

PEMBUATAN KULTUR SEL PRIMER DARI SIRIP EKOR IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Tuti Sumiati, Lila Gardenia, dan Agus Sunarto

Pusat Riset Perikanan Budidaya
Jl. Ragunan 20, Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12540
E-mail: tuti.sumiati@yahoo.co.id

Naskah diterima: 20 Maret 2009; Diterima publikasi: 2 April 2009

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuat kultur sel primer dari sirip ekor ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan diberi nama *common carp tail* (CCT). *Explant* ditumbuhkan dalam cawan kultur (*culture flask*) ukuran 25 cm² yang berisi media Leibovitz's L-15 dengan penambahan serum 20%, Penicillin 250 IU, Streptomycin 250 µg/mL, Kanamycin Sulfate 250 µg/mL dan L-Glutamin 2 mM, serta diinkubasi pada suhu 28°C. Perbedaan perlakuan berupa waktu pergantian media dan konsentrasi media dilakukan untuk mendapatkan kultur sel primer. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *explant* menunjukkan pertumbuhan sel setelah diinkubasi selama 24 jam. Pembentukan sel selapis (*monolayer*) mulai terlihat pada hari ke-4. Pasase pertama dilakukan pada hari ke-21 saat konfluensi mencapai 65%. Pasase selanjutnya dilakukan setiap 3 minggu dimana konfluensi mencapai 70%-80%. CCT terdiri atas sel berbentuk fibroblas dan epitel, dan berhasil dipasase sebanyak 12 kali selama lebih 2 tahun pemeliharaan.

KATA KUNCI: ikan mas, kultur sel primer, *common carp tail* (CCT)

ABSTRACT: *Development of primary cell culture from caudal fin of common carp (Cyprinus carpio). By: Tuti Sumiati, Lila Gardenia, and Agus Sunarto*

The objectives of this research were to develop primary cell from caudal fin of common carp (Cyprinus carpio) and designate it as Common Carp Tail (CCT). The explants were maintained in 25 cm² tissue culture flask containing Leibovitz's L-15 medium supplemented with 20% Fetal bovine serum, 250IU Penicilline, 250 µg/mL Streptomycin, 250 µg/mL Kanamycin Sulphate and 2 mM L-Glutamin, and incubated at 28°C. Different concentrations of glutamine and media, and timing of media replacement were applied to establish primary cell culture. The result showed that explants produced cell outgrowth after 24 hours of incubation. Monolayer was first observed at day 4th. First passage was done at day 21st when the cells achieved 65% confluent. The subsequence passages were done every 3 weeks when the cells reached 70-80% confluent. CCT consisted of both fibroblast-like and epithelial-like cells, and has been passaged for 12 times for over 2 years.

KEYWORDS: *Cyprinus carpio*, primary cell culture, common carp tail (CCT)

PENDAHULUAN

Pengembangan kultur jaringan menjadi episode baru dalam investigasi virus penyebab penyakit karena metode tersebut

memungkinkan diproduksi virus dalam jumlah lebih banyak sebagai sumber antigen (Malole, 1990). Kultur sel adalah kultur sel-sel yang berasal dari jaringan atau organ yang telah diuraikan secara mekanis ataupun

enzimatis menjadi suspensi sel yang dibiakkan dan berkembang menjadi satu lapisan jaringan (*monolayer*) di atas permukaan yang keras seperti *flask* dan dapat diperbaharui lagi melalui subkultur (pasase) sehingga diperoleh sel yang lestari (*cell line*) (Malole, 1990; Freshney, 1994).

Pembuatan kultur sel dari ikan pertama kali dilaporkan oleh Wolf & Quimby (1962), dan terus berkembang sampai pada akhir 1993 di mana terdapat sekitar 159 kultur sel ikan telah dibuat dan berhasil dipakai untuk menumbuhkan virus (Freyer & Lannan, 1994). Umumnya kultur sel ikan dibuat dari ikan-ikan komersil dan yang menjadi tujuan utamanya sejauh ini adalah isolasi, identifikasi dan studi tentang virus dan diharapkan bisa dikembangkan dengan pembuatan vaksin. Virus merupakan agen penyakit yang sangat berbahaya dan akibat dari serangan penyakit viral bisa menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat tinggi. Hal ini terjadi pada kasus kematian massal pada ikan mas dan koi akibat *Koi herpesvirus* (Hedrick *et al.*, 2000).

