

**KULTUR SEL OTAK IKAN KERAPU BEBEK (*Cromileptes altivelis*) DENGAN MENGGUNAKAN MEDIA L-15, MEM DAN TCM**

**CELL CULTURE BRAIN OF HUMPBACK GROUPE FISH (*Chromileptes altivelis*) WITH MEDIUM L-15, MEM AND TCM.**

**Hari Suprpto dan Nunik Diantiwi**

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga  
Kampus C Mulyorejo - Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

**Abstract**

Humpback grouper is high value commodity fish. The demand of domestic and foreign markets increases every year. The obstacles of Humpback grouper fish cultivation is a disease caused by Viral Nervous Necrosis (VNN). The virus attacks the brain leading to mass death. To prevent the disease, a research on VNN virus has to be started. The problem of the research is the lack of culture of fish tissue. Virus have specific location to tissue cell and species to be infected. Therefore, first step must be done is growth from tissue cell which infection of virus. Cell culture is a technique to isolate cell, protoplasm, tissue or organ to be grown in a sterile condition with nutrition containing growth hormone to promote multiplication. Cell culture technique can be used in many basic applications in cell biology. The purpose of this research is to develop cell culture from Grouper fish brain for VNN research. The hope is culture can grow and develop well. Research executed at June until Desember 2009 in Laboratory In Vitro of Veterinari Faculty of Airlangga University and Laboratory Gastroenteritis Institute of Tropical Disease, Airlangga University, Surabaya. The result showed that brain cell culture of humpback grouper fish can be grow and multiply well in all three media, media L-15 cell growth was faster compared to media MEM and TCM.

**Keywords :** Humpback grouper fish, VNN, Cell culture, Medium L-15, MEM, TCM

**Pendahuluan**

Kerapu bebek merupakan komoditas unggulan yang memiliki nilai ekonomis penting sebagai komoditas ekspor. Harga ditingkat pembudidaya antara Rp. 250.000 hingga Rp. 350.000 per kg. Permintaan pasar terhadap ikan ini sangat tinggi baik di dalam maupun luar negeri (Sutarmat dan Adi, 2005).

Budidaya ikan kerapu bebek sudah mulai berkembang sejak tahun 1998. Kendala yang terdapat pada budidaya ikan kerapu adalah penyakit. Penyakit utama yang sering menyerang ikan kerapu adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang disebabkan oleh noda virus (Sugama, 2003). VNN adalah penyakit yang sangat berbahaya karena dapat menimbulkan kematian yang tinggi pada kerapu terutama pada stadia larva dan juvenil (Koesharyani *et al.*, 2005).

Penyakit yang disebabkan oleh nodavirus ini menyerang sistem syaraf pusat dimana biasanya menyebabkan nekrosis pada sel (Munday and Nakai, 1997). Ikan yang terinfeksi telah diperkirakan 19 spesies dalam 10 famili ikan (Munday and Nakai, 1997). Laporan terakhir oleh Munday *et al.*, (2002) menyatakan lebih dari 32 spesies ikan dari 16

famili yang telah terinfeksi. Di Indonesia, infeksi VNN dilaporkan pertama kali pada barramundi (*Lates carcarifer*) di panti pembenihan di Jawa Timur pada tahun 1997 kemudian pada tahun 1998 menyebar ke Bali dan menyebabkan terjadinya kematian massal (Zafran *et al.*, 1998).

Berdasarkan terjadinya kematian massal pada kerapu bebek akibat serangan virus, maka diadakan kegiatan penelitian tentang virus VNN. Virus mempunyai sifat spesifik terhadap sel jaringan dan spesies tertentu. Oleh karena itu, untuk memulai penelitian tentang virus yang pertama yang harus dilakukan adalah menumbuhkan atau mengkultur sel dari jaringan yang terinfeksi. Kelemahan dari penelitian tentang virus adalah karena kurangnya penelitian tentang kultur sel dari jaringan ikan (Roza, 2006). Kultur sel adalah suatu teknik untuk mengisolasi sel, protoplasma, jaringan atau organ dan menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh sel pada kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi (Firman, 2009).

