

## Konsentrasi Serum Anjing yang Optimum untuk Menumbuhkan dan Memelihara *Babesia canis* dalam Biakan

(THE OPTIMUM CONCENTRATION OF DOG SERUM IN CULTURE TO CULTIVATE AND MAINTAIN *BABESIA CANIS*)

Tutuk Astyawati<sup>1)</sup>, Retno Wulansari<sup>2)</sup>, Cahyono<sup>1)</sup>,  
Ferry Ardhiyansyah<sup>1)</sup>, Ari Rumekso<sup>2)</sup>, Dhetty<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Bagian Parasitologi; <sup>2)</sup>Bagian Penyakit Dalam;  
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor  
Jl. Agatis 1 Kampus IPB Darmaga Bogor

### ABSTRACT

The use of cultivation system *in vitro* is very important in the future study of *Babesia canis*. The aim of this study was to cultivate *B. canis in vitro* using RPMI media with different concentration of dog sera. *B. canis* infected erythrocytes were collected from splenectomized infected dog. Parasites were cultivated with RPMI 1640 medium supplemented with normal dog sera at the concentration of 10%, 20% and 40%, the culture were then incubated in 5% CO<sub>2</sub>, 37°C temperature for 17 days and subcultured every 48 hours. The Percentage of Parasitized Erythrocytes (PPE) in culture with 10% dog serum was significantly lower than those 20%, and 40%. The used of 20% and 40 % sera were better than 10%. It is recommended that 40 % serum can be used for initiation phase of cultivation, whereas 20% concentration were used for maintenance of the culture.

Keys: *Babesia canis*, Cultivation, Percentage of Parasitized Erythrocytes

### ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menerapkan teknik pemupukan *Babesia canis* secara *in-vitro*. Eritrosit berparasit *B. canis* diperoleh dari anjing terinfeksi *B. canis* yang telah diplenektomi. Pemupukan parasit dilakukan menggunakan media RPMI 1640 dan serum anjing normal pada konsentrasi 10%, 20%, dan 40%, diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% selama 17 hari, dan sub-kultur setiap 48 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara persentase eritrosit berparasit/percentage of paratized erythrocytes (PPE) pada konsentrasi serum 10% dengan PPE pada konsentrasi serum 20% dan 40%. Namun, demikian tidak terdapat perbedaan yang nyata antara PPE pada serum dengan konsentrasi 20% dan 40%. Penggunaan serum dengan konsentrasi 20% dan 40% lebih baik dibandingkan dengan serum konsentrasi 10%. Serum dengan konsentrasi 40% dapat digunakan pada tahap awal pemupukan, sedangkan serum dengan konsentrasi 20% lebih baik digunakan pada tahap pemeliharaan pemupukan.

Kata-kata kunci : *Babesia canis*, pemupukan, persentase eritrosit berparasit

### PENDAHULUAN

Babesiosis merupakan infeksi oleh parasit intraeritrosit yang disebabkan oleh *Babesia* sp. Penyakit ini sering ditemukan di daerah yang beriklim tropis, subtropis, dan beriklim sedang. Patogenitas dari spesies *Babesia* di seluruh dunia beragam seiring dengan vektor biologisnya yang

tersebar secara luas. Keberadaan babesiosis di Indonesia sudah dilaporkan sejak tahun 1986, tetapi sampai sekarang belum dapat diberantas (Astyawati dan Winarto, 1991). Menurut Ressang (1984), penyakit ini bersifat endemik di daerah Bogor dan sekitarnya sehingga banyak ditemukan kasus babesiosis dalam bentuk menahun.