Koi herpesvirus menyerang bagian dalam sel ikan sehingga tidak dapat ditembus oleh antibiotik yang pada umumnya hanya bekerja pada permukaan sel. Oleh karena itu, usaha pengendalian wabah KHV lebih difokuskan pada usaha pencegahan, antara lain melalui diagnosa yang akurat. Virus merupakan suatu organisme yang hanya dapat hidup dan berkembang di sel hidup oleh karena itu ketersediaan kultur sel sangat penting dalam usaha penegakan diagnosa penyakit viral. Kultur sel juga merupakan media utama untuk mempelajari ekobiologi virus (Paul, 1972; Malole, 1990; Freshney, 1994).

Tujuan dari penelitian ini adalah pembuatan kultur sel primer dari sirip ekor ikan mas (*Cyprinus carpio*) untuk studi ekobiologi *Koi herpesvirus*.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan Kultur Sel Primer

Prosedur pembuatan kultur sel primer dilakukan menurut metode Wolf & Quimby (1976) dan dilakukan modifikasi berupa perbedaan perlakuan waktu pergantian media dan konsentrasi media. Prosedur pembuatan serta media yang digunakan mengikuti metode standar dalam kultur jaringan. Ikan dimatikan dengan memotong syaraf tulang belakang, organ yang digunakan diambil

secara aseptis kemudian direndam beberapa saat dalam larutan klorin lalu dicuci sampai bersih, selanjutnya dibawa ke ruang kultur sel. Pekerjaan selanjutnya dilakukan di dalam *biosafety cabinet class II*.

Organ dicacah sambil ditambahkan larutan PBS⁺ (200 mL *phosphate buffer saline* (PBS) + 10 mL penicilin/streptomycin dan 10 mL kanamycin) dan dilakukan pencucian dengan larutan PBS⁺ sampai larutan terlihat bening. Cacahan organ dipindahkan ke dalam botol yang sudah berisi PBS⁺ kemudian diinkubasi pada 28°C selama 1,5 jam sambil di-*stirrer*, larutan PBS⁺ dibuang lalu ditambahkan larutan PBS⁺⁺ (50 ml PBS⁺ + 50 mL tripsin 0,25%), tahap ini dilakukan dua kali. Selanjutnya larutan di-*stirrer* sambil ditambahkan 20 mL larutan PBS⁺⁺ baru, dan diinkubasi selama satu malam pada suhu 4°C sambil diaduk dengan pengadukan rendah sampai larutan keruh.

Sel yang dipanen ditambahkan 3-5 tetes serum kemudian disentrifuse pada 3.000 g selama 5 menit pada suhu ruang. Pelet sel dilarutkan dalam 6 ml larutan PBS⁺ dan didistribusikan ke dalam 4 *flask* kultur 25cm² (A, B, C, dan D) yang sudah diisi media kultur sel primer (Leibovitz's L-15 dengan penambahan serum 20%, penicillin 250 IU, streptomycin 250 µg/mL, kanamycin sulfate 250 µg/mL dan L-glutamin 2 mM). Masing-masing inokulasi sel sebanyak 1,5 mL/*flask* kemudian diinkubasi pada suhu 28°C. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat pertumbuhan sel yang dilakukan langsung dan menggunakan mikroskop *inverted*. Setelah teramati adanya inisiasi sel pada *flask* kemudian diberi perlakuan dengan penggantian media dan waktu yang berbeda (Tabel 1). Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan kultur jaringan, setelah sel tumbuh dan berkembang mencapai konfluensi di atas 50% segera dilakukan pasase untuk mendapatkan pertumbuhan jaringan yang lebih stabil sebagai sel selapis (*monolayer*).

Subkultur dan Pemeliharaan

Subkultur (pasase) dilakukan jika konfluensi sel sudah lebih dari 50%. Pada pasase pertama dari satu *flask* dipasase menjadi 2 *flask* (*split ratio* 1:2). Pasase selanjutnya dilakukan dengan *split ratio* 1:3. Pasase dilakukan dengan terlebih dahulu membuang media kultur kemudian sel dibilas dengan larutan PBS. Prosedur pencucian dilakukan dua kali.