Teknologi kultur sel dapat digunakan untuk bermacam-macam aplikasi dasar biologi sel (Phelan, 1998). Menurut Muhajir dkk., (2007) sel yang dikultur sebenarnya dapat dibeli dari luar negeri tetapi dengan harga yang sangat mahal dan setiap minggu harus dilakukan sub kultur. Di Indonesia kultur sel sendiri masih sulit dicari. Diharapkan dengan keberhasilan pembuatan kultur sel nantinya akan menjadi dasar untuk penelitian kerapu lainnya misalnya mengetahui pola penularan virus, penyebaran virus, inang yang terinfeksi, daya tahan tubuh kerapu di alam serta pengembangan ke arah pencegahan penyakit terutama yang disebabkan oleh virus.

### Metodologi

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2009 di Laboratorium *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Gastroenteritis di *Institute of Tropical Disease*, Universitas Airlangga, Surabaya. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *petri disk*, gelas ukur, botol 250 ml, *aluminium foil*, gunting, pinset, mikroskop, kamera, pipet, timbangan, LAF (*Laminar Air Flow*) dan inkubator CO<sub>2</sub>. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kerapu bebek yang diambil bagian otaknya, alkohol, media L-15 (*Leibovitz 15*), media MEM (*Minimum Essential Medium*) dan media TCM (*Tissue Culture Medium*), *Penicillin G*, *Streptomycin*, NaHCO<sub>3</sub>, FBS (*Fetal Bovin Serum*), DW<sub>2</sub> (*Diionized water*) dan *trypanblue*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif, yaitu metode yang mendeskripsikan dan menggambarkan suatu keadaan, mengenai apa dan bagaimana, berapa banyak, sejauh mana variabel yang diteliti (menjelaskan dan menerangkan peristiwa) serta penyajian fakta secara sistemik agar mudah untuk disimpulkan (Nazir, 1983).

Prosedur kerja yang harus dilakukan dalam membuat kultur sel otak ikan kerapu bebek adalah :

1. Mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Semua peralatan dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian harus disterilkan terlebih dahulu dengan tujuan menghilangkan dan membebaskan semua alat dan bahan dari gangguan organisme mikroba seperti virus, bakteri, spora dan fungi. Sterilisasi alat-alat yang tahan terhadap panas gelas seperti pipet, *petri disk*, botol dan gelas ukur dapat dilakukan dengan metode panas

basah yaitu memanaskan alat ke dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi untuk media kultur dilakukan secara mekanik yaitu dengan menggunakan *filter* (penyaring) bakteri dengan pori 2 µm untuk memisahkan bakteri. Penyaringan dilakukan menggunakan *filter miliphore* dengan bantuan *syringe injeksi*.

2. Pembuatan media kultur.

Cara pembuatan media kultur sel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Bahan yang dibutuhkan dalam pembuatan kultur sel otak

Bahan	Media kultur		
	L-15	MEM	TCM
Sebanyak	4,7 g	4,7 g	4,7 g
DW <sub>2</sub>	200 ml	200 ml	200 ml
<i>penicillin G</i> ;	0,007 g	0,007 g	0,007 g
<i>streptomycin</i>	0,007 g	0,007 g	0,007 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,1 g	1,1 g	1,1 g
FBS	0,06 g	0,06 g	0,06 g

Timbang semua bahan pada Tabel 1. lalu bahan tersebut dimasukkan kedalam botol 250 ml kemudian kocok hingga seluruh bahan tercampur. Setelah itu media disterilkan dengan filter *miliphore* ukuran 0,2 µm.

3. Penyiapan sel otak ikan kerapu.

Ikan kerapu bebek yang akan diambil otaknya disiapkan dan dibersihkan. Bagian kepala dipotong terlebih dahulu untuk mempermudah pengambilan otak. Kemudian dengan menggunakan bantuan gunting dan pinset yang telah disterilkan, gunting di bagian mulut ke arah atas kepala sampai terlihat bagian otak lalu dengan menggunakan pinset ambil otak tersebut.