Babesiosis pada anjing disebabkan oleh *B. canis* dan *B. gibsoni*. *B. canis* adalah parasit protozoa darah yang menyerang eritrosit serta penularannya melalui gigitan caplak. *B. canis* pertama kali diidentifikasi oleh Pinna dan Galli Valerio tahun 1895 di Italia (Ressang, 1984). Secara morfologi parasit darah ini menyerupai *B. bigemina* yang menyerang sapi dengan vektor caplak *Dermacentor marginatus* dan *Rhipicephalus sanguineus*. Gejala klinis yang dapat timbul akibat penyakit ini antara lain demam, anoreksia, malaise, hemoglobinuria, splenomegali, dan hemolisis darah yang sering kali menyebabkan kematian (Arai, 1998). Kematian hewan yang terinfeksi dapat meningkat jika infeksi tersebut tidak dikendalikan khususnya pada anak anjing.

Teknik biakan *Babesia sp.* secara *in vitro* sudah dikembangkan sejak tahun 1965 dengan berbagai tujuan antara lain untuk mempelajari perjalanan infeksi, mekanisme kekebalan dan pengembangan teknik pembuatan vaksin. Sejak Treger dan Jensen (1976) [dalam Kellerman *et al.* 1988] berhasil membiakkan *Plasmodium falciparum* secara *in vitro* para peneliti mencoba menerapkan metode tersebut pada beberapa spesies *Babesia*. Callow (1977) mencoba mengisolasi *B. bigemina* yang sebelumnya dilakukan pasase pada anak sapi yang telah displenektomi. Kemudian Erp *et al.* (1978) berhasil membiakkan *B. canis* berdasarkan metode Treger dan Jensen pada anjing yang sebelumnya displenektomi. Splinektomi dilakukan untuk meningkatkan persentase eritrosit berparasit. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menerapkan teknik pemupukan *B. canis* secara *in vitro* pada media RPMI-1640 dengan menggunakan serum anjing sehat pada konsentrasi 10%, 20%, dan 40%.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Protozoologi dan Laboratorium Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Hewan IPB pada bulan Februari sampai Oktober 2004. Metode penelitian ini mengacu pada teknik yang dilakukan oleh Sunaga *et al.* (2002); Levy dan Ristic (1983) dengan menggunakan media RPMI-1640.

Pada penelitian ini digunakan anjing yang terinfeksi *B. canis* secara alami, displenektomi sebagai sumber *Babesia sp.*, Anjing yang bebas dari infeksi *B. canis* diambil serum dan eritrosit-

nya. Media kultur yang digunakan : RPMI-1640 (GIMCO®) dengan suplemen 25 mM HEPES (n-[2-hydroxyethyl] piperazin Nethanezulfonic acid), 2mM L-glutamin, 1 mM *sodium pyruvat* (Ch<sub>3</sub>COONa), 24mM *sodium hydrogen carbonat* (NAHCO<sub>4</sub>), penisilin G 100unit/mL, streptomisin 100 ig/mL, fungizone 2,5 µg/mL dan serum dengan konsentrasi 10%, 20% , 40%.

## Penyiapan Larutan Vega Y Martinex (Vym's solution)

Larutan Vym's 10x terdiri dari 800 ml aquabidest; 14,5 g NaHPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O atau 19,37 g NaHPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O; 14,15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 70,77 g NaCl dan 0,16 g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O dilarutkan. Kemudian campurkan 4 g KCl; 4,54 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 205 g dekstrosa, 0,24 g adenin HCl dan 0,708 g guanosine. Tambahkan aquabidest sampai volume menjadi 1000 ml, selanjutnya larutan disteril dengan cara filtrasi menggunakan *milliopore* 0,45 µm dan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan. Saat akan digunakan, larutan Vym's 10 x dilarutkan dalam aquabidest dengan perbandingan 1 : 10, selanjutnya disebut larutan Vym's 1x. (Astyawati 1990).