Tabel 1. Waktu penggantian media kultur
Table 1. Period for culture media replacement

Hari ke- Day number	Perlakuan (Treatment)			
	A	B	C	D
1	Inokulasi sel pada flask kultur <i>Cell inoculation to culture flask</i>	Inokulasi sel pada flask kultur <i>Cell inoculation to culture flask</i>	Inokulasi sel pada flask kultur <i>Cell inoculation to culture flask</i>	Inokulasi sel pada flask kultur <i>Cell inoculation to culture flask</i>
2	Pengamatan terjadinya inisiasi sel pada flask <i>Observation of cell initiation</i>	Pengamatan terjadinya inisiasi sel pada flask <i>Observation of cell initiation</i>	Pengamatan terjadinya inisiasi sel pada flask <i>Observation of cell initiation</i>	Pengamatan terjadinya inisiasi sel pada flask <i>Observation of cell initiation</i>
3	Media baru, dicuci PBS 2x <i>Newmedia, washed with PBS 2x</i>	-	1/2 media baru <i>1/2 volume newmedia</i>	-
4	-	-	Media baru, dicuci PBS 2x <i>Newmedia, washed with PBS 2x</i>	-
6	Media baru <i>Newmedia</i>	½ media baru <i>1/2 volume new media</i>	-	-
7	-	-	Media baru, dicuci PBS 2x <i>Newmedia, washed with PBS 2x</i>	-
10	Media baru <i>Newmedia</i>	-	-	-
13	-	1/2 media baru + 0,1 mL Glutamin <i>1/2 volume new media + 0.1 ml Glutamin</i>	-	1/2 media baru + 0,1 mL Glutamin <i>1/2 volume newmedia + 0.1 ml Glutamin</i>
18	-	-	-	Media baru <i>Newmedia</i>
21	-	-	-	Pasase pertama <i>First passage</i>
34	-	Media baru <i>Newmedia</i>	-	-
55	-	Pasase pertama <i>First passage</i>	-	-

Keterangan: - Tidak dilakukan pergantian media
Note: - No replacement of media culture

Ke dalam *flask* yang sudah dicuci, dimasukkan 1 mL larutan trypsin / versene (T/V) 0,25%; larutan harus mengenai semua permukaan sel. Selanjutnya diinkubasi selama 0,5-1 menit sampai lapisan sel terlihat putih (*opaque*) dan larutan T/V dibuang kemudian diinkubasi lagi selama 1-5 menit, hal ini agar pemisahan sel dari *flask* terjadi secara menyeluruh. Pemisahan dan pelepasan sel dari *flask* dapat dilakukan dengan menepuk *flask* dengan telapak tangan secara perlahan. Sel yang sudah saling terpisah dilarutkan dengan 6 mL media kultur, kemudian suspensi sel dibagi ke dalam 3 *flask* (yang sudah diisi media kultur) masing-masing sebanyak 2 mL/*flask*. *Flask* diberi label (Nama Sel, Nomor Pasase, Tanggal Pasase, dan Operator/Staf yang mengerjakan) lalu diinkubasi pada suhu 28°C dalam inkubator dan dilakukan pengamatan setiap hari.

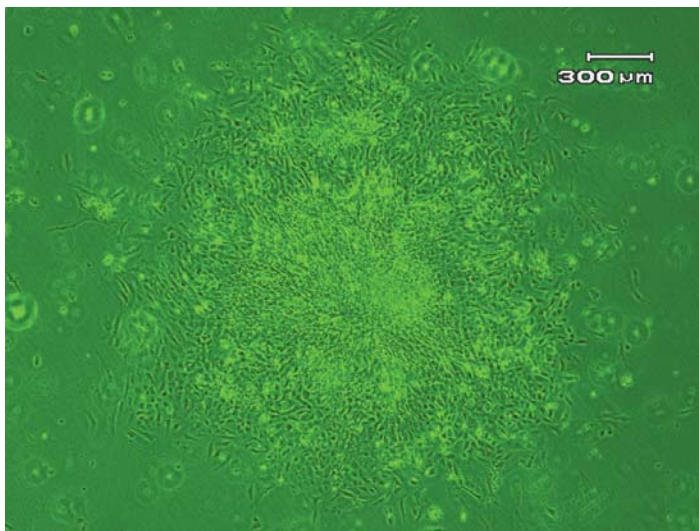
Prosedur Pewarnaan

Prosedur pewarnaan sel dilakukan berdasarkan Freshney (1994). Media Kultur dibuang kemudian sel dibilas dengan 5 mL PBS lalu dibuang. Larutan PBS:Methanol (1:1) ditambahkan ke dalam *flask* sebanyak 5 mL, didiamkan sekitar 2 menit kemudian sebagian dari larutan tersebut diganti dengan 5 mL ethanol p.a. dan diinkubasikan selama 10 menit. Langkah tersebut dilakukan sebanyak 2 kali. Pada tahap ini, sel dapat disimpan atau

