

PENYEDIAAN BIAKAN SEL ORGAN LIMFOID UDANG WINDU *Penaeus monodon* SECARA *IN VITRO* SEBAGAI MEDIA TUMBUH BAGI VIRUS

Nuryati S.¹, D. Dana¹, M.B. Malole² & F.H. Pasaribu²

*Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680*

ABSTRACT

Primary shrimp cell culture from lymphoid organ of *Penaeus monodon* was successfully developed. Minced tissues of lymphoid organ were seeded by trypsin enzyme and culture in Leibovitz-15 supplemented with 10% fetal bovine serum and 5% NaCl. Plates were then incubated at 27 °C with 5% CO₂ supply. Confluent cells were infected by white spot baculovirus (WSBV). Cytopathic effect (CPE) induced by white spot baculovirus showed characteristics of detachment cells and lysis forming giant polycaryon cells. Primary shrimp cell culture could be continued by advanced cell culture resulting cell line could be used virus media.

Key words : cell culture, lymphoid organ, tiger shrimp, invitro, virus

ABSTRAK

Kuitur sel primer dari organ limfoid udang windu *Penaeus monodon* telah berhasil dilakukan. Potongan organ limfoid dipisahkan menjadi sel-sel tunggal dengan menggunakan enzim tripsin. Sel-sel tunggal tersebut dikultur dalam media Leibovitz-15 dengan tambahan 10 % fetal bovine serum dan 5 % NaCl. Biakan diinkubasi pada suhu 27 °C dengan kandungan CO₂ sebanyak 5 %. Biakan yang telah konfluen diinfeksi dengan virus WSBV dan menghasilkan *cytopathic effect* (CPE) dengan karakter sel lepas dari perlekatan dan mengalami lisis yang menyisakan *giant cells* dengan inti banyak (*polycaryons*). Kuitur sel primer ini dapat ditindaklanjuti dengan kuitur sel dengan pasase yang berulang-ulang sehingga dapat menghasilkan sel lestari (*cell line*) untuk media tumbuh virus.

Kata kunci: biakan sel, organ limfoid, udang windu, invitro, virus

PENDAHULUAN

Udang (*Penaeus monodon*) windu merupakan salah satu komoditas ekspor andalan yang diharapkan dapat memberi kontribusi bagi perekonomian Indonesia. Melalui Gema Protekan 2003, pemerintah mencanangkan peningkatan ekspor perikanan termasuk udang yang ditargetkan sebesar US \$ 6,8 milyar. Untuk mencapai target tersebut diperlukan usaha yang tidak ringan mengingat kendala yang dihadapi dalam budidaya udang adalah masalah penyakit. Kendala penyakit, terutama penyakit viral yang berpotensi untuk menurunkan produksi udang, belum teratasi sampai saat ini.

Penyakit viral merupakan ancaman serius bagi kelangsungan budidaya udang windu. Informasi mengenai karakterisasi virus yang sangat diperlukan untuk pencegahan dan pengendalian penyakit viral pada udang masih belum banyak diketahui. Hal ini disebabkan karena belum dikuasainya teknologi penyediaan biakan sel dari udang yang berguna untuk menumbuhkan virus hewan akuatik. Oleh karena itu penelitian mengenai karakterisasi dan biologi virus penyebab penyakit pada udang harus diawali dengan penelitian terhadap penyediaan media tumbuh berupa kuitur sel ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kuitur sel organ limfoid (oka) udang sebagai media tumbuh virus. Dengan adanya media ini diharapkan dapat menunjang dan mempermudah penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi virus dan pengembangan

produksi bahan biologi untuk penanggulangan penyakit viral pada udang.

BAHAN DAN METODE

Udang Windu

Udang windu (panjang 10 cm dan Bobot 20-30 g) diperoleh dari Tambak Intensifikasi Rakyat (TIR) Karawang. Udang dipelihara selama dua bulan sebelum diambil organ limfoidnya untuk dikultur (Frerich 1996)

Isolat *White Spot Baculovirus* (WSBV)

Isolat WSBV diperoleh dari Balai Penelitian Perikanan Pantai (Balitkanta) Maros - Sulawesi Selatan dalam bentuk suspensi. Isolat ini diperlukan untuk menginfeksi sel hasil kuitur organ limfoid.