## Penyediaan Anjing Bebas Infeksi *B. canis* dan Splinektomi

Hewan yang digunakan sebagai donor adalah tiga ekor anjing lokal, dua ekor anjing bebas infeksi dan satu ekor terinfeksi *B. canis*. Dua ekor anjing bebas infeksi *B. canis* sebagai donor serum dan eritrosit normal. Anjing bebas dari infeksi *B. canis* diteguhkan dengan pemeriksaan mikroskop ulas darah, dengan pewarnaan Giemsa dan dinyatakan bebas caplak. Seekor anjing terinfeksi *B. canis* secara alami, kemudian displenektomi untuk meningkatkan jumlah parasitemia dan selanjutnya *B. Canis* tersebut akan digunakan dalam pupukan kultur. Sebelum displenektomi, anjing yang terinfeksi diperiksa darahnya dengan pewarnaan Giemsa pada ulas darah untuk memastikan adanya parasit.

## Pembuatan Serum Normal

Serum normal diperoleh dari anjing yang bebas dari infeksi *B. canis*. Darah diambil melalui vena *saphena* dan vena *cephalica* dengan menggunakan venojek tanpa antikoagulan. Darah yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C selama lebih kurang 2 jam, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Setelah disentrifuse serum pada bagian atas yang berwarna bening

kekuningan dipisahkan. Di dalam *laminar flow* serum yang sudah dipisahkan difiltrasi dengan menggunakan filter *milliopore* 20  $\mu\text{m}$  dan diinaktifkan dalam penangas air pada suhu 56°C selama 30 menit, kemudian disimpan pada suhu -20 °C sampai serum digunakan. (Astyawati, 1990)

### Pemurnian Eritrosit

Pemakaian eritrosit dalam penelitian ini ada dua jenis yaitu eritrosit berparasit *B. canis* dan eritrosit normal. Eritrosit berparasit digunakan sebagai pupuk kultur, sedangkan eritrosit normal sebagai bahan makanan parasit dalam proses pembiakan. Selain itu eritrosit normal juga berfungsi sebagai media propagasi yaitu tempat parasit untuk berkembangbiak.

Cara pengambilan darah dan proses pemurnian kedua jenis eritrosit ini tidak berbeda. Darah diambil dari vena *cephalica* atau vena *saphena* dengan venojek berantikoagulan EDTA. Darah yang diperoleh disentrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Didalam *laminar flow* supernatan, bagian permukaan endapan dibuang dengan menggunakan *syringe*. Selanjutnya pada endapan ditambahkan larutan *Vym's* dengan perbandingan sama, kemudian disentrifuse kembali. Proses ini dilakukan tiga kali sehingga didapatkan eritrosit murni. Pada eritrosit ditambahkan larutan *Vym's* dengan perbandingan 3 : 1 dan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan (Astyawati, 1990).

### Pemupukan *B. canis* secara *in vitro*

Semua pengerjaan kultur parasit ini dilakukan dalam *laminar flow* dan menggunakan 3 buah *multiple plate* (satu *plate* untuk satu macam konsentrasi serum) sebagai tempat pupuk parasit. *Plate* ini terdiri dari 24 sumuran/*well* yang berkapasitas 2 ml per sumuran. Pada setiap *sumuran* posisi terluar diisi dengan 1 ml aquabidest. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk mempertahankan kelembaban biakan. Delapan sumuran pada posisi tengah digunakan untuk pemupukan *B. canis*.

Proses dalam kultur diawali dengan pengisian satu *sumuran* dengan 0,3 ml eritrosit berparasit dan media kultur ( mengandung serum 10%, 20%, 40%) pada masing-masing *plate*. Biakan awal ini diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%. Setiap 24 jam dilakukan penggantian media dengan membuang 1 ml media lama

(supernatan) dari sumuran dan digantikan dengan 1 ml media baru secara hati-hati tanpa mengganggu endapan. Setiap 48 jam dilakukan subkultur, yaitu dengan membuang media (supernatan) 1,2 ml dan memindahkan 0,3 ml endapan ke dalam sumuran berikutnya kemudian ditambahkan 0,3 ml eritrosit segar dan 1,2 ml media kultur. Hal ini dilakukan dengan tujuan menambah bahan makanan parasit yaitu eritrosit dan penyediaan media propagasi sehingga parasit dapat tumbuh secara kontinyu (Astyawati dan Winarto, 1991).

### Penghitungan Jumlah Eritrosit Berparasit

Perkembangan parasit hasil kultur diamati dengan melakukan uji ulas mulai hari ke 1 (sebelum dilakukan kultur) dengan pewarnaan Giemsa. Selanjutnya dilakukan pengamatan setiap hari sampai hari ke-16 dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 1000 x yang dilengkapi dengan lensa *ocular micrometer*.

Lensa *ocular micrometer* merupakan alat bantu dalam penghitungan persentase parasitemia. Persentase eritrosit berparasit ditentukan dengan menghitung jumlah eritrosit berparasit dalam 1000 eritrosit dalam preparat ulas yang diwarnai dengan Giemsa.

### Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan sidik ragam, dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil, sehingga dapat diamati apabila ada perbedaan antara konsentrasi serum anjing 10 %, 20 % dan 40 %.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Media penumbuh RPMI 1640 merupakan media yang cocok digunakan untuk kultur sel mamalia, termasuk sel darah merah dapat tumbuh dalam media ini (Malole 1990). Onishi *et al.*, (1993) yang dikutip Sunaga *et al.*, (2002), menggunakan media kultur seperti RPMI-1640,  $\alpha$ -MEM, M-199, F-12 dan L-15 dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% dan selang pengantian media pada penanaman *in vitro* *B. gibsoni*, melaporkan bahwa jumlah eritrosit berparasit lebih tinggi diperoleh dengan menggunakan media RPMI 1640.

Dalam penelitian ini pembiakan *in vitro* *B. canis* pada media RPMI 1640 dengan konsentrasi serum yang berbeda yakni 10%, 20% dan 40 %, diinkubasi pada suhu 37°C dengan

kadar CO<sub>2</sub> 5% yang dipertahankan selama 18 hari hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1. Jumlah eritrosit berparasit pada awal dari masing-masing konsentrasi serum adalah sama yaitu 4,84±0,63%, selama 18 hari pemupukan menunjukkan peningkatan PPE yang berbeda. Pada pemupukan dengan konsentrasi serum anjing 10% PPE terendah terjadi pada hari ke-18 yaitu 1,54±0,22% dan PPE tertinggi terjadi pada hari ke-10 yaitu 5,29±0,19%. Pada pemupukan dengan konsentrasi serum anjing 20 % PPE terendah terjadi hari ke-3 yaitu 3,23±0,76% dan PPE tertinggi terjadi pada hari ke-9 yaitu 8,07±1,26%. Sedangkan pemupukan dengan konsentrasi serum anjing 40 % PPE terendah terjadi pada hari ke-17 yaitu 2,90±1,04%, dan PPE tertinggi dicapai pada hari ke-3 yaitu 8,51±0,88% (Gambar1).

Pada awal pemupukan *B. canis* terjadi penurunan jumlah parasit baik pada konsentrasi serum anjing 10%, 20% maupun 40%. Penurunan ini terjadi karena parasit dalam kultur masih beradaptasi dengan lingkungan kultur (Zweygarth dan Lopes-Rebollar, 2000) dan selanjutnya parasit akan mengalami perkembangan (pembelahan).

Peningkatan PPE terjadi mulai hari ke-3 pada pemupukan dengan konsentrasi serum anjing 10% dan 20%, sedangkan pada konsentrasi serum anjing 40% selain terjadi peningkatan pada hari ketiga, juga merupakan nilai PPE tertinggi. Peningkatan ini terjadi karena parasit telah mampu beradaptasi dengan lingkungan kultur sehingga dapat berkembang biak. Selain itu peningkatan PPE juga didukung oleh adanya pergantian media.

Menurut Sunaga *et al.*, (2002) peningkatan PPE terjadi secara signifikan setelah tiga hari pemupukan. Peningkatan ini karena penggantian media lama dengan media baru ditambah eritrosit segar sebagai penunjang pertumbuhan parasit. Faktor yang menentukan perlunya penggantian media dalam kultur antara lain: perubahan pH, konsentrasi sel, tipe sel, dan morfologi sel itu sendiri (Malole, 1990). Faktor-faktor tersebut juga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan parasit dalam lingkungan *in vitro*.

Pertumbuhan optimal parasit pada kultur dengan konsentrasi serum 10% dicapai pada hari ke-10, konsentrasi serum 20% dicapai pada hari ke-9 dan konsentrasi serum 40% dicapai pada hari ke-3. Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan bahwa pemupukan dengan konsentrasi serum anjing 10% dan 20%

pertumbuhan awalnya lebih lambat dibandingkan pemupukan dengan konsentrasi serum anjing 40%. Menurut Onishi *et al.* (1993) yang dikutip Sunaga *et al.*, (2002) pemupukan *B. gibsoni* dengan menggunakan media RPMI 1640 dan serum anjing konsentrasi 20%, pertumbuhan parasit maksimal dicapai pada hari ke-7 dan setelah itu akan mengalami penurunan walaupun telah diberi eritrosit segar dan penggantian media (Murase *et al.*, 1991; Sunaga *et al.*, 2002) yang dikutip Sunaga *et al.*, (2002) juga melaporkan bahwa PPE tertinggi terjadi pada hari ke-8.

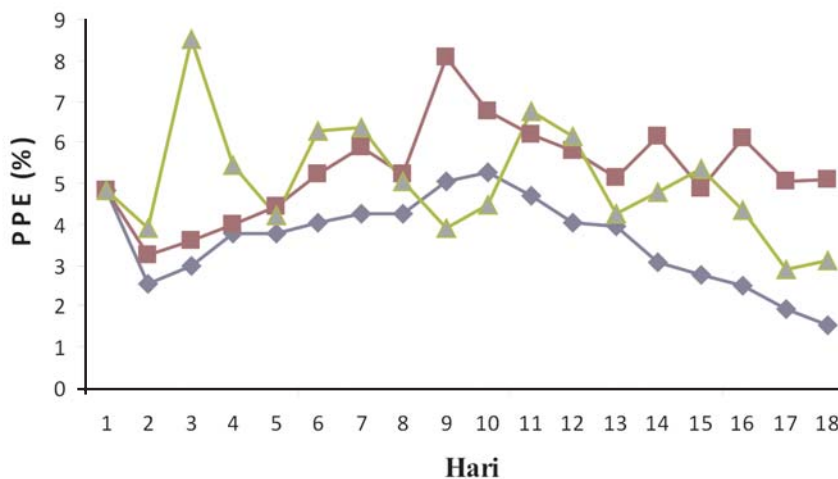
Kultur dengan konsentrasi serum anjing 40% mencapai pertumbuhan optimal pada hari ke 3 (48 jam pemupukan). Hasil penelitian ini memperkuat laporan Levy dan Ristic (1983) bahwa peningkatan eritrosit berparasit terjadi pada saat 72 jam pertama pembiakan dan menurun setelah beberapa jam kemudian. Kellermann *et al.* (1988) hanya dapat mempertahankan *B. canis* dalam kultur selama 96 jam yaitu parasit tumbuh maksimal pada 24 jam

Tabel 1. Rataan nilai persentase eritrosit berparasit/PPE (%) pada pemupukan *B. canis* dengan konsentrasi serum anjing 10 %, 20 % dan 40% selama 16 hari pada suhu 37°C , kadar CO<sub>2</sub> 5%

Hari	PPE (%) <i>B. canis</i> dengan konsentrasi serum		
	10 % ± SD	20% ± SD	40% ± SD
1	4,84 ± 0,63	4,84 ± 0,63	4,84 ± 0,63
2	2,55 ± 0,55	<b>3,23 ± 0,76</b>	3,89 ± 0,39
3	2,98 ± 0,25	3,58 ± 0,64	<b>8,51 ± 0,88</b>
4	3,76 ± 0,16	4,01 ± 0,31	5,43 ± 0,34
5	3,78 ± 0,37	4,45 ± 0,74	4,20 ± 0,32
6	4,06 ± 0,33	5,22 ± 0,42	6,30 ± 1,47
7	4,26 ± 0,51	5,88 ± 0,25	6,36 ± 1,07
8	4,26 ± 0,51	5,22 ± 0,00	5,04 ± 1,80
9	5,03 ± 0,23	<b>8,07 ± 1,26</b>	3,91 ± 0,30
10	<b>5,29 ± 0,19</b>	6,75 ± 0,23	4,49 ± 0,23
11	4,71 ± 0,16	6,21 ± 0,13	6,74 ± 0,60
12	4,05 ± 0,01	5,80 ± 1,46	6,14 ± 0,75
13	3,97 ± 0,29	5,15 ± 0,39	4,25 ± 2,12
14	3,09 ± 0,59	6,15 ± 0,83	4,78 ± 0,00
15	2,76 ± 0,19	4,87 ± 0,37	5,37 ± 1,86
16	2,52 ± 0,15	6,09 ± 0,51	4,34 ± 0,31
17	1,95 ± 0,15	5,06 ± 0,45	<b>2,90 ± 1,04</b>
18	<b>1,54 ± 0,22</b>	5,11 ± 1,05	3,11 ± 0,13

\*) yang dicetak tebal menunjukkan nilai PPE tertinggi dan terendah





Gambar 1. Grafik rata-rata PPE (%) pada pemupukan *B. canis* dengan konsentrasi serum anjing —◆— 10 %, —■— 20 % dan —▲— 40% selama 16 hari pada suhu 37°C , kadar CO<sub>2</sub> 5%.

setelah pemupukan awal dan menurun setelah 48 jam hingga akhirnya mati. Astyawati dan Winarto (1991) melaporkan bahwa pemupukan *B. bigemina* menunjukkan hasil yang optimal pada 48 jam pengeraman.

Pertumbuhan *B. canis* pada pemupukan dengan konsentrasi serum anjing 10%, setelah mencapai PPE tertinggi pada hari ke-10, terjadi penurunan mulai hari ke-11 sampai hari ke-18 dengan rata-rata penurunan masing-masing sebesar 0,5%. Hal ini dikarenakan parasit dalam pertumbuhannya mengalami penghambatan akibat adanya sisa-sisa metabolisme dari sel darah merah itu sendiri yang bersifat toksik sehingga akan menghambat pertumbuhan parasit, selain itu juga pemenuhan nutrisi yang dibutuhkan parasit untuk tumbuh pada konsentrasi serum anjing 10% tidak tercapai sehingga akan menyebabkan parasit mati setelah mencapai pertumbuhan optimal.

Pertumbuhan parasit pada pemupukan dengan konsentrasi serum anjing 40% lebih fluktuatif dibandingkan dengan konsentrasi serum 10% ataupun 20%. Pertumbuhan optimal pada konsentrasi serum 40% lebih tinggi dibandingkan konsentrasi serum 10% dan 20%. Pengujian secara statistik, menunjukkan bahwa konsentrasi serum berpengaruh nyata terhadap PPE ( $P < 0,05$ ). Uji lanjutan dengan menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil, menunjukkan bahwa ada perbedaan yang nyata PPE antara konsentrasi 10% dengan 20% dan 40%, tetapi tidak ada perbedaan PPE pada konsentrasi 20% dan 40%.

Pemupukan pada konsentrasi serum anjing 20% menunjukkan persentase PPE yang lebih stabil (tidak ada perubahan) dibandingkan konsentrasi 40% ataupun 10%. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pemupukan dengan serum anjing konsentrasi 20% dan 40% memberikan pengaruh yang sama baiknya untuk pemupukan *B. canis*. Konsentrasi serum 40% penting pada tahap awal pemupukan *B. canis* secara *in vitro* sedangkan konsentrasi 20% dapat digunakan pada tahap selanjutnya atau tahap pemeliharaan. Zwegarth dan Lopes-Rebollar (2000) dan Sunaga *et al.*, (2002) melaporkan bahwa penggunaan serum anjing dengan konsentrasi 40% pada pupukan *B. gibsoni* sangat penting selama tahap awal (fase inisiasi) dan dapat diturunkan sampai konsentrasi 20% setelah fase inisiasi.

### SIMPULAN

*Babesia canis* dapat tumbuh dalam medium RPMI 1640 dengan penambahan serum anjing konsentrasi 10%, 20% dan 40% yang diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%. Pertumbuhan parasit pada penambahan serum anjing dengan konsentrasi 10% kurang stabil dibandingkan konsentrasi 20% dan 40%. Penambahan serum anjing dengan konsentrasi 40% sebaiknya digunakan pada fase inisiasi dari kultur sedangkan pada fase pemeliharaan sebaiknya digunakan serum dengan konsentrasi 20% untuk memberikan hasil yang lebih baik.

### SARAN

Perlu dilakukan pengamatan dengan waktu yang lebih panjang untuk menentukan daya tahan parasit dalam media pupuk.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian IPB yang telah memberi dana penelitian. Terima kasih juga penulis haturkan kepada Subdit Satwa SAMAPTA POLRI Kelapa Dua Cimanggis Depok yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Arai S, Tsiji M, Kim SJ, Nakade T, Ishihara. 1998. *Babesia canis* infection in canine red blood cell-substituted SCID mice, *Int. J Parasitol* 28: 1429 – 1435.
- Astyawati T. 1990. Laporan Kursus Teknik *in vitro Babesia spp.* Fakultas Science Mahidol, Thailand. PAU Bioteknologi IPB.
- Astyawati T, Winarto A. 1991. Studi tentang teknik Biakan *Babesia bigemina in Vitro.* *Hemera Zoa* 74 : 76 – 82.
- Callow LL. 1977. Vaccination against Bovine Babesiosis. New York. Plenum. Pp 121 – 149.
- Erp EE, Smith RD, Ristic M, Osomo BM. 1980. Continuous Cultivation in a *Babesia bovis*, *Am J Ver Res Sci.* 41: 1141 – 1142.
- Kellermann G, Tsangkr, Kakoma I. 1988. Advances in: the *in vitro* cultivation of *Babesia* species. In: Ristic M. (Ed.) *Babesiosis of Domestic Animals and Man.* Florida: CRC Press.Inc. Pp. 71-79.
- Levy MG, Ristic M. 1983. Cultivation and in Vitro Studies of *Babesia*. In: Jensen J.B. (ed.) *Vito Cultivation of Protozoan Parasites.* Florida: CRC Press Inc.
- Malole MBM. 1990. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan.* Bogor. PAU Bioteknologi IPB, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi.
- Murase T, Hashimoto T, Ueda T and Maede Y. 1991. Multiplication of *Babesia gibsoni in Vitro* Culture and Its Relation to Hemolysis of infected Erythrocytes. *J. Vet.Med. Sci.* 53 : 759-760
- Ressang AA. 1984. Patologi Khusus Veteriner, ed.2. Denpasar. NV. Percetakan Bali.
- Sunaga F, Namikawa K, Kanno Y. 2002. Continuous *in Vitro* Culture of Erythrocytic stage of *Babesia gibsoni* and Virulence of the Cultivated Parasite. *J Vet Med Sci* : 64 (7) ; 571 – 575.
- Zweygarth E, Lopes-Rebollar LM. 2000. Continuous *in Vitro* Cultivation of *Babesia gibsoni.* *Parasitol Res* 86 : 905 – 907.