinggi dari media yang lain (Tabel 1). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pertumbuhan kultur sel insang ikan koi pada media L-15 berbeda signifikan dengan kedua media lainnya ( $p < 0,05$ ). Hal tersebut mungkin dikarenakan media ini memiliki kandungan L-glutamin yang lebih banyak dibandingkan dua media lain. L-glutamin tersusun atas asam amino non essensial yang berfungsi sebagai sumber energi dalam proses metabolisme sel. Mekanisme pemanfaatan sumber energi tersebut dimulai dari glutamin diubah menjadi glutamat didalam mitokondria. Glutamat kemudian bersama alanin dan asam piruvat diubah menjadi alfa ketoglutarat yang digunakan dalam siklus asam trikarboksilik (TCA) untuk memproduksi ATP sehingga menjadi sumber energi utama dalam kehidupan sel serta pembentukan asam amino dan nukleotida (Miller, 1999).

Leibovitz-15 diketahui memiliki kapasitas buffer yang lebih besar daripada kedua media lainnya, sehingga memungkinkan sel-sel untuk memanfaatkan asam amino bebas dan menggantikan glukosa dengan galaktosa dan piruvat (Griffiths, 1986). Kapasitas buffer yang besar pada media L-15 menyebabkan media tersebut mampu menstabilkan pH media yang diketahui berpengaruh dalam pertumbuhan sel (Lio-Po *et al.*, 1999). Griffiths (1986) menambahkan adanya kandungan piruvat pada media tersebut memungkinkan sel untuk meningkatkan produksi  $\text{CO}_2$  *endogeneous* sehingga pertumbuhannya tidak bergantung pada  $\text{CO}_2$  dan  $\text{HCO}_3$  *eksogeneous*. Hal ini didukung juga oleh Wood *and* Pärt (1997) bahwa sel epitel pada media L-15 mampu tumbuh cepat dalam waktu 48 jam seperti yang

ditunjukkan pada Tabel 1. Diperkuat oleh pernyataan Leibovitz (1981) bahwa media L-15 cocok digunakan dalam kultur sel yang berasal dari ikan. Media tersebut memiliki konsentrasi asam amino utama dalam bentuk bebas seperti *L-arginine* dan bikarbonat sebagai buffer penyeimbang pH media sehingga memacu pertumbuhan sel lebih cepat.

Pada media MEM, sel insang mampu tumbuh pada media tersebut. Namun, rata-rata pertumbuhannya tidak sebanyak sel yang dikultur pada media L-15. Hal tersebut terjadi mungkin disebabkan media MEM memiliki kapasitas buffer yang lebih sedikit dibandingkan media L-15, sehingga kurang bisa menstabilkan pH media (Lio-Po *et al.*, 1999). Neukirch *et al.* (1999) menambahkan sel insang ikan koi mampu membentuk monolayer sel epitel yang terjadi dalam waktu lima hari dengan kepadatan sel mencapai  $2-3 \times 10^6$  sel/ml. Secara umum, Sel epitel mampu tumbuh antara tiga sampai 48 jam pasca kultur (Fresney, 2002).

Pada media TCM, sel insang mampu tumbuh pada media tersebut. Namun, rata-rata pertumbuhannya tidak sebanyak sel yang dikultur pada media L-15. Hal tersebut terjadi mungkin disebabkan media TCM mengandung buffer lebih rendah daripada media L-15, sehingga kurang bisa menstabilkan pH media yang diketahui berpengaruh terhadap pertumbuhan sel. Didukung oleh pernyataan Fernandes *et al.* (1993) bahwa media TCM kurang mendukung pertumbuhan sel jika digunakan dalam kultur sel ikan. Kumar *et al.* (2001) dalam studi penelitiannya menambahkan bahwa sel ovari *C. gariepinus* yang dikultur pada media TCM dapat berproliferasi setelah 72 jam inokulasi.

Peran nutrisi dalam pertumbuhan sel insang juga didukung oleh faktor lingkungan berupa suhu dan pH. Padapenelitiankulturselinsang ikan koi,suhu yang digunakansebesar 25°C. Hal tersebut sesuai pernyataan Neukirch *et al.* (1999) bahwa sel epitel pada insang ikan koi dapat tumbuh optimal pada suhu 25°C.