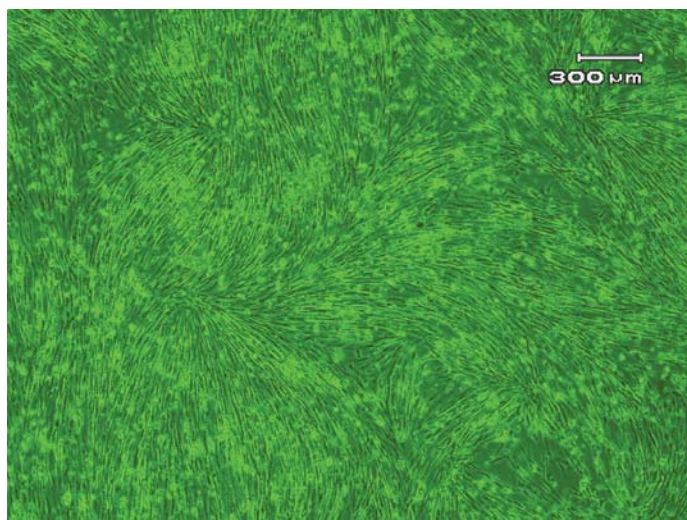
langsung diwarnai. Apabila disimpan, harus dibilas dengan Metanol p.a sebelum dilakukan proses pewarnaan. Untuk tahap selanjutnya 2 mL pewarna Giemsa p.a. dimasukkan ke dalam *flask* dan diinkubasi selama 2 menit kemudian ditambahkan 8 mL aquadest dan diinkubasi lagi selama 2 menit. Larutan dibuang dan dibilas dengan air sampai kelebihan pewarna hilang. Sel dibilas dengan aquadest dan diamati di bawah mikroskop inverted.

HASIL DAN BAHASAN

Perkembangan kultur sel primer dari jaringan sirip ekor ikan mas yang ditripsinasi dapat tumbuh baik dalam media Leibovitz's L-15 dengan penambahan 20% Fetal Bovine Serum, 250IU Penicilline, 250µg/mL Streptomycin, 250µg/mL Kanamycin Sulfate dan 2mM L-Glutamin dan diinkubasi pada suhu 28°C. *Explant* menghasilkan pertumbuhan sel setelah diinkubasi selama 24 jam (Gambar 1) dan terjadi inisiasi pada hari kedua. Kumpulan sel mulai terbentuk pada hari ketiga selanjutnya mulai terlihat pembentukan sel selapis (*monolayer*) pada hari ke-4 dengan konfluensi sekitar 3% (Gambar 2). Pasase pertama dilakukan pada hari ke-21 untuk *flask* D dan hari ke-52 untuk *flask* B saat konfluensi masing-masing mencapai sekitar 65% dengan split rasio 1:2. Pasase selanjutnya dilakukan setiap 3 minggu dengan konfluensi mencapai 70%-80% dengan *split ratio* 1:3.



Gambar 1. Penempelan *explant* yang menghasilkan pertumbuhan sel
Figure 1. Attachment of an explant which produces cell growth



Gambar 2. Kultur sel mulai membentuk *monolayer*
Figure 2. *Monolayer formation of cell culture*

Identifikasi jenis sel dilakukan melalui pengamatan mikroskopis dan menggunakan pewarnaan giemsa (Freshney, 1994). Berdasarkan bentuk sel yang diwarnai dengan pewarnaan giemsa, CCT terdiri atas dua jenis sel yaitu fibroblas dan epitel. Perkembangan kultur sel yang dilakukan penggantian media kultur hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 memperlihatkan bahwa waktu pergantian media dan pencucian PBS sangat berpengaruh pada perkembangan sel dalam membentuk kultur sel primer. Untuk *flask A* dan *flask C*, meskipun telah terjadi inisiasi sel dan sel mulai menyebar di permukaan *flask*, perkembangannya tidak sempurna menjadi *monolayer* yang bisa dipasase, bahkan akhirnya mati. Sementara untuk *flask B* dan *flask D*, setelah dilakukan penggantian media setengah dari volume awal tanpa adanya pencucian PBS, kultur sel terus berkembang sampai membentuk *monolayer* yang sempurna sampai bisa dilakukan pasase.

Pertumbuhan sel secara *in vitro* membutuhkan sejumlah media untuk pertumbuhannya (Sugiri, 1992). Untuk mempertahankan kehidupan sel sehingga bisa dilakukan subkultur, kultur sel perlu ditambah bahan nutrisi dengan penggantian media lama dengan yang baru secara keseluruhan atau hanya sebagian (Paul, 1972; Malole, 1990). Setelah dilakukan pergantian media dan pencucian dengan PBS pada setiap *flask*

kecuali pada *flask D*, sel pada *flask A* dan *C* tidak menunjukkan perkembangan dan akhirnya mati. Hal ini disebabkan terlalu cepat dan sering dilakukan pergantian media sebelum sel menempel (*attach*) pada permukaan *flask* dengan sempurna dan membentuk *monolayer* yang lebih stabil, perlakuan ini mengakibatkan sel tidak tumbuh sempurna dan akhirnya mati sebelum waktu pasase. Sel-sel yang langsung berasal dari organ, yaitu sel primer, hanya dapat tumbuh apabila melekat pada permukaan *flask* (Malole, 1990). Sedangkan untuk *flask B* dan *D* sel terus tumbuh dan berkembang seperti terlihat pada Gambar 3.

Kultur sel tumbuh sempurna pada *flask B* dan *D*. Sehingga hanya kultur sel primer pada *flask B* dan *D* yang kemudian bisa dilakukan pasase. Pasase dapat dilakukan setelah mencapai tingkat pertumbuhan (konfluensi) lebih dari 50%. Ada perbedaan waktu yang dicapai untuk kedua kultur ini mencapai kepadatan minimal untuk dilakukan pasase. Kultur sel primer pada *flask B* terus berkembang dan berhasil dipasase setelah berumur 52 hari dari awal pemeliharaan. Sedangkan pada *flask D* hanya memerlukan waktu 21 hari sampai kultur tersebut dilakuklan pasase. Hal ini terjadi karena pengaruh waktu pergantian media kultur yang dilakukan sebelum kultur tersebut benar-benar melekat sempurna di atas permukaan *flask*. Selama enam bulan

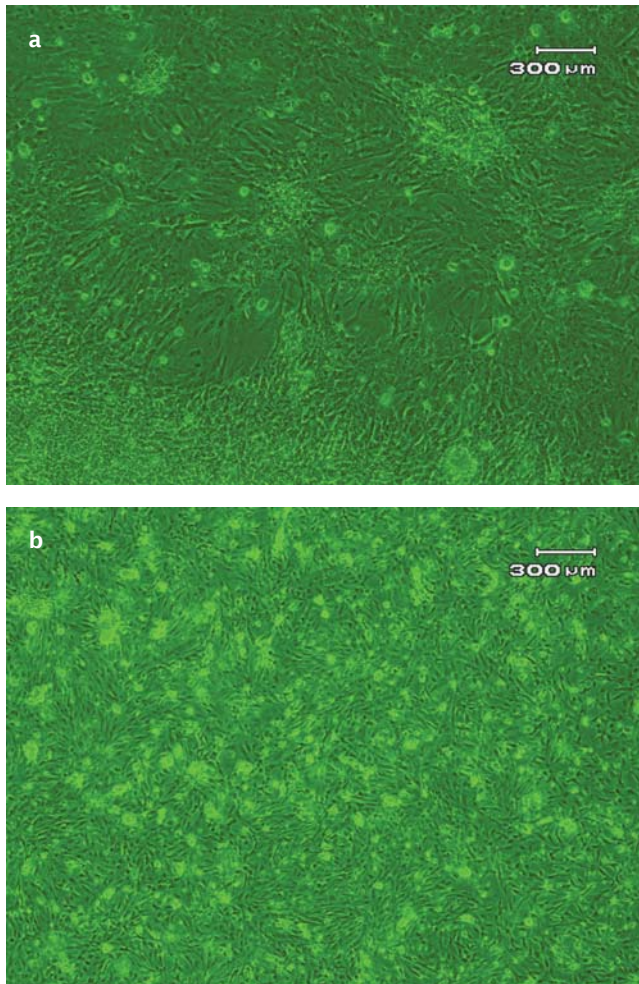
Tabel 2. Perkembangan sel di dalam flask kultur
 Table 2. Cell development in culture flask

Hari ke- Day number	Flask			
	A	B	C	D
2	Terjadi inisiasi sel Cell initiation	Terjadi inisiasi sel Cell initiation	Terjadi inisiasi sel Cell initiation	Terjadi inisiasi sel Cell initiation
3	Mulai terbentuk kumpulan sel di beberapa tempat Beginning of start of monolayer formation	Mulai terbentuk kumpulan sel di beberapa tempat Beginning of start of monolayer formation	Mulai terbentuk kumpulan sel di beberapa tempat Beginning of start of monolayer formation	Mulai terbentuk kumpulan sel di beberapa tempat Beginning of start of monolayer formation
4	Mulai terbentuk monolayer Start of monolayer formation	Mulai terbentuk monolayer Start of monolayer formation	Mulai terbentuk monolayer Start of monolayer formation	Mulai terbentuk monolayer Start of monolayer formation
5	Sel yang tumbuh hanya sedikit Limited cell growth	Monolayer lebih berkembang Advance development of monolayer	Monolayer lebih berkembang Advance development of monolayer	Monolayer lebih berkembang Advance development of monolayer
14	Monolayer tidak berkembang Undeveloped monolayer	Monolayer lebih berkembang, konfluensi sekitar 25% Advance development of monolayer, 25% confluence	Monolayer tidak berkembang Undeveloped monolayer	Monolayer lebih berkembang, konfluensi sekitar 45% Advance development of monolayer, 45% confluence
17	Monolayer tidak berkembang Undeveloped monolayer	Konfluensi sekitar 30% 30 % confluence	Sel tunggal Single cell	Konfluensi sekitar 50% 50% confluence
21	Sel tunggal, akhirnya sel mati Single cell, cell died	Konfluensi sekitar 40% 40% confluence	Sel mati Cell died	Konfluensi sekitar 65%, dilakukan pasase pertama 65% confluence, first passage being done
52	-	Pasase pertama setelah konfluent 65%, berkembang sampai pasase ke-5 (selama 6 bulan) kemudian mati Continued development up to first passage (within 6 months) and then died off	-	Terus berkembang sampai membentuk CCT Continued development up to CCT

Keterangan:- Tidak ada lagi sel yang tumbuh
 Note:- No cell growth

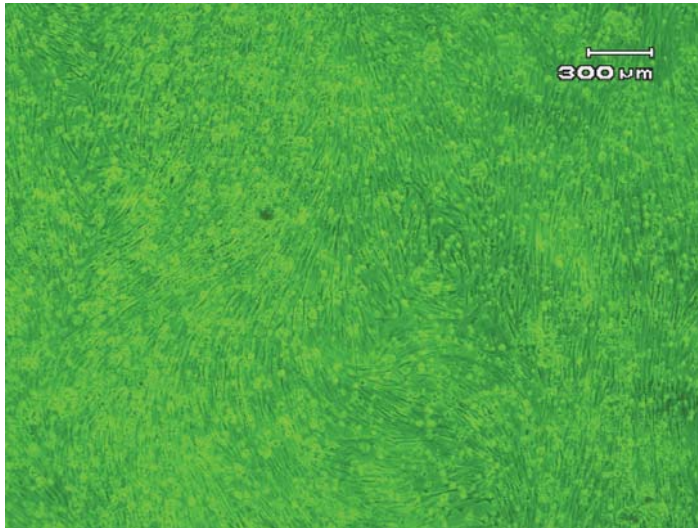
pemeliharaan kultur sel pada *flask* B berhasil dilakukan pasase sebanyak 5 kali dengan tingkat konfluensi pada tiap pasase mencapai 80%. Setelah dilakukan lima kali pasase tidak mengalami pertumbuhan lagi, bahkan akhirnya mati. Tidak semua sel dapat hidup lama, beberapa diantaranya mati sesudah beberapa kali pasase dan sel semacam itu disebut sel lestari terbatas (*finite cell line*) (Malole, 1990; Freshney, 1994). Kultur sel yang ditanam pada *flask* D dapat tumbuh dan berkembang dengan baik kemudian diberi nama CCT (*Common Carp Tail*), karena organ asal sel berasal dari sirip ekor (*tail*) ikan mas (Gambar 4).

Dari hasil pengamatan secara mikroskopik dan hasil pewarnaan giemsa terlihat bahwa CCT terdiri atas dua tipe sel, yaitu fibroblas dan epitel (Gambar 5). Tipe sel yang teramati pada awal pertumbuhan yaitu tipe fibroblas, tetapi setelah dilakukan pasase ternyata terdapat juga tipe sel epitel. Hal ini terjadi karena di awal pertumbuhannya tipe fibroblas lebih banyak tumbuh (dominan) daripada sel epitel sehingga sel epitel tidak terlalu tampak waktu diamati. Kultur sel primer terdiri dari berbagai macam sel yang berasal dari organ asalnya (Paul, 1972; Malole, 1990; Freshney, 1994).



Gambar 3. Perkembangan kultur sel setelah dilakukan pencucian pada *flask* B (a) dan *flask* D (b)

Figure 3. Cell culture development after washing procedure on *flask* B (a) and *flask* D (b)



Gambar 4. Kultur sel primer CCT tumbuh subur dan mencapai konfluensi 80%
Figure 4. CCT Primary cell culture grows well and reaches 80% confluence

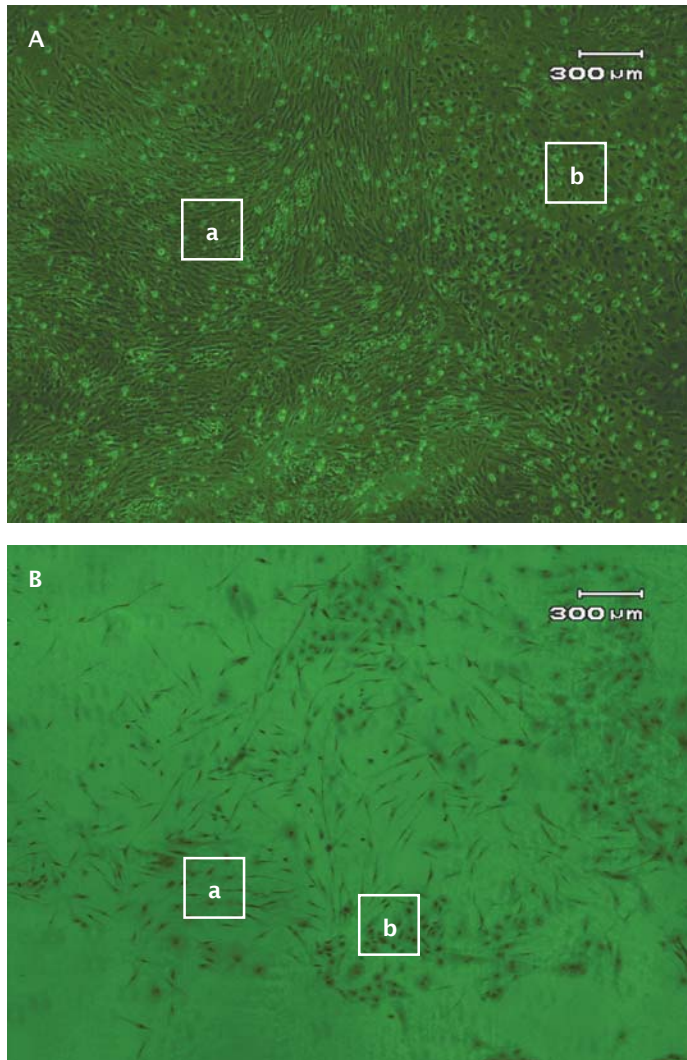
Selama dua tahun pemeliharaan CCT bisa berkembang dan dipasase selama 12 kali dengan konfluensi sekitar 80%. Dari pasase pertama sampai pasase ke-7 CCT membutuhkan waktu tiap 3 minggu untuk setiap pasase. Komposisi media yang dipakai untuk membuat kultur primer tidak terlalu berbeda dengan komposisi media yang dipakai untuk memelihara kultur tersebut, hanya kadar serum yang digunakan diturunkan menjadi 10%. Kadar serum sebanyak 20% digunakan pada waktu pembuatan kultur primer dilakukan untuk memacu pertumbuhan kultur primer sampai berkembang membentuk *monolayer*. Sedangkan pada proses pemeliharaan hanya dipakai kadar yang lebih sedikit yaitu sekitar 10% bahkan bisa kurang, karena hanya untuk mempertahankan hidup sel tersebut. Penggunaan media kultur *Leibovitz-15* (L-15) lebih cocok untuk pembuatan kultur sel yang berasal dari ikan, hal ini sudah dilaporkan oleh Fernandez *et al.* (1993) dan Kumar *et al.* (2001), meskipun banyak juga yang memakai media lain untuk pemeliharaan sel.