Siapkan 3 *petri disk*, dibagian bawah *petri disk* diberi label atau keterangan masing-masing media (L-15, MEM dan TCM). Media yang sudah disiapkan dimasukkan ± 3 ml kedalam *petri disk* tersebut sesuai nama pada label atau keterangan medianya. Kemudian otak yang telah diambil dipotong menjadi ± 1 gram kemudian masukan ke dalam *petri disk* yang telah berisi media L-15, MEM dan TCM.

4. Kultur sel otak ikan kerapu.

Otak dalam *petri disk* dipotong atau digunting menjadi bagian yang lebih kecil dan seluruh sel terendam pada media,

kemudian disimpan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 30°C selama 24 jam. Setelah 24 jam sel diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dan pengamatan dilakukan setiap 24 jam sekali. Pada hari ke-7 atau setelah 168 jam pertumbuhan sel sangat padat sehingga harus dilakukan subkultur.

5. Pengamatan pertumbuhan sel otak ikan kerapu.

Pengamatan terhadap sel otak dilakukan setiap hari menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) untuk mengurangi resiko kontaminasi.

6. Subkultur.

Subkultur dilakukan untuk mendapatkan sel baru dari pembiakan sel. Subkultur adalah menumbuhkan sel pada media lama ke media yang baru dilakukan dengan cara mengambil dengan menggunakan pipet ( $\pm$  5 ml) media yang lama dan memasukkan kedalam media baru. Subkultur dilakukan setiap 168 jam atau setiap satu minggu sekali selama 5 minggu, dimaksudkan untuk mengetahui apakah sel masih dapat tumbuh dengan baik meskipun telah dilakukan subkultur berulang kali.

### Pembahasan

Hasil penelitian kultur sel menggunakan medium yang berbeda terhadap pertumbuhan sel otak ikan kerapu bebek, didapatkan bahwa medium L-15 (*Leibovitz 15*), MEM (*Minimum Essential Medium*) dan TCM (*Tissue Culture Medium*) memberikan pertumbuhan sel yang berbeda. Adapapun hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pertumbuhan kultur sel otak ikan kerapu pada media yang berbeda

Media Hari ke-	L- 15	MEM	TCM
1	+	+	+
2	++	+	+
3	++	++	++
4	+++	++	++
5	+++	+++	+++
6	+++	+++	+++
7	Subkultur	Subkultur	Subkultur
8	1	1	1
9	+	+	+
10	++	+	+
11	++	++	++
12	+++	++	++
13	+++	+++	+++
14	+++	+++	+++
15	Subkultur	Subkultur	Subkultur
16	2	2	2
17	+	+	+
18	++	+	+
19	++	++	++
20	+++	++	++
21	+++	+++	+++
22	+++	+++	+++
23	Subkultur	Subkultur	Subkultur
24	3	3	3
25	+	+	+
26	++	+	+
27	++	++	++
28	+++	++	++
29	+++	+++	+++
30	+++	+++	+++
31	Subkultur	Subkultur	Subkultur
32	4	4	4
33	+	+	+
	++	++	++
	+++	++	++
	+++	+++	+++
	+++	+++	+++
34	+++	+++	+++
35	Subkultur	Subkultur	Subkultur
36	5	5	5
37	+	+	+
38	++	++	++
39	+++	++	++
40	+++	+++	+++
41	+++	+++	+++
	+++	+++	+++

### Keterangan :

- + = Awal perkembangan sel
- ++ = Lebih banyak sel
- +++ = Kepadatan sel yang tinggi

Dari Tabel 1. didapat bahwa pertumbuhan sel otak ikan kerapu dengan menggunakan media L-15 lebih cepat daripada media MEM dan TCM.