Selain faktor nutrisi yang ada didalam media kultur, peran faktor pendukung dalam kultur sel seperti pH juga berpengaruh terhadap pertumbuhan sel.Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa kisaran pH pada ketiga media kultur sebesar 7-8. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Grajek *and* Olejnik (2004) bahwa kisaran pH optimal dalam kultur sel epitel adalah 6,9-7,4. pH optimal yang digunakan dalam kultur sel dapat membantu proses metabolisme sel terutama dalam produksi CO<sub>2</sub>(Yang *and* Xiong, 2012) yang diketahui berfungsi dalam pembentukan purin dan pirimidin dalam nukleotida (Grajek *and* Olejnik, 2004).Jika pH melebihi batas optimal maka kandungan amonia dalam media kultur menjadi tinggi sehingga akan menghambat pertumbuhan sel (Butler, 2004). Pemberian NaHCO<sub>3</sub> pada saat pembuatan media kultur berfungsi sebagai buffer untuk penyeimbang pH pada media (Grajek *and* Olejnik, 2004). Malole (1990) menambahkanpenggunaankadar CO<sub>2</sub>sebesar 5% pada inkubator dapatdigunakansebagaipengaturkeseimbangan pH dalam media.

Selama penelitian diketahui rata-rata pertumbuhanselpadaketiga media yaitu MEM, TCM dan L-15 menunjukkanhasilyang baikkarenanilai viabilitasselinsanglebihdari80% (Tabel 2).Hal ini didukung oleh pernyataan Part

*et al.*, (1993) bahwa nilai viabilitas sel epitel yang baik pada ikan *rainbow trout* adalah sebesar 80%.

Pada media L-15, diketahui nilai viabilitas sel insang berkisar antara 95-97% (Tabel 2). Hal tersebut sesuai pernyataan Gibco (2011) bahwa media optimal dalam menentukan viabilitas sel adalah media yang dapat mempertahankan kelangsungan hidup kultur sel dengan nilai viabilitas minimal 95%.



## VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

1. Media MEM, L-15 dan TCM berpengaruh terhadap pertumbuhan dan viabilitas sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*).
2. Media L-15 merupakan media terbaik bagi kultur sel insang ikan koi (*Cyprinus carpio*).

### 6.2 Saran

Pembuatan kultur sel insang ikan koi sebaiknya menggunakan media L-15 karena dapat memberikan hasil pertumbuhan sel insang ikan koi yang lebih optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin, K., K. Sumantadinata dan Y. Hadiroseyan. 2002. Fenotipe Keturunan Diploid Persilangan Ikan Koi Kohaku dan Sanke Betina dengan Jantan Putih dan Merah. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 1 (3) : 97-100.
- American Type Culture Collection (ATCC). 2012. Animal Cell Culture Guide. Tips and Continous Cell Lines. ATCC®. pp. 1-40.
- Arora, M. 2013. Cell Culture Media : A Review. Labome. The World of Laboratories. 14 hal.
- Boediono, A. 2002. Teknik Aseptis dan Upaya Mencegah Kontaminasi pada Kultur Jaringan. Modul VII. Pemanfaatan Teknik Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional. 12 hal.
- Butler, M. 2004. Animal Cell Culture and Technology. Second Edition. BIOS Scientific Publisher. New York. pp.1-78.
- Chien Tu., H. Hsieh., S. Chang., J. Su and M. Chen. 2013. Development of A Cell Line from The Gill of Koi and Molecular Characterization of KHV Isolated in Taiwan. *Academic Journals* 7 (28) : 3665-3674.
- Christie, E. 2010. Pembuatan Kultur Sel Ikan Kerapu Tikus (*Chromileptes altivelis*) serta Penyimpanannya dengan Kryopreservasi. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Diantiwi, N. 2010. Kultur Sel Otak Ikan Kerapu Bebek (*Chromileptes altivelis*) dengan Menggunakan Media L-15, MEM dan TCM. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga. Surabaya. 54 hal.
- Djuwita, I. 2002. Modul Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologis dan Medis. Biologi Kultur Jaringan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi dan Institut Pertanian Bogor. 42-58 hal.
- Dora, G. 2007. Respon Imun Ayam Single Comb Brown Leg Horn terhadap Koi Herpesvirus (KHV). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. 86 hal.
- Fernandes, R.D., M. Yoshimizu., Y. Ezura and T. Kimura. 1993. Comparative Growth Responses of Fish Cell Lines in Different Media, Temperatures and Sodium Chloride Concentrations. *Fish Pathology* 28 (1) : 27-34.