Umumnya semakin sering dipasase semakin pendek interval waktu yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel. Hal ini dibandingkan dari hasil pengamatan pada kultur sel yang dikembangkan dari sirip ekor ikan koi (KT-2), dengan formulasi media yang sama perkembangannya semakin cepat. Hal yang

sebaliknya terjadi pada kultur sel CCT, untuk pasase berikutnya membutuhkan waktu yang lebih lama. Bahkan kultur sel tersebut tidak berkembang dan cenderung terus mengalami perlambatan pertumbuhan. Setelah 12 kali pasase, CCT tidak berkembang lagi dan akhirnya mati sebelum sempat dipakai untuk studi KHV. Tetapi untuk isolasi dan studi KHV di Indonesia dilakukan dengan menggunakan kultur sel dari ikan koi (Sunarto *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Kultur sel primer telah berhasil dibuat dengan menggunakan sirip ekor ikan mas (*Cyprinus carpio*). Kultur sel yang tumbuh dan berkembang berasal dari jaringan ekor dengan penggantian media setelah lebih dari 10 hari dari waktu inisiasi. Hanya kultur sel pada *flask* D dengan penggantian media setelah 13 hari dan sudah stabil menempel pada *flask* kultur yang tumbuh dan berkembang. Sel yang tumbuh terdiri atas 2 tipe sel yaitu fibroblas dan epitel dan diberi nama CCT (*Common Carp Tail*), dan telah berhasil dipasase sebanyak 12 kali meskipun tidak bisa berkembang lagi sampai akhirnya mati. Dari penelitian ini disarankan dalam pembuatan kultur sel sebaiknya tidak melakukan penggantian media sampai sel tersebut benar-benar melekat pada permukaan *flask* dan membentuk *monolayer* yang lebih stabil.



Gambar 5. Morfologi CCT secara mikroskopis (A) dan pewarnaan giemsa (B) terlihat tipe fibroblas (a) dan epitel (b)

Figure 5. *Morfology of CCT under (A) microscope and (B) giemsa staining fibroblast (a) and epithel (b) cell type*

DAFTAR ACUAN

- Fernandez, R.D., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T. 1993. Comparative growth response of fish cell lines in different media, temperatures, and sodium chloride concentrations. *Fish Pathol.*, 28: 27-34.
- Freshney, R.I. 1994. *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. 3rd ed. WileyLiss. Inc. USA, 486 pp.
- Freyer, J.L. and Lannan, C.N. 1994. Three

decades of fish cell culture: a current listing of fish cell lines derived from fishes. *Journal of Tissue Culture Methods*, 10: 87-94.

- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S.C., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W., Kebus, M.J., Bercovier, H., and Eldar, A. 2000. A herpes virus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, 12: 44-57.

- Kumar, G.S., Singh, I.S.B., and Philip, R. 2001. Development of cell culture system from the ovarian tissue of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 194: 51-62.
- Malole, M.B. 1990. *Kultur sel dan jaringan hewan*. Pusat Antar Universitas, IPB. Bogor, 327 pp.
- Paul, J. 1972. *Cell and tissue culture*. 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone. 430 pp.
- Sugiri, N. 1992. *Biologi sel vol. 1*. Pusat Antar Universitas. IPB. Bogor. 203 hlm.
- Sunarto, A., Sumiati, T., Koesharyani, I., Hyatt, A., and Itami, T. 2005. Development of cell line from tail of koi (*Cyprinus carpio*) and isolation of koi herpes virus from Indonesia aquaculture. *Book of abstracts 6th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, 25-28 October 2005. Colombo. Srilanka, 74 pp.
- Wolf, K. and Quimby, M.C. 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*. 135: 1,065-1,066.
- Wolf, K. and Quimby, M.C. 1976. Primary monolayer culture of fish cells initiated from trypsinized tissues, *In TCA Manual 2*. Evans, V.J., V.P. Perry, and M.M. Vincent (eds). Tissue Culture Association, Rockville, p. 453-456.