Pertumbuhan sel adalah suatu proses pembelahan sel dimana setelah satu sel membelah menjadi dua maka masing-masing sel akan mengalami pertumbuhan sel kemudian menjadi dewasa serta siap untuk mengadakan pembelahan kembali (Juwono, 2000). Sel ditumbuhkan kedalam media yang mengandung nutrisi yang sesuai untuk tumbuh dan perkembangan sel. Yang harus dikontrol dan diperhatikan selama pertumbuhan sel meliputi nutrisi, suhu dan pH. Penggantian media atau subkultur dilakukan untuk mencegah terjadinya kerusakan atau kematian sel akibat kekurangan nutrisi. Suhu optimum untuk pertumbuhan sel otak kerapu secara *in vitro* adalah 25°C - 30°C (www.baphiq.gov.tw, 2009). Pertumbuhan sel yang baik terjadi pada pH 7,0 – 7,4 (Rahma, 2007). Penambahan NaHCO<sub>3</sub> berfungsi untuk membuat/mengatur pH menjadi 7 dan hasilnya adalah terbentuk larutan media berwarna merah yang menunjukkan pH 7,4.

Faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan sel adalah media kultur (Phelan, 1998). Media merupakan tempat hidup dari sel yang dikultur oleh karena itu komposisi media ikut mempengaruhi pertumbuhan sel. Media yang dibutuhkan dalam kultur pada umumnya membutuhkan komposisi yang sesuai untuk sel tertentu. Komposisi bahan tersebut antara lain asam amino, vitamin, garam-garaman, glukosa, hormon dan *growth factor*, antibiotik serta serum. Asam amino merupakan bahan yang sangat penting untuk pertumbuhan sel pada media tumbuh terutama untuk pertumbuhan sel. Vitamin sangat diperlukan untuk membantu asam amino dalam pertumbuhan sel maupun untuk membantu metabolisme energi sel. Garam-garaman untuk menunjang osmolaritas media yaitu untuk menjaga kestabilan dinding sel yang sedang tumbuh, dan mempengaruhi adhesi sel untuk membentuk agregasi sel atau jaringan, serta mempengaruhi pH untuk viabilitas sel. Hormon dan *growth factor* digunakan untuk membantu meningkatkan pertumbuhan sel yang dikultur. Penambahan antibiotik kedalam media bertujuan untuk menghasilkan media yang bebas dari kontaminan. Antibiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Penicillin G* dan *Streptomycin*. *Penicillin G* merupakan antibiotik golongan *betalaktam* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif, sedangkan *streptomisin* dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (Yati dan Vincent, 2007).

Serum merupakan pendukung penyediaan nutrisi dan hormon untuk pertumbuhan sel. Serum yang digunakan pada penelitian ini adalah FBS (*Fetal Bovin Serum*). Menurut Florence *et al.* (1992) FBS merupakan serum yang paling baik untuk digunakan untuk pertumbuhan sel. Langkah pertama yang harus dilakukan pada pembuatan media adalah menyemprotkan tangan, meja kerja dan peralatan dengan alkohol 70%. Bahan-bahan ditimbang dengan neraca analitik untuk memperoleh komposisi dan ukuran bahan yang tepat. Air yang digunakan untuk melarutkan bahan adalah DW (*Diionized water*) yaitu air yang dimurnikan dengan melewati berbagai macam proses untuk menghilangkan kotoran dan ion, sehingga dapat menghasilkan bahan terlarut yang steril.

Pertumbuhan sel pada ketiga media yaitu media L-15, MEM dan TCM mengalami perbedaan pertumbuhan karena setiap media mempunyai kandungan yang berbeda. Hasil yang didapat setelah dilakukan kultur sel otak ikan kerapu bebek adalah pertumbuhan sel yang dikultur pada media L-15 lebih cepat tumbuh dibandingkan dengan sel yang dikultur dengan media MEM dan TCM. Dapat dilihat pada Gambar 4. bahwa pada media L-15 di hari pertama kultur, sel tumbuh lebih banyak dibandingkan dengan media MEM dan TCM. Pada hari ketiga pertumbuhan sel di media L-15 sudah memenuhi sepertiga luas petri, sedangkan pada media MEM dan TCM sel baru memenuhi sepertiga petri pada hari keempat. Pertumbuhan sel di hari keempat pada media L-15, sel sudah memenuhi seluruh bagian petri dan pada hari kelima media mulai terlihat keruh, hal tersebut disebabkan oleh pertumbuhan sel yang sangat padat sehingga sudah tidak ada lagi tempat sel untuk tumbuh sehingga sel saling menumpuk antara yang satu dengan yang lain, sedangkan pada media MEM dan TCM sel baru memenuhi seluruh petri pada hari kelima dan media mulai keruh baru terlihat pada hari keenam.