- Fletcher, N. 1999. The Ultimate Koi. England. Interpet Publishing. pp. 15.
- Freshney, R. I. 1992. Introduction to Basic Principles. Animal Cell Culture A Practical Approach Second Edition. Oxford University Press. New York. pp.1-14.
- Freshney, R. I. 1994. Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique. New York. A John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Freshney, R.I and M. G. Freshney. 2002. Culture of Epithelial Cell 2<sup>nd</sup> Edition. A John Wiley & Sons, Inc. Publication. pp. 1-30.
- Freshney, R.I. 2005. Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique 5<sup>th</sup> Edition. New York. A John Wiley & Sons, Inc. Publication. pp. 175-216.
- Freyer, J. L and C. N. Lannan. 1994. Three Decades of Fish Cell Culture : A Current Listing of Cell Lines Derived from Fishes. Journal of Tissue Culture Method (16) : 87-94.
- Gibco. 2011. Cell Culture Basics. [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com). 18 Juni 2014. pp. 56.
- Grajek, W and A. Olejnik. 2004. Epithelial Cell Cultures In Vitro as a Model to Study Functional Properties of Food. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 13 (54) : 5-24.
- Griffiths, J. 1986. Scaling-up of Animal Cell Cultures. In: R. I Freshney (Ed). Animal Cell Culture. IRL Press, Washington DC. pp. 36-69.
- Halim, D., H. Murti, F. Sandra, A. Boediono, T. Djuwantoro dan B. Setiawan. 2010. Stem Cell. Dasar Teori dan Aplikasi Klinis. Erlangga. Jakarta. Hal. 51-54.
- Hediger, S. 2002. Biosystem for the Culture and Electrical Characterisation of Epithelial Cell Tissues. Tesis. Ingénieur Microtechnique Diplômé. De Nationalité Suisse et Originaire de Reinach. 144 hal.
- Heinemann, B. 1993. In Vitro Cultivation of Animal Cells. University of Greenwich (Formerly Thames Polytechnic). Butterworth-Heinemann Ltd. London. pp. 63-101.
- HiMedia Laboratories (Himelab). 2011. HiMedia Cell Culture Enabling Breakthroughs. Product Information. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516. Mumbai. India.
- Iqbal, M. 2005. Penerapan Metode Jarigan Syaraf Tiruan untuk Pendugaan jenis kelamin ikan : Studi Kasus Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 78 hal.

- Işisağ, S and H. Karaklı. 1998. Fine Structure of the Chloride Cell in The Gill Epithelium of *Brachydanio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). Journal of Veterinary and Animal Sciences 22 : 431-436.
- Kalanjati, W. W. 2006. Perbedaan Konfluensitas dan Viabilitas Sel Kultur Primer Sel Fibroblas dari Jaringan Daun Telinga Rusa Bawean pada Media TCM 199 dan MEM. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 64 hal.
- Kottelat, M and J. Freyhof. 2007. Handbook of European Freshwater Fishes. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland. pp. 646.
- Kumar, G. S., I. S. B. Singh and R. Philip. 2001. Development of a Cell Culture system from the Ovarian Tissue of African Catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture (194) : 51-62.
- Lakra, W.S., M. Goswami, T. Rajaswaminathan and G. Rathore. 2010. Development and Characterization of Two New Cell Line from Common Carp (Linn). Biological Research 43 (4) : 385-392.
- Lee, I. E. J., V. R. Dayeh., K. Schirmer and N. C. Bols. 2009 Applications and Potential Uses of Fish Gill Cell Lines : Examples with Rtgill-W1. In Vitro Cell. Dev. Biology Animal : 1-8.
- Leibovits, A. 1963. *Leibovits-15*. Am. J. Hyg. 78, 173.
- Lio-Po, G.D., G.S. Traxles and L.J. Albright. 1999. Establishment of Cell Lines from Catfish (*Clarias bathracus*) and snakeheads (*Opicephalus striatus*). Asian Fisheries Science (12) : 343-349.
- Ma`at, S. 2009. Sterilisasi dan Disinfektan. Airlangga University Press. Surabaya. hal. 55-71.
- Malole, M. B. 1990. Kultur Sel dan Jaringan Hewan. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Maurer, H. R. 1992. Toward Serum-Free, Chemically Defined Media for Mammalian Cell Culture. Animal Cell Culture A Practical Approach Second Edition. Oxford University Press. New York. pp.15-46.
- Miller, A. L. 1999. Therapeutic Considerations of L-glutamine : A Review of The Literature. Alternative Medicine Review 4 (4) : 239-248.
- Mothersill, C and B. Austin. 2003. In Vitro Method in Aquatic Toxicology. Praxis Publishing. United Kingdom. pp. 35-52.