Bahan Pembuatan Media Kuitur

Media yang diperlukan untuk mengkultur sel adalah Leibovitz L-15 (Gibco) dengan ditambah 5 g/l NaCl dan 10% FBS (Gibco). Antibiotik yang digunakan untuk mencegah kontaminasi oleh bakteri adalah penisillin-streptomisin (Gibco) dengan dosis 100 IU/ml, sedang untuk mencegah kontaminasi cendawan digunakan fungizon (Gibco) yang berisi Amfoterisin B dengan dosis 2,5 u.g/l. Bahan tersebut dilarutkan dalam akuades bebas ion. Sebelum digunakan media

disterilisasi dengan menggunakan filter 0,22 jam. Bahan pelengkap yang digunakan adalah etanol 70% sebagai desinfektan, PBS (*phosphat buffer saline*) enzim tripsin 0,125 % dan kertas pH.

Preparasi Kultur Sel Monolayer

Organ limfoid dipisahkan dari udang windu secara aseptik dan kemudian dipisahkan menjadi sel tunggal dengan metode mekanis dan enzimatis menurut Hsu *et al* (1995). Sebanyak dua buah organ diletakkan di cawan petri, dipotong-potong sehingga didapatkan potongan berukuran kecil. Potongan limfoid ini diberi enzim tripsin 0,125 sebanyak 0,5 ml. Potongan ini dimasukkan ke dalam *syringe* tanpa jarum, dan dikeluarkan lagi dengan efek hentakan. Pekerjaan tersebut dilakukan berulang-ulang sehingga potongan terpisah menjadi sel tunggal.

Sel tunggal ini kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri *disposable* berdiameter 3 cm dan tinggi 1 cm (Nunc) yang sebelumnya telah diberi media dengan kedalaman 0,5 cm. Jumlah sel yang dikultur sebanyak $8,1 \times 10^4$ sel/petri. Cawan petri berisi sel ini dimasukkan ke dalam cawan petri steril berdiameter 12 cm yang berfungsi sebagai pengaman untuk mencegah kontaminasi. Biakan ini kemudian dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 27°C dengan pemberian CO₂ sebanyak 5%. Setelah pemeliharaan 2 hari biakan ini menjadi konfluen (sel tumbuh menutupi dasar cawan petri).

Uji Infeksi Virus

Penginfeksi terhadap sel hasil kultur menggunakan metode sel kultur selapis (*monolayer*) yang sudah konfluen (penutupan 100%). Kultur selapis diberi media baru setelah berubah menjadi coklat muda dari

merah muda (*pink*). Supernatan WSBV diambil sebanyak 0,5 ml yang disebarkan ke sel *monolayer* dan diinkubasi 24 jam pada suhu 27°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian penyediaan biakan sel limfoid udang windu yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut. Organ atau jaringan yang diuraikan secara mekanis atau enzimatis menjadi suspensi sel dan suspensi ini bisa dikultur (Tabel 1). Suspensi sel tersebut kemudian dibiakkan menjadi satu lapisan jaringan (*monolayer*) di atas permukaan jaringan yang keras (botol, tabung atau cawan) atau menjadi suspensi sel dalam media penumbuh (Malole, 1990).

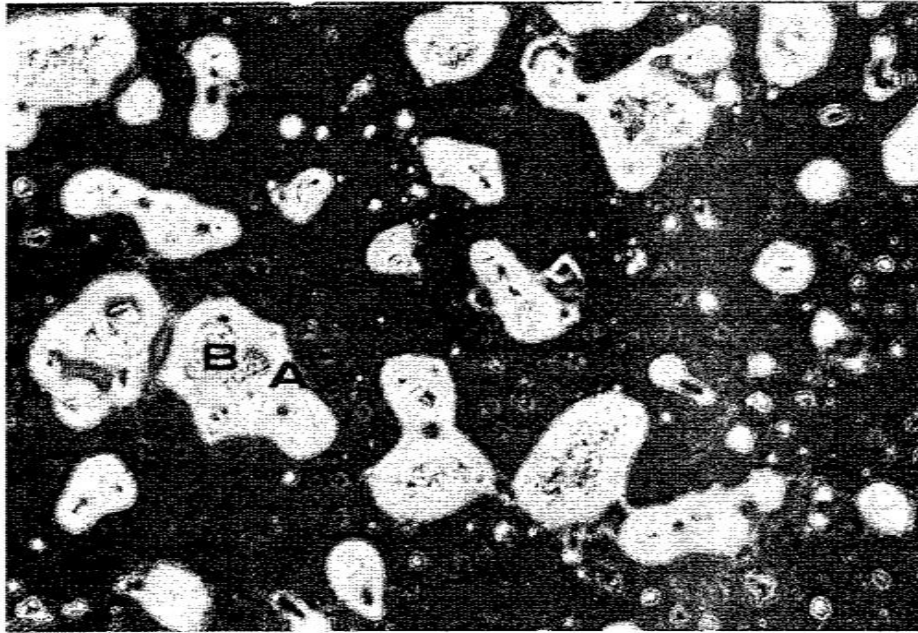
Dalam proses pembuatannya kultur sel ini selalu menghadapi resiko kegagalan. Kegagalan tersebut biasanya berkaitan dengan teknik pemisahan jaringan menjadi sel-sel tunggal, penggunaan teknik aseptik dan sterilisasi, dan ketersediaan buffer yang dapat memelihara kestabilan pH media.