Media L-15 memberikan pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan media lainnya karena komposisi yang terkandung dalam media L-15 sesuai dengan komposisi yang dibutuhkan oleh sel otak ikan kerapu bebek. Komposisi pada media L-15 selain mengandung asam amino, vitamin, garam-garaman, L-15 juga mengandung Glukosa, arginin, cistin, histidin, dan tirosin dalam konsentrasi tinggi (Florence *et al.*, 1992). Komposisi media L-15 dapat dilihat pada Lampiran 1. Tirosin, arginin, cistin dan histidin merupakan asam amino yang sangat penting untuk pembentukan protein. Protein berperan

dalam perbaikan jaringan dan pemeliharaan sel, juga sebagai penyusun hormone, enzim, dan zat antibodi untuk menunjang pertumbuhan dan perkembangan sel. Media MEM dan TCM juga mengandung asam amino seperti asam amino yang terkandung pada media L-15 namun kurang optimal untuk pertumbuhan sel otak ikan kerapu karena pada pertumbuhan sel otak memerlukan kandungan asam amino yang lengkap dengan konsentrasi tinggi seperti sebagaimana yang terkandung pada media L-15. Komposisi media MEM dan TCM dapat dilihat pada Lampiran 2 dan 3.

Sel dapat tumbuh dan berkembang dari nutrisi yang tersedia pada masing-masing media, oleh karena itu setelah sel terlihat penuh maka perlu dilakukan subkultur agar sel tidak mati akibat kekurangan nutrisi. Subkultur dilakukan dengan cara mengambil sebagian kultur sel pada media yang lama dan memindahkannya ke dalam media yang baru. Tujuan dilakukan subkultur adalah untuk mempertahankan sel agar tetap hidup dan berkembang. Subkultur dilakukan sebanyak lima kali setiap satu minggu atau tujuh hari sekali. Sel otak yang di subkultur di media L-15 mengalami pertumbuhan yang lebih cepat, dapat dilihat pada Tabel 2. pada hari kedua pada media L-15 sudah lebih banyak sel yang tumbuh sedangkan pada media MEM dan TCM sel baru terlihat tumbuh lebih banyak pada hari ketiga, dan di hari keempat pada media L-15 sel sudah tumbuh dengan padat sedangkan pada media MEM dan TCM sel baru tumbuh padat pada hari kelima. Hasil yang didapat setelah subkultur adalah sel Kultur sel otak tetap dapat hidup dan berkembang biak pada ketiga media, namun pertumbuhan kultur sel otak yang paling cepat tetap terjadi pada media L-15 kemudian MEM dan TCM.

Kontaminasi yang sering terjadi dalam kultur sel biasanya disebabkan oleh virus, bakteri dan jamur. Ciri-ciri terjadinya kontaminasi dapat ditandai dengan terjadinya perubahan pH yang diikuti dengan perubahan warna pada media, dan jika dilihat dengan mikroskop pada perbesaran 400 kali bentuk sel terlihat coccus dan basil. pH optimum pada media kultur bekisar antara 7,0 - 7,4 hal tersebut diikuti dengan terbentuknya larutan media yang berwarna merah. Namun, pada penelitian yang telah dilakukan tidak ditemukan adanya kontaminasi. Cara yang dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi adalah dengan melakukan serangkaian proses kultur dengan cara aseptik seperti mensterilkan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan, menyemprotkan tangan dan meja dengan

alkohol sebelum dan sesudah bekerja dilaboratorium dan melakukan pengamatan sel didalam LAF (*Laminar Air Flow*).

### Kesimpulan

Sel otak ikan kerapu dapat tumbuh di media L-15, MEM dan TCM. Pertumbuhan kultur sel otak yang paling cepat di dapat pada media L-15 dan pada hari keenam pertumbuhan sel di ketiga media sudah sangat padat. Ketiga media bisa digunakan untuk kultur sel otak ikan kerapu namun bila ingin mendapatkan hasil pertumbuhan sel yang lebih cepat dapat menggunakan media L-15. Apabila media sudah terlihat memenuhi petri perlu dilakukan subkultur untuk mencegah terjadinya kematian sel karena kekurangan nutrisi. Untuk menjaga agar sel otak ikan kerapu dapat bertahan hidup dalam waktu yang lama tanpa harus dilakukan subkultur setiap minggu maka perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai penyimpanan kultur sel.