- Nagai, T., T. Nakatsugawa, T. Nishizawa and K. Muroga. 1998. Primary Culture of Hemocyte from Japanese Black Abalone *Nordotis discus discus*. Fish Pathology, 33 (3) : 147-148.
- Nazir, M. 2011. Metode Penelitian. Cetakan ketujuh. Penerbit Ghalia Indonesia. Bogor. Hal. 54.
- Neukirch, M., K. Böttcher and S. Bunnajirakul. 1999. Isolation of a Virus from Koi Altered Gills. Bulletin Eurasia Fish Pathology 19 (5) : 221-224.
- Nuryati, S. 2000. Penyediaan Biakan Sel Organ Limfoid (Oka) Udang Windu *Penaeus monodon* Secara In Vitro Sebagai Media Tumbuh bagi Virus. Tesis. Ilmu Perairan. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Part, P., L. Norrgren., E. Bergstrom and P. Sjoberg. 1993. Primary Cultures of Epithelial Cells from Rainbow Trout Gills. J. Exp. Biol 175 : 219-232.
- Phelan, M. C. 1998. Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. Current Protocols in Cell Biology 1.1.1-1.1.10. John Wiley & Sons, Inc.
- Prasetya, N. 2013. Prevalensi Ektoparasit yang Menyerang Benih Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) di Bursa Ikan Hias Surabaya. Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan 5 (1) : 113-114.
- Puspitasari, R. L., C. T. Sardjono, B. Setiawan dan F. Sandra. 2008. Kultur Embrionic Stem Cell menjadi Sel Neuron dengan Medium Bebas Serum. CDK 35 (6) : 342-344.
- Shobana, K.S., K.C George., G.V. Ravi., G. Ittop and R. Paulraj. 2009. Development of A Cell Culture System from Gill Explants of The Grouper, *Ephinephelus malabaricus* (Bloch and Shneider). Asian Fisheries Science 22 : 1-6.
- Suchman, E. and C. Blair. 2013. Aminal Cells in Culture Protocols. <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3111-animal-cell-in-cell-culture-protocols>. 3 Oktober 2013. 9 hal.
- Sultana, Y. 2007. Pharmaceutical Microbiology and Biotechnology. Sterilization Methods and Principles. Departement of Pharmaceutics Faculty of Pharmacy Jamia Hamdard. New Delhi. pp. 2-5.
- Sunarto, A and A. Cameron. 2006. Epidemiology and Control of Koi Herpesvirus in Indonesia. proceeding of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. pp. 1-5.
- Tauhid, A.M. Lusiastuti, W. Andiyani, Rosidah dan Sriati. 2010. Induksi Kekebalan Spesifik pada Ikan Mas, *Cyprinus carpio* Linn. terhadap

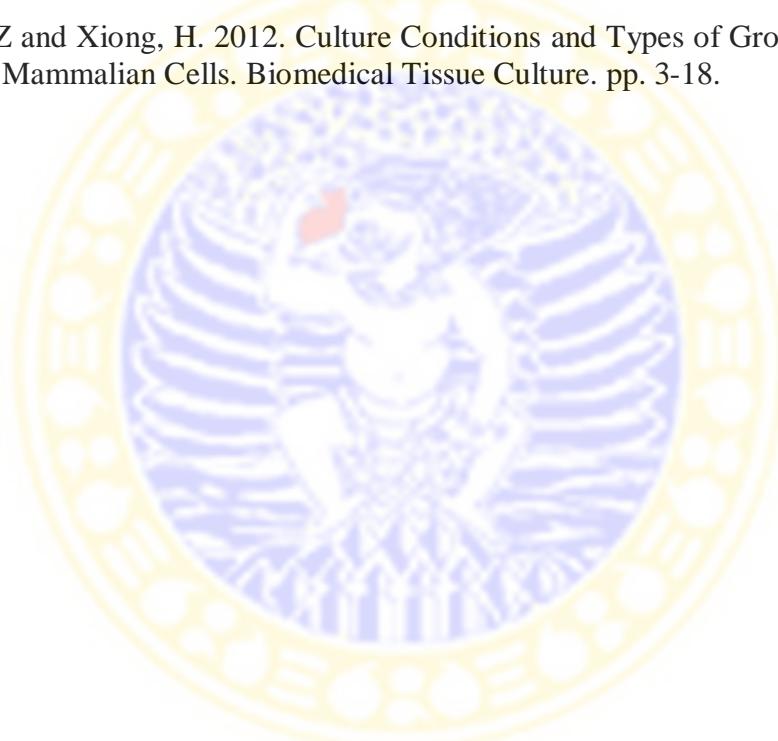
Infeksi *Koi Herpesvirus* (KHV) melalui Teknik Kohabitasi Terkontrol. Jurnal Riset Akuakultur 5 (2) : 257-276.