Teknik Pemisahan Jaringan

Pemisahan jaringan menjadi sel tunggal harus menggunakan teknik yang tepat. Pemisahan organ limfoid tidak cukup hanya dengan menggunakan teknik mekanis saja. Hal ini terbukti pada penelitian pendahuluan bahwa pemisahan dengan penggerusan saja tidak disertai dengan tumbuhnya sel yang dikultur. Sel limfoid yang agak lunak ternyata membuat sel hancur ketika digerus. Sel yang sudah hancur tidak mampu mempertahankan diri lagi apalagi untuk memperbanyak diri.

Tabel 1. Proses biakan sel organ limfoid udang windu (*Penaeus monodon*) yang kemudian diinfeksi dengan virus WSBV

Hari ke-	Parameter	
	Media Biakan	Perlakuan
1	a. Warna media berubah dari merah muda menjadi kuning b. Ada pertumbuhan sel sebanyak 25 % dari luas total permukaan	Penggantian media
2	a. Warna media berubah dari merah muda menjadi kuning b. Biakan tumbuh konfluen (100%) menutupi seluruh permukaan cawan	Penggantian media Biakan diinfeksi dengan virus WSBV dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27°C
3	a. Warna media berubah merah muda menjadi kuning muda b. Terbentuk <i>cytophatic effect</i> (CPE) seluas 20% (Gambar 1)	Inkubasi lanjut selama 24 jam pada suhu 27°C
4	Luasan <i>cytophatic effect</i> bertambah mencapai 50 %	Tidak ada perlakuan



Gambar 1. Cytopathic Effect (CPE) 20% yang terbentuk setelah biakan diinfeksi dengan virus WSBV dan diinkubasi selama 24 jam (A) Giant cell (perbesaran 100 x) (B)

Pemisahan jaringan menjadi sel-sel tunggal tetap memerlukan peran enzim tripsin. Enzim ini mampu menguraikan ikatan antar sel sehingga sel terpisah menjadi sel tunggal. Konsentrasi enzim yang biasa dipakai untuk memisahkan jaringan menjadi sel tunggal pada mamalia umumnya adalah 0,25%. Tekstur organ limfoid lunak, berbeda dengan jaringan mamalia pada umumnya, sehingga digunakan konsentrasi tripsin yang lebih rendah yaitu 0,125%. Pada percobaan ini konsentrasi tersebut berhasil memisahkan jaringan pada organ limfoid menjadi sel tunggal yang dibuktikan dengan tumbuhnya sel-sel yang dikultur sehingga tumbuh konfluen.

Urgensi Teknik Aseptik

Teknik aseptik termasuk faktor penting yang menentukan keberhasilan kultur. Teknik aseptik dan sterilisasi terhadap bahan dan peralatan merupakan langkah pencegahan terjadinya kontaminasi. Kontaminasi dapat disebabkan oleh bakteri, virus, fungi/cendawan, khamir atau mikoplasma. Apabila kontaminasi sudah terjadi, penanganan dengan pemberian antibiotik pada media saja tidak cukup mengingat kompleksnya sumber kontaminasi.

Udang windu merupakan organisme akuatik yang menjadi bahan dalam percobaan ini tidak bebas dari kontaminasi. Lingkungan akuatik merupakan lingkungan di mana bermacam-macam mikroorganisme dapat ditemukan di dalamnya seperti bakteri, cendawan maupun virus. Oleh karena itu tidak jarang organisme budidaya seperti udang windu yang dipelihara pada lingkungan yang terbatas/tertutup dan dengan sistem

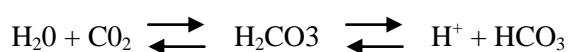
budidaya intensif seringkali terinfeksi oleh agen penyakit.

Untuk membebaskan udang windu dari mikroorganisme/kontaminan yang diprediksi dapat mengakibatkan kegagalan kultur sel, maka sebelum udang dibedah dan diambil organ limfoidnya perlu diberi perlakuan. Perlakuan dalam percobaan ini adalah dengan memberikan bahan kimia untuk mendisinfeksi, setelah sebelumnya dikarantina selama dua bulan untuk memutuskan siklus mikroorganisme penyebab penyakit.

Ketersediaan Buffer

Nilai pH yang ideal untuk kultur jaringan adalah 7,4 (Malole 1990), sedangkan nilai pH yang optimal untuk pertumbuhan sel limfoid adalah 7,63-8,1 (Hsu *et al.*, 1995). Nilai pH media yang diset dalam percobaan ini adalah 7,6 yang berwarna merah jambu (agak kebiruan). Selama pemeliharaan biakan sel dalam inkubator pH dijaga pada kisaran nilai tersebut. Untuk menjaga agar pH stabil maka ditambahkan *buffer*. *Buffer* yang sering digunakan adalah bikarbonat dan penambahan gas CO₂ pada permukaan media.

Penambahan gas CO₂ ini akan membentuk kesetimbangan mengikuti reaksi berikut (Freshney, 1987):



Apabila CO₂ di atmosfer terlalu banyak maka reaksi akan bergeser ke kanan, ion H⁺ banyak terbentuk sehingga kondisi media akan menjadi asam. Oleh karena itu perlu ditambahkan NaHCO₃ yang

merupakan buffer dan dapat menggeser reaksi ke kiri. NaHCO_3 ini di media akan terurai setimbang menurut reaksi berikut:



Penambahan/peningkatan konsentrasi HCO_3^- akan menekan pergeseran reaksi untuk mencapai keadaan setimbang, yaitu pH sekitar 7,4.

Media Leibovitz merupakan media khusus yang tidak mengandung natrium bikarbonat, akan tetapi untuk pengaturan *buffer* dapat digantikan oleh asam amino bebas serta mengganti glukosa dengan galaktose dan piruvat. Media ini cocok untuk kultur terbuka (Malole 1990). Kandungan sodium piruvat pada media Leibovitz LI5 ini 550 mg/L, tertinggi di antara media yang ada, tidak mengandung NaHCO_3 dan tidak memerlukan CO_2 (Freshney 1987).

Pada percobaan kultur sel-sel limfoid tanpa menggunakan gas CO_2 ternyata sel yang dikultur tidak dapat tumbuh. Permasalahannya kemungkinan terletak pada konsentrasi sel. Menurut Freshney (1987), kultur sel pada konsentrasi rendah sebaiknya diinkubasi pada atmosfer yang mengandung suplai gas CO_2 . Kepadatan sel yang terlalu rendah dan kultur dalam keadaan terbuka yaitu di dalam cawan petri, dapat mengakibatkan keluarnya CO_2 dan bikarbonat (untuk media yang mengandung bikarbonat) yang terlarut di dalam media. Kepadatan sel $8,1 \times 10^4$ sel/petri termasuk rendah, sehingga cara yang tepat untuk mengkultur sel dengan kepadatan tersebut adalah dengan memberi suplai CO_2 atau mengkultur dalam sistem yang tertutup (diisolasi).

Fenomena *Cytopatic Effect*

Biakan sel limfoid yang telah konfluen dan diinfeksi virus WSBV akan

mengakibatkan munculnya *cytopatic effect* (CPE). CPE ini ditandai dengan munculnya area yang berlubang pada biakan sel yang konfluen tersebut. Sel-sel yang terinfeksi WSBV akan mengalami lisis yang menyisakan sel-sel yang rusak yang membentuk *giant cell* (sel raksasa) yang berinti banyak (polykaryons). CPE tersebut semakin hari prosentasenya semakin meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa virus WSBV tersebut dapat tumbuh dan berbiak seiring dengan matinya sel limfoid yang menjadi sumber nutriennya.

Keberhasilan kultur sel limfoid ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu teknik pemisahan jaringan menjadi sel tunggal, teknik aseptik dan sterilisasi serta ketersediaan suplai gas CO_2 dari luar yang sangat berperan dalam kestabilan pH media. Keberhasilan kultur ditandai dengan tumbuhnya sel sehingga mencapai tahap konfluen. Biakan sel ini dapat digunakan untuk menumbuhkan virus WSBV sehingga penelitian ini dapat dilanjutkan pada tahap kultur untuk mendapatkan sel lestari (*cell line*).

DAFTAR PUSTAKA

- Freshney, R.I. 1987. Culture of Animal Cell: A Manual of Basic Technique (Second Edition). Alan R. Liss Inc., New York.
- Hsu, Y.L., Y.H. Yang, Y.C. Chen, M.C. Tung, J.L. Wu, M.H. Engelking & J.C. Leong. 1995. Development of an in vitro subculture system for the oka organ (lymphoid tissue) of *Penaeus monodon*. Journal of Aquaculture, 136:43-55.
- Malole, M.B. 1990. Kultur Sel dan Jaringan Hewan. PAU Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.