### Daftar Pustaka

- Alisianti, T., B. Slamet, dan G. S. Prasetya. 2004. Aplikasi Budidaya Kerpu Bebek, *Cromileptes altivelis* di Teluk Ekas Kabupaten Lombok Timur. <http://www.ntb.litbang.deptan.go.id>. 15/Agustus/2009. 5 hal
- Firman. 2009. Kultur Jaringan. [http : //gurungeblog.wordpress.com](http://gurungeblog.wordpress.com). 14 September 2009. 2 hal.
- Florence, G. B., T. M. Ghambars, and D. L. Wiedhrauk. 1992. *Virologi a laboratory Manual*. Harcourt Brace Jovanovich, publisher. San diego, New York, Boston, London, Sidney, Tokyo, Toronto. 15 pp.
- Juwono dan A. Z. Juniarto. 2000. *Biologi sel*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 1- 30 hal.
- Koesharyani, I., D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny, Zafran and K. Yuasa. 2005. *Manual for Fish Diseases Diagnosis II. Marine Fish and Crustacean Diseases in Indonesia*. Gondol Research Institute for Mariculture and Japan International Cooperation Agency. p. 5-15
- Kompas. 2008. Pasar perikanan Indonesia di Amerika Serikat meningkat. [www.kompas .com](http://www.kompas.com). 16/Desember/2009. 2 hal.
- Muhajir, Kusyairi, dan Sumaryam. 2007. Pembuatan Kultur Sel Kerapu *Cromileptes altivelis* untuk Replikasi Viral Nervous Necrosis (VNN) dan Virus lain Serta Penyimpangan dan Cryopreservasi. <http://lppm.unitomo.ac.id>. 12/Agustus/2009. 48 hal.

- Munday, B. L and Nakai. 1997. Special Topic Review : Nodavirus as Pathogen in Larva and Juvenil Marine Finfish. *World Jurnal Microbiology and Biotechnology* 13 : 375-381.
- Munday, B. L., J. S. Langdon, A. Hyatt and D. Humprey. 2002. Mass mortality associated with a Viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larva and juvenile barramundi, Lates Carcarifer Bloch. *Aquaculture* 103 : 197-211.
- Nazir, R. 1988. *Metode Penelitian*. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Phelan, C. M. 1998. Basic Technique for Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology* 1.1.1-1.1.10.
- Rahma. 2007. Kultur sel dan pertumbuhan virus. [http : // rahma02.wordpress.com](http://rahma02.wordpress.com). 3/Agustus/2009. 3 hal.
- Roza, D., F. Johnny dan Tridjoko. 2006. Peningkatan Respon Imun Non Spesifik Benih Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) dengan Imunostimulan dan Bakterin Terhadap Infeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). *Jurnal Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gajah Mada*. Yogyakarta. 15 hal.
- Sugama, K. 2003. Manual for humpback grouper culture (*Cromileptes altivelis*) in floating net cages. Gondol Research Institute for mariculture and Japan International Cooperation Agency. P. 1-3.
- Sutarmat, T., dan A. Hanafi. 2005. Pembesaran Ikan Kerapu Bebek dalam Keramba Jaring Apung di Teluk Pegametan Kecamatan Gerokgak, Bali. *Prosiding Seminar Riptek Kelautan Nasional* : 213-217.
- Trubus. 2007. Pembesaran Kerapu Bebek. [http : //trubus-online.co.id](http://trubus-online.co.id). 8/Agustus/2009. 16 hal.
- Zafran, D. Roza, I. Koesharyani, F. Johnny and K. Yuasa. 1998. Manual for Fish Diseases Diagnosis. *Marine Fish and Crustacean Diseases in Indonesia*. Gondol Research Institute for Coastal Fisheries and Japan International Cooperation Agency. P. 17-18.