Watson, C.A., J.e. Hill and D.B. Pouder. 2004. Spesies Profile : Koi and Goldfish. University of Florida. South Regional Aquaculture Centre (SRAC) Publication No. 7201. pp. 1-6.

Wilson, J. M and P. Laurent. 2002. Gill Morphology : Inside Out. Journal of Experimental Zoology 293 : 192-213.

Wood, C. M and P. Pärt. 1997. Cultured Branchial Epithelia from Freshwater Fish Gills. Journal of Experimental Biology (200) : 1047-1059.

Yang, Z and Xiong, H. 2012. Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. Biomedical Tissue Culture. pp. 3-18.



Lampiran 1. Komposisi Media Kultur *Minimum Essential Medium* (MEM),  
 Tissue Culture Medium (TCM) dan Leibovitz 15 (L-15)

Komponen	Media Kultur		
	MEM	TCM	L-15
<b>Garam an-organik</b>			
CaCl <sub>2</sub>	200,00	200,00	185,00
KCl	400,00	400,00	400,00
MgSO <sub>4</sub>	98,00	98,00	97,720
NaCl	6.800,00	6.800,00	8.000,00
NaHCO <sub>3</sub>	2.200,00	2.200,00	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	140,00	140,00	190,12
MgCl			200,00
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			60,00
<b>Asam amino</b>			
L-ArginineHCl	126,00	70,00	500,00
L-Cystine2HCl	31,00	26,00	120,00
L-HistidineHCl H <sub>2</sub> O	42,00	22,00	250,00
L-Isoleucine	52,00	40,00	250,00
L-Leucine	52,00	60,00	125,00
L-LysineHCl	73,00	70,00	94,00
L-Methionine	15,00	15,00	75,00
L-Penylalanine	32,00	25,00	125,00
L-Threomine	48,00	30,00	300,00
L-Tryptophan	10,00	10,00	20,00
L-Tyrosine2Na2H2O	52,00	58,00	276,16
L-Valine	46,00	25,00	100,00
L-Cystine2HCl H <sub>2</sub> O		0,10	
L-Alanine		25,00	
L-Aspartic Acid		30,00	
L-Glutamic Acid		75,00	
L-Glutamine		100,00	300,00
Glycine		50,00	
L-Proline		40,00	
L-Serine		25,00	200,00
L-Hydroxyproline		10,00	
D-Alpha alanine			450,00
L-Asparagine			250,00
<b>Vitamin</b>			
K-Ca-Panthothenate	1,00	0,01	1,00
Folic Acid	1,00	0,01	1,00
i-Inositol	1,00	0,05	2,00
Niacinamide	2,00	0,025	
Pyridoxal HCl	1,00	0,025	1,00
Riboflavin	1,00	0,025	
Thiamine HCl	0,10	0,01	

Choline Chloride	1,00	0,50	1,00
Pyridoxine HCl		0,025	
Biotin		0,01	
Para-Aminobenzoic Acid		0,05	
Niacin		0,025	
Ascorbic Acid		0,05	
a-Tocopherol Phosphate		0,01	
Calciferol		0,10	
Menadione		0,01	
Vitamin A		0,14	
Nicotinamide			1,00
Thiamine Monophosphate			1,00
<b>Komponen kimia lainnya</b>			
D-Glucose	1.000,00	1.000,00	1.000,00
Phenol Red	10,00	20,00	20,00
Gluthatione (reduced)		0,05	
Hypoxanthine.Na		0,04	
Thymine		0,30	
Adenine Sulphate		10,00	
Adenosine-5-Triphosphate		0,20	
Cholesterol		0,20	
2-deoxy-D-ribose		0,50	
Adenosine-5-Phoshate		0,20	
Guanine HCl		0,30	
Ribose		0,50	
Sodium Acetate		50,00	
Tween 80		20,00	
Uracil		0,30	
Xanthine Na		0,34	

Keterangan : komposisi nutrisi tiap media dalam satuan mg/L

Sumber : Komposisi media MEM dan TCM menurut Yang *and* Xiong, 2012 dan media L-15 menurut Himelab, 2011.

## Lampiran 2. Pertumbuhan Kultur Sel Insang pada Media Berbeda

### Media MEM

No.	Hari ke-	Ulangan ke-	Jumlah sel yang tumbuh ( $\times 10^6$ sel/ml)	Rata-rata ( $\times 10^6$ sel/ml)
1.	6	1	7	7
2.		2	6	
3.		3	8	
4.	12	1	15	13
5.		2	13	
6.		3	11	
7.	18	1	16	18
8.		2	20	
9.		3	18	
10.	24	1	27	25
11.		1	24	
12.		1	24	

### Media TCM

No.	Hari ke-	Ulangan	Jumlah sel yang tumbuh ( $\times 10^6$ sel/ml)	Rata-Rata ( $\times 10^6$ sel/ml)
1.	6	1	10	11
2.		2	11	
3.		3	12	
4.	12	1	19	19
5.		2	21	
6.		3	17	
7.	18	1	28	27
8.		2	24	
9.		3	29	
10.	24	1	33	36
11.		1	37	

12.		1	38	
-----	--	---	----	--

**Media L15**

No.	Hari ke-	Ulangan	Jumlah sel yang tumbuh ( $\times 10^6$ sel/ml)	Rata-rata ( $\times 10^6$ sel/ml)
1.	6	1	15	14
2.		2	14	
3.		3	13	
4.	12	1	22	24
5.		2	25	
6.		3	25	
7.	18	1	30	33
8.		2	34	
9.		3	35	
10.	24	1	43	43
11.		1	41	
12.		1	45	

### Lampiran 3. Hasil Analisis Data Pertumbuhan Sel Insang dengan SPSS

#### Hari ke-6

**One-Sample Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MEM	3	7.0000E6	1.00000E6	5.77350E5
TCM	3	1.1000E7	1.00000E6	5.77350E5
L15	3	1.4000E7	1.00000E6	5.77350E5

**One-Sample Test**

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
MEM	12.124	2	.007	7.00000E6	4.5159E6	9.4841E6
TCM	19.053	2	.003	1.10000E7	8.5159E6	1.3484E7
L15	24.249	2	.002	1.40000E7	1.1516E7	1.6484E7

**Tests of Within-Subjects Effects**

Measure:MEASURE\_1

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
factor1	Sphericity Assumed	7.400E13	2	3.700E13	27.750 .005
	Greenhouse-Geisser	7.400E13	1.000	7.400E13	27.750 .034
	Huynh-Feldt	7.400E13	1.000	7.400E13	27.750 .034
	Lower-bound	7.400E13	1.000	7.400E13	27.750 .034
Error(factor1)	Sphericity Assumed	5.333E12	4	1.333E12	
	Greenhouse-Geisser	5.333E12	2.000	2.667E12	
	Huynh-Feldt	5.333E12	2.000	2.667E12	
	Lower-bound	5.333E12	2.000	2.667E12	

#### Hasil

liv

Duncan

Media	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MEM	3	7.0000E6		
TCM	3		1.1000E7	
L15	3			1.4000E7
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## Hari ke-12

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MEM	3	1.3000E7	2.00000E6	1.15470E6
TCM	3	1.9000E7	2.00000E6	1.15470E6
L15	3	2.4000E7	1.73205E6	1.00000E6

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
MEM	11.258	2	.008	1.30000E7	8.0317E6	1.7968E7
TCM	16.454	2	.004	1.90000E7	1.4032E7	2.3968E7
L15	24.000	2	.002	2.40000E7	1.9697E7	2.8303E7

## Tests of Within-Subjects Effects

Measure:MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
factor1	Sphericity Assumed	1.820E14	2	9.100E13	22.750	.007
	Greenhouse-Geisser	1.820E14	1.391	1.308E14	22.750	.020
	Huynh-Feldt	1.820E14	2.000	9.100E13	22.750	.007
	Lower-bound	1.820E14	1.000	1.820E14	22.750	.041
Error(factor1)	Sphericity Assumed	1.600E13	4	4.000E12		
	Greenhouse-Geisser	1.600E13	2.783	5.750E12		
	Huynh-Feldt	1.600E13	4.000	4.000E12		
	Lower-bound	1.600E13	2.000	8.000E12		

**Hasil**

Duncan

Media	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MEM	3	1.3000E7		
TCM	3		1.9000E7	
L15	3			2.4000E7
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Hari ke-18****One-Sample Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MEM	3	1.8000E7	2.00000E6	1.15470E6
TCM	3	2.7000E7	2.64575E6	1.52753E6
L15	3	3.3000E7	2.64575E6	1.52753E6

**One-Sample Test**

Test Value = 0

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
MEM	15.588	2	.004	1.8000E7	1.3032E7	2.2968E7
TCM	17.676	2	.003	2.7000E7	2.0428E7	3.3572E7
L15	21.604	2	.002	3.3000E7	2.6428E7	3.9572E7

### Tests of Within-Subjects Effects

Measure:MEASURE\_1

Source	Type III Sum of Squares		df	Mean Square	F	Sig.
	Sphericity Assumed	Greenhouse-Geisser				
Media	3.420E14		2	1.710E14	27.000	.005
	3.420E14		1.249	2.738E14	27.000	.021
	3.420E14		2.000	1.710E14	27.000	.005
	3.420E14		1.000	3.420E14	27.000	.035
Error(Media)	2.533E13		4	6.333E12		
	2.533E13		2.498	1.014E13		
	2.533E13		4.000	6.333E12		
	2.533E13		2.000	1.267E13		

### Hasil

Duncan

Media	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MEM	3	1.8000E7		
TCM	3		2.7000E7	
L15	3			3.3000E7
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

### Hari ke-24

#### One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MEM	3	2.5000E7	1.73205E6	1.00000E6
TCM	3	3.6000E7	2.64575E6	1.52753E6
L15	3	4.3000E7	2.00000E6	1.15470E6

**One-Sample Test**

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
MEM	25.000	2	.002	2.50000E7	2.0697E7	2.9303E7
TCM	23.568	2	.002	3.60000E7	2.9428E7	4.2572E7
L15	37.239	2	.001	4.30000E7	3.8032E7	4.7968E7

**Tests of Within-Subjects Effects**

Measure:MEASURE\_1

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Media	Sphericity Assumed	4.940E14	2	2.470E14	42.343
	Greenhouse-Geisser	4.940E14	1.424	3.470E14	42.343
	Huynh-Feldt	4.940E14	2.000	2.470E14	42.343
	Lower-bound	4.940E14	1.000	4.940E14	42.343
Error(Media)	Sphericity Assumed	2.333E13	4	5.833E12	
	Greenhouse-Geisser	2.333E13	2.847	8.195E12	
	Huynh-Feldt	2.333E13	4.000	5.833E12	
	Lower-bound	2.333E13	2.000	1.167E13	

**Hasil**

Duncan

Media	N	Subset for alpha = 0.05

		1	2	3
MEM	3	2.5000E7		
TCM	3		3.6000E7	
L15	3			4.3000E7
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



#### Lampiran 4. Hasil Analisis Data Viabilitas Sel Insang dengan SPSS

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MEM	3	90.6333	.75009	.43306
TCM	3	92.7033	1.03220	.59594
L15	3	96.7100	1.11638	.64454

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
MEM	209.284	2	.000	90.63333	88.7700	92.4967
TCM	155.558	2	.000	92.70333	90.1392	95.2675
L15	150.045	2	.000	96.71000	93.9368	99.4832

Tests of Within-Subjects Effects

Measure:MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Media	Sphericity Assumed	57.264	2	28.632	21.000	.008
	Greenhouse-Geisser	57.264	1.009	56.735	21.000	.044
	Huynh-Feldt	57.264	1.038	55.186	21.000	.041
	Lower-bound	57.264	1.000	57.264	21.000	.044
Error(Media)	Sphericity Assumed	5.454	4	1.363		
	Greenhouse-Geisser	5.454	2.019	2.702		
	Huynh-Feldt	5.454	2.075	2.628		
	Lower-bound	5.454	2.000	2.727		

**Hasil**

Duncan

Media	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MEM	3	90.6333		
TCM	3		92.7033	
L15	3			96.7100
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

