

1 PENDAHULUAN

Latar Belakang

Produksi perikanan budidaya dunia mengalami peningkatan dengan melonjaknya permintaan produk-produk perikanan sebagai sumber makanan dan juga akibat kecenderungan penurunan produksi perikanan tangkap (Subramaniam 2012). Menurut FAO (2014), pada tahun 2013 total perikanan dunia mencapai 97,2 juta ton, meningkat 7 juta ton dibandingkan tahun sebelumnya. Di Indonesia, produksi perikanan budidaya juga terus mengalami peningkatan. Tahun 2011 kontribusi Indonesia terhadap produksi dunia sebesar 9,5 persen, naik sebesar 10,63 persen pada tahun 2012 dan 13,53 persen pada tahun 2013 persen. Ikan gurami (*Osphronemus goramy*) merupakan ikan asli Indonesia yang diperkenalkan ke negara Asia lainnya dan dibudidayakan di negara-negara tersebut (Welcomme 1988). Saat ini ikan gurami telah menjadi komoditas ikan di Asia Tenggara. Tahun 2013, produksi gurami dunia mencapai 98.490 ton dengan kenaikan produksi rata-rata sebesar 15,49 persen pertahun. Indonesia memberikan kontribusi terbesar dengan capaian 94.605 ton dengan kenaikan rata-rata per tahunnya sebesar 16,96 persen. Kontribusi Indonesia sebesar 96,1 persen dari total produksi ikan gurami dunia dan sisanya sebanyak 3,9 persen merupakan kontribusi dari Thailand, Filipina dan Singapura (FAO 2014).

Gurami (*Osphronemus goramy*) merupakan ikan asli Indonesia yang saat ini telah tersebar dan dibudidayakan ke negara-negara Asia Tenggara dan Cina (Welcomme 1988; Pusat Penyuluhan Perikanan dan kelautan 2011). Saat ini ikan gurami telah menjadi salah satu komoditas perikanan di Asia Tenggara dengan Indonesia sebagai kontributor utama dari total produksi ikan gurami dunia. Di Indonesia, ikan gurami merupakan salah satu komoditas perikanan budidaya air tawar unggulan yang sangat disukai dan prospektif untuk dibudidayakan karena nilai ekonomis yang tinggi (Nuryati *et al.* 2015). Saat ini produksi ikan gurami di Indonesia terus mengalami peningkatan dan sentra budidaya ikan gurami tidak terbatas pada daerah pulau Jawa saja namun telah menyebar ke provinsi lain di Indonesia dengan pusat budidaya terbesar di Jawa Timur, Jawa Barat, Sumatera Barat, Jawa Tengah dan Yogyakarta. Berdasarkan data statistik perikanan budidaya tahun 2016, penyebaran sentra budidaya ikan gurami telah meluas hingga wilayah Bali, Sulawesi, Kalimantan, Nusa Tenggara, Maluku dan Papua.

Meluasnya budidaya gurami di Indonesia tanpa mengikuti cara budidaya yang baik akan meningkatkan resiko terjadinya wabah dan penyebaran penyakit di lokasi budidaya ikan tersebut. Peningkatan produksi perikanan melalui intensifikasi budidaya menyebabkan menurunnya kualitas lingkungan yang pada akhirnya menimbulkan masalah penyakit yang menyerang ikan (Sommerset *et al.* 2005). Patogen yang merupakan agen penyakit pada ikan budidaya tersebut menimbulkan banyak kerugian bagi pembudidaya akibat tingginya mortalitas. Hal tersebut menyebabkan penurunan produksi maupun peningkatan biaya produksi untuk penanggulangannya (Murray dan Peeler 2005).

Megalocytivirus merupakan patogen yang dapat menyebabkan kematian masal pada ikan budidaya air tawar, ikan hias air tawar dan ikan budidaya laut sehingga berdampak pada timbulnya kerugian besar pada proses budidaya. Virus

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

ini memiliki kemampuan menginfeksi berbagai inang baik pada air tawar maupun air laut sehingga berpotensi tinggi dalam menularkan infeksi ke spesies ikan lain yang rentan (Go *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007; Jeong *et al.* 2008). Tahun 2009 di Indonesia, kasus infeksi *megalocytivirus* telah dilaporkan terjadi pada ikan hias air tawar *warf gouramy* (*Colisa lalia*) yang diperdagangkan di pasar ikan hias di daerah Jakarta. Selain itu, *megalocytivirus* dilaporkan menyerang ikan gurami (*Osporonemus goramy*) yang dibudidayakan di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Bali sejak tahun 2011 – 2013 (Koesharyani *et al.* 2009; 2013). Pada tahun 2016, telah terjadi wabah *megalocytivirus* di Banyumas, Jawa Tengah dengan mortalitas mencapai 100% dalam waktu kurang dari 2 minggu.

Walaupun kasus infeksi akibat *megalocytivirus* pada ikan gurami belum banyak dilaporkan, namun sifat virus tersebut sangat mudah menginfeksi berbagai jenis ikan sehingga berpotensi tinggi dalam menimbulkan masalah penyakit di masa datang. Hal ini telah terjadi pada *red seabream iridovirus* (RSIV), salah satu spesies *megalocytivirus*, yang menyerang budidaya ikan laut seperti ikan kerapu dan ikan kakap. Hal inilah yang menjadikan diperlukannya tindakan pencegahan dengan mengembangkan vaksin sebagai salah satu upaya pengendalian virus tersebut. Vaksinasi sebagai salah satu solusi aplikatif menjadi sangat diperlukan dalam budidaya untuk mencegah terjadinya wabah dan penyebaran penyakit potensial pada perikanan budidaya. Penggunaan vaksin menjadi alternatif yang aman, ramah lingkungan dan efektif dalam meningkatkan ketahanan ikan dalam melawan agen penyakit. Pencegahan penyakit melalui vaksinasi diharapkan dapat memberi kontribusi yang signifikan terhadap peningkatan produksi perikanan budidaya, melalui penurunan tingkat mortalitas akibat infeksi patogen potensial. Dengan demikian tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan vaksin *megalocytivirus* untuk pencegahan penyakit viral pada ikan gurami.

Perumusan Masalah

Infeksi *megalocytivirus* pada ikan gurami yang menyebabkan terjadinya kasus wabah penyakit pada budidaya ikan konsumsi tersebut masih relatif baru dan sampai saat ini belum ada data mengenai besar kerugian akibat infeksi virus tersebut yang dialami oleh pembudidaya baik di Indonesia maupun di luar negeri. Namun virus tersebut berpotensi menyebabkan masalah penyakit seperti kasus infeksi RSIV pada budidaya ikan laut.

Infeksi virus merupakan kendala pada sistem budidaya dimana sampai saat ini belum ada obat yang dapat digunakan untuk mengobati ikan yang terinfeksi virus. Tidak seperti infeksi bakteri yang masih dapat diobati dengan pemberian antibiotik yang diizinkan untuk diaplikasikan pada lingkungan budidaya. Hal ini menyebabkan upaya pencegahan terjadinya infeksi penyakit khususnya oleh virus menjadi sangat penting. Selain menjaga lingkungan agar tetap dalam kondisi yang baik serta penggunaan benih yang berkualitas (*specific pathogen free/SPF* dan *specific pathogen resistant/SPR*) juga dengan melakukan vaksinasi. Namun, sampai saat ini belum ada vaksin yang dapat digunakan untuk pencegahan penyakit akibat infeksi *megalocytivirus* pada ikan gurami. Sementara kasus infeksi virus ini semakin banyak terjadi pada budidaya ikan gurami dan harus diantisipasi pencegahannya sejak dini agar tidak terjadi kerugian yang lebih besar lagi.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Megalocytivirus dan virus pada umumnya merupakan organisme yang hanya dapat hidup dan berkembang di dalam sel hidup (inang) atau kultur sel. Kultur sel adalah sel yang dikembangkan dan ditumbuhkan secara *in vitro*, sehingga dapat digunakan sebagai sarana produksi virus dalam jumlah banyak sebagai sumber antigen. Apabila sesuai, virus tertentu akan dapat berploriferasi pada media kultur sel tersebut. Kultur sel berasal dari jaringan atau organ yang telah diuraikan secara mekanis ataupun enzimatik menjadi suspensi sel yang dibiakkan dan berkembang menjadi satu lapisan jaringan (*monolayer*) di atas permukaan yang keras dan dapat diperbaharui lagi melalui subkultur (*pasase*) sehingga diperoleh sel yang lestari (*cell line*).

Masalah yang dihadapi dalam pembuatan vaksin virus adalah kebutuhkannya *cell line* yang suseptibel yang dapat digunakan untuk isolasi dan perbanyak virus untuk pembuatan vaksin. Kultur sel primer dari ikan gurami (*O. goramy*) perlu dibuat karena *grunt fin (GF) cell line* yang umum digunakan untuk perbanyak *Megalocytivirus* (RSIV/*Red seabream iridovirus*) tidak berhasil menghasilkan *cytopathic effect* (CPE) yang merupakan tanda tumbuh dan berkembangnya virus di dalam sel. Suseptibilitas kultur sel primer perlu diuji untuk *Megalocytivirus* dari ikan gurami dan kemampuan kultur sel primer dalam memperbanyak virus tersebut.

Inaktivasi virus merupakan tahapan penting dalam pembuatan vaksin karena menjadikan virus inaktif namun prosesnya tidak menyebabkan rusak/hilangnya bagian-bagian imunogenik dari virus. Pemberian vaksin dapat menghasilkan respons imunitas pada ikan dalam mencegah dan menekan invasi virus pada saat infeksi. Beberapa metode inaktivasi virus antara lain dengan formalin dan pemanasan yang nantinya akan dicari metode terbaik untuk inaktivasi virus ini.

Dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh vaksin yang dapat menghasilkan efikasi yang baik dengan nilai *relative percent survival* (RPS), titer antibodi yang tinggi dan menimbulkan ekspresi gen imunitas serta aman untuk diaplikasikan pada ikan gurami.

Kerangka Pemikiran Penelitian

Proses budidaya ikan tidak terlepas dari keterkaitan antara inang, patogen dan lingkungan. Proses budidaya harus mencapai keseimbangan antara ketiga faktor tersebut agar proses budidaya dapat berjalan lancar dan diperoleh hasil yang diharapkan. Budidaya ikan gurami rentan terhadap gangguan dan hambatan yang mempengaruhi kelangsungan hidup ikan. Salah satunya adalah infeksi *Megalocytivirus* dapat menyebabkan mortalitas tinggi pada ikan gurami hingga mencapai 90% dalam waktu 2 minggu. Infeksi virus tersebut menyebabkan kerugian ekonomi yang besar yang dialami pembudidaya ikan. Penanggulangan penyakit akibat infeksi patogen dilakukan melalui upaya pengobatan dan upaya pencegahan. Untuk pengobatan infeksi patogen yang disebabkan oleh bakteri dapat dilakukan dengan pemberian antibiotik atau menggunakan bahan lain seperti herbal (bahan alami) maupun bahan kimia yang bersifat antibakteri. Namun pemberian bahan kimia maupun antibiotik saat ini sudah tidak direkomendasikan karena adanya kekhawatiran terhadap bahaya residu bahan kimia dan resistensi antibiotik terhadap lingkungan. Upaya pencegahan digunakan tindakan vaksinasi yang dipercaya aman dan ramah lingkungan untuk merangsang sistem kekebalan tubuh

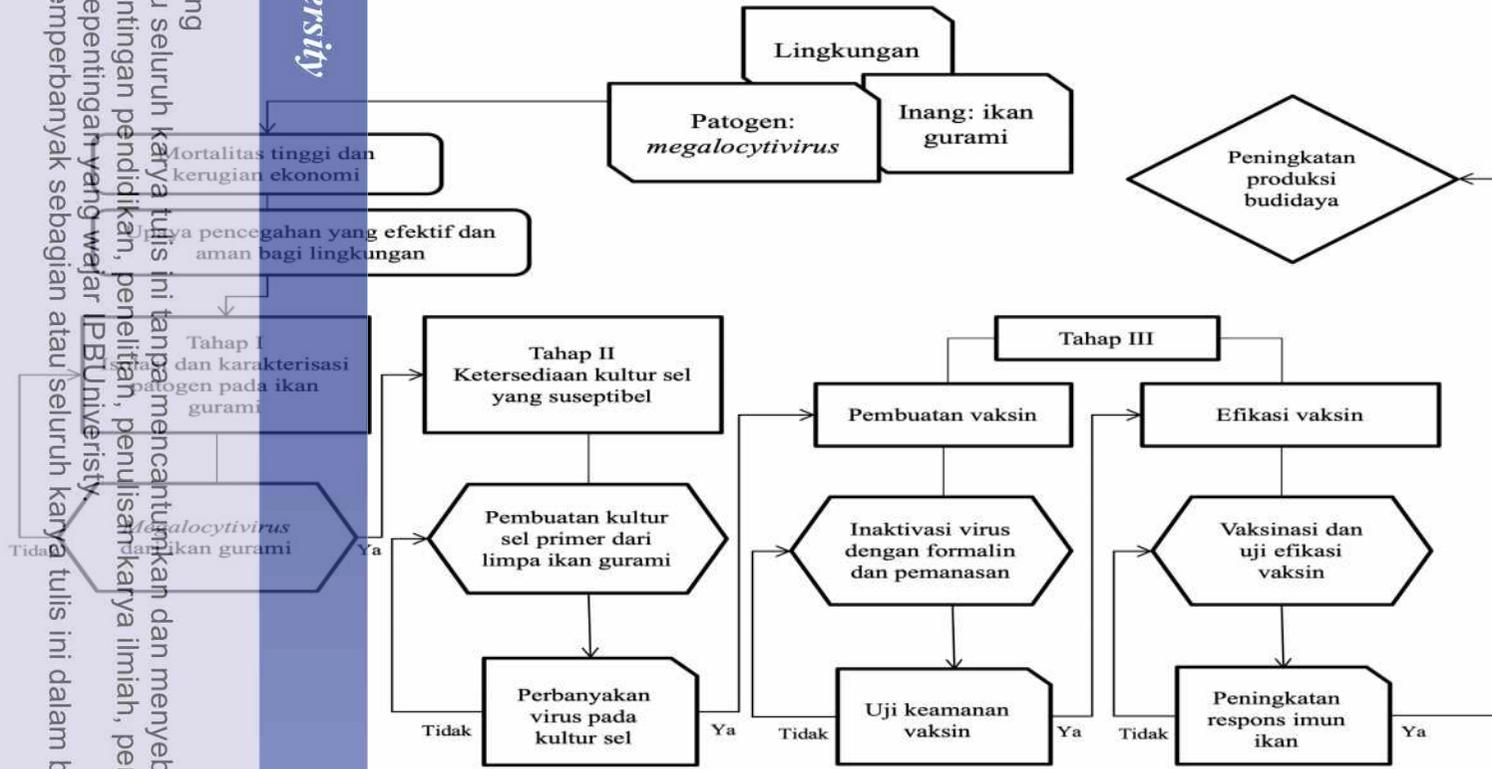


ikan secara alami untuk merespons patogen yang masuk (non-spesifik) dan adanya sel memori untuk mengenali agen patogen tersebut sehingga respons yang didapat lebih cepat dan bersifat spesifik. Vaksin untuk penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus memerlukan sel kultur yang suseptibel untuk memperbanyak antigen. Proses inaktivasi dilakukan agar vaksin aman diaplikasikan pada lingkungan budidaya setelah dilakukan uji efikasi untuk melihat efektivitas vaksin tersebut pada ikan uji. Dari penelitian ini diharapkan akan dapat dihasilkan kultur sel yang suseptibel terhadap *megalocytivirus* sehingga dapat digunakan untuk memperbanyak virus secara *in vitro*. Juga diharapkan sediaan vaksin yang akan dibuat ini dapat memberikan nilai *relative percent survival*/RPS yang tinggi sehingga dapat meningkatkan produksi budidaya ikan gurami. Kerangka pemikiran penelitian tersaji pada Gambar 1.

IPB University

IPB University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 1 Kerangka pemikiran vaksin *megalocytivirus* untuk pencegahan penyakit pada ikan gurami

Keterangan:

- Tahap I (karaktisasi *megalocytivirus* dari ikan gurami)
- Tahap II (pembuatan kultur sel yang suseptibel dari limpa ikan gurami)
- Tahap III (pembuatan vaksin dan efikasi vaksin)

Ikti IPB University
 ngi Undang-undang
 tip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber
 anyanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan,
 tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 mumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian adalah mengembangkan vaksin *megalocytivirus* pada ikan gurami (*O. goramy*).

Adapun tujuan khususnya adalah:

1. Mengisolasi dan mengkarakterisasi *megalocytivirus* dari ikan gurami
2. Mengembangkan kultur sel dari limpa ikan gurami serta menguji suseptibilitas kultur sel dalam memperbanyak virus
3. Melakukan inaktivasi virus menggunakan formalin dan pemanasan serta mengevaluasi hasil vaksinasi melalui beberapa parameter efikasi vaksin seperti titer antibodi dan ekspresi gen terkait imunitas.

Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan vaksin dengan efikasi yang baik dan dapat mengendalikan penyakit akibat infeksi *megalocytivirus* pada ikan gurami.

Kebaruan (*novelty*)

1. Isolat *megalocytivirus* asal ikan gurami (*giant gourami iridovirus/ GGIV*).
2. Kultur sel primer dari ikan gurami yang suseptibel terhadap *megalocytivirus*
3. Vaksin *megalocytivirus* yang efektif untuk mencegah infeksi GGIV pada ikan gurami
4. Sekuen primer spesifik ikan gurami untuk ekspresi gen terkait imunitas dalam respons imun bawaan (*innate immunity*).

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

2 METODOLOGI UMUM

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2017–Januari 2019. Kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi dan Laboratorium Biomolekuler serta wet lab Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan (IP4I) Depok, Laboratorium *transmission electron microscope* (TEM) dan Histologi Eijkman Institute Jakarta dan Laboratorium Kesehatan Ikan Departemen Pendidikan Perairan, FPIK Institut Pertanian Bogor.

Ikan Uji

Ikan uji pada penelitian ini menggunakan ikan gurami (*Osphronemus goramy*) asal Citayam Jawa Barat. Ikan dipelihara selama 3-4 minggu sebelum digunakan dalam pengujian. Ikan uji yang digunakan telah memenuhi asumsi *spesifik pathogen free* (SPF) dan hasil negatif *megalocytivirus* pada uji *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi virus tersebut.

Isolat *megalocytivirus*

Virus yang akan digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi IP4I dari ikan gurami terinfeksi alami asal Banyumas-Jawa Tengah pada 2016. *Supernatant homogenate* dibuat dari jaringan ginjal dan limpa ikan gurami yang telah diencerkan sebanyak 50x dan disaring melalui membran filter 0.45 µm. Virus kemudian disimpan pada -80 °C.

Alur Pelaksanaan penelitian

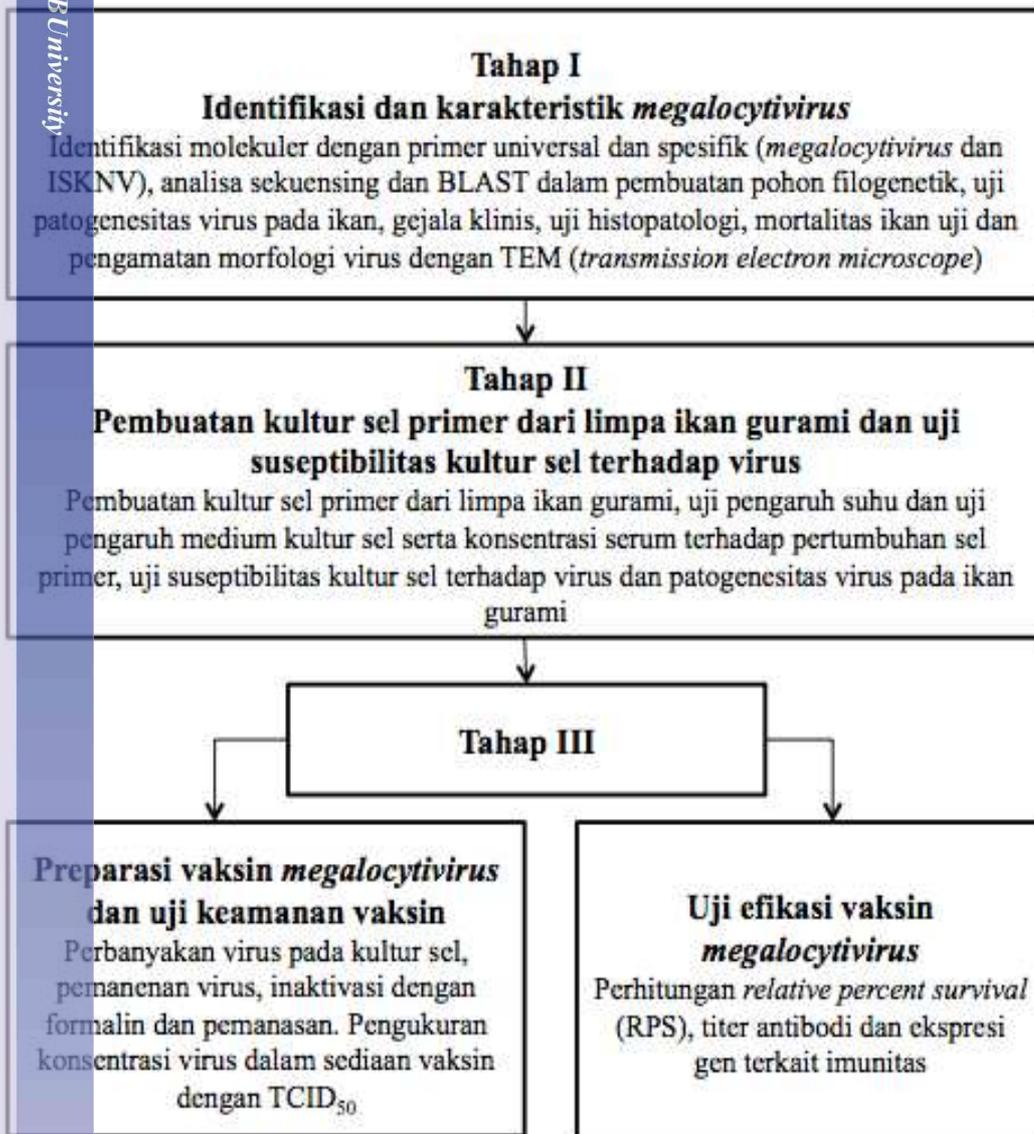
Penelitian ini terdiri dari 3 tahapan. Penelitian tahap pertama bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi patogen penyebab infeksi *megalocytivirus* pada ikan gurami dari wabah penyakit infeksi di Banyumas-Jawa Tengah. Pada penelitian ini identifikasi dilakukan menggunakan primer *universal* dan spesifik untuk *megalocytivirus* dan *infectious spleen and kidney necrosis virus* (ISKNV). Sekuensing dan analisis BLAST digunakan untuk memperoleh pohon filogenetik. pengamatan gejala klinis, uji histopatologi, mortalitas ikan uji dan *negative staining transmission electron microscope* (TEM) untuk pengamatan bentuk virus.

Penelitian tahap dua bertujuan untuk mengembangkan kultur sel primer dari ikan gurami (*Osphronemus goramy*) sebagai sel inang untuk memperbanyak *megalocytivirus* secara *in vitro*. Pada penelitian ini dilakukan pembuatan kultur sel primer dari jaringan limpa ikan gurami, uji pengaruh suhu terhadap pertumbuhan sel primer, uji pengaruh medium kultur dan konsentrasi serum terhadap pertumbuhan sel primer, uji suseptibilitas kultur sel terhadap virus dan patogenisitas virus pada ikan gurami.



@Hak_cipta_milik_IPB_University

Tahap tiga pada penelitian ini dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama dilakukan perbanyakan virus, pengukuran konsentrasi virus menggunakan TCID₅₀, pembuatan vaksin *megalocytivirus* dengan dua metode inaktivasi (formalin/*formalin-killed* dan pemanasan/*heat-killed*), uji keamanan vaksin sebelum uji *in vivo*. Pada bagian kedua, dilanjutkan dengan uji efikasi vaksin *megalocytivirus* skala laboratorium dari kelompok vaksin *formalin-killed* dan *heat-killed*, perhitungan nilai RPS dan pengukuran titer antibodi serta analisis ekspresi gen terkait imunitas pada ikan gurami. Alur pelaksanaan penelitian secara skematis disajikan pada Gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2 Tahapan pelaksanaan penelitian

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



3 IDENTIFIKASI GIANT GOURAMI IRIDOVIRUS (GGIV): INFECTIOUS SPLEEN AND KIDNEY NECROSIS VIRUS (ISKNV) PADA IKAN GURAMI (*Osphronemus goramy*)

Abstrak

Megalocytivirus yang merupakan anggota dari family *Iridoviridae* telah diidentifikasi sebagai patogen penyebab infeksi sistemik fatal dan menyebabkan mortalitas tinggi dari berbagai macam spesies ikan baik ikan hias maupun ikan konsumsi yang dibudidayakan. *Megalocytivirus* menyebabkan kerugian ekonomi yang besar akibat tingginya tingkat mortalitas dari ikan yang terinfeksi. Sejak tahun 2011 di Indonesia, *megalocytivirus* pada ikan gurami (*Osphronemus goramy*) telah diketahui menjadi patogen penyebab infeksi pada beberapa kasus wabah penyakit khususnya di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Bali. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi *megalocytivirus* pada budidaya ikan gurami. Pada penelitian ini, virus diidentifikasi menggunakan primer *universal* dan spesifik untuk *megalocytivirus* dan *infectious spleen and kidney necrosis virus* (ISKNV). Sekuensing dan analisis BLAST digunakan untuk memperoleh pohon filogenetik. Analisis filogenetik dari gen *major capsid protein* (MCP) tersebut menunjukkan strain baru dari *megalocytivirus* yaitu *giant gourami iridovirus* (GGIV). GGIV masuk dalam *cluster* ISKNV dan memiliki 100% homologi dengan genom lengkap ISKNV. Percobaan infeksi buatan melalui injeksi *intraperitoneal supernatant homogenate* yang dibuat dari organ dalam (limpa dan ginjal) ikan terinfeksi dari wabah penyakit menghasilkan mortalitas sebesar 93% dalam waktu 12 hari. Ikan menunjukkan gejala klinis terinfeksi seperti lemah, kehilangan nafsu makan, warna tubuh gelap/pucat dan hemoragi. Hasil nekropsi terlihat limpa dan ginjal membengkak serta hati pucat. Analisis *quantitative* PCR pada beberapa organ ikan terinfeksi menunjukkan jumlah *copy* DNA virus tertinggi terdapat pada limpa diikuti oleh ginjal, insang dan hati. Analisis histopatologi menunjukkan hemoragi pada organ tersebut dan ditemukan sel-sel hipertropi yang merupakan karakteristik infeksi *megalocytivirus*. Sebagai kesimpulan, GGIV merupakan strain ISKV dari genus *megalocytivirus*.

Kata kunci: *giant gourami iridovirus*, ISKNV, *megalocytivirus*, *O. goramy*

Abstract

Megalocytivirus of family *Iridoviridae* has been identified as a pathogen that caused fatal systemic infection lead to massive death of numerous fish species in both ornamental and food fish industries. It caused significant economic losses due to severe mortality of infected fish. Since 2011 in Indonesia, *megalocytivirus* in giant gourami (*Osphronemus goramy*) had been found as main pathogen in some cases of giant gourami outbreak especially in West Java, Central Java and Bali. The aim of this study was to identify and characterized the pathogen known as a *megalocytivirus* infection in freshwater-cultured giant gourami. We identified

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



virus using universal and spesific primers for megalocytivirus and infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). Sequencing and BLAST analysis were used to develop phylogenetic tree. The result showed that phylogenetic analysis of major capsid protein (MCP) gene unveiled a new megalocytivirus strain, designated as giant gourami iridovirus (GGIV). GGIV formed cluster belonged to ISKNV and has 100% homology to ISKNV complete genome. Artificial infection by intraperitoneally injection with supernatant homogenate from spleen and kidney of naturally infected fish were showed 93% mortality in 12 days. Fish showed clinical sign of infection as lethargic, loss of appetite, pale or darken body color and haemorrhages. Internal organ on death fish showed swollen spleen and kidney and pale liver. Quantitative PCR analysis on internal organs showed spleen had the highest viral DNA copy number followed by kidney, gill and liver. Histopathological analysis showed hemorrhage in these organs and many abnormally hypertrophied cells which is typical histopathological characteristic of megalocytivirus infection. In conclusion, GGIV is belongs to ISKNV from genus megalocytivirus.

Keywords: ISKNV, giant gourami iridovirus, megalocytivirus, *O. goramy*

PENDAHULUAN

Megalocytivirus dari family *Iridoviridae* merupakan penyebab infeksi sistemik yang menyebabkan kematian masal dan kerugian ekonomi yang sangat besar pada berbagai spesies ikan hias, ikan laut dan air tawar yang dibudiyakan dan bernilai tinggi (He *et al.* 2000; Kim *et al.* 2002; Williams *et al.* 2005). Beberapa strain dari *megalocytivirus* seperti *red sea bream iridovirus* (RSIV) dan *turbot reddish body iridovirus* (TRIBV) menjadi ancaman pada budidaya ikan laut, dan *infectious spleen and kidney necrosis virus* (ISKNV) mengancam budidaya ikan hias air tawar. Sebaliknya, ISKNV hanya menginfeksi spesies ikan air tawar tertentu yang menjadi komoditas ikan konsumsi (Kurita dan Nakajima 2012; Subramaniam *et al.* 2012). ISKNV dapat menyerang ikan budidaya air laut maupun air tawar, diperkirakan penyebarannya terjadi melalui perdagangan ikan dari negara-negara Asia dan Asia Tenggara lainnya (Song *et al.* 2008). Berdasarkan analisis gen *major capsid protein* (MCP), ISKNV, RSIV dan TRBIV merupakan tiga spesies *megalocytivirus* (Subramaniam *et al.* 2012). Virus-virus ini tersebar pada daerah beriklim tropikal (Indonesia, Malaysia, Thailand, Singapura, Taiwan) dan daerah beriklim sedang (*temperate*) seperti Cina, Jepang, Korea dan Australia (Chou *et al.* 1998; Chao *et al.* 2002; Go dan Whittington 2006; Song *et al.* 2008).

Megalocytivirus memiliki spesifisitas inang yang luas dan beberapa spesies dari inang berpotensi menyebarkan infeksi ke spesies lain yang lebih rentan terhadap virus (Waltzek *et al.* 2012; Go *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007; Jeong *et al.* 2008). Menurut Subramainam *et al.* (2012), penyebaran virus terjadi akibat banyaknya inang yang dapat terinfeksi pada industri akuakultur. Banyak virus dalam genus *megalocytivirus* ini yang dinamakan berdasarkan spesies inang dimana virus tersebut ditemukan seperti *African lamprey iridovirus* (ALIV), *murray cod iridovirus* (MCIV), *dwarf gouramy iridovirus* (DGIV), *taiwan grouper iridovirus* (TGIV), *red sea bream iridovirus* (RSIV) dan *infectious spleen and kidney necrosis*

iridovirus (ISKNV).

Ikan gurami (*Osphronemus goramy*) merupakan spesies asli Indonesia dan juga tersebar di Asia Tenggara, juga merupakan ikan budidaya air tawar yang sangat digemari dan memiliki nilai ekonomis tinggi (Welcome 1988; Setijaningsih *et al.* 2007; Azrita dan Syandri 2015). Berdasarkan data statistik Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia (2004-2015), ikan gurami merupakan komoditas ikan air tawar terbesar ke-5 setelah ikan nila (*Oreochromis niloticus*), ikan lele (*Clarias spp*), ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan ikan patin (*Pangasius spp*). Budidaya ikan gurami terbesar di banyak provinsi di Pulau Jawa dan Sumatera, dan peningkatan produksi yang terjadi akibat peningkatan permintaan pasar menyebabkan budidaya ikan gurami saat ini menyebar ke pulau-pulau lainnya di Indonesia.

Di Indonesia, Koesharyani *et al.* (2001) telah melaporkan wabah penyakit yang disebabkan oleh infeksi *megalocytivirus* pada budidaya ikan kerapu lumpur (*Orange-spotted grouper, Epinephelus coioides*) dengan mortalitas tinggi di Sumatera Utara. Di Bali, Mahardika *et al.* (2001, 2004) juga melaporkan adanya wabah penyakit pada budidaya ikan kerapu lumpur, ikan kerapu bintik (*Bleeker's grouper, Epinephelus bleekeri*) dan kerapu bebek/tikus (*humpback grouper, Cromileptes altivelis*). Sudthongkong *et al.* (2002) berhasil mengisolasi *megalocytivirus* dari ikan hias *African lampeye Aplocheilichthys normani* yang dibudidayakan di Sumatera-Indonesia dan diekspor ke Jepang. Infeksi *megalocytivirus* lainnya juga dilaporkan terjadi pada ikan hias *Dwarf gourami Colisa lalia* (Koesharyani *et al.* 2009). Kasus infeksi *megalocytivirus* pada ikan gurami yang dibudidayakan di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Bali dilaporkan terjadi pada tahun 2011-2013 (Koesharyani dan Gardenia 2013; Koesharyani *et al.* 2009).

Pada tahun 2016, terjadi wabah *megalocytivirus* di Banyumas-Jawa Tengah yang menghasilkan mortalitas lebih dari 90% dalam waktu dua minggu. Infeksi virus ini dan wabah penyakit pada ikan gurami relative baru dan belum ada data mengenai kerugian secara ekonomis yang disebabkan infeksi *megalocytivirus* di Indonesia. Saat ini belum ada laporan tentang terjadinya wabah penyakit yang disebabkan infeksi *megalocytivirus* pada ikan gurami di negara lain.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi *megalocytivirus* yang menyerang ikan gurami. Pada penelitian ini diperoleh informasi iridovirus pada ikan gurami (GGIV) ini merupakan anggota genus *megalocytivirus* yang erat hubungannya dengan ISKNV.

BAHAN DAN METODE

Ikan uji

Ikan terinfeksi dikoleksi dari wabah penyakit dengan mortalitas kurang lebih 90% di Banyumas, Jawa Tengah-Indonesia. Ikan gurami terinfeksi (± 300 g) menunjukkan gejala lemah dan tidak mau makan. Pengamatan secara makroskopis terlihat hati pucat, limpa dan ginjal membengkak. Jaringan ikan (limpa dan ginjal) dikoleksi secara aseptik dan disimpan dalam larutan fiksatif alkohol 95% untuk identifikasi secara molekuler dan jaringan yang dikumpulkan (*pool samples*) berupa limpa dan ginjal disimpan pada suhu -86°C sebagai sumber virus.



Ekstraksi DNA

Identifikasi virus secara molekuler dilakukan dengan menggunakan metode sekuensing dan kuantifikasi virus. Total DNA dari limpa, ginjal, hati dan insang dari ikan terinfeksi secara alami tersebut diisolasi menggunakan reagen DNAzol (Invitrogen) dengan prosedur kerja yang telah disediakan. Pengukuran kontaminasi protein pada DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan Nanodrop (Thermo Scientific). DNA disimpan pada suhu -20 °C hingga digunakan dalam uji berikutnya.

Tabel 1. Urutan primer yang digunakan untuk identifikasi virus secara molekuler

Primers	Sequences	Amplicon	Reference
F3/R8	F3: 5'-AGGTGTCGGTGTCCATTAACGACCTG-3' R8: 5'-TCTCAGGCATGCTGGGCGCAAAG-3'	777 bp	Kurita and Nakajima (2012)
F3/R3	F3: 5'-GGTGGCCGGCATCACCAACGGC-3'; R3: 5-ACGGGGTGACTGAACCTG-3'.	415 bp	Kurita and Nakajima (2012)
RSIV RT-F RSIV RT-R	5'-TGACCAGCGAGTTCCTTGACTT-3' 5'-CATAGTCTGACCGTTGGTGATACC-3'	125 bp	Crane and Devies (2006)
Probe	FAM-AACGCCTGCATGATGCCTGGC-TAMRA		

Deteksi *megalocytivirus*

Amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR) dilakukan menggunakan dua pasang primer yang merupakan bagian dari gen *major capsid protein* (MCP). Primer dibuat berdasarkan bagian sekuen dari gen MCP *megalocytivirus* (RSIV/TRBIV/ISKNV) dan genom ISKNV dengan hasil amplifikasi PCR pada berat molekul target 777 dan 415 bp (Kurita dan Nakajima 2012). Sekuen dari pasangan primer F3/R3 untuk deteksi ISKNV dan pasangan primer F3/R8 untuk deteksi *megalocytivirus* ditunjukkan pada Tabel 1. Pasangan primer F3/R3 juga digunakan untuk mengkonfirmasi diagnosa infeksi virus pada uji patogenisitas. Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan total volume reaksi sebanyak 25 µl yang terdiri dari: mastermix Go Taq DNA polymerase reaction (Promega, pH. 8.5), dNTP (400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP; 400 µM dTTP), MgCl₂ (3 mM); masing-masing primer *reverse* dan *forward* (10 pMol) sebanyak satu mikroliter dan *nuclease-free water* serta DNA *template* sebanyak dua mikroliter. *Nuclease-free water* digunakan sebagai kontrol negatif. Amplifikasi dilakukan menggunakan *thermal cycler* (Biometra, Analytic Jena) sebanyak 35 kali reaksi (94 °C selama 30 detik, 58 °C selama satu menit, 72 °C selama satu menit dan tahap pemanjangan akhir/*final extension* pada 72 °C selama tujuh menit). Uji PCR dilanjutkan pada tahap elektroforesis dimana amplicon dianalisis pada gel agarosa 1.5% selama 25 menit, 100 volt. Gel kemudian direndam dalam larutan *ethidium bromide* 0.05% dan divisualisasikan di bawah sinar ultra violet (UV) menggunakan GelDoc.

Hak Cipta Ditinjau Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Sekuensing DNA dan analisis filogenetik

Urutan gen MCP yang telah diamplifikasi menggunakan pasangan primer F3/R3 dan F3/R8 kemudian dilakukan analisis sekuensing melalui perusahaan jasa komersial (1st Base: www.base-asia.com). Urutan gen MCP yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan *database* pada *National Center for Biotechnology Information/NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan *basic local alignment search tool* (BLAST) untuk mengidentifikasi virus penyebab infeksi pada ikan gurami. Urutan DNA virus dari ikan gurami terinfeksi digunakan untuk melakukan analisis filogenetik dengan beberapa *megalocytivirus* lain yang ada dalam *database* pada *GenBank* sebagai referensi (Sembilan urutan DNA dari KKNV, enam urutan DNA dari RSIV dan tiga urutan DNA dari TRBIV) yang ada pada Kurita dan Nakajima (2012). Nilai jarak antara spesies virus/strain ditunjukkan dari panjang dari masing-masing cabang. *Beet armyworm ascovirus-USA* (AJ620613.1) yang merupakan anggota ascovirus digunakan sebagai *out-group*. Sejarah evolusi untuk membentuk pohon filogenetik diperoleh menggunakan *Maximum Composite Likelihood method* dengan *1000x bootstrap*. Analisis evolusi dilakukan menggunakan *software* MEGA X (Kumar *et al.* 2018). Persentase dari identitas urutan nukleotida dari gen MCP di antara virus-virus tersebut disejajarkan menggunakan program MegaBLAST (Zhang *et al.* 2000).

Kuantifikasi virus pada jaringan ikan terinfeksi

Kuantitatif PCR (qPCR) pada penelitian ini dan reaksi amplifikasi dilakukan secara *duplo* menggunakan sampel DNA dari limpa, ginjal, hati dan insang ikan terinfeksi. Volume total sebanyak 25 μl terdiri dari Taqman® Universal Mastermix II (Applied Biosystem, USA) sebanyak 12.5 μl ; masing-masing primer RSIV-RT *forward* dan *reverse* (20 μM) sebanyak satu mikroliter; Taqman RSIV probe (10 μM) sebanyak 0.5 μl ; *RNase free water* sebanyak sembilan mikroliter dan DNA *template* (50 ng) sebanyak dua mikroliter. Amplifikasi sebanyak 40 kali reaksi terdiri dari 90 °C selama dua menit, 95 °C selama 10 menit dan 95 °C selama 15 detik, serta 60 °C selama satu menit. Data dianalisis menggunakan *software* 2.3.1.49 *Rotor-gene Q*. Kurva *standard* dihasilkan oleh hasil amplifikasi dari pengenceran serial plasmid (10^5 , 10^4 , 10^3) dan *no-template control* (NTC) disertakan pada uji ini sebagai kontrol negatif. Primer efisiensi sebesar 95% diperoleh dari nilai *slope* sementara nilai $R^2 \geq 0.99$. Nilai *threshold cycle* (Ct) dan pengaturan *baseline* dilakukan secara otomatis.

Isolasi virus

Isolasi virus dilakukan menggunakan jaringan ikan terinfeksi (limpa dan ginjal) sebanyak satu gram yang dihomogenasikan dengan *phosphate buffer saline*/PBS steril pH 7.4 (PBS, Gibco) sebanyak sembilan mililiter. Suspensi jaringan tersebut disentrifugasi pada 1500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C lalu disaring menggunakan membran filter 0.45 μm (Millipore, USA). *Supernatant homogenate* yang dihasilkan disimpan pada suhu -86 °C untuk uji patogenisitas virus.



Uji patogenisitas

Ikan sehat dengan bobot rata-rata 62.77 ± 16.22 g diperoleh dari lokasi budidaya ikan gurami di Citayam-Jawa Barat dan dipelihara dalam wadah berukuran 500 liter dengan dilengkapi aerasi dan suhu air dipertahankan pada $25-30$ °C. Ikan diaklimatisasi selama paling sedikit tiga minggu sebelum pengujian dilakukan untuk aklimatisasi dan diberi pakan komersial (Chaoroen Phokpand Prime Indonesia). Sebelum digunakan dalam penelitian, ikan telah diuji bebas *Megalocytivirus* menggunakan analisis PCR dengan primer spesifik dari Kurita dan Nakajima (2012). Sebanyak 60 ekor ikan digunakan dan dibagi menjadi dua kelompok: kontrol dan injeksi. Masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor ikan dalam tiga ulangan masing-masing ditempatkan dalam wadah berukuran 50 liter yang dilengkapi dengan aerasi. Pada kelompok injeksi, ikan diinjeksi secara *intrapertoneal* dengan *supernatant homogenate* sebanyak 0.2 ml yang telah dipersiapkan sebelumnya dan disimpan pada suhu -86 °C. Ikan pada kelompok kontrol diinjeksi dengan PBS steril (pH 7.4) sebanyak 0.2 ml. Pengamatan terhadap munculnya gejala klinis, perubahan tingkah laku dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari selama 14 hari. Sampel jaringan berupa limpa dan ginjal dari ikan yang mengalami mortalitas dikoleksi dan disimpan dalam larutan fiksatif alkohol 95% untuk analisis PCR untuk memastikan mortalitas yang terjadi disebabkan oleh infeksi virus.

Analisis histopatologi dan *negative staining*

Sampel jaringan (limpa dan ginjal) dari ikan yang hampir mati dari kelompok injeksi disimpan dalam larutan fiksatif *normal buffered formalin* (NBF) 10% selama 24 jam sebelum dipindahkan ke dalam larutan fiksatif alkohol 70%. Jaringan terfiksasi tersebut kemudian diproses untuk analisis histologi dan ditanam dalam parafin. Irisan jaringan setebal lima mikrometer lalu dideparafinasi, diwarnai menggunakan hematoksilin-eosin (HE) dan diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus Life Science) pada pembesaran 40-100x.

Sampel untuk pengamatan menggunakan *transmission electron microscope*/TEM diambil dari sampel jaringan (limpa dan ginjal) dari ikan terinfeksi dan disimpan dalam larutan fiksatif 2.5% glutaraldehida dalam larutan 0.1 M buffer kakodilat dengan penambahan 3% sukrosa. Post-fiksatif dilakukan dengan menggunakan larutan 2% osmium tetroksida dalam 2.5% $K_3Fe(CN)_6$ dengan penambahan 3% sukrosa. Dehidrasi, infiltrasi, *embedding* dan proses selanjutnya hingga diperoleh blok jaringan yang siap dipotong dengan ketebalan antara 50-100 nm menggunakan ultramikrotom. Pewarnaan uranil asetat (*positive staining*) dilakukan pada irisan *ultrathin* dari masing-masing spesimen sebelum diamati dengan mikroskop elektron TEM (JEOL 1010, 80.0 kv) dengan pembesaran 12.000x (Lampiran 1).

Supernatant homogenate dari ikan terinfeksi yang disimpan pada suhu -86 °C kemudian disentrifugasi pada $100.000xg$ selama satu jam pada suhu 4 °C menggunakan ultrasentrifugasi (Hitachi CS 150NX dengan S50A-2002 rotor). Pelet virus yang dihasilkan kemudian diresuspensi dalam satu mililiter PBS pH 7.4 steril. *Negative staining* dilakukan dengan meneteskan larutan virus sebanyak 10 μ l pada *grid* kemudian diwarnai dengan pewarnaan *uranil acetate* sebelum diamati

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

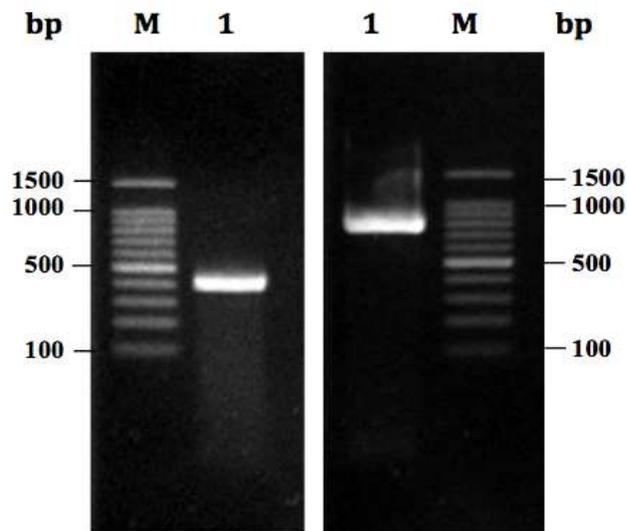
menggunakan TEM dengan pembesaran 30.000x. Analisis *negative staining* dan pengamatan morfologi virus pada sayatan jaringan menggunakan ultramikrotom dilakukan di Laboratorium TEM dan Histologi-Eijkman Institute, Jakarta.

Analisis protein sel utuh menggunakan SDS–PAGE

Protein virus dianalisis dengan SDS–PAGE (Dong *et al.* 2008). Protein virus sebanyak 20 µl dipisahkan menggunakan 12% *polyacrylamide gel (Mini-Protean tetra Cell, Bio-Rad)* dan kemudian diwarnai dengan *Coomassie Blue (Bio-Rad)*. *Pre-stained SDS-PAGE standards, Kaleidoscope (Bio-Rad)* digunakan sebagai *standard* untuk menentukan berat protein virus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi DNA dari isolat virus dari ikan gurami menghasilkan hasil positif *megalocytivirus* menggunakan pasangan primer F3/R8 dan juga positif ISKNV menggunakan pasangan primer F3/R3. Pita DNA dihasilkan pada target produk PCR (berat molekul pada 777 dan 415 bp). Hasil analisis PCR ditunjukkan pada Gambar 3.

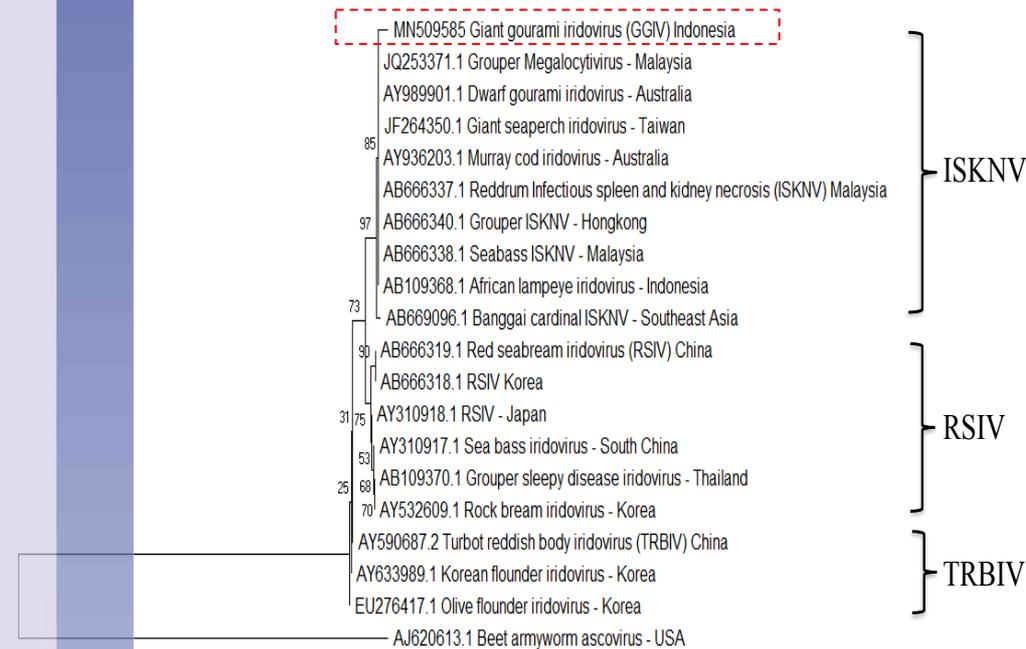


Gambar 3 Amplifikasi PCR gen *major capsin protein/MCP megalocytivirus* dari ikan gurami menggunakan primer spesifik untuk mengidentifikasi ISKNV dengan target 415 bp (kiri) dan primer *universal* untuk deteksi *megalocytivirus* dengan target 777 bp (kanan). DNA ladder 100 bp (Promega)



Pada penelitian ini digunakan dua set primer dari Kurita dan Nakajima (2012) untuk menghasilkan pita DNA spesifik untuk *megalocytivirus* dan ISKNV. Analisis sekuensing dan BLAST menunjukkan amplicon dari pasangan primer F3/R3 identik dengan genom lengkap ISKNV (KT781098.1) sedangkan amplicon dari pasangan primer F3/R8 menghasilkan homologi sebesar 99%. Analisis selanjutnya untuk menghasilkan pohon filogenetik digunakan urutan nukleotida dari amplicon PCR dengan target berat molekul sebesar 415 bp.

Analisis filogenetik dari urutan nukleotida *megalocytivirus* yang menginfeksi ikan gurami, *megalocytivirus* lainnya dari *GenBank* (Kurita dan Nakajima 2012) dan *out-group Beet armyworm ascovirus-USA* (AJ620613.1) yang merupakan anggota *family Iridoviridae* menghasilkan tiga *clade* dari genus *megalocytivirus* (ISKNV, RSIV dan TRBIV) masing-masing sebagai spesies virus yang berbeda. Pohon filogenetik dari gen MCP isolat virus asal ikan gurami (*giant gourami iridovirus*/GGIV) menunjukkan anggota baru dalam genus *megalocytivirus* yang membentuk *cluster* dengan ISKNV (Gambar 4). Hasil penelitian ini menguatkan penelitian lainnya yang dilakukan oleh Koesharyani dan Gardenia (2013). Menurut Tidona *et al.* (1998), gen MCP merupakan gen yang terkonservasi dan sangat sesuai untuk mengidentifikasi hubungan filogenetik antara isolat yang berkerabatan dekat. Sebagian urutan nukleotida gen MCP dari GGIV telah disimpan dalam database *GeneBank* pada *National Center for Biotechnonology Information* (NCBI) dengan *accession number* MN509585.



Gambar 4 Analisis filogenetik gen *major capsin protein*/MCP *megalocytivirus* dari ikan gurami (*giant gourami iridovirus*/GGIV) dengan beberapa anggota *megalocytivirus* lainnya. Jarak evolusi dihitung berdasarkan metode *maximum composite likelihood*. Analisis evolusi dilakukan menggunakan program MEGA X.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Analisis *pairwise distance* untuk memperkirakan penyimpangan evolusi (*evolutionary divergence*) di antara urutan nukleotida dari beberapa virus tersebut menunjukkan penyimpangan genetik yang lebih dekat (0.034-0.058) antara urutan nukleotida dari GGIV dan urutan nukleotida dari anggota *clade* ISKNV lain yang digunakan pada penelitian ini. Analisis penyimpangan genetik dari isolat-isolat virus tersebut menunjukkan jarak genetik antara urutan nukleotida GGIV dengan anggota *clade* ISKNV lainnya sangat dekat dibandingkan anggota *clade* RSIV dan TRBIV. Penyimpangan genetik terjauh (2.685) dihasilkan dari *out-group ascovirus* (Tabel 2).

Pensejajaran nukleotida (*nucleotide alignment*) menunjukkan tingkat kesamaan (*homology*) sebesar 97-99.5% dari urutan nukleotida dalam anggota *clade* ISKNV yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 3). Tingginya tingkat kesamaan urutan nukleotida gen MCP antara GGIV dan anggota *clade* ISKNV menunjukkan virus tersebut merupakan *minor variant/strain* dari ISKNV (genus *Megalocytivirus*). *International Committee on Taxonomy of Viruses* menyatakan bahwa semua *megalocytivirus* yang merupakan varian dari ISKNV, RSIV atau TRBIV memiliki kesamaan pada urutan nukleotida gen MCP dan *adenosine triphosphatase* (ATPase) sebanyak lebih dari 94% (Chinchar *et al.* 2005)



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Tabel 3. Persentase homologi urutan nukleotida dari gen *major capsid protein* (MCP) antara isolat *giant gourami iridovirus* (GGIV) dan 18 isolat yang berferensi dari genus *megalocytivirus* (ISKNV, RSIV dan TRBIV). Data diambil dari *database* pada *Genbank* dan disejajarkan dengan program *MegaBLAST*.

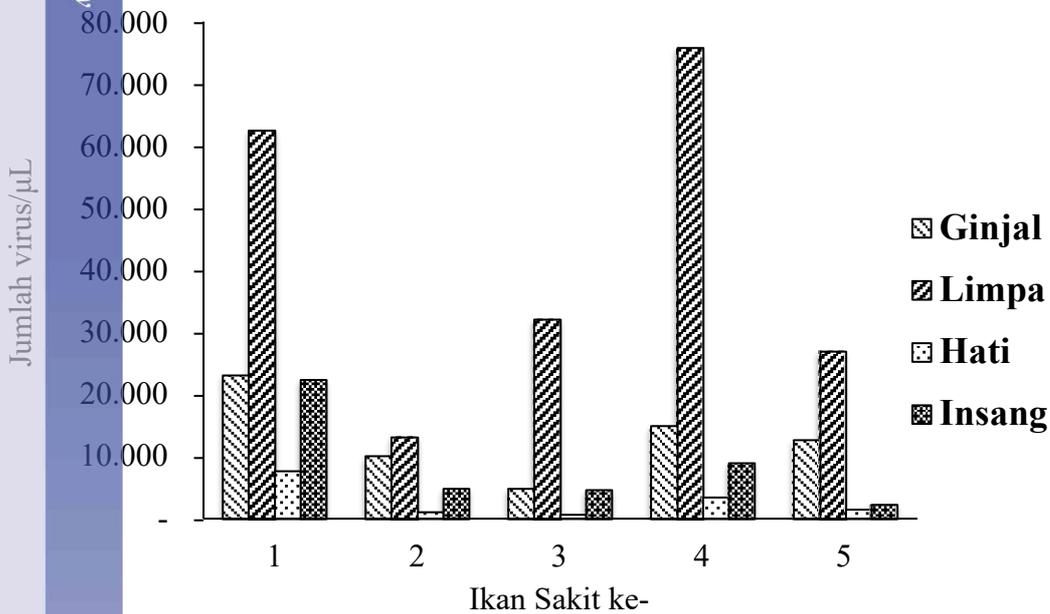
Accession no.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 MN50955.1																		
2 AB666339.1	100																	
3 AB666338.1	99.96	100																
4 AY590607.1	94.05	94.05																
5 AY936233.1	94.13	94.13	93.83															
6 AY989991.1	94.20	94.20	93.83	99.93														
7 EU276417.1	94.20	94.20	99.37	93.98	93.98													
8 AY633999.1	94.05	94.05	99.41	93.91	93.91	99.41												
9 AB666337.1	94.20	94.20	93.83	99.93	100	93.98	93.91											
10 AB669036.1	93.98	93.98	93.61	98.38	98.46	93.76	93.69	98.46										
11 AB109330.1	98.16	98.16	94.26	94.71	94.78	94.41	94.26	95.00	94.71									
12 AY532609.1	97.65	97.65	94.35	94.79	94.86	94.35	94.20	94.86	94.79	99.49								
13 AY310938.1	97.94	97.94	94.49	94.93	95.00	94.49	94.34	94.78	94.78	99.34	99.41							
14 AB109338.1	94.49	94.49	93.97	99.63	99.71	94.12	94.04	99.71	98.16	95.13	95.00	95.30						
15 JF264331.1	94.12	94.12	93.60	99.71	99.78	93.75	93.68	99.78	98.24	94.71	94.64	94.93	99.63					
16 AY310937.1	98.31	98.31	94.41	94.71	94.78	94.56	94.41	94.78	94.71	99.85	99.34	99.34	95.08	94.71				
17 JQ253331.1	94.20	94.20	93.61	99.63	99.71	93.75	93.68	99.71	98.16	94.72	94.64	94.94	99.63	99.63	94.72			
18 AB666330.1	94.20	94.20	93.83	99.93	100	93.98	93.91	100.00	98.46	94.78	94.86	95.00	99.71	99.78	94.78	99.71		
19 AB666338.1	94.20	94.20	93.83	99.93	100	93.98	93.91	100.00	98.46	94.78	94.86	95.00	99.71	99.78	94.78	99.71	100	

1 GGIV *Giant gourami iridovirus-Indonesia*, 2 *Red seabream iridovirus* (RSIV)-Cina, 3 RSIV-Korea, 4 TRBIV-Cina, 5 *Murray cod iridovirus*-Australia, 6 *Giant gourami iridovirus*-Australia, 7 *Olive flounder iridovirus*-Korea, 8 *Korean flounder iridovirus*-Korea, 9 *Infectious spleen and kidney necrosis virus* (ISKNV) *Reddrum*-Malaysia, 10 ISKNV *Banggai cardinal fish*-Southeast Asia, 11 *Grouper sleepy disease iridovirus*-Thailand, 12 *Rock seabream iridovirus*-Korea, 13 RSIV-Japan, 14 *African lampeye iridovirus*-Indonesia, 15 *Giant seaperch iridovirus*-Taiwan, 16 *Sea bass iridovirus*-South China Sea, 17 *Grouper Megalocytivirus*-Sabah Malaysia, 18 *Grouper* ISKNV-Hongkong, 19 ISKNV *Seabass*-Australia

nologi Undang-undang
 tip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mengaitkan dan
 anyanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan
 tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 mumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Analisis kuantitatif PCR dari beberapa organ/jaringan ikan terinfeksi GGIV menunjukkan limpa mengandung konsentrasi (jumlah *copy* DNA) virus yang paling tinggi dibandingkan organ lainnya yang diuji (Gambar 5). Ginjal dan insang juga mengandung konsentrasi virus yang tinggi, dan terendah teramati pada hati. Ito *et al.* (2013) melaporkan infeksi buatan melalui injeksi *intraperitoneal* RSIV yang diperbanyak pada sel *Grunt Fin* (GF) dan hasil analisis kuantitatif DNA virus tersebut menunjukkan limpa merupakan organ target infeksi RSIV pada *Japanese Amberjack* (*Seriola quinqueradiata*). Diagnosis *megalocytivirus* banyak menggunakan limpa dan ginjal dan hal ini disebabkan banyaknya konsentrasi partikel virus pada kedua organ tersebut (Mahardika *et al.* 2004; Fauquet *et al.* 2005; Choi *et al.* 2006).

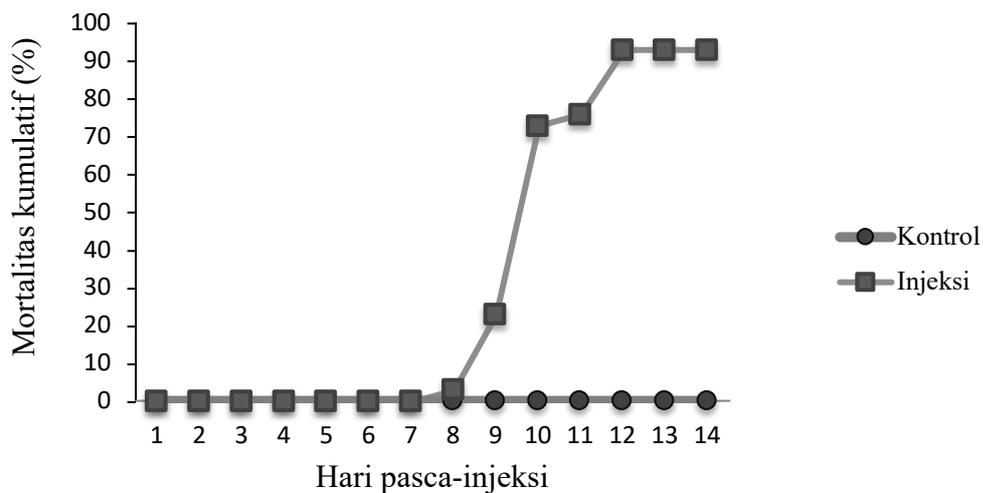


Gambar 5 Hasil analisis *quantitative* PCR (qPCR) dari *giant gourami iridovirus* (GGIV) pada beberapa organ (ginjal, limpa, hati dan insang) dari lima ekor ikan yang dikoleksi dari kasus wabah penyakit (ikan gurami yang terinfeksi secara alami)

Supernatant homogenate dari jaringan (limpa dan ginjal) ikan terinfeksi digunakan untuk pengujian infeksi buatan. Hasil uji menunjukkan GGIV sangat virulen pada ikan gurami yang diinjeksi secara *intraperitoneal* pada uji patogenisitas virus. Hasil uji menunjukkan gejala klinis dari ikan kelompok injeksi mulai terlihat pada hari ke-5 pasca-infeksi. Gejala klinis ikan yang terinfeksi seperti lemah, kehilangan nafsu makan, warna tubuh menjadi gelap atau pucat dan berenang tidak beraturan (berenang lemah sambil mengeluarkan gelembung-gelembung pada permukaan air) dibandingkan ikan sehat seperti yang terlihat pada kelompok kontrol. Mortalitas ikan uji mulai terlihat pada kelompok ikan yang

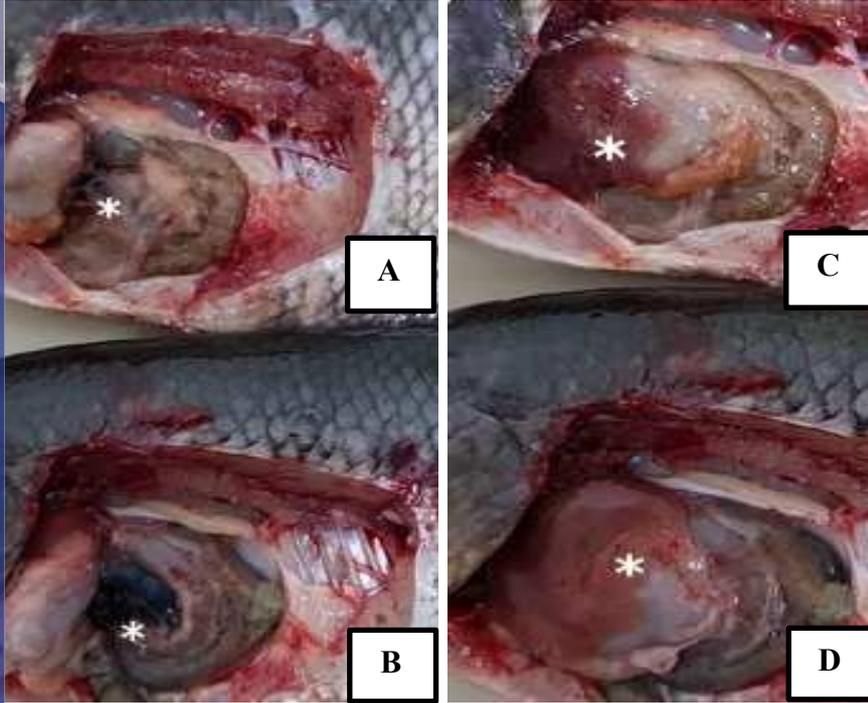
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

diinjeksi virus pada hari ke-8 pasca-infeksi dan mencapai mortalitas kumulatif sebesar 93% pada hari ke-12 pasca-infeksi sementara tidak ada mortalitas yang teramati pada kelompok kontrol (Gambar 6). Hampir semua ikan uji kelompok injeksi mengalami mortalitas, dan hanya tersisa sedikit selama 14 hari uji tantangan dengan GGIV. Ikan terinfeksi menunjukkan abnormalitas berupa hati pucat, limpa dan ginjal membengkak (Gambar 7). Analisis PCR mengkonfirmasi GGIV merupakan penyebab mortalitas ikan uji kelompok injeksi dari hasil pengamatan jaringan ikan tersebut positif terinfeksi ISKNV (Gambar 8).

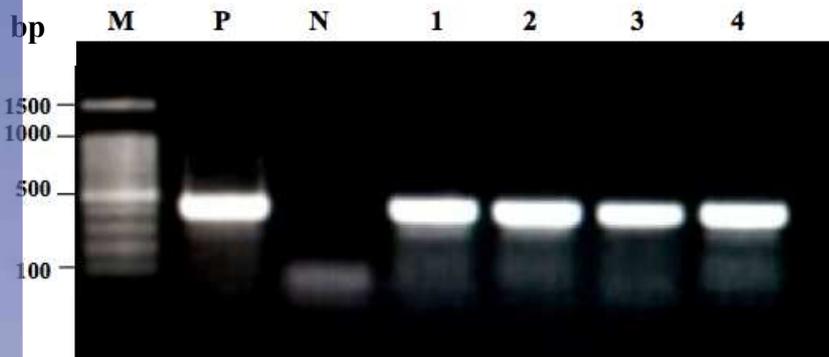


Gambar 6 Persentase mortalitas kumulatif pada uji infeksi buatan. Ikan yang diinjeksi secara *intraperitoneal* dengan *supernatant homogenate* jaringan limpa dan ginjal dari ikan gurami yang terinfeksi alami. Ikan pada kelompok kontrol diinjeksi secara *intraperitoneal* dengan *phosphate buffer saline/PBS* steril

Mortalitas ikan uji pada penelitian ini hampir sama dengan mortalitas pada kasus wabah infeksi alami di Banyumas, Jawa Tengah. Hasil penelitian ini juga hampir sama dengan infeksi ISKNV yang menyebabkan mortalitas 100% dalam waktu 7-10 hari pasca-infeksi pada ikan mandarin (*Siniperca chuatsi*). *Supernatant homogenate* yang mengandung DGIV dari *dwarf gourami* (*Colisa lalia*) terinfeksi menginduksi mortalitas sebesar 90% pada benih *murray cod* (*Maccullochella peelii peelii*), dan juga *African lampeye* (*Aplocheilichthys normani*) yang terinfeksi *African lampeye iridovirus* (ALIV) menyebabkan infeksi hingga menyebabkan mortalitas hampir 100% (Go dan Whittington 2006; He *et al.* 2000; Sudthongkong *et al.* 2002; Ito *et al.* 2013).



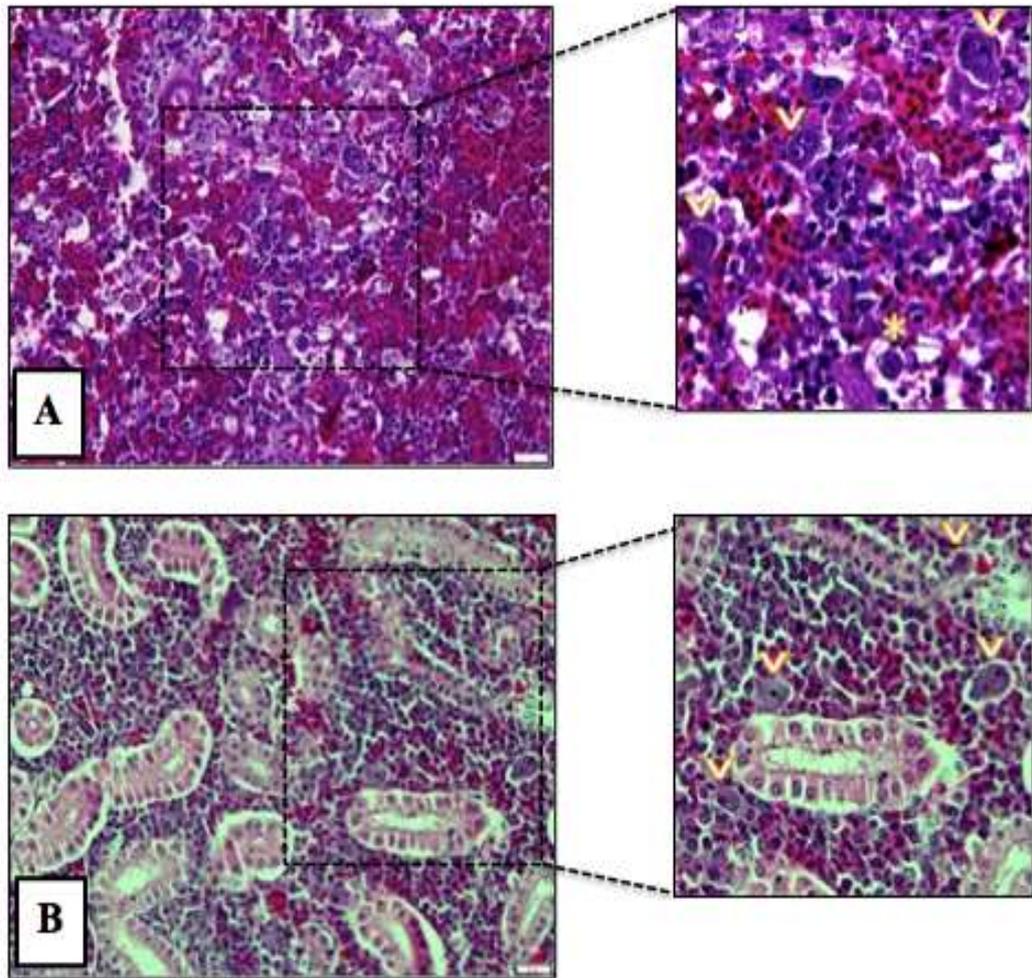
Gambar 7 Limpa normal dari ikan gurami sehat (A) dibandingkan dengan limpa yang membesar pada ikan yang terinfeksi (B) dan hati normal (C) dibandingkan dengan hati pucat dari ikan gurami yang terinfeksi (D) pada uji infeksi buatan.



Gambar 8 Hasil analisis *polymerase chain reaction* (PCR) sampel campuran jaringan limpa dan ginjal dari ikan yang mengalami mortalitas. M: *marker* 100bp *DNA ladder* (Promega); P: kontrol positif; N: kontrol negatif, baris 1-4: sampel dari ikan kelompok injeksi.

Hasil analisis histopatologi memperlihatkan adanya sel basofilik hipertropi/*hypertrophic cells* yang terlihat pada pengamatan sayatan limpa dan ginjal dengan menggunakan mikroskop cahaya (Gambar 9). Limpa ikan gurami terinfeksi menunjukkan nekrosis parah dan hemoragi dengan banyak badan inklusi intrastoplasmik dan intranuklear.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

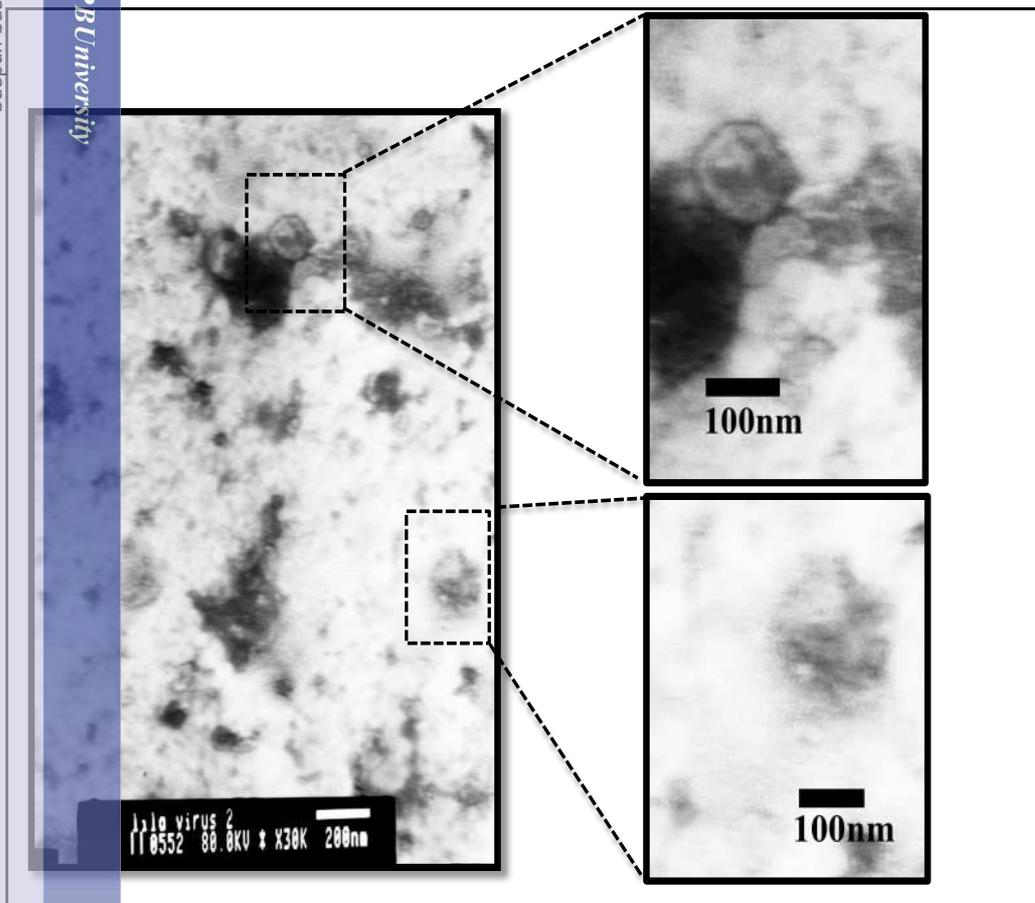
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Gambar 9 Limpa dari ikan gurami menunjukkan nekrosis parah dengan banyak badan inklusi intrasitoplasmik (v) dan intranuklear (*) serta hemoragi teramati pada sayatan jaringan limpa (A) dan ginjal (B). Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) dengan pembesaran 400x, garis putih 20 µm

Nekrosis dan sel basofilik hipertropi dengan inklusi sitoplasmik merupakan karakteristik histopatologi yang khas infeksi *megalocytivirus* (Sudthongkong *et al.* 2002; Jancovich *et al.* 2012). Banyak sel hipertropi tersebut ditemukan pada berbagai organ ikan yang terinfeksi. Xu *et al.* (2008) melaporkan adanya jaringan nekrosis dan sel hipertropi pada ginjal dan limpa. Penelitian yang dilakukan oleh He *et al.* (2000; 2002) memperlihatkan sel-sel hipertropi pada limpa, jaringan hematopoietik pada ginjal, jaringan ikat kranial dan endokardium. Sel-sel tersebut juga dapat dijumpai pada hati, usus dan insang dari ikan mandarin yang terinfeksi ISKNV. Badan inklusi yang mengandung virus akan mengisi sitoplasma dan selanjutnya dapat menekan inti sel. Viraemia menyebabkan penyebaran infeksi virus ke hampir semua organ ikan terinfeksi (Mcdermott *et al.* 2013). Menurut Jung-Schroers *et al.* (2016), ikan terinfeksi virus tersebut akhirnya mati akibat kegagalan fungsi organ.

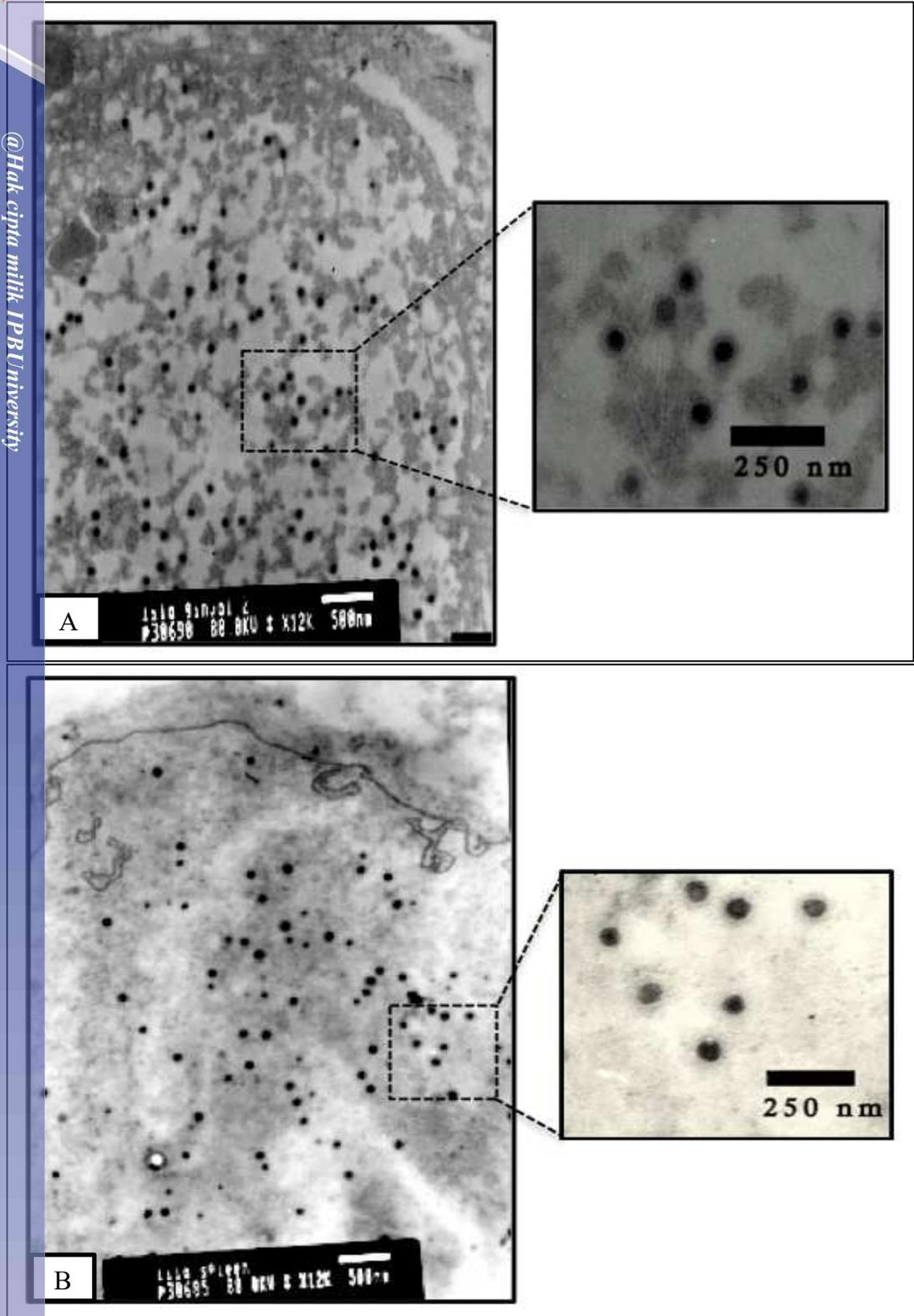


Pengamatan hasil *negative staining* dengan menggunakan *transmission electron microscope* (TEM) memperlihatkan partikel mirip virus (*virus-like particle*) dengan bentuk *icosahedral* dengan diameter sekitar 150-200 nm (Gambar 10) dan juga hasil sayatan ultra dari limpa dan ginjal ikan terinfeksi yang diamati menggunakan TEM (Gambar 11). Diameter partikel ini hampir sama dengan ukuran anggota *megalocytivirus* lainnya. Menurut Chinchar (2011) partikel virus dari *megalocytivirus* memiliki morfologi *icosahedral* dengan diameter sekitar 125-200 nm.



Gambar 10 Partikel seperti virus (*virus-like particle*) terlihat dari pengamatan *negative staining* (uranil asetat) menggunakan *transmission electron microscope* (TEM) dengan pembesaran 30.000x.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



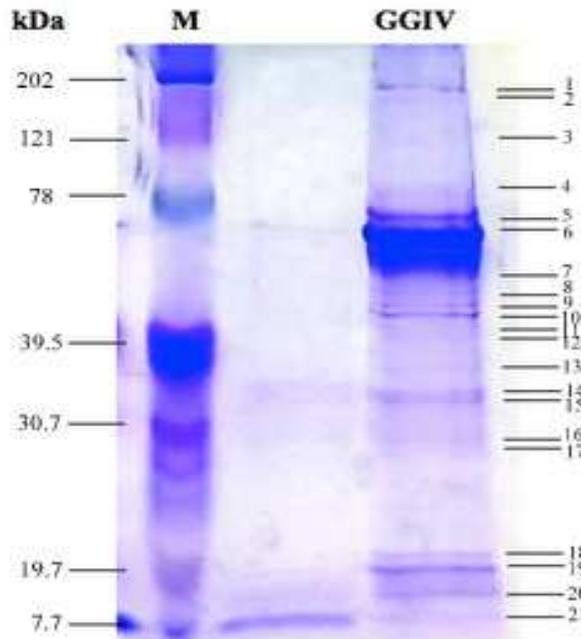
Gambar 11 Partikel seperti virus (*virus-like particle*) terlihat dari pengamatan jaringan ginjal (A) dan limpa (B) ikan gurami terinfeksi menggunakan *transmission electron microscope* (TEM) dengan pembesaran 12.000x.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



Pada analisis profil protein sel utuh dari isolat *megalocyctivirus* dari ikan gurami *giant gourami iridovirus* (GGIV) yang telah dipurifikasi dilakukan dengan menggunakan metode SDS-PAGE menghasilkan 21 pita protein dengan ukuran antara 7.7 hingga 202 kDa (Gambar 12). Pita 6 yang merupakan pita protein yang paling tebal dengan berat molekul sekitar 40-60 kDa diduga merupakan protein *major capsid protein* (MCP) dari *megalocyctivirus*.



Gambar 12 Profil protein *giant gourami iridovirus* (GGIV) menggunakan analisis SDS-PAGE dengan 12% *polyacrylamide* gel

Profil polipeptida dari OSGIV-HN11 (*megalocyctivirus* pada *orange-spotted grouper Epinephelus coioides*) yang telah dipurifikasi memperlihatkan pita protein paling tebal teramati pada berat protein sekitar 47.5 kDa dan telah teridentifikasi sebagai MCP (Ma *et al.* 2012). Profil polipeptida pada isolat SKIV-ZJ07 yang diisolasi dari *spotted knifefish (Oplegnathus punctatus)* menggunakan sel *mandarin fish fry* (MFF-1 memperlihatkan MCP berupa pita tebal pada 49.9 kDa. MCP memiliki berat protein sekitar 50 kDa, merupakan protein utama yang dihasilkan oleh iridovirus selama proses infeksi dan dapat mencapai 45% dari keseluruhan protein virus (Kelly dan Tinsley 1972; Willis *et al.* 1985; Black *et al.* 1981). Hal yang hampir sama juga dinyatakan oleh Fauquet *et al.* (2005) bahwa sekuen lengkap gen MCP (1362 bp) menghasilkan protein pada berat 48-55 kDa yang mencakup 40% dari total protein virus. Iridovirus terdiri dari empat komponen utama yaitu inti, membran lipid bagian dalam, *capsid icosahedral* dan komponen membran luar berupa viral *envelope* (Whitley *et al.* 2010). *Myristylated membrane protein* (MMP (target protein ISKNV-ORF007) telah diketahui merupakan protein *envelope* utama dari *megalocyctivirus* (Dong *et al.* 2011, Shuang *et al.* 2013).

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penelitian yang dilakukan oleh Ma *et al.* (2012) dan Dong *et al.* (2010) memperlihatkan lebih dari 30 pita protein yang teramati pada gel poliakrilamid. Berdasarkan gen MCP (*complete genome* 1362 bp), isolat SKIV-ZJ07 (Cina) dan OSGIV-HN11 (Cina) serta RSIV-U1 (Jepang) masuk dalam tipe spesies yang sama dari genus *megalocytivirus*. Perbedaan jumlah pita protein dengan yang diperoleh dari hasil analisis profil virus utuh dengan SDS-PAGE pada penelitian ini diduga karena OSGIV termasuk dalam ISKNV, spesies lain dari genus *megalocytivirus*. Perbedaan lainnya diduga disebabkan konsentrasi virus yang digunakan. Menurut Shinmoto *et al.* (2009) perbedaan di antara strain dengan genotip yang identik dapat disebabkan oleh adanya perbedaan fenotip seperti virulensi, kecepatan replikasi dan patogenitas virus.

Virus merupakan organisme obligat intraseluler yang terdiri dari inti DNA/RNA yang diselubungi mantel protein atau lipoprotein. Virus memperbanyak diri di dalam sel inang dengan menggunakan mesin sintesis asam nukleat dan protein inang sehingga mengganggu sintesis protein dan fungsi sel normal inang. Virus masuk ke dalam sel dengan menggunakan reseptor permukaan sel dan menimbulkan infeksi. Beberapa virus memiliki *capsid* yang diselubungi oleh lapisan fosfolipid sel inang yang didapatkan pada saat *budding* untuk melepaskan diri dari sel inang. *Envelope* tersebut memberikan proteksi lebih pada virus terhadap enzim protease. Antigen pada *envelope* tersebut dapat menjadi target antibodi yang dapat mencegah infeksi pada sel inang dengan bantuan komplemen.

Hasil penelitian Dong *et al.* (2010) menunjukkan lebih dari 30 pita protein dengan 10 pita protein yang tebal. Hasil tersebut dianalisis lebih lanjut menggunakan MALDI-TOF/MS dan berhasil mengidentifikasi 14 pita protein. Sebanyak 12 pita merupakan protein dari *megalocytivirus* yaitu RBIV DNA binding protein (RBIV-ORF058L), OSGIV-ORF075L, RBIV putative NTPase (ORF059L), RBIV-ORF068L, OSGIV-ORF087R, RSIV-putative phosphatase, RSIV myristylated membrane protein, GSIV major capsid protein (MCP), OSGIV-ORF038L, RBIV-ORF053L, OSGIV-putative ankyrin repeat protein (OSGIV-ORF121L), RBIV-ORF053L, OSGIV-ORF097L dan OSGIV-ORF097L yang masing-masing merupakan pita protein 1, 2, 3, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 26, 27 dan 28. Pita 18 dan 26 teridentifikasi merupakan RBIV-ORF053L dan pita 27, 28 merupakan OSGIV-ORF097L.

Pada analisis selanjutnya Dong *et al.* (2010) menggunakan LC-MS/MS untuk mengidentifikasi delapan protein virus baru dari enam pita protein. Pita 2 merupakan OSGIV-ORF055L dan pita 23; 24 berkaitan dengan ISKNV-ORF100L. Pita 13, 29 dan 30 merupakan campuran protein yang mengandung sedikitnya masing-masing tiga protein *megalocytivirus*. Pita 13 LYCIV-ORF037L merupakan satu-satunya protein *megalocytivirus* yang unik. OSGIV-ORF080R, RBIV-ORF056L dan OSGIV-ORF019L merupakan protein yang ditemukan pada pita 29. RBIV-ORF075R, RBIV-ORF089R dan OSGIV-ORF099R merupakan protein spesifik pada pita 30. Pita 1 dengan berat protein 145.1 kDa merupakan DNA binding protein; pita 2 pada berat protein 112.9 kDa merupakan *transmembrane domain*; pita 3 pada berat protein 101.8 kDa kemungkinan merupakan NTPase, RGD Arg-Gly-Asp domain, *transmembrane domain*; pita 9 pada berat protein 53.5 kDa merupakan *transmembrane domain*; pita 10 pada berat protein 59.3 kDa merupakan *transmembrane domain*; pita 11 pada berat protein 58.1 kDa kemungkinan merupakan phosphatase, *transmembrane domain*; pita 12 pada berat

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



protein 49.9 kDa merupakan *RGD Arg-Gly-Asp domain*; pita 13 pada berat protein 49.9 (*RGD Arg-Gly-Asp domain*), 49.6 kDa (*transmembrane domain*) dan 51.4 kDa (*transmembrane domain*); pita 14 pada berat protein 49.9 kDa merupakan MCP, *transmembrane domain*; pita 16 pada berat protein 38.6 kDa merupakan *transmembrane domain, signal peptide*; pita 18 pada berat protein 34.9 dDa merupakan *serine-threonine protein kinase, RGD Arg-Gly-Asp domain*; pita 20 pada berat protein 25.2 kDa merupakan *transmembrane domain*; pita 21 pada berat protein 35.3 kDa merupakan *virus-specific 2-cysteine adaptor*; pita 23/24 pada berat protein 19.8 kDa (tidak dikenali); pita 26 pada berat protein 34.9 kDa merupakan *serine-threonine protein kinase, RGD Arg-Gly-Asp domain*; pita 27 pada berat protein 19.3 kDa (tidak dikenali), pita 28 pada berat protein 18.6 kDa (tidak dikenali); pita 29 pada berat protein 18.8 kDa (*transmembrane domain, signal peptide*), 34.1 kDa (*serine-threonine protein kinase, RGD Arg-Gly-Asp domain*) dan 12.3 kDa (*transmembrane domain*); pita 30 pada berat protein 17.3 kDa (tidak dikenali), 7.3 kDa (*transmembrane domain, signal peptide*) dan 15.6 kDa (*vSOCS, Viral suppressor of cytokine signalling protein*).

SIMPULAN

Hasil analisis filogenetik gen *major capsid protein* (MCP) dari virus yang menginfeksi ikan gurami mengenalkan anggota baru dari genus *megalocytivirus, giant gourami iridovirus*/GGIV, yang merupakan *minor variant*/strain dari ISKNV.

SARAN

Pada penelitian ini hasil analisis SDS-PAGE belum dapat mengidentifikasi pita protein dari GGIV. Perlu dilakukan analisis proteomik lebih lanjut untuk mengidentifikasi pita protein tersebut sehingga dapat diperoleh informasi bagian-bagian imunogenik dari virus.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PENGEMBANGAN KULTUR SEL PRIMER DARI LIMPA IKAN GURAMI (*Osphronemus goramy*) UNTUK PERBANYAKAN *GIANT GOURAMI IRIDOVIRUS* (GGIV)

Abstrak

Kasus infeksi *megalocytivirus* menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi yang disebabkan besarnya mortalitas yang terjadi pada ikan yang terinfeksi. Sejak 2011, *megalocytivirus* telah diketahui merupakan patogen utama pada ikan gurami (*Osphronemus goramy*) di Indonesia, terutama di Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Bali. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan kultur sel primer dari limpa ikan gurami (*Osphronemus goramy*) sebagai sel inang untuk memperbanyak *megalocytivirus* secara *in vitro*. Pembuatan kultur sel primer dari limpa ikan gurami ini dilakukan melalui disosiasi sel secara enzimatik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel primer (sel GPs) dapat tumbuh dengan baik pada suhu 27 °C dan penambahan 10% serum dalam medium L-15 cukup baik untuk pertumbuhan sel. Sel GPs yang diinfeksi dengan *megalocytivirus* yang diisolasi dari ikan gurami (*giant gourami iridovirus*/GGIV) memperlihatkan sel yang mengalami pembesaran dan membulat. Virus yang diperbanyak pada kultur sel GPs sangat virulen ketika diinjeksikan pada ikan gurami pada percobaan infeksi buatan. Pengenceran supernatan virus yang diinjeksikan pada ikan gurami secara intraperitoneal menghasilkan mortalitas 100% dalam waktu 7-11 hari setelah infeksi dan infeksi buatan secara kohabitasi menghasilkan mortalitas 97% dalam waktu 21 hari dengan abnormalitas pada hati dan limpa. Sel primer GPs telah berhasil disubkultur hingga lebih dari 30 pasase dan sel primer ini suseptibel terhadap infeksi GGIV yang merupakan patogen penyebab infeksi ISKNV pada budidaya ikan gurami.

Kata kunci: ikan gurami, kultur sel primer, *megalocytivirus*, *Osphronemus goramy*

Abstract

Megalocytivirus caused significant economic losses due to severe mortality of infected fish. Since 2011, *megalocytivirus* has become a main pathogen in giant gourami (*Osphronemus goramy*), particularly in West Java, Central Java and Bali. The aim of study was to develop primary cell cultures from its spleen as target organ for propagating *megalocytivirus in vitro*. We developed primary cell from spleen by enzymatic dissociation. The result showed that primary cell (GPs cell) can grow well at 27 °C and 10% serum in L-15 medium was sufficient for cells growth. GPs cells were infected with giant gourami iridovirus (GGIV) showed enlargement and rounding cells. Virus propagated in GPs cells was highly virulent when injected to giant gourami in artificial infection. Intraperitoneal injection experiments of diluted virus supernatant showed 100% mortality within 7-11 dpi and 97% mortality in 21 days by cohabitation with abnormalities were observed in

spleen and kidney. In conclusion, GPs cell was successfully subcultured for more than 30 passages and was found to be susceptible to GGIV.

Keywords: giant gourami, megalocytivirus, *Osphronemus goramy*, primary cells

PENDAHULUAN

Produksi perikanan budidaya dunia mengalami peningkatan dengan melonjaknya permintaan produk-produk perikanan sebagai sumber makanan (Subramaniam 2012). Di Indonesia, produksi perikanan budidaya juga terus mengalami peningkatan. Tahun 2013, produksi gurami dunia mengalami peningkatan produksi dan saat ini Indonesia memberikan kontribusi terbesar dengan capaian 94.605 ton (96,1 persen) dari total produksi ikan gurami dunia.

Ikan gurami (*Osphronemus goramy*) merupakan ikan asli Indonesia yang diperkenalkan ke negara Asia lainnya dan dibudidayakan (Welcomme, 1988). Saat ini ikan gurami telah menjadi komoditas ikan di Asia Tenggara. Ikan gurami merupakan salah satu komoditas unggulan pada budidaya air tawar dengan nilai ekonomis yang tinggi. Harga ikan gurami yang tinggi dan stabil, bahkan cenderung meningkat, menjadikan ikan ini prospektif untuk dibudidayakan (Nuryati *et al.* 2015). Ikan gurami merupakan komoditas unggulan ke-5 di Indonesia dan budidaya ikan ini telah meluas hampir di seluruh Indonesia.

Meluasnya budidaya gurami di Indonesia tanpa mengikuti cara budidaya yang baik akan meningkatkan resiko terjadinya wabah dan penyebaran penyakit di lokasi budidaya ikan tersebut. Peningkatan produksi perikanan melalui intensifikasi budidaya menyebabkan menurunnya kualitas lingkungan yang pada akhirnya menimbulkan masalah penyakit yang menyerang ikan (Sommerset *et al.* 2005). Patogen yang merupakan agen penyakit pada ikan budidaya tersebut menimbulkan banyak kerugian bagi pembudidaya akibat tingginya mortalitas. Hal tersebut menyebabkan penurunan produksi maupun peningkatan biaya produksi untuk penanggulangannya (Murray dan Peeler 2005).

Megalocytivirus merupakan salah satu *genus* dalam *family Iridoviridae* yang saat ini telah menjadi masalah besar penyebab turun dan gagalnya produksi serta menimbulkan kerugian ekonomi yang besar pada perikanan air tawar, ikan laut dan ikan hias (Kurita dan Nakajima 2012, Subramaniam *et al.* 2012). Saat ini, *megalocytivirus* semakin banyak ditemukan dan dikarakterisasi (Fu *et al.* 2015). Anggota *genus megalocytivirus* antara lain *red sea bream iridovirus* (RSIV) (Inouye *et al.* 1992), *infectious spleen and kidney necrosis virus* (ISKNV) (He *et al.* 1998) dan *turbot reddish body iridovirus* (TRBIV). *Giant gourami iridovirus* (GGIV) telah diusulkan sebagai anggota baru *megalocytivirus* dari ikan gurami yang termasuk dalam strain ISKNV (Sukenda *et al.* 2020).

Kultur sel dengan tingkat kerentanan terhadap virus yang tinggi merupakan sarana yang penting untuk isolasi, propagasi dan karakterisasi virus lebih lanjut (Subramaniam *et al.* 2012). Menurut Lakra *et al.* (2011), kultur sel adalah metode yang lazim untuk menentukan keberadaan virus pada ikan sehat atau mengisolasi virus dari ikan yang terinfeksi, sehingga penting bagi kultur sel untuk memiliki kerentanan tinggi terhadap infeksi virus. Dari lima *genus family Iridoviridae*,

sebanyak tiga genus (*ranavirus*, *lymphocytivirus* dan *megalocytivirus*) yang merupakan agen penyebab penyakit dengan tingkat mortalitas yang tinggi (Williams *et al.* 2005). Berbeda dengan *ranavirus* yang lebih mudah untuk diperbanyak dalam berbagai jenis kultur sel, *lymphocytivirus* dan *megalocytivirus* sulit untuk diperbanyak (Chao *et al.* 2004; Chen *et al.* 2004; Imajoh *et al.* 2007). Hal ini yang menyebabkan pentingnya pengembangan kultur sel yang cocok untuk menumbuhkan dan memperbanyak virus-virus tersebut.

Kultur sel menjadi inang bagi virus dan sangat dibutuhkan dalam pengembangan vaksin berbasis kultur sel (Imajoh *et al.* 2007; Wen *et al.* 2008, Dong *et al.* 2010). Aplikasi kultur sel untuk pengembangan vaksin ini bersifat adisional, namun efektif untuk mencegah penyakit viral. Beberapa kultur sel untuk produksi vaksin telah berhasil dikembangkan. Vaksin RSIV inaktif (*formalin-killed*) yang diperbanyak dalam kultur sel GF (*Grunt Fin*, berasal dari ikan *blue striped grunt Haemulon sciurus*) saat ini telah tersedia secara komersial di Jepang (Caipang *et al.* 2006). Sel GF cocok untuk memperbanyak RSIV dalam produksi vaksin (Nakajima *et al.* 2002). Sedangkan kultur sel MFF-1 (*Mandarin fish fry* berasal dari larva *mandarin fish Siniperca chuatsi*) cocok untuk memperbanyak ISKNV dari ikan *mandarin* (Dong *et al.* 2008). Namun sel GF tidak suseptibel terhadap GGIV yang terlihat dari upaya memperbanyak virus tersebut tidak menghasilkan *cytopathic effect*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan kultur sel primer dari limpa ikan gurami (*Osphronemus goramy*) sebagai sel inang untuk memperbanyak *megalocytivirus* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi dan Biologi Molekular Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok-Jawa Barat, Indonesia pada bulan Agustus 2017 hingga April 2019. Ikan sakit yang digunakan pada penelitian ini berasal dari wabah penyakit pada budidaya ikan gurami dengan mortalitas 90% di Banyumas, Jawa Tengah. Ikan terinfeksi (rata-rata berat sekitar 300 gr) menunjukkan gejala klinis antara lain lemah, tidak mau makan, hati pucat serta limpa dan ginjal membengkak. Sampel limpa dan ginjal dijadikan satu (*pooled sample*) dan disimpan pada suhu -86 °C sebagai sumber virus dalam pembuatan *supernatant homogenate*.

Kultur sel primer dari limpa ikan gurami

Prosedur kultur sel dan subkultur dilakukan seperti yang dijelaskan oleh Huang *et al.* (2009) dan Kawato *et al.* (2017) dengan sedikit modifikasi. Ikan gurami sehat diperoleh dari lokasi budidaya ikan di Citayam Jawa Barat. Limpa sebanyak 50 gram, yang telah diuji *polymerase chain reaction/PCR* bebas dari infeksi *megalocytivirus*, dikoleksi secara aseptik kemudian dipindahkan ke cawan petri steril yang berisi medium *Leibovitz-15* (L-15, Gibco/BRL Life Technologies) dengan tambahan 10x *antibiotic-antimikotic* (*anti-anti*, Gibco/BRL Life Technologies). Jaringan tersebut dipotong menjadi berukuran sekitar 1x1 mm² menggunakan gunting steril, kemudian direndam dalam larutan 10x *anti-anti*

sebanyak 3 kali masing-masing selama 10 menit. Potongan jaringan (*explants*) tersebut dipindahkan ke cawan petri baru yang steril dan direndam dalam larutan 0.25% *trypsin*-EDTA (*Trypsin-Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*, Gibco/BRL Life Technologies) selama 15 menit, kemudian disentrifugasi pada 1500xg selama 10 menit pada 4 °C. Pelet diresuspensi dalam medium pertumbuhan L-15 dengan 20% serum (*Fetal Bovine Serum*/FBS, Gibco/BRL Life Technologies) dan 1x *anti-anti*, kemudian dipindahkan ke dalam *flask* kultur berukuran 25cm² (*Nunc*) pada suhu 37 °C. Setengah volume dari medium diganti setiap 5 hari dengan medium baru selama 2 minggu.

Pengamatan pertumbuhan sel dan adanya kontaminasi dilakukan setiap hari menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus Life Science). Setelah terbentuk pertumbuhan sel menjadi *monolayer* yang mencapai konfluensi sekitar 80-90%, dilakukan pasase/subkultur pada sel primer dengan menggunakan larutan 0.25% *trypsin*-EDTA. Subkultur dilakukan dengan membilas sel dengan larutan PBS 1x steril (Gibco/BRL Life Technologies), lalu menambahkan larutan *trypsin*-EDTA 0.25% dan dipindahkan ke *flask* kultur sel 25cm² baru sebagai pasase-1. Sel primer disubkultur setiap minggu dengan rasio 1:2-1:3. Setelah pasase-5, konsentrasi FBS dalam medium pertumbuhan dikurangi menjadi 10%. Setelah pasase-20, sel dengan pertumbuhan yang paling stabil dipilih dan dinamakan sebagai sel GPs (*gourami primary cells from spleen*). Subkultur sel primer terus dilakukan dan setiap 10 pasase sel disimpan pada suhu -86 °C dalam medium L-15 yang mengandung 20% FBS dan 10% dimetil sulfoksida (DMSO, Merck).

Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan sel primer

Sel primer ditumbuhkan dalam *flask* kultur sel berukuran 25cm² yang mengandung medium pertumbuhan 10% L-15. Sel GPs dengan kepadatan sebanyak 2x10⁵ sel/ml diinkubasi pada suhu 25 °C selama 30 menit untuk mengoptimalkan perlekatan sel, kemudian langsung diinkubasi pada suhu 17, 22, 27 atau 32 °C. Pada hari ke-3 dan ke-6 pasca-inkubasi dilakukan pemanenan sel. Pengujian dilakukan secara triplo untuk setiap suhu dan perhitungan jumlah sel total dilakukan dengan menggunakan penghitung sel otomatis (Countess, Invitrogen).

Pengaruh medium kultur sel dan konsentrasi serum terhadap pertumbuhan sel primer

Penelitian dilakukan untuk menentukan medium pertumbuhan yang sesuai dan konsentrasi serum optimal bagi pertumbuhan sel primer. Dalam penelitian ini, digunakan dua medium pertumbuhan (L-15 dan GMEM/*Glasgow Minimum Essential Medium*, Gibco/BRL Life Technologies) dengan konsentrasi serum yang berbeda. Sel GPs pada kepadatan awal 2x10⁵ sel/ml ditumbuhkan dalam *flask* kultur sel berukuran 25cm² dalam medium pertumbuhan 10% L-15, kemudian diinkubasi pada suhu 27 °C selama 16-24 jam sebelum medium lama dibuang dan diganti medium dengan konsentrasi serum berbeda (5%, 10%, 15% dan 20%). Sel diinkubasi pada suhu 27 °C selama 3 hari sebelum dipanen dan sel dihitung dengan penghitung sel otomatis (Countess, Invitrogen). Percobaan dilakukan secara triplo untuk setiap jenis medium dan konsentrasi serum.

Isolasi virus

Untuk isolasi virus, satu gram jaringan (limpa dan ginjal) dari ikan terinfeksi alami dari wabah penyakit pada tahun 2016 dihomogenasi dengan sembilan milliliter *phosphate buffer saline* pH 7.4 (PBS, Gibco/BRL Life Technologies). Suspensi jaringan kemudian disentrifugasi pada 1500xg selama 15 menit pada 4 °C, kemudian disaring menggunakan membran filter berukuran 0.45 µm (Millipore, USA). Sel GPs dalam *flask* kultur sel berukuran 25cm² dengan konfluensi sekitar 80-90% digunakan untuk inokulasi virus. Medium pertumbuhan dibuang dan sebanyak 1 ml *filtrate homogenate* ditambahkan dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang untuk mengoptimalkan penyerapan virus. Medium pemeliharaan sebanyak 5 ml (medium L-15 dengan 2% FBS dan 1x *anti-anti*) ditambahkan, lalu diinkubasi pada suhu 25 °C. Pengamatan *cytopathic effect* (CPE) pada sel yang terinfeksi virus dilakukan setiap hari. Setelah 10 hari, medium kultur sel yang mengandung virus dipanen lalu diinokulasikan kembali ke kultur sel baru (pasase virus ke-2) selama 5-7 hari. Supernatan virus pada pasase virus ke-3 dipanen dengan cara sentrifugasi pada 1500xg selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan virus disimpan dalam *cryotube* pada suhu -86 °C untuk digunakan pada uji patogenisitas virus.

Suseptibilitas kultur sel primer terhadap virus dari ikan gurami

Sel primer dalam 25cm² *flask* kultur dengan konfluensi 80-90% digunakan dalam penelitian ini. *Cryotube* berisi supernatan virus dikeluarkan dari -86°C dan dibiarkan pada suhu ruang. Setelah medium pertumbuhan dibuang, sebanyak 1 ml dari supernatan virus tersebut diinokulasikan pada kultur sel primer dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang untuk penyerapan virus. Medium pemeliharaan (2% medium L-15) sebanyak 5 ml ditambahkan dan sel diinkubasi pada suhu 25 °C. Percobaan suseptibilitas kultur sel primer terhadap virus ini dilakukan secara duplo. Pengamatan sel dilakukan setiap hari dan supernatan kultur sel sebanyak 200 µl dikoleksi pada 24, 72, 120, 168, 240 dan 360 jam pasca-inokulasi virus lalu disimpan pada suhu -86 °C untuk uji deteksi virus secara kuantitatif menggunakan *quantitative PCR* (qPCR).

Patogenisitas virus pada ikan gurami

Gurami sehat dengan rata-rata bobot 62.7±16.2 g dan panjang 15.62 ± 1.32 cm digunakan dalam penelitian ini. Ikan dipelihara dalam bak *fiber* berukuran 500 liter dengan aerasi pada suhu 25-30 °C. Ikan diberi pakan komersial dan dipelihara sedikitnya tiga minggu sebelum pengujian untuk proses aklimatisasi. Total sebanyak 90 ekor ikan gurami sehat digunakan dan dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kontrol, perlakuan injeksi dan perlakuan kohabitasi. Masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor ikan uji dengan tiga ulangan. Pada kelompok injeksi, ikan di injeksi secara *intraperitoneal* dengan 0.2 ml supernatan virus, sementara pada kelompok kontrol, ikan diinjeksi secara *intraperitoneal* dengan 0.2 ml medium L-15. Uji lainnya dengan injeksi *intraperitoneal* dengan menggunakan beberapa pengenceran dari konsentrasi stok virus (10⁻¹ – 10⁻³). Pengamatan

dilakukan setiap hari terhadap munculnya gejala klinis, perubahan tingkah laku dan mortalitas ikan uji selama 21 hari.

Analisis PCR dan *quantitative* PCR (qPCR)

konfirmasi agen penyebab infeksi yang disebabkan oleh *megalocytivirus*, dilakukan dengan analisis PCR dan ekstraksi DNA dari sampel jaringan (limpa dan ginjal sebanyak 25 mg) ikan uji yang mengalami mortalitas. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan reagen DNAzol (Invitrogen, Life Technologies) sesuai protokol yang diberikan, kemudian DNA yang diperoleh digunakan sebagai DNA *template*/cetakan untuk deteksi *megalocytivirus*. Primer *forward* dan *reverse* (Kurita *et al.* 1998) disusun dari genom DNA *red sea bream iridovirus* (RSIV) dengan target berat molekul 570 bp. Pasangan primer *forward* terdiri dari 1F: 5'CTGAACACTCTGGCTCATC'3 dan primer *reverse* 1R: 5'GCACCAACACATCTCCTATC'3. Analisis PCR untuk melihat originalitas sel primer juga dilakukan. Total RNA diisolasi dari sel GPs menggunakan reagen TRIzol (Invitrogen, Life Technologies) sesuai protokol yang diberikan. Pasangan primer *degenerate* yang terdiri dari primer *forward* ActB-F: 5'-CAGGTATTGTCATGGACTACGAT-3' dan primer *reverse* ActB-R: 5'-ACACTTCATGATGCTGTTGTAGGT-3' digunakan untuk mengamplifikasi *fragment* gen mRNA dari *beta-actin Osphronemus goramy* (*Accession number* KT359533.1) dengan target berat molekul 410 bp. *Complementary* DNA (cDNA) dilakukan dengan menggunakan Rever TraAce® qPCR RT-Master mix dengan gDNA *remover* (Toyobo) sesuai protokol.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Go Tag Green Master Mix* 2x (Promega) dengan total reaksi sebanyak 25 µl yang mengandung 12.5 µl *Go Tag* DNA *polymerase reaction buffer* (pH 8.5), dNTPs (masing-masing sebanyak 400 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl₂ (3 mM); masing-masing 1 µl *Reverse* dan *Forward primers* 10 pMol; 8,5 µl *nuclease-free water*, dan 2 µl *template* DNA. Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan *thermal cycler* (MJ Research) dengan program siklus amplifikasi sebagai berikut: 94 °C selama 30 detik, 58 °C selama 60 detik dan 72 °C selama 60 detik (sebanyak 30 siklus) dan dilanjutkan pada 72 °C selama tujuh menit. Analisis hasil amplifikasi dilakukan dengan melakukan elektroforesis pada 1.5% gel agarosa yang mengandung *ethidium bromide*, yang selanjutnya divisualisasikan dan didokumentasikan di bawah sinar UV (GelDoc).

Analisis qPCR dari jumlah *copy* DNA virus di dalam sel GPs dilakukan menggunakan StepOnePlus *machine Real-time PCR System* (Applied Biosystems, USA) dan untuk reaksi qPCR digunakan SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline). Amplifikasi secara *real-time* dilakukan secara duplo pada 96-well *plate* menggunakan medium kultur sel yang dikoleksi pada 24, 72, 120, 168, 240 dan 360 jam pasca-inokulasi virus, *standard* (kontrol positif) dan *non template control* (NTC) sebagai kontrol negatif. Pasangan primer *forward* dan *reverse* 1F/1R (Kurita *et al.* 1998), dan kontrol positif digunakan pengenceran serial 10x dari plasmid (10⁴, 10³, 10² *copies/µl*). Reaksi yang digunakan sebanyak 20 µl terdiri dari 10µl SYBR *master mix*, 0.5 µl masing-masing primer (20 pmol), 7 µl *nuclease-free water* dan 7 µl *template* DNA. Program siklus amplifikasi untuk reaksi qPCR sebagai berikut: siklus pre-inkubasi pada 95 °C selama 10 menit, 40 siklus (denaturasi dan

annealing) pada 95 °C selama 15 detik dan 60 °C selama 60 detik; dan tahap *melting curve* pada 95 °C selama 15 detik, 60 °C selama 60 detik dan 95 °C selama 15 detik.

Analisis data

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan program *Microsoft Exel 2011*. Data jumlah sel total dari beberapa kelompok pada uji pengaruh perbedaan suhu, medium dan konsentrasi serum terhadap pertumbuhan sel dibandingkan menggunakan analisis *one-way of variance* (ANOVA) dengan *Software Minitab* versi 16. Hasil analisis dengan perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf kepercayaan 95%.

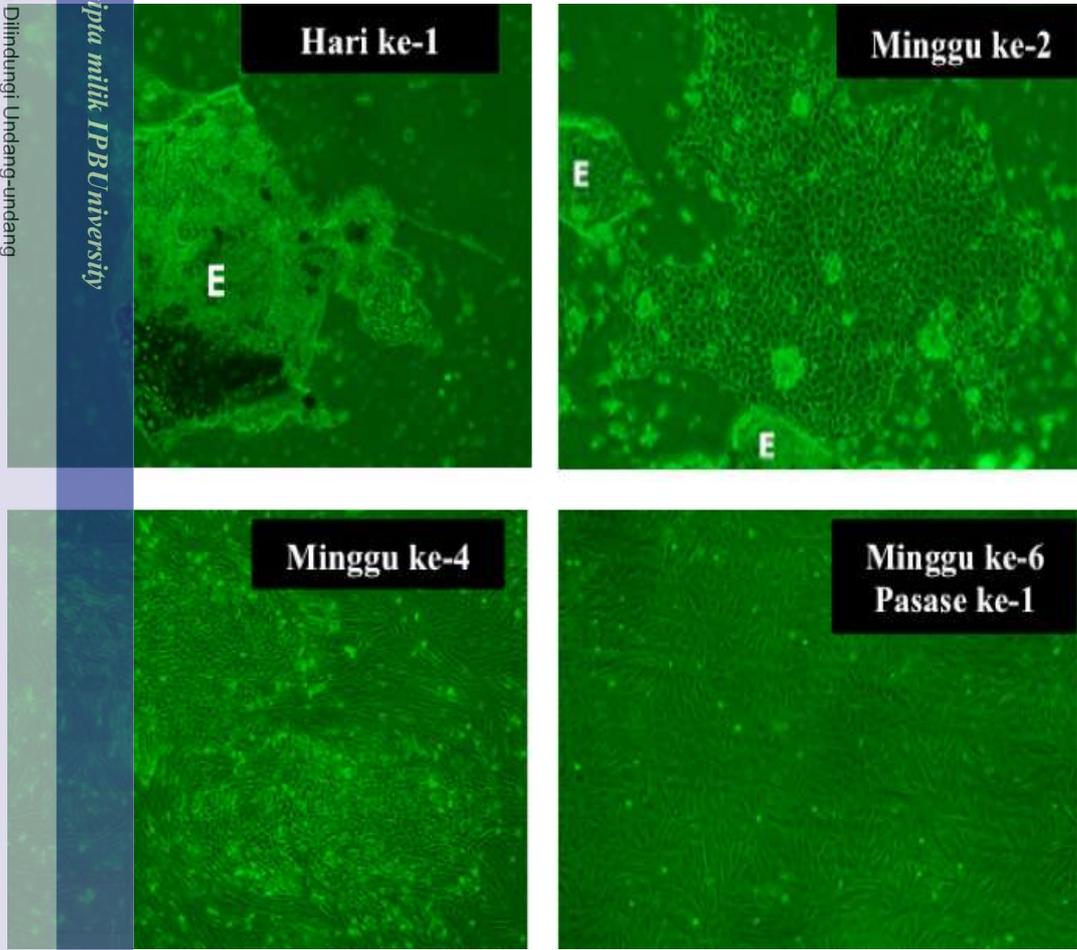
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sel GF tidak rentan terhadap infeksi GGIV (*megalocytivirus* yang diisolasi dari ikan gurami). Hal ini diketahui dari beberapa usaha yang telah dilakukan untuk mengisolasi virus dari ikan gurami yang terinfeksi tidak berhasil (data tidak ditampilkan). Kultur sel yang dibuat dari inang dengan spesies yang sama atau dekat kekerabatannya cenderung memiliki sensitivitas dan kerentanan tinggi terhadap infeksi virus tertentu (Sobhana *et al.* 2008). Dalam penelitian ini, dikembangkan sel primer dari limpa ikan gurami untuk memperbanyak *megalocytivirus* yang nantinya akan digunakan dalam pengembangan vaksin (Gambar 1). Limpa digunakan karena organ tersebut penting sebagai organ target infeksi *megalocytivirus* pada ikan (Choi *et al.* 2006; Ito *et al.* 2013). Pada sebagian besar kasus infeksi *megalocytivirus* terlihat gejala klinis berupa pembesaran limpa pada ikan mati/hampir mati (Jin *et al.* 2017). Pada pengamatan mikroskopis dari organ internal ikan yang terinfeksi menunjukkan ditemukannya sel-sel hipertrofik dengan inklusi *intracytoplasmic* basofilik (Gibson-Kueh *et al.* 2003; He *et al.* 2002).

Kultur sel primer yang berasal dari limpa ikan gurami sehat (sel GPs) telah berhasil dilakukan menggunakan metode *explants*. Sel-sel bermigrasi dari potongan jaringan limpa (*explants*) dan menempel pada permukaan *flask* kultur pada hari ke-3 pasca-inkubasi pada suhu 25 °C. Pada hari ke-6 sel mulai membentuk *monolayer* hingga mencapai konfluensi lebih dari 90% dalam waktu 3-4 minggu (Gambar 13). Sel GPs tumbuh dengan baik dan berproliferasi dengan cepat dalam medium L-15 dengan penambahan 20% FBS. Subkultur/pasase berikutnya dilakukan dengan menggunakan *split* rasio 1:2-1:3, mencapai konfluensi 100% dalam waktu 4-5 hari. Setelah 8 kali disubkultur, dilakukan pengurangan konsentrasi serum dalam medium L-15 menjadi 10%. Sel GPs tumbuh dengan baik dalam medium 10% L-15 dan sejak pertama dilakukan subkultur pada Februari 2018, kultur sel primer ini telah berhasil disubkultur lebih dari 30 kali. Pada awal subkultur, sel-sel GPs terdiri dari campuran sel-sel yang berbentuk epitel (*epithelial-like*) maupun fibroblas (*fibroblast-like*), tetapi sel berbentuk epitel menjadi lebih dominan pada subkultur sel selanjutnya. Pada penelitian ini tidak dilakukan kloning sel primer menjadi sel tunggal, sehingga sel fibroblas dan epitel masih ada dalam kultur sel primer ini (Chen *et al.* 2010). Chi *et al.* (1999) dan Lai *et al.* (2003) melaporkan bahwa sel



berbentuk seperti fibroblas lebih dominan dalam kultur sel yang berasal dari ikan. Tetapi, hal ini juga tergantung pada sel dapat berproliferasi lebih cepat misalnya sel MFF-1 yang pada tahap pasase lanjut didominasi sel berbentuk epitel. Sel MFF-1 berasal dari sirip ikan mandarin dan telah digunakan untuk memperbanyak *Megalocytivirus* (Dong *et al.* 2008).

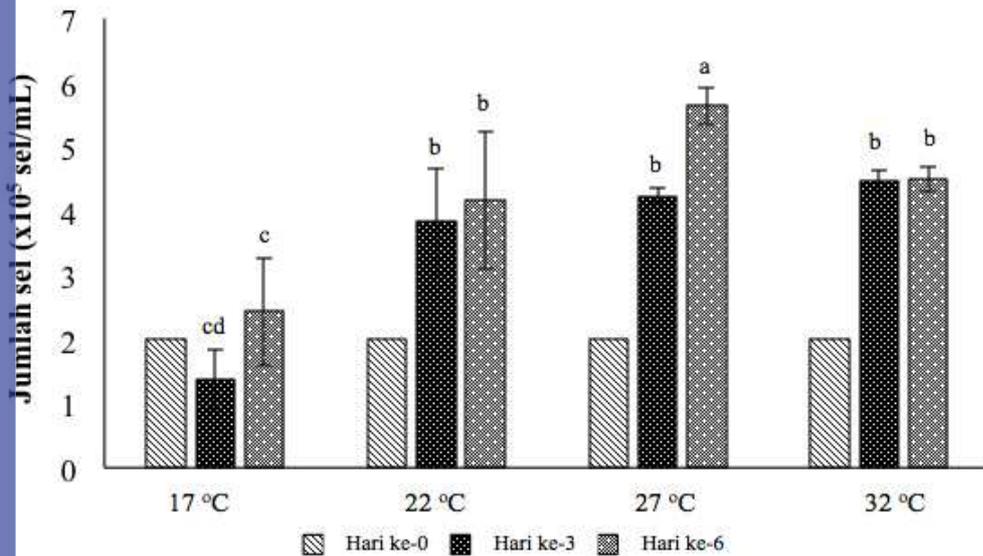


Gambar 13 Perkembangan sel GPs (*gourami primary-spleen*) yang berasal dari jaringan limpa ikan gurami sehat dengan menggunakan metode *explants* dari awal penempelan sel primer hingga mencapai *monolayer* setelah 3-4 minggu. E: *explant* (potongan limpa ikan gurami)

Sel GPs pada subkultur/pasase-15 digunakan untuk memperoleh kondisi suhu optimal untuk pertumbuhan sel *in vitro* (Gambar 14). Sel GPs mampu tumbuh dengan baik pada rentang suhu antara 22-32 °C, dengan suhu optimal pada 27 °C. Pada hari ke-6 pasca-inkubasi, pertumbuhan sel pada 27 °C memperlihatkan perbedaan nyata dibanding suhu lainnya. Pertumbuhan sel minimum teramati pada kultur yang diinkubasi pada suhu 17 °C. Menurut Nicholson *et al.* (1987), kultur sel yang mampu tumbuh pada suhu tinggi sangat cocok digunakan untuk mengisolasi virus dari ikan yang hidup di air hangat. Kultur sel ikan relatif lebih mudah dipelihara daripada kultur sel mamalia karena memiliki rentang suhu inkubasi yang

1. Dilarang melindungi Undang-undang Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

lebih besar (Lakra *et al.* 2011) dan rentang suhu inkubasi yang besar tersebut berpotensi digunakan untuk mengisolasi virus baik dari ikan yang hidup di air hangat maupun air dingin (Nicholson *et al.* 1987).



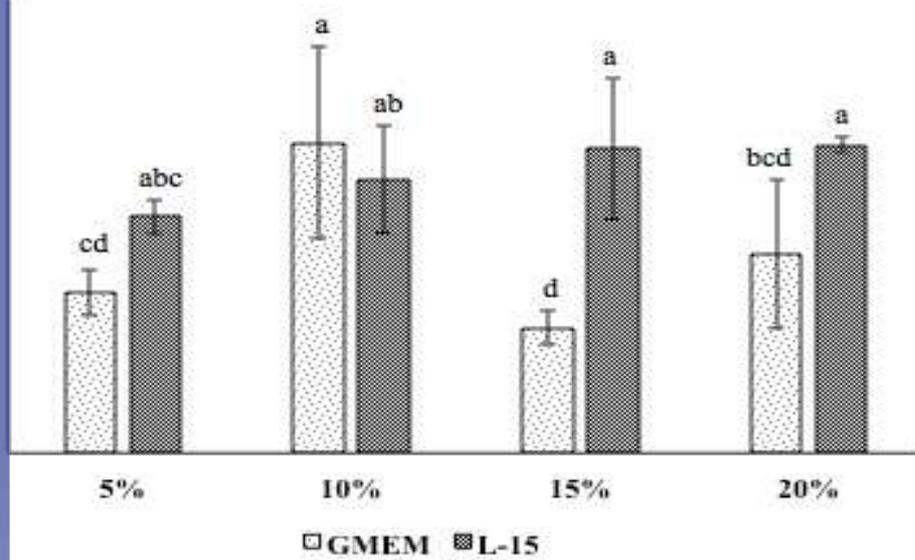
Gambar 14 Pengaruh suhu inkubasi bagi pertumbuhan optimum sel GPs (*gourami primary-spleen*) secara *in vitro*. Total sel dihitung pada hari ke-3 dan ke-6 pasca-inkubasi pada suhu yang berbeda. Huruf berbeda yang tertera di histogram menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0.05$).

Sel GPs dapat tumbuh dengan baik dalam medium L-15 maupun GMEM dengan penambahan serum (FBS) sebanyak 10% (Gambar 15). Pertumbuhan optimal diamati pada sel GPs yang ditumbuhkan dalam medium GMEM dengan penambahan 10% serum. Pertumbuhan yang hampir sama ditunjukkan pada sel GPs yang ditumbuhkan dalam medium L-15 dengan penambahan 10-20% serum. Medium pertumbuhan kultur sel umumnya menggunakan 5-20% serum, hampir tidak pernah digunakan konsentrasi yang lebih dari 20% karena konsentrasi serum yang tinggi pada akhirnya dapat menghambat pertumbuhan sel, selain faktor ekonomis yang membatasi sehingga digunakan serum dalam konsentrasi yang lebih rendah namun masih mampu mendukung pertumbuhan sel dengan cukup baik. Konsentrasi serum yang berbeda dalam medium kultur memiliki efek signifikan dalam pertumbuhan sel primer. Konsentrasi serum yang lebih tinggi dari 10% cocok pada fase awal dalam pembuatan kultur sel primer dan konsentrasi serum sebesar 5% cukup memadai bagi sel untuk dapat tumbuh dengan baik pada subkultur lebih lanjut (Sahul Hameed *et al.* 2006; Parameswaran *et al.* 2006 a, b). Untuk subkultur sel GPs berikutnya digunakan 10% serum dalam medium L-15, karena pertumbuhan dalam medium L-15 terlihat lebih stabil dibandingkan medium GMEM walaupun pada medium GMEM dengan 10% serum memperlihatkan pertumbuhan sel yang paling optimal. Medium L-15, GMEM dan beberapa medium kultur sel lainnya banyak digunakan untuk mengkultur sel ikan secara *in vitro*

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



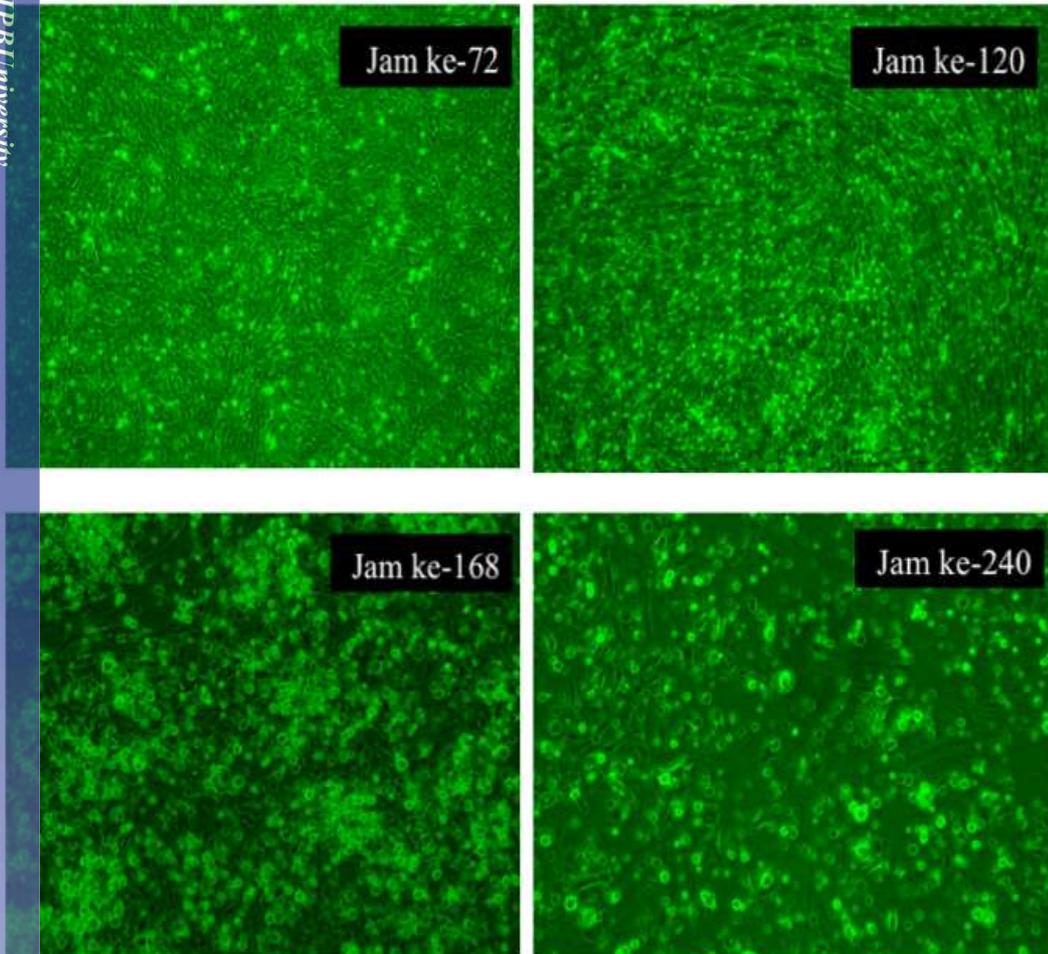
Gambar 15 Pengaruh medium kultur yang berbeda (L-15/*Leibovits-15* dan GMEM/*Glasgow minimum essential medium*) dan konsentrasi serum untuk pertumbuhan optimal sel primer dari limpa gurami (sel GPs/*gourami primary cells-spleen*). Total sel dihitung pada hari ke-3 pasca-inkubasi. Huruf berbeda yang tertera di histogram menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($P < 0.05$).

Kerentanan/suseptibilitas sel primer terhadap GGIV diamati berdasarkan munculnya *cytophatic effect* (CPE). Morfologi sel sebelum dan setelah inokulasi virus pada pada jam ke-168 pasca-inokulasi dapat dilihat pada Gambar 16. Perubahan pada sel GPs yang terlihat seperti CPE mulai teramati dalam waktu 72 jam pasca-inokulasi. CPE lebih lanjut teramati antara 120-168 jam pasca-inokulasi dimana terjadi peningkatan jumlah sel yang membesar dan membulat, sel-sel mulai terlepas dari substrat dan memberikan tampilan berkilau pada pengamatan dengan fase kontras mikroskop *inverted*. Sel GPs yang terinfeksi terlepas seluruhnya dari substrat/dasar *flask* kultur dalam waktu 10-21 hari. Hasil pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Dong *et al.* (2008) yang menggunakan sel MFF-1 yang diinfeksi ISKNV dimana sel yang menyusut dan membulat teramati setelah 1-2 hari pasca-inokulasi. Jumlah sel yang membulat terus meningkat hingga 3 hari pasca-inokulasi dan akhirnya mulai pecah pada hari ke-5 pasca-inokulasi. Oh dan Nishizawa (2016) menunjukkan bahwa sel RoBE-4 yang berasal dari embrio *rock bream* (*Oplegnathus fasciatus*) rentan terhadap RSIV. Sel RoBE-4 menunjukkan

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

CPE berupa perubahan sel menjadi berbentuk bulat pada 2-3 hari pasca-inokulasi RSIV.

Amplifikasi gen *beta-actin* menghasilkan pita DNA pada target berat molekul 410 bp. Hasil sekuensing DNA dan analisis nukleotida (BLASTN) menunjukkan bahwa sekuens *beta-actin* yang teramplifikasi dari sampel sel GPs memiliki kemiripan 99% dengan sekuens referensi dari *Osphronemus goramy* yang ada di *GeneBank* (*Accession number* KT359533.1). Hasil uji ini mengkonfirmasi bahwa sel GPs berasal dari ikan gurami (Gambar 17).



Gambar 16 Pengamatan *cytopathic effect* (CPE) pada sel primer dari limpa ikan gurami (sel GPs, *gourami primary cells-spleen*) beberapa jam setelah inokulasi *giant gourami iridovirus* (GGIV) yang diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted* pembesaran 400x (atas) dan 1000x (bawah)

Sel GPs rentan/suseptibel terhadap GGIV seperti yang terlihat pada hasil analisis qPCR menggunakan primer spesifik yang dikembangkan oleh Kurita et al. (1998). Hasil analisis qPCR dan adanya CPE pada kultur sel yang diinokulasi virus mengkonfirmasi potensi sel primer ini untuk mengisolasi dan

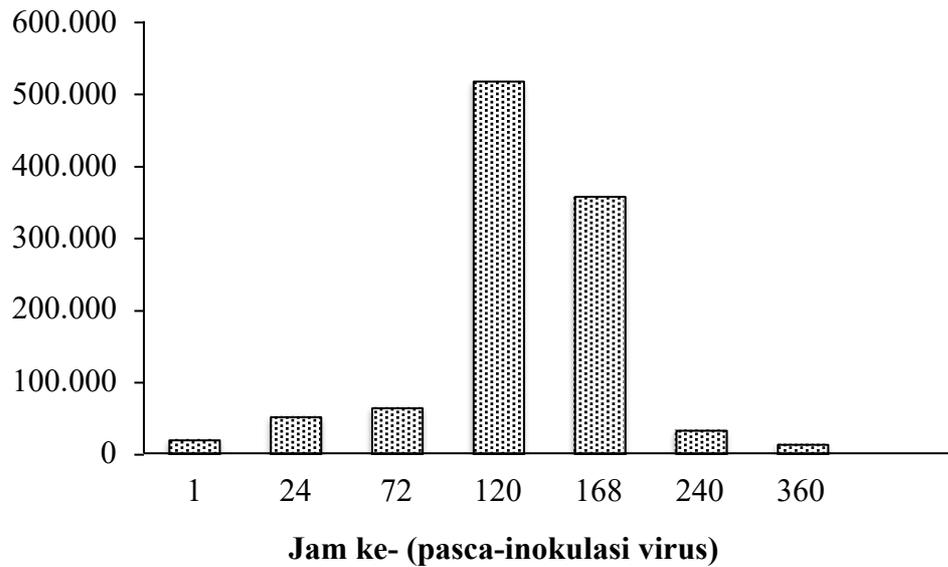


mempropagasi/perbanyak GGIV. Pada jam ke-120 pasca-inokulasi virus, *copy* genom virus mencapai jumlah tertinggi dalam sel GPs dan setelah itu terus mengalami penurunan (Gambar 18). Perbanyak virus dalam sel GPs mencapai lebih dari 12 kali lipat dari jumlah awal dalam 120 jam (5 hari) pasca-inokulasi. Pola yang sama pada sel RoBE-4 yang diinokulasi dengan RSIV memperlihatkan konsentrasi virus (dalam TCID₅₀) meningkat pada 3 hari pasca-inokulasi dan menurun setelah 5 hari (Oh dan Nishizawa 2016).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
747 bit (404)	0.0	408/410(99%)	0/410(0%)	Plus/Plus
Query 2	CAGGTATTGTCATGGACTACGATGATGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTACGAGGGCT	61		
Sbjct 192	CAGGTATTGTCATGGACTACGATGATGGTGTGACCCCTCACAGTGCCCATCTACGAGGGCT	251		
Query 62	ATGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCTGGCCGTGACCTCACAGACTACC	121		
Sbjct 252	ATGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCTGGCCGTGACCTCACATACTACC	311		
Query 122	TCATGAAGATCCTGACGGAGCGTGGCTACTCCTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATTG	181		
Sbjct 312	TCATGAAGATCCTGACGGAGCGTGGCTACTCCTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATTG	371		
Query 182	TGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCA	241		
Sbjct 372	TGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCA	431		
Query 242	CTGCTGCCTCTTCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCCGACGGACAGGTCATCA	301		
Sbjct 432	CTGCTGCCTCTTCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCCGACGGACAGGTCATCA	491		
Query 302	CCATTGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCTTCTCGGTA	361		
Sbjct 492	CCATTGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCTTCTCGGTA	551		
Query 362	TGGAGTCTGCGGAATCCACGAGACCACCTACAACAGCATCATGAAGTGT	411		
Sbjct 552	TGGAGTCTGCGGAATCCACGAGACCACCTACAACAGCATCATGAAGTGT	601		

Gambar 17 Identifikasi asal sel GPs menggunakan uji PCR. Amplifikasi gen mRNA *beta-actin* dari sel GPs menunjukkan kemiripan sebesar 99% dengan sekuens referensi *Osphronemus goramy* di *GeneBank*. *Query*: sekuens DNA ikan gurami pada penelitian ini, *Sbjct*: sekuens DNA *Osphronemus goramy* (*accession number* KT359533.1).

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

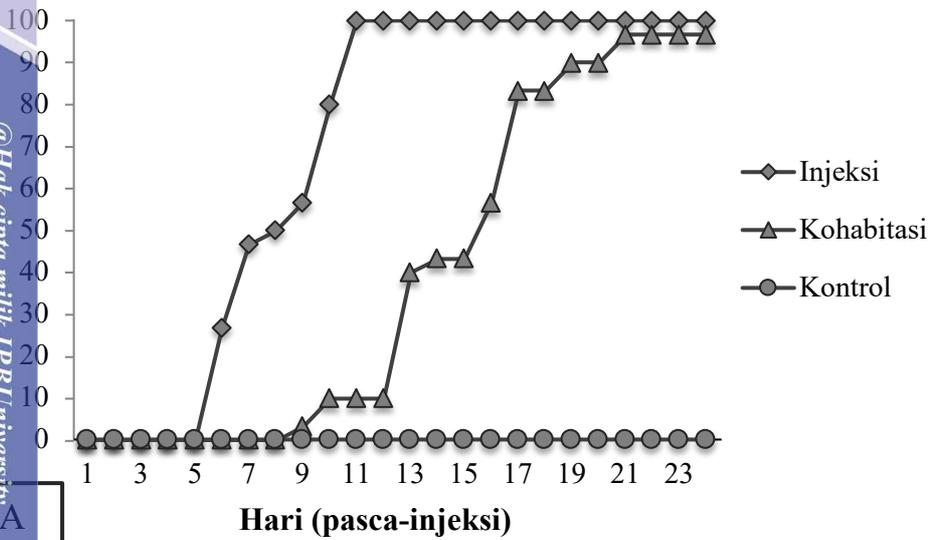


Gambar 18 Deteksi kuantitatif *polymerase chain reaction* (q-PCR) jumlah *copy* genom virus dalam sel primer dari limpa ikan gurami (sel GPs) beberapa jam pasca-inokulasi virus.

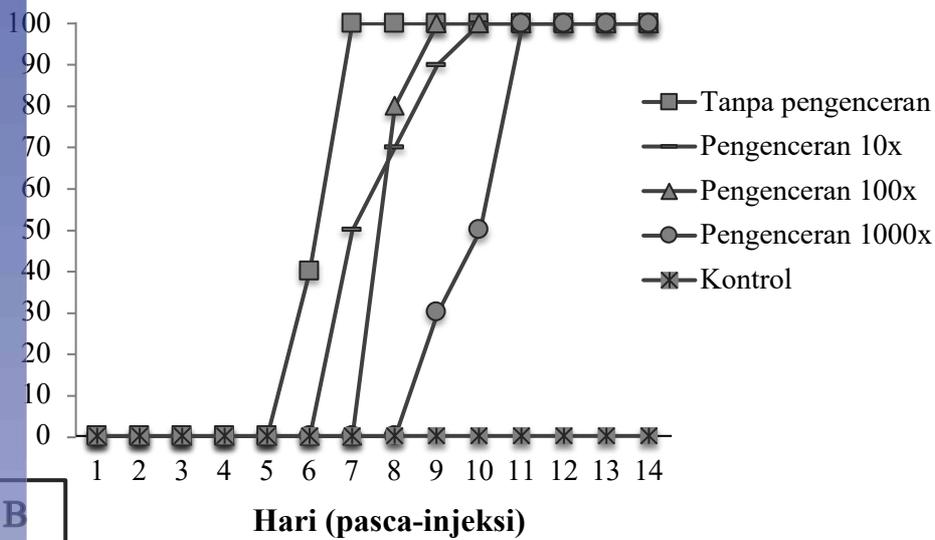
Megalocytivirus yang diperbanyak dalam sel GPs tetap virulen ketika diinfeksi pada ikan gurami dalam percobaan infeksi buatan. Gejala klinis dan mortalitas ikan uji lebih cepat teramati pada ikan uji yang diinfeksi dengan metode injeksi secara *intraperitoneal* (ip) dibandingkan dengan metode kohabitasi. Gejala klinis pada ikan uji kelompok injeksi mulai terlihat pada hari ke-3 pasca-infeksi, mortalitas mulai teramati pada hari ke-6 pasca-infeksi dan mencapai mortalitas 100% dalam waktu 11 hari pasca-infeksi. Pada kelompok kohabitasi, mortalitas mulai terjadi pada hari ke-9 pasca-infeksi dan mencapai mortalitas 97% dalam 21 hari (Gambar 19A). Percobaan lain menunjukkan ikan uji yang diinjeksi dengan supernatan virus tanpa pengenceran mengalami gejala klinis dan mortalitas lebih awal daripada kelompok lain yang diinjeksi supernatan virus dengan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} . Mortalitas 100% pada ikan uji yang diinjeksi pada semua perlakuan terjadi dalam waktu 7-11 pasca-infeksi (Gambar 19B). Hasil yang hampir sama teramati pada RISV yang diperbanyak pada sel RoBE-4. Virus yang dikoleksi dari supernatan kultur sel sangat virulen dan menghasilkan mortalitas 100% pada ikan *rock bream* dalam waktu 9-13 hari pasca-infeksi (Oh dan Nishizawa 2016). ISKNV yang diinjeksikan pada ikan mandarin menghasilkan mortalitas mulai hari ke-4 pasca infeksi dan mortalitas 100% terjadi dalam waktu 7-11 hari pasca infeksi pada kelompok yang diinjeksi dengan pengenceran supernatan virus (Dong *et al.* 2008).



Mortalitas kumulatif (%)
@Hak cipta milik IPB University
A

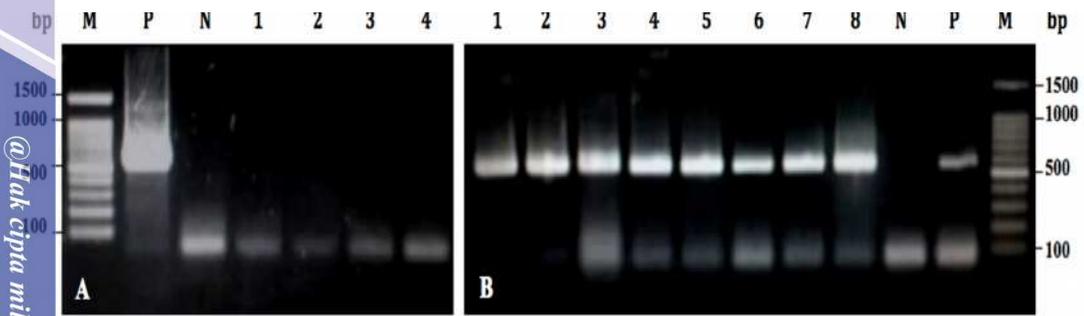


Mortalitas kumulatif (%)
B



Gambar 19 Mortalitas kumulatif dari percobaan infeksi buatan dengan injeksi secara *intraperitoneal* dan kohabitasi (A) serta ikan uji diinjeksi *intraperitoneal* dengan pengenceran serial dari supernatan virus yang diperbanyak pada sel GPs (B).

Hasil analisis PCR dari ikan yang mengalami mortalitas/hampir mati dari kelompok kontrol dan perlakuan (injeksi dan kohabitasi) menunjukkan positif terinfeksi *megalocytivirus*. Dari hasil percobaan infeksi buatan ini, *megalocytivirus* terbukti sebagai agen penyebab mortalitas ikan uji (Gambar 20).



Gambar 20 Hasil elektroforesis gel agarosa pada uji PCR dengan menggunakan primer spesifik dengan berat target molekul 570 bp untuk mengidentifikasi *megalocytivirus*. M: DNA ladder 100 bp (Promega), P: kontrol positif, N: kontrol negatif, baris: 1-4 sampel kelompok kontrol (A) dan baris: 1-4 sampel kelompok injeksi dan baris 5-8: sampel kelompok kohabitasi (B)

SIMPULAN

Kultur sel primer (sel GPs) telah berhasil dikembangkan dari limpa ikan gurami dan saat ini telah dipasase lebih dari 30 kali. Sel GPs rentan/suseptibel terhadap infeksi GGIV (*megalocytivirus* dari ikan gurami) dan virus yang diperbanyak dalam sel primer ini tetap virulen dan dapat menyebabkan infeksi pada ikan gurami. Selanjutnya sel primer ini akan dipelajari lebih lanjut potensinya sebagai kandidat kultur sel dalam pengembangan vaksin.

SARAN

Pada tahap II penelitian ini perlu dilakukan pencegahan kontaminasi dan preservasi kultur sel primer yang dilakukan melalui penyimpanan beku pada suhu -80°C . Optimasi konsentrasi *dimethyl sulfoxide* (DMSO) dalam media penyimpanan sel perlu dilakukan agar sel yang dibekukan dapat bertahan hidup dan mampu berploriferasi pada saat ditumbuhkan kembali.

infections are still difficult to do. *Megalocytivirus* is pathogenic agent which cause mass mortalities in various species in freshwater, seawater aquaculture and ornamental fish. This virus caused more than 90% mortality in two weeks and had caused great losses among giant gourami farmers. The purpose of this study was to develop an effective vaccine and measure its efficacy using relative percent survival (RPS), serological parameters (antibody titers), and molecular (relative expression of gourami immune genes). The virus was propagated in GPs cell cell and produced virus titer of $10^{5.9}$ TCID₅₀/ml. Virus inactivation was carried out using two methods (heat-killed and formalin-killed). Vaccination in giant gourami by intraperitoneal injection for three weeks of vaccine induction period and challenge test was done by cohabitation method. The experimental results show RPS value 17.7-73.3% wherein formalin-killed vaccine results in a higher value. Viral accumulation in fish spleen in formalin-killed vaccine trials was lower than in the heat-killed and control vaccine groups which has higher chances of survival due to viral infection. Differential leukocyte after challenge test showed a decrease in percentage of lymphocytes, increase in percentage of monocytes and neutrophils, but no significant differences were observed between treatments. Formalin-killed vaccine showed an increased of antibody titer started on the 7th day post-vaccination and decreasing after 14th day. Increased antibody titer was observed 7th day post-challenge test. Immune gene expression has increased in formalin-killed vaccine group which showed that administration of the formalin-killed vaccine induced expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and increased expression of MyD88 gene that plays a role in activation of signal transduction of Toll-Like Receptor (TLR) pathway. In conclusion, formalin-killed vaccine gave high efficacy which showed in higher protection from viral infection after challenge test, higher RPS value and increased antibody titer and expression of immune genes after challenge test.

Keyword: inactivated-vaccine, *megalocytivirus*, *O. goramy*, vaccine efficacy

PENDAHULUAN

Pesatnya ekspansi dan intensifikasi budidaya perikanan menimbulkan banyak munculnya kasus wabah penyakit. Penyakit infeksi antara lain disebabkan oleh bakteri (54.9%) kemudian virus (22.6%), parasit (19.4%) dan jamur (3.1%). Infeksi virus pada umumnya menyebabkan tingkat kematian yang tinggi, namun meskipun demikian belum ada metode pengobatan yang cukup efektif untuk mengatasi masalah tersebut. Pencegahan menjadi pilihan yang lebih baik daripada pengobatan walaupun usaha pencegahan dan pengendalian penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus sampai saat ini masih sulit dilakukan. Hal ini disebabkan kurangnya obat anti-virus dan tingkat kesulitan yang tinggi dalam pengembangan vaksin virus (Shefat 2018; Hazreen-nita *et al.* 2019). Pengendalian penyakit bakterial pada usaha budidaya masih banyak menggunakan antibiotik walaupun menimbulkan efek samping yang kurang baik terhadap lingkungan. Salah satu alternatif untuk mengatasi wabah penyakit dan mengurangi pemakaian antibiotik antara lain dengan melakukan usaha pencegahan melalui vaksinasi. Vaksinasi juga merupakan usaha

pengendalian infeksi virus yang efektif dan telah terbukti menurunkan prevalensi serta meminimalkan infeksi penyakit pada ikan (Ou-yang *et al.* 2012; Sivasankar *et al.* 2017). Vaksinasi telah menjadi bagian dari proses budidaya ikan (Evensen 2009; Plant dan LaPatra, 2011; Sommerset *et al.* 2005; Thorarinsson dan Powell 2006) karena keberhasilan eradikasi patogen secara total hampir tidak mungkin terjadi. Pengembangan aplikasi vaksin berbasis kultur sel merupakan metode yang telah lama digunakan, namun masih efektif untuk pencegahan dan pengendalian penyakit yang disebabkan infeksi virus (Sommerset *et al.* 2005).

Megalocytivirus merupakan patogen yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan budidaya air tawar, air laut dan ikan hias air sehingga berdampak pada timbulnya kerugian besar pada proses budidaya. Virus ini memiliki kemampuan menginfeksi berbagai inang baik pada air tawar maupun air laut sehingga berpotensi tinggi dalam menularkan infeksi ke spesies lain (Go *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007; Jeong *et al.* 2008). Di Indonesia sejak tahun 2009, kasus infeksi *megalocytivirus* telah dilaporkan terjadi pada ikan hias air tawar *dwarf gourami* (*Colisa lalia*) di daerah Jakarta. *Megalocytivirus* dilaporkan menyerang ikan gurami (*Osphronemus goramy*) yang dibudidayakan di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Bali sejak 2011 – 2013 (Koesharyani *et al.* 2009; 2013).

Isolat *megalocytivirus* yang diisolasi pada akhir tahun 2016 berasal dari wabah penyakit pada lokasi budaya ikan gurami di Banyumas-Jawa Tengah. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan *giant gourami iridovirus* (GGIV) tersebut merupakan spesies baru dari *infectious spleen and necrosis virus* (ISKNV) yang menyerang ikan gurami (Sukenda *et al.* 2020). Pada saat kejadian wabah penyakit, infeksi virus menimbulkan kematian lebih dari 90% hanya dalam waktu dua minggu dan menyebabkan kerugian yang besar di kalangan pembudidaya ikan gurami. Percobaan infeksi buatan melalui injeksi secara *intraperitoneal supernatant homogenate* limpa dan ginjal ikan terinfeksi dari lokasi wabah menghasilkan mortalitas 93% dalam waktu 12 hari. Kultur sel primer dari limpa ikan gurami (sel GPs) yang dikembangkan sebagai media perbanyakan GGIV suseptibel terhadap virus tersebut. GGIV yang diperbanyak pada sel GPs tetap mempertahankan virulensinya. Hasil infeksi buatan menggunakan supernatan virus dengan pengenceran secara injeksi *intraperitoneal* menghasilkan mortalitas 100% dalam waktu 7-11 hari. Sedangkan infeksi buatan melalui kohabitasi menghasilkan mortalitas 97% dalam waktu 21 hari (Gardenia, *unpublish*)

Walaupun kasus infeksi *megalocytivirus* pada ikan gurami masih relatif baru, namun pengembangan vaksin untuk pencegahan penyakit ini perlu dilakukan. Hal ini dimaksudkan sebagai langkah antisipasi agar infeksi virus ini tidak berkembang menyebar ke wilayah budidaya ikan gurami lain di Indonesia dan mencegah infeksi virus ini ke spesies lain yang rentan. Virus ini berpotensi tinggi dalam menimbulkan masalah penyakit di masa datang, seperti yang telah terjadi pada *red seabream iridovirus* (RSIV), salah satu spesies *megalocytivirus*, yang menyerang budidaya ikan laut seperti ikan kerapu dan ikan kakap di Indonesia. Hal ini menjadikan perlu adanya tindakan pencegahan melalui pengembangan vaksin sebagai salah satu upaya pengendalian virus tersebut. Vaksinasi sebagai salah satu solusi aplikatif menjadi sangat diperlukan dalam budidaya untuk pencegahan terjadinya wabah dan penyebaran penyakit potensial pada perikanan budidaya. Penggunaan vaksin menjadi alternatif yang aman, ramah lingkungan dan efektif dalam meningkatkan ketahanan ikan dalam melawan agen penyakit. Pencegahan penyakit melalui

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang memungut dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

vaksinasi diharapkan dapat meningkatkan produksi perikanan budidaya, melalui penurunan tingkat mortalitas akibat infeksi patogen potensial.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan vaksin inaktif dan mengukur efektivitas vaksin menggunakan nilai *relative percent survival* (RPS), parameter serologi (titer antibodi), dan molekuler (ekspresi relatif gen imunitas ikan gurami).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan November 2018 - April 2019 di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok, Jawa Barat. Pengujian titer antibodi dilakukan di Laboratorium Kesehatan Organisme Akuatik-FPIK, Institut Pertanian Bogor (IPB).

Ikan Uji

Ikan gurami sehat dengan rata-rata bobot awal 62.77 ± 16.22 g dan panjang awal 15.62 ± 1.32 cm digunakan untuk percobaan efikasi vaksin. Ikan gurami diperoleh dari lokasi budidaya ikan di Citayam Jawa Barat. Ikan dipelihara dalam wadah berukuran 500 liter dengan aerasi dan suhu air dijaga pada kisaran 25-30 °C dengan menggunakan pemanas air. Pemberian pakan komersial (Charoen Phokphand Prime Indonesia) dilakukan dua kali sekali pagi dan sore. Ikan diaklimatisasi terlebih dahulu pada kolam percobaan minimal selama tiga minggu sebelum perlakuan. Pengecekan status kesehatan ikan gurami khususnya *megalocytivirus* dilakukan dengan menggunakan uji PCR dengan primer spesifik (Kurita dan Nakajima, 2012).

Virus

Megalocytivirus yang digunakan merupakan isolat dari ikan gurami terinfeksi pada wabah penyakit di Banyumas (Jawa Tengah). Isolat diperbanyak pada kultur sel primer GPs (*Gourami Primary cell-spleen*) menggunakan medium *Leibovits-15* (L-15, Gibco/BRL Life Technologies) yang diperkaya dengan 2% *Fetal Bovine Serum* (FBS, Gibco/BRL Life Technologies) dan 1% *antibiotic-antimycotic* (anti-anti, Gibco/BRL Life Technologies). Supernatan virus disimpan pada suhu -86°C untuk digunakan dalam pembuatan vaksin.

Persiapan antigen untuk uji serologi

Persiapan antigen untuk analisis protein utuh menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS–PAGE) dan *indirect-enzym-linked immunosorbent assay* (i-ELISA) dilakukan berdasarkan Song *et al.* (2004) dengan sedikit modifikasi. Virus dikeluarkan dari penyimpanan pada suhu -86 °C, lalu disentrifugasi pada 4.500xg selama 30 menit pada 4 °C untuk mengendapkan debris sel. Supernatan dikoleksi kemudian untuk mengendapkan virus dilakukan



ultrasentrifugasi pada 100.000xg selama satu jam pada 4 °C (Hitachi CS 150NX dengan S50A-2002 rotor). Pelet diresuspensi dalam PBS steril kemudian dilewatkan melalui *gradient* sukrosa pada konsentrasi 30, 40, 50 dan 60% pada 200.000xg selama 1 jam pada 4 °C. Pita virus pada 50% *gradient* sukrosa dikoleksi dan diresuspensi dengan PBS sebelum dilewatkan kembali melalui *gradient* sukrosa dengan konsentrasi yang sama. Virus murni diresuspensi dalam satu milliliter PBS steril (pH 7.4). Antigen disonikasi pada 50 Hz selama lima menit kemudian dilakukan perhitungan konsentrasi protein dengan metode BCA. Konsentrasi antigen yang diperoleh sebanyak 798.4 µg/mL (Lampiran 2).

Persiapan virus untuk pembuatan vaksin

Sel primer GPs dalam 75cm² *flask* kultur dengan konfluensi 80-90% digunakan dalam penelitian ini. *Cryotube* berisi supernatan virus dikeluarkan dari -86°C dan dibiarkan pada suhu ruang. Setelah medium pertumbuhan dibuang, sebanyak 3 ml dari supernatan virus tersebut diinokulasikan ke dalam masing-masing *flask* dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang untuk penyerapan virus. Medium pemeliharaan 2% L-15/medium L-15 yang diperkaya dengan 2% FBS sebanyak 20 ml ditambahkan dan sel diinkubasi pada suhu 25 °C. Pengamatan terbentuknya *cytopathic effect* (CPE) dari sel yang terinfeksi virus dilakukan setiap hari, dan panen virus dilakukan pada hari ke-7 post-inokulasi dengan cara memisahkan sel kultur GPs dari supernatan yang mengandung virus melalui sentrifugasi pada 2.500xg selama 15 menit, 4°C.

Inaktivasi virus

Pada penelitian ini digunakan metode inaktivasi dengan formalin (*formalin-killed*) berdasarkan Nakajima *et al.* 1997 dengan sedikit modifikasi dan metode pemanasan (*heat-killed*). Supernatan virus dikoleksi sebanyak 500 mL dalam tabung berukuran 1000 mL, setelah diaduk hingga homogen suspensi tersebut dibagi menjadi dua bagian ke masing-masing tabung berukuran 500 mL dengan volume sebanyak 250 mL. Untuk pembuatan vaksin *formalin-killed*, ke dalam supernatan virus ditambahkan 0.1% formalin (v/v). Virus diinaktivasi selama 10 hari pada 4 °C. Sedangkan untuk pembuatan vaksin *heat-killed*, supernatan virus tersebut diinkubasi dalam oven dengan suhu 60 °C selama 90 menit lalu disimpan pada 4 °C. Vaksin *formalin-killed cultured-based* (FKC) dan *heat-killed cultured-based* (HKC) kemudian disimpan dalam kondisi steril pada suhu 4 °C hingga siap untuk digunakan. Sisa supernatan virus dengan konsentrasi virus yang sama dengan konsentrasi virus dalam pembuatan vaksin disimpan pada suhu -86°C untuk pengecekan dosis infeksi virus pada kultur sel dengan TCID₅₀.

Dosis infeksi virus pada kultur sel dengan TCID₅₀

Penentuan dosis tersebut dilakukan pada supernatan virus untuk pembuatan vaksin maupun virus yang digunakan untuk uji tantang dilakukan dengan menggunakan cawan kultur 96-well. Kultur sel GPs ditumbuhkan pada 96-well plates, kemudian diinfeksi virus dengan pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ dan 10⁻⁶, tanpa pengenceran sebagai kontrol positif dan tanpa diinfeksi virus

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

sebagai kontrol negatif dengan 12 duplikasi. Kultur diinkubasikan pada 25 °C dan pengamatan atas ada/tidaknya CPE dilakukan hingga hari ke-14 (H14) post-infeksi. Perhitungan TCID₅₀ dilakukan berdasarkan metode Reed dan Muench (1938) sebagai berikut:

$$\frac{50\% - \% \text{ positif pada pengenceran di bawah } 50\%}{\% \text{ positif pada pengenceran di atas } 50\% - \% \text{ positif pada pengenceran dibawah } 50\%}$$

Uji keamanan vaksin secara *in vitro* dan *in vivo*

Uji ini dilakukan pada kedua jenis vaksin setelah selesai proses inaktivasi virus untuk mengetahui keamanannya pada kultur sel GPs dan ikan uji. Sebanyak satu mililiter vaksin *formalin-killed* dan *heat-killed* masing-masing diinokulasi pada *flask* kultur 25cm² (duplo) selama satu jam pada suhu ruang sebelum ditambah medium 2% L-15 sebanyak lima mililiter. Pengamatan adanya CPE dilakukan selama 14 hari sebelum direinokulasi pada kultur sel baru. Vaksin dianggap aman apabila tidak teramati adanya CPE pada pasase ke-2. Uji keamanan vaksin secara *in vivo* dilakukan dengan menginjeksi secara *intraperitoneal* (ip.) ikan gurami sebanyak 10 ekor menggunakan masing-masing jenis vaksin sebanyak 0.2 mL/ekor dan sebagai kontrol digunakan 10 ekor ikan gurami yang diinjeksi dengan PBS steril. Vaksin dianggap aman apabila tidak ditemukan adanya ikan yang mengalami gejala klinis terinfeksi virus dan mortalitas setelah 21 hari pasca-injeksi vaksin.

Vaksinasi ikan uji

Penelitian dilakukan dengan 3 kelompok yaitu kontrol dan perlakuan masing-masing menggunakan 90 ekor ikan uji. Sebelum dilakukan vaksinasi, dilakukan pengambilan sampel darah ikan uji untuk koleksi serum awal (S0). Vaksinasi pada kelompok vaksin *formalin-killed* (FK) maupun *heat-killed* (HK) dilakukan melalui injeksi *intraperitoneal* (ip.) sebanyak 0.2 mL/ekor ikan, sedangkan kelompok uji diinjeksi sebanyak 0.2 mL/ekor ikan menggunakan PBS steril. Pada minggu ke-3 dilakukan ujiantang dengan metode kohabitasi. Pengambilan darah ikan uji dilakukan setiap minggu selama periode vaksinasi pada semua kelompok perlakuan untuk koleksi serum ikan uji.

Uji Tantang

Ujiantang dilakukan pada minggu ke-3 setelah vaksinasi menggunakan metode kohabitasi dengan ikan terinfeksi *megalocytivirus*. Perlakuan kohabitasi dilakukan dengan perbandingan ikan sehat dan sakit sebanyak 3:1. Selama satu minggu awal ujiantang, ikan sumber infeksi yang mati ditambahkan dengan ikan sakit yang baru dari stok ikan sumber infeksi. Ikan sumber infeksi diberi tanda untuk membedakan dari ikan uji. Pengambilan sampel darah dilakukan sebelum ujiantang dan setiap minggu setelah ujiantang untuk koleksi serum ikan uji pada semua kelompok perlakuan.



Pengamatan dan pengambilan data

Pengamatan dan pengumpulan data kematian ikan dilakukan selama periode vaksinasi (tiga minggu) dan selama periode ujiantang (16 hari). Ikan uji yang mati diambil dari wadah pemeliharaan dan limpa dikoleksi untuk dianalisis dengan metode PCR. Parameter yang diamati dan diukur meliputi RPS (*relative percent survival*) dan mortalitas kumulatif. RPS dihitung berdasarkan Amend (1981) dengan rumus sebagai berikut:

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{ kematian ikan yang divaksin}}{\% \text{ kematian ikan kontrol}} \right) \times 100$$

Analisis polymerase chain reaction (PCR)

Total DNA dari 25 mg sampel (limpa dan ginjal) ikan uji diekstraksi dengan menggunakan reagen DNAzol (Invitrogen) sesuai dengan protokol yang diberikan dan digunakan sebagai cetakan DNA. Primer *forward* dan *reverse* (Kurita *et al.* 1998) disusun dari genom DNA *red sea bream iridovirus* (RSIV) dengan target berat molekul 570 bp. Pasangan primer *forward* terdiri dari 1F: 5'CTCAAACACTCTGGCTCATC'3 dan primer *reverse* 1R: '5 GCACCAACACATCTCCTATC'3. DNA diamplifikasi menggunakan *Go Tag Green Master Mix 2x* (Promega) dalam total reaksi 25 µl yang mengandung: 12.5 µl *Go Tag DNA polymerase reaction buffer* (pH 8,5), dNTPs (400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP; 400 µM; 400 µM dTTP), MgCl₂ (3 mM); masing-masing 1 µl *Reverse* dan *Forward primers* 10 pMol; 8,5 µl *nuclease-free water*, dan 2 µl *template* DNA. Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan *thermal cycler* (MJ Research) dengan program siklus amplifikasi sebagai berikut: tahap denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 5 menit, kemudian dilakukan 30 kali siklus denaturasi, pada 94 °C selama 30 detik, *annealing* pada 58 °C selama 1 menit, dan elongasi pada 72 °C selama 1 menit. Terakhir dilanjutkan elongasi akhir pada 72 °C selama 5 menit. Sebagai kontrol negatif digunakan *RNase free water*. Analisis hasil amplifikasi dilakukan dengan melakukan elektroforesis pada 1,5% gel agarosa yang mengandung *ethidium bromide*. Visualisasi dan dokumentasi dilakukan bawah sinar UV (GelDoc).

Analisis quantitative PCR (qPCR)

Analisis qPCR dari jumlah *copy* DNA virus dilakukan menggunakan mesin *real-time* PCR System StepOnePlus (Applied Biosystems, USA) dan *mastermix* SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline) untuk reaksi qPCR. Primer 1F/1R dengan berat molekul target 570 bp (Kurita *et al.* 1998) digunakan dalam reaksi qPCR ini dengan susunan nukleotida sebagai berikut: 1F: 5'CTCAAACACTCTGGCTCATC'3; 1R: '5 GCACCAACACATCTCCTATC'3. Sampel RNA dikoleksi dari limpa ikan uji sebelum perlakuan (S0), limpa ikan kontrol dan ikan uji (yang telah divaksinasi dengan vaksin *formalin-killed* dan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB University

IPB University

vaksin *heat-killed* selama 21 hari) pada hari ke-4, dan 7 setelah ujiantang. RNA yang dihasilkan dirubah menjadi cDNA menggunakan *ReverTraAce*®qPCR RT-*Master mix with gDNA Remover* (Bioline) kemudian diamplifikasi secara duplo di dalam 96-well plate (Applied Biosystems, USA). Amplifikasi sampel dilakukan dengan menyertakan tiga pengenceran *standard* dari plasmid dan *non template control* (NTC) sebagai kontrol negatif. Total reaksi sebanyak 10 µl terdiri dari 5 µl SYBR *master mix*, 0.4 µl masing-masing primer (10 pmol), 2.2 µl *nuclease-free water* and 2 µl *template* DNA. Siklus reaksi yang digunakan sebagai berikut: siklus pre-inkubasi pada 95 °C selama 10 menit, 40 siklus (denaturasi dan penempelan primer) pada 95 °C selama 15 detik dan 60 °C selama satu menit, dan terakhir tahap *melting curve* pada 95 °C selama 15 detik, 60 °C selama 1 menit dan 95 °C selama 15 detik.

Analisis ekspresi gen imunitas ikan gurami

Untuk analisis ekspresi gen terkait imunitas ikan gurami digunakan qPCR, spesies spesifik primer yang didesign dari keseluruhan atau sebagian urutan cDNA referensi yang diambil dari *database* pada GenBank. Sekuen primer gen imunitas target dari ikan gurami dan kontrol gen β-aktin serta target berat molekul hasil amplifikasi disajikan pada Tabel 4 yang terdiri dari gen β-aktin gurami (*accession number* KT359533.1), IL-1β gurami (*accession number* KT884611.1), TNF-α gurami (*accession number* KT884610.1) dan MYD-88 gurami (*accession number* KT884615.1). Data berupa *Ct value* dibandingkan dalam tingkat ekspresi gen menggunakan metode *comparative 2^{-ΔΔCT}* (Livak dan Schmittgen 2001) dari hasil qPCR dengan primer spesifik untuk masing-masing gen imunitas. Sampel RNA dikoleksi dari limpa ikan uji sebelum perlakuan (S0), limpa ikan kontrol dan ikan uji (yang telah divaksinasi dengan vaksin *formalin-killed* dan vaksin *heat-killed* pada periode induksi hari ke-21) serta periode ujiantang hari ke-4 dan ke-7. RNA yang dihasilkan dirubah menjadi cDNA menggunakan *ReverTraAce*®qPCR RT-*Master mix with gDNA Remover* (Bioline) kemudian diamplifikasi secara duplo di dalam 96-well plate (Applied Biosystems, USA). Analisis dilakukan menggunakan mesin *Real-time PCR System StepOnePlus* (Applied Biosystems, USA) dan *mastermix SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit* (Bioline) untuk reaksi qPCR. Amplifikasi sampel dilakukan menggunakan total reaksi sebanyak 10 µl terdiri dari 5 µl SYBR *master mix*, 0.4 µl masing-masing primer (10 pmol), 2.2 µl *nuclease-free water* dan 2 µl *template* DNA. Siklus reaksi yang digunakan sebagai berikut: siklus pre-inkubasi pada 95 °C selama 2 menit, 45 siklus (denaturasi dan penempelan primer) pada 95 °C selama 10 detik dan 60 °C selama 10 detik, 72 °C selama 20 detik, dan terakhir tahap *melting curve* pada 95 °C selama 10 detik, 60 °C selama satu menit dan 95 °C selama 15 detik.



Tabel 4 Urutan primer untuk analisis respons gen imunitas ikan gurami

Primer	Urutan nukleotida	Amplikon
β-aktin gurami	F: 5'-ACAGGTATTGTCATGGACTACGAT-3' R: 5'-CGTCAGGATCTTCATGAGGTTAGTAT-3'	136 bp
IL-1β gurami	F: 5'-GTGGAACAACCTTCTAATCTAC-3' R: 5'-CAATGATGATGTTGACTAAG-3'	176 bp
TNF-α gurami	F: 5'-TGTCAAAGACTGAAAGTAG-3' R: 5'-CTCCATCACTGTCCTAAG-3'	114 bp
MyD88 gurami	F: 5'-CTGATTGAGAAGAGGTGTA-3' R: 5'-GTACACCACAGGGATAAG-3'	138 bp

Uji *indirect*-ELISA

Uji I-ELISA (*indirect-enzim-linked immunosorbent assay*) digunakan menurut metode Breuil & Romestand (1999) dengan sedikit modifikasi. Tahapan pengujian menggunakan metode I-ELISA sebagai berikut: antigen dilarutkan dalam 0.05 M *buffer carbonat bicarbonate* (pH 9.6) hingga mencapai konsentrasi 5 µg/mL. Antigen lalu *dicoating* pada dasar *microplate* dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama semalaman. Pencucian 3x dengan *phosphate buffer saline-tween* (0.05% PBS-T). *bovine serum albumin* (BSA) sebanyak 1% dalam PBS-T ditambahkan sebanyak 150 µL ke dalam masing-masing sumur *microplate* selama satu jam pada suhu 37 °C. Pencucian sebanyak 3x dengan 0.05% PBS-T. Serum ikan gurami (1:100) ditambahkan sebanyak 100 µL dan diinkubasi kembali selama 1 jam pada suhu 25 °C. Pencucian dilakukan sebanyak 3x dengan 0.05% PBS-T. Anti gurami (*monoclonal antibody-Osphronemus goramy*, Aquatic Diagnostic) dengan pengenceran 1:100 ditambahkan dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 25 °C. Setelah dicuci 3x dengan 0.05% PBS-T, ditambahkan *goat anti-mouse IgG* dikonjugasikan dengan *horse reddish peroxidase* (HRP) menggunakan pengenceran 1:12.000 selama satu jam pada suhu 25 °C. Penambahan *substrat TMB* sebanyak 100 µL ke dalam sumuran selama 20 menit pada suhu 25 °C lalu dilanjutkan dengan pemberian larutan pemberhenti reaksi (H₂SO₄ 3 M) sebanyak 100 µL. Pembacaan nilai absorbansi/*Optical Density* (OD) menggunakan ELISA *reader* (Multiscan go, Thermo Scientific) pada panjang gelombang 405 nm. Nilai *cut off value* (CV) diperoleh melalui persamaan:

$$CV = \text{rata-rata nilai OD kontrol negatif} + (2 \times \text{standar deviasi})$$

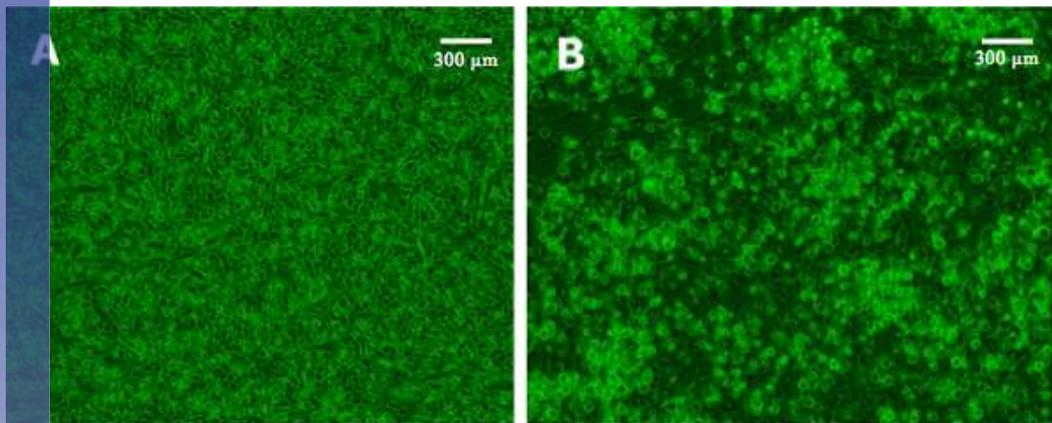
Analisis data

Uji tantang dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil uji tantang dan pengaruh aplikasi vaksin antara kelompok perlakuan diis dengan program SPSS pada selang kepercayaan 95% dan perbedaan antara perlakuan dianalisis lebih lanjut menggunakan uji Duncan. Data konsentrasi virus dihitung berdasarkan TCID₅₀. Nilai RPS dan *indirect*-ELISA dianalisis secara deskriptif.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

HASIL DAN BAHASAN

Pada penelitian ini vaksinasi dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan sistem kekebalan spesifik dari ikan gurami terhadap infeksi *megalocytivirus* hingga ikan memperoleh proteksi terhadap virus tersebut. Virus yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari ikan gurami terinfeksi dari wabah penyakit di Banyumas-Jawa Tengah pada tahun 2016. Virus diperbanyak pada sel GPs (*gourami primary cell from spleen*) yang berasal dari limpa ikan gurami dan menghasilkan titer infeksi sebesar $10^{5.9}$ TCID₅₀/mL (Gambar 21). Kultur virus yang dihasilkan dari perbanyakan pada kultur primer tersebut tetap mempertahankan virulensinya pada infeksi buatan pada ikan gurami (Sukenda *unpublish*; Gardenia *unpublish*). Dari hasil penelitian awal terhadap kemampuan virus menginfeksi baik pada sel primer maupun ikan gurami pada uji infeksi buatan, terlihat isolat virus tersebut dapat digunakan sebagai kandidat dalam pembuatan vaksin *megalocytivirus*. Virus mampu menginfeksi sel dan menyebabkan munculnya *cytopathic effect* pada hari ke-5 pasca-inokulasi virus. Virus yang diperbanyak pada kultur primer mampu menginfeksi ikan gurami pada infeksi buatan dengan injeksi secara *intraperitoneal* dan menyebabkan mortalitas hingga 100%.



Gambar 21 Sel kultur primer GP-s sebelum inokulasi (A) dan setelah inokulasi *giant gourami iridovirus*/GGIV pada hari ke-7 pasca-inokulasi pada proses perbanyakan virus dalam pembuatan vaksin (B). Dokumentasi menggunakan kamera pada mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x.

Pengembangan vaksin untuk pencegahan penyakit bakteri ataupun virus pada dasarnya mencakup efikasi berdasarkan nilai kelangsungan hidup relatif */relative percentage survival* (RPS) dan menekan mortalitas secara efektif pada ujiantang yang menghasilkan nilai proteksi yang cukup tinggi (Hazreen-nita *et al.* 2019). Vaksin yang dikembangkan dari virus inaktif banyak digunakan untuk pencegahan dan mengontrol penyakit virus pada ikan (Fu *et al.* 2015). Vaksin *megalocytivirus* pada penelitian ini dihasilkan dengan cara memperbanyak virus pada kultur sel (*cell culture-based vaccine*) kemudian diinaktivasi dengan bahan inaktivasi (*formalin-killed*) maupun dengan metode pemanasan (*heat-killed*). Penggunaan metode

kohabitasi pada ujiantang dilakukan untuk menirukan kondisi alami penularan patogen dimana mekanisme imun di lapisan mukosa kulit tetap utuh (Nakajima *et al.* 1999).

Uji keamanan vaksin dari masing-masing vaksin inaktif menunjukkan tidak adanya CPE pada kultur sel GPs selama dua kali pasase virus pada kultur sel dan tidak adanya ikan uji yang mengalami gejala klinis terinfeksi virus maupun mengalami mortalitas selama periode tiga minggu pasca-infeksi. Hasil uji ini menunjukkan proses inaktivasi pada proses pembuatan vaksin telah berlangsung secara efektif dan vaksin aman diaplikasikan dalam vaksinasi ikan uji. Metode inaktivasi dengan formalin dapat merusak kemampuan virus dalam proses replikasi dan infeksi, namun tetap dapat dikenali oleh sistem imun dari inang (Hazreen-nita *et al.* 2019). Inaktivasi dengan formalin telah terbukti cukup efektif dan telah digunakan dalam pembuatan beberapa jenis vaksin virus lain antara lain vaksin *formalin-killed betanavir*, *red sea bream iridovirus*, *infectious spleen and necrosis virus* dan *Singapore grouper iridovirus* (Dadar *et al.* 2017; Nakajima *et al.* 1997, Dong *et al.* 2013, Ou-yang *et al.* 2012). Inaktivasi virus dengan formalin terjadi dengan adanya ikatan silang (*cross-linking*) antara gugus amino primer pada protein yang berdekatan dengan atom nitrogen pada protein atau asam nukleat melalui ikatan -CH₂- yang terjadi secara permanen (Gard 1960). Metode inaktivasi pada suhu tinggi dapat menyebabkan kerusakan partikel virus dan merubah struktur protein yang dapat menurunkan tingkat antigenisitas dari virus tersebut (Ou-yang *et al.* 2012). Inaktivasi pada suhu tinggi/kondisi panas dapat menyebabkan protein pada virus terdenaturasi, sehingga berkurang kelarutannya. Hal ini dapat terjadi pada kondisi larutan protein mendekati pH isoelektris, dimana terjadi pembalikan bagian dalam lapisan molekul protein yang bersifat hidrofobik akan menjadi dibagian luar dan sebaliknya bagian protein yang bersifat hidrofilik akan terlipat ke dalam yang pada akhirnya protein akan menggumpal dan mengendap. Denaturasi protein dapat terjadi antara lain diakibatkan oleh paparan panas, pH, bahan kimia dan mekanis (Winarno 1992).

Isolat virus yang digunakan merupakan vaktor krusial yang sangat mempengaruhi peningkatan respons imun yang dihasilkan (Shimmoto *et al.* 2009). Vaksin dapat bekerja dengan mencegah patogen masuk ke dalam sel atau mencegah berkembangnya patogen pada jaringan ikan terinfeksi yang pada akhirnya dapat menyebabkan mortalitas ikan. Sistem imun ikan memberikan perlindungan terhadap penyakit dengan mengenali dan menghancurkan patogen yang masuk dan mempertahankan proses homeostatis setelah timbulnya reaksi inflamasi dan kerusakan jaringan (Magnadottir *et al.* 2009). Respons imun dan imun memori pada ikan yang ditimbulkan oleh antibodi memiliki peran penting dalam mekanisme perlindungan terhadap reinfeksi berbagai mikroorganisme. Respons anti-virus dan antibodi tersebut sangat penting dalam peningkatan proteksi melalui vaksinasi terhadap penyakit virus (Burton, 2002; Guidotti dan Chisari, 2001).

Vaksinasi ikan gurami dengan menggunakan vaksin *formalin-killed culture-based* (FKC, vaksin *formalin-killed*) dan vaksin *heat-killed culture-based* (HKC, vaksin *heat-killed*) dengan periode induksi vaksin selama 21 hari sebelum dilakukan ujiantang. Hasil percobaan menunjukkan nilai RPS dari ikan gurami yang divaksin sebesar 16.7-73.3% dimana vaksin FKC menghasilkan nilai RPS yang lebih tinggi yaitu sebesar 73.3% dibandingkan vaksin HKC. Indikator efektivitas vaksin menurut Amend (1981) dapat terlihat dari nilai RPS yang lebih

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

besar dari 60%. Nilai RPS menunjukkan vaksin FKC dapat digunakan sebagai kandidat vaksin *megalocytivirus*. Nilai RPS dan persentase mortalitas harian pada percobaan ini dapat dilihat pada Tabel 5 di bawah ini.

Tabel 5 Nilai kelangsungan hidup relatif (*Relative Percent Survival/RPS*) dari ikan gurami yang divaksinasi dengan vaksin *formalin-killed* dan *heat-killed* terhadap infeksi *megalocytivirus*

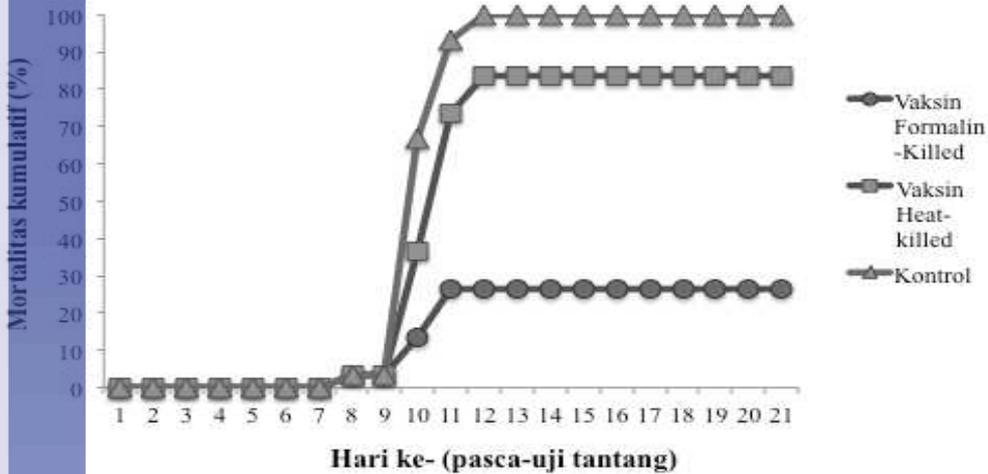
Kelompok Perlakuan	Jumlah ikan (ekor)	Mortalitas (%)	RPS (%)
A Vaksin <i>Formalin-killed</i> /FKC	30	26.7	73.3
B Vaksin <i>Heat-killed</i> /HKC	30	83.3	16.7
C Kontrol	30	100	-

Nilai RPS hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Caipang *et al.* (2006) dengan nilai RPS sebesar 65-75% menggunakan vaksin FKC RSIV pada *red sea bream* (*Pagrus major*). Nilai RPS yang lebih tinggi dihasilkan pada penelitian yang dilakukan oleh Dong *et al.* (2013) sebesar 95% menggunakan vaksin FKC ISKNV pada *mandarin fish* (*Siniperca chuatsi*). Nilai efikasi vaksin yang tinggi pada penelitian Dong *et al.* (2013) dihasilkan dari kombinasi titer ISKNV yang tinggi (10^6 TCID₅₀) dan penggunaan *adjuvant* yang dicampurkan dalam suspensi virus pada pembuatan vaksin tersebut. Penelitian ini dilakukan menggunakan vaksin dengan titer virus yang hampir sama dengan yang digunakan Dong *et al.* (2013) yaitu sebesar $10^{5.9}$ TCID₅₀ namun tanpa penambahan *adjuvant*.

Penambahan *adjuvant* pada vaksin diketahui dapat meningkatkan respons imun ikan. *Adjuvant* berperan sebagai tempat penyimpanan yang mengikat antigen dalam bentuk globul pada tempat injeksi (Anderson 1997), dimana terjadi induksi respons proinflamasi dan pelepasan sitokin yang pada akhirnya menginduksi produksi antibodi spesifik terhadap antigen tersebut (Evensen *et al.* 2005). Namun vaksinasi dengan *adjuvant* yang sering digunakan dalam campuran bahan vaksin untuk ikan dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan baik secara morfologi maupun fisiologi akibat stimulasi sistem imun dalam waktu yang lebih panjang (Midtlyng 1997). Menurut Mahardika *et al.* (2016) penggunaan *adjuvant* pada vaksin dengan konsentrasi antigen tinggi dapat terakumulasi pada lokasi injeksi sehingga terbentuk nodul dalam rongga abdomen ikan. Hal ini dapat terjadi karena kurang terserapnya vaksin ke dalam organ atau jaringan ikan yang pada akhirnya mempengaruhi kondisi kesehatan ikan antara lain menghasilkan nilai sintasan yang rendah. Selain itu menurut Ackerman *et al.* (2000) interaksi antara antigen, *adjuvant* dan sistem imun ikan dapat menyebabkan efek samping berupa terhambatnya pertumbuhan ikan. Penggunaan *adjuvant* dalam vaksin menyulitkan dalam aplikasi di lapangan dan dibutuhkan dosis injeksi yang lebih tinggi akibat peningkatan viskositas vaksin (Dong *et al.* 2013).



Selama tiga minggu periode induksi vaksinasi pada percobaan ini, semua kelompok baik kontrol maupun perlakuan, ikan terlihat sehat dan tidak memperlihatkan gejala berupa stres maupun terinfeksi penyakit. Pada saat dilakukan uji tantang dengan menggunakan metode kohabitasi dengan ikan terinfeksi *megalocytivirus*, terjadi mortalitas sebesar 100% pada ikan kelompok kontrol dan tingkat mortalitas yang bervariasi pada kelompok perlakuan vaksinasi (Gambar 22). Hasil uji tantang ini menunjukkan bahwa vaksin memberikan perlindungan terhadap infeksi *megalocytivirus*, walaupun vaksin HKC masih menghasilkan mortalitas yang cukup tinggi (83.3%) sehingga menyebabkan nilai RPS rendah. Ikan uji vaksin FKC menghasilkan proteksi yang baik pada hasil uji tantangan, vaksin ini memberikan perlindungan yang lebih baik dari vaksin HKC.



Gambar 22 Persentase mortalitas kumulatif kelompok perlakuan vaksin (*formalin-killed* dan *heat-killed*) dan kontrol pada saat uji tantang dengan ikan gurami terinfeksi *megalocytivirus* menggunakan metode kohabitasi.

Hasil analisis PCR dari jaringan ikan uji yang mengalami mortalitas dari kelompok kontrol maupun perlakuan memperlihatkan hasil positif terinfeksi *megalocytivirus* melalui munculnya pita DNA pada berat molekul target 570 bp (Gambar 23). Konfirmasi PCR dengan primer spesifik ISKNV dilakukan untuk mengidentifikasi *megalocytivirus* dan memastikan mortalitas ikan tersebut disebabkan oleh infeksi ISKNV.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 23 Analisis PCR dengan berat molekul target 570 bp untuk mendeteksi *megalocytivirus* dari limpa ikan uji yang mengalami mortalitas setelah ujiantang. Baris 1, 2: sampel ikan kelompok vaksinasi dengan *formalin-killed*, baris 3, 4: sampel ikan kelompok vaksinasi dengan *heat-killed*, baris 5, 6: sampel ikan kelompok kontrol; P: kontrol positif; N: kontrol negatif dan M: Marker 100bp (Promega).

Hasil analisis qPCR jaringan limpa ikan uji yang dikoleksi pada hari ke-4 pasca-ujiantang (*days post-infection/dpi*) jumlah virus tetap stabil dan tidak terlihat adanya kenaikan jumlah *copy* DNA virus antara semua perlakuan dan kontrol (Gambar 24). Pada hari ke-7 dpi, terlihat kenaikan cukup tinggi pada perlakuan vaksin HKC dan kontrol, sementara tidak terlihat kenaikan jumlah *copy* DNA virus pada limpa ikan uji vaksin FKC. Mortalitas ikan mulai terjadi pada hari ke-8 dpi dan mencapai puncaknya pada hari ke-11 hingga ke-12 dpi.

Dari hasil penelitian ini diduga sebelum hari ke-7 hari dpi, virus masih terakumulasi di darah, terperangkap dan dinetralkan oleh antibodi dan sel imun non-spesifik dalam darah (*blood-borne antibodies*) yang menahan penyebaran virus ke dalam organ ikan (Shimmoto *et al.* 2010). Pada hari ke-7 dpi, virus mulai berhasil menembus pertahanan sistem imun ikan dalam darah yang terlihat dari meningkatnya jumlah *copy* DNA virus di dalam limpa. Hasil ini didukung dengan hasil analisis PCR dimana pada hari ke-4 setelah ujiantang pada limpa semua kelompok uji memperlihatkan hasil negatif *megalocytivirus* sedangkan pada hari ke-7 hanya limpa kelompok ikan yang divaksinasi dengan vaksin FKC yang memperlihatkan hasil negatif, limpa kelompok ikan yang divaksinasi dengan vaksin HKC dan kontrol memperlihatkan pita DNA positif *megalocytivirus* (Gambar 25). Pada hari ke-7 setelah ujiantang, virus mulai dapat menembus sistem pertahanan imunitas pada ikan ikan kelompok vaksin HKC dan kontrol dan menyebabkan mulai banyaknya mortalitas ikan uji. Hal ini sesuai dengan hasil ujiantang dimana mortalitas mulai terjadi pada hari ke-8 hingga ke-12 pada kelompok tersebut.

Shimmoto *et al.* (2010) menyatakan bahwa akumulasi virus yang lebih sedikit dijumpai pada insang *red sea bream* (*Pagrus major*) yang divaksinasi menggunakan vaksin protein rekombinan dibandingkan dengan kontrol dan sebaliknya akumulasi virus pada darah lebih banyak pada perlakuan vaksinasi dibandingkan kontrol pada hari ke-5 dan ke-7 dpi. Pada penelitian Zhang *et al.* 2015 memperlihatkan jumlah virus lebih sedikit pada limpa dan ginjal ikan turbot (*Scophthalmus maximus*) yang divaksin menggunakan vaksin DNA ORF075. Vaksinasi tersebut efektif mempertahankan sistem imun dengan menekan replikasi virus dan menghasilkan nilai RPS sebesar 73% dengan mortalitas 100% pada ikan kelompok kontrol.

@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

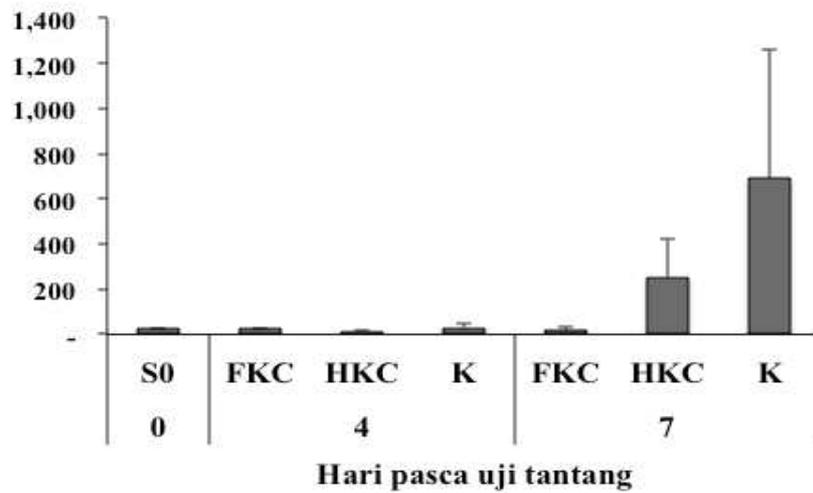
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.

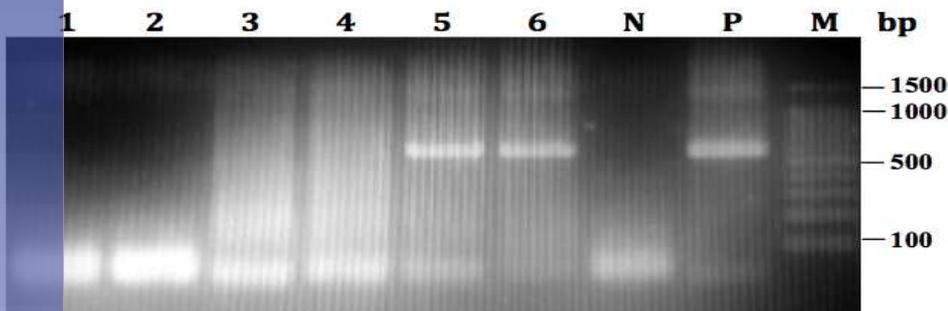
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



Jumlah *copy* DNA virus
@Hak cipta milik IPB University



Gambar 24 Jumlah (*copy* DNA) virus pada limpa ikan uji pra-perlakuan (S0), limpa ikan uji kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan vaksin *formalin-killed* (FKC), vaksin *heat-killed* (HKC) setelah divaksinasi selama 21 hari, yang dikoleksi pada hari ke-4 dan ke-7 setelah uji tantang.



Gambar 25 Elektroforesis hasil qPCR jumlah (*copy* DNA) virus pada limpa ikan uji kelompok kontrol dan perlakuan vaksinasi pada hari ke-4 dan ke-7 pasca-uji tantang. No.1-3: sampel limpa ikan uji pada hari ke-4 *dpi* (1: vaksin FKC/*formalin killed*; 2: vaksin HKC/*heat-killed*; 3: kontrol), No. 4-6: sampel limpa ikan uji pada hari ke-7 *dpi* (4: vaksin FKC/*formalin killed*; 5: vaksin HKC/*heat-killed*; 6: kontrol).

Akumulasi virus yang lebih rendah pada organ target infeksi RSIV seperti limpa, ginjal dan insang dapat meningkatkan kelulus-hidupan (*survival*) dari ikan uji (Chou *et al.* 1998; Sudthongkong *et al.* 2002 dan Inouye *et al.* 1992). Penelitian Nakajima *et al.* (1997) dengan menggunakan *indirect-immunoflourescence test* pada limpa *red sea bream* memperlihatkan penurunan jumlah antigen virus (RSIV)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

hari ke-5 dan ke-9 *dpi* pada kelompok vaksin *formalin-killed*, dan diduga terjadi penghambatan replikasi virus pada organ tersebut yang menggambarkan proteksi dari vaksinasi. Limpa merupakan organ target *megalocytivirus* dimana dijumpai jumlah *copy* DNA virus yang paling tinggi dibandingkan organ lain seperti ginjal, hati, insang, usus, lambung dan otot (Lin *et al.* 2017). Hasil penelitian ini juga sesuai dengan hasil penelitian Lin *et al.* (2017) dimana pada hari ke-5 *dpi* belum terjadi peningkatan jumlah virus. Namun, jumlah *copy* DNA ISKNV meningkat 1 jam (10^2 hingga 10^{11}) pada hari ke-6 hingga hari ke-11 *dpi*. Ikan mandarin yang diinfeksi virus mengalami mortalitas mulai hari ke-7 hingga ke-11 *dpi* pada saat jumlah virus mencapai batas tertentu dan ikan mulai memperlihatkan gejala klinis yang juga mortalitas. Pada penelitian He *et al.* 2002, ikan mandarin yang diinfeksi menggunakan metode kohabitasi juga terlihat mulai terinfeksi pada hari ke-7 *dpi* dan mortalitas sebanyak 100% terjadi pada hari ke-12 *dpi*.

Sistem imun pada ikan memiliki dua sistem imun penting yaitu sistem imun bawaan (*innate immune system*) bersifat non-spesifik dan terdiri dari komponen selular dan humoral, juga sistem imun adaptif (*adaptive immune system*) yang bersifat spesifik melalui respons imun humoral yang dihasilkan dari produksi antibodi dan respons imun seluler melalui mediasi oleh sel limfosit-T yang bereaksi spesifik dengan antigen tertentu. Berbeda dengan sistem imun adaptif, sistem imun bawaan tidak memiliki memori dan pengenalan spesifik terhadap benda asing tertentu yang masuk ke dalam tubuh inang. Pada ikan, sintesis antibodi relatif lebih lambat dibandingkan vertebrata lain sehingga menjadikan sistem imun bawaan ini sangat penting dalam sistem pertahanan inang terhadap mikroorganisme penyebab penyakit. Pada ikan salmon, respons imun adaptif berlangsung selama 4-6 minggu dan sangat dipengaruhi oleh suhu lingkungan (Ellis 2001).

Pada respons imunitas spesifik (humoral), antibodi merupakan efektor yang berperan penting terhadap infeksi virus pada kondisi ekstraseluler seperti diawal proses infeksi sebelum virus masuk ke dalam sel inang dan pada saat dilepas oleh sel terinfeksi yang lisis oleh sel sitotoksik. Antibodi bekerja menetralkan virus, mencegah virus menempel dan masuk ke dalam sel inang. Antibodi dapat berperan sebagai opsonin dan mengaktivasi komplemen untuk meningkatkan fagositosis. Fagositosis terjadi pada saat bahan asing melekat pada permukaan sel fagosit yang dimediasi oleh ikatan hidrofobik atau interaksi gula/lektin (Secombes 1996). Pada respons imun spesifik seluler difasilitasi oleh sel $CD8^+$ /CTL (*cluster of differentiation/cytotoxic T lymphocyte*) yang membunuh sel terinfeksi melalui pengenalan peptida virus dalam sel terinfeksi. Sel terinfeksi difagosit dan antigen virus dipresentasikan bersama molekul MHC-1 ke sel $CD8^+$ yang berproliferasi menjadi sel spesifik untuk peptida virus. Sel CTL *naive* yang diaktifkan lalu berdiferensiasi menjadi sel CTL efektor yang membunuh sel bernukleus yang terinfeksi. Infeksi virus menimbulkan kematian sel inang dan kerusakan jaringan akibat respons imun aktif untuk membatasi replikasi dan penyebaran virus ke sel dan organ lain (Baratawidjaya dan Rengganis 2014).

Pertahanan awal pada sistem imunitas bawaan terhadap infeksi patogen adalah kulit (lapisan dermis, epidermis, sisik) dan membran mukus. Keutuhan lapisan epidermis sangat penting dalam menjaga keseimbangan osmotik dan menghalangi masuknya benda asing (Shephard, 1994). Lapisan mukus dan juga pada cairan tubuh yang dihasilkan oleh inang mengandung senyawa anti-bakteri seperti antibodi, antibakterial peptida, antiprotease, lisozim, protein komplemen,

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



transferin dan lektin yang dapat bereaksi dengan berbagai macam mikroorganisme dan produk sekresinya (Nowak 1999; Nagashima *et al.* 2001).

Status kesehatan ikan dan respons imun pada hewan akuatik dapat dimonitor menggunakan parameter hematologi. Sel darah putih (leukosit) berperan penting dalam pertahanan tubuh bawaan pada ikan terhadap infeksi bakteri maupun virus. Menurut Shen *et al.* (2018) leukosit merupakan komponen penting yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh ikan, selain itu sel darah putih mengekspresikan gen-gen yang terkait dengan imunitas. Komponen sel darah putih terdiri dari limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil dan basofil. Sel-sel fagositik tersebut bersama dengan sel sitotoksik lainnya berperan dalam sistem imun non-spesifik dalam menginisiasi respons imun dan menimbulkan reaksi inflamasi. Inflamasi merupakan respons fisiologis dari inang terhadap adanya infeksi dan cedera pada jaringan yang pada akhirnya dapat menimbulkan kelainan patologis. Pada kondisi tersebut terjadi vasodilatasi yang dapat menimbulkan pendarahan. Peningkatan permeabilitas pembuluh darah di jaringan menimbulkan kebocoran yang menimbulkan edema yang diikuti oleh migrasinya leukosit melewati dinding kapiler dan masuk ke jaringan. Berbagai faktor plasma dan sel inflamasi berinteraksi dan patogen yang berhasil masuk memicu rangkaian reaksi inflamasi yang kompleks. Masuknya mikroorganisme patogen ke dalam inang akan mengaktifkan mekanisme pertahanan inang, baik selular maupun humoral dari sistem imun bawaan tersebut (Magnado'ttir 2006).

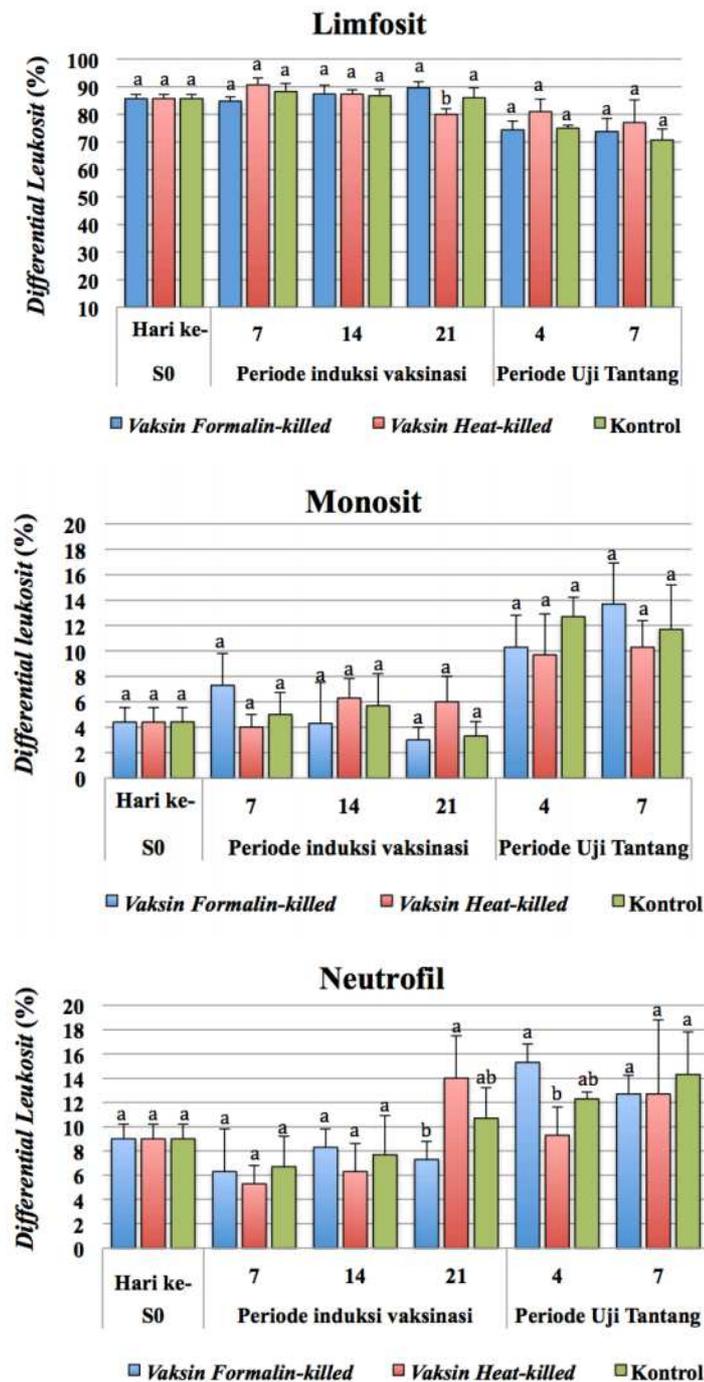
Pada penelitian ini persentase jumlah limfosit pada kedua perlakuan vaksin tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan kontrol pada awal periode induksi vaksinasi, namun jumlah limfosit pada perlakuan vaksin HKC secara nyata lebih rendah dibandingkan vaksin FKC dan kontrol pada hari ke-21 pasca-vaksinasi. Jumlah limfosit cenderung stabil pada periode induksi vaksinasi dan terlihat menurun hingga periode akhir ujiantang. Limfosit merupakan komponen terbesar dari sel darah putih yang merupakan penghasil antibodi yang berperan dalam sistem imun humoral adaptif. Persentase jumlah monosit pada kedua perlakuan vaksin tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan kontrol pada periode induksi vaksinasi dan periode ujiantang. Jumlah monosit terlihat berfluktuasi pada periode induksi vaksinasi dan mengalami peningkatan pada periode ujiantang. Persentase limfosit, monosit dan neutrofil ikan gurami sebelum perlakuan (S0), pasca-vaksinasi dengan vaksin *formalin-killed* dan *heat-killed* (periode induksi vaksinasi) serta periode pasca-ujiantang dapat dilihat pada Gambar 26 di bawah ini.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.



Gambar 26 Persentase limfosit, monosit dan neutrofil ikan gurami sebelum perlakuan (S0), pasca-vaksinasi dengan vaksin *formalin-killed* dan *heat-killed* (periode induksi vaksinasi) serta periode pasca-ujiantang dengan GGIV (*giant gourami iridovirus*). Huruf berbeda yang tertera di histogram menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($P < 0.05$).



Persentase jumlah neutrofil pada kedua perlakuan vaksin tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan kontrol. Jumlah neutrofil cenderung mengalami penurunan pada awal periode induksi vaksinasi dan berangsur-angsur meningkat hingga periode akhir ujiantang. Neutrofil merupakan sel fagosit *polimorphonuclear* utama yang pertama kali bermigrasi ke jaringan luka atau terinfeksi pada awal proses inflamasi. Pada inflamasi akut yang merupakan respons cepat terhadap kerusakan sel, jumlah neutrofil dalam pembuluh darah meningkat dengan cepat dan berakumulasi di daerah infeksi untuk membersihkan debris dan eradikasi mikroorganisme secara fagositosis. Pada saat inflamasi telah terkontrol, neutrofil tidak dikerahkan kembali dan berdegenerasi. Selanjutnya dikerahkan sel fagosit *polimorphonuclear* seperti monosit, makrofag, limfosit dan sel plasma. Pasca-ujiantang pada penelitian ini terjadi penurunan persentase limfosit, peningkatan persentase monosit dan neutrofil. Berbeda dengan vaksin bakterial, parameter *differential leukocyte count* kemungkinan kurang efektif digunakan sebagai salah satu indikator efikasi vaksin virus. Menurut Skinner *et al.* (2010) respons imun non-spesifik akan mengalami fluktuasi sesaat setelah invasi antigen dalam hitungan hari, sedangkan respons imun spesifik terbentuk dalam hitungan minggu. Kedua respons imun tersebut baik spesifik maupun non-spesifik berperan penting dalam mekanisme sistem imun ikan terhadap serangan patogen.

Respons imun adaptif diinduksi oleh antigen yang disajikan oleh molekul *major histocompatibility complex* (MHC) yang mengaktifkan ekspresi sel limfosit CD8+ T-sitotoksik dan merupakan faktor penting dalam memerangi berbagai infeksi virus. Limfosit ini mengenali dan membunuh sel-sel yang mengandung peptida virus melalui molekul MHC. Respons imun adaptif dimulai oleh sel-sel *antigen presenting cells* (APC) berupa limfosit dan makrofag yang mempresentasikan antigen berupa molekul asing di permukaan sel. Molekul MHC menyajikan peptida endogen ke sel T-sitotoksik serta peptida eksogen ke sel T-*helper*. Pada mamalia, respons imun adaptif terhadap infeksi virus dilakukan oleh limfosit CD8+ T-sitotoksik yang merupakan faktor penting dalam memerangi berbagai infeksi virus. Limfosit ini mengenali dan membunuh sel-sel yang memiliki peptida virus melalui molekul MHC.

Antibodi atau imunoglobulin (Ig) merupakan molekul efektor utama sistem imun humoral yang spesifik (Uribe *et al.* 2011). Fungsi utama dari antibodi adalah untuk mengikat antigen. Imunoglobulin permukaan sel-B berfungsi sebagai reseptor untuk pengikatan antigen. Pada respons imun humoral, sel B mengenali antigen yang dipresentasikan melalui molekul MHC oleh sel T, dan selanjutnya berdiferensiasi menjadi sel plasma yang melepaskan antibodi dan sel memori. Sebagian dari sel B yang teraktivasi tersebut akan menjadi sel memori yang hidup lama. Memori jangka panjang dapat mengikuti aktivasi sel T dan sel B. Memori aktif dapat dibuat melalui vaksinasi dengan memperkenalkan antigen untuk merangsang sistem imun dan mengembangkan imunitas spesifik melawan patogen tanpa menimbulkan penyakit. Antibodi mengenali dan berikatan dengan antigen untuk memudahkan eliminasi dari tubuh inang. Fungsi efektor antibodi adalah netralisasi dan eliminasi patogen maupun toksinnya yang menimbulkan infeksi. Antibodi menetralkan antigen, dapat berfungsi sebagai opsonin dimana makrofag dapat mengenali antibodi melalui reseptor dan menfagositosis patogen untuk proses fagosit serta antibodi dapat berperan dalam *antibody dependent cell mediated cytotoxicity* (ADCC) dan mengaktifkan sistem komplemen (Bratawidjaja dan

Rengganis 2014). Menurut Anderson (1974), antigen dalam keadaan teropsonisasi lebih mudah dikenali makrofag sehingga lebih efektif dan mudah untuk dihancurkan.

Antibodi memegang peranan penting dalam perlindungan inang terhadap infeksi virus (Fu *et al.* 2012). Deteksi antibodi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengevaluasi efikasi dari vaksin yang digunakan. Tingkat proteksi dari vaksin berkorelasi dengan nilai *optical density* (OD) yang teramati dari interaksi antigen-antibodi spesifik menggunakan metode analisis *enzyme-linked immunoassay*/ELISA setelah dilakukan ujiantang. Caipang *et al.* (2006) menemukan adanya peningkatan antibodi penetralisir (*serum neutralization antibodies*) dalam serum *red sea bream* pasca-vaksinasi dengan vaksin RSIV yang dinaktivasi dengan formalin maupun yang divaksinasi dengan protein hasil denaturasi vaksin *formalin-killed* tersebut.

Pada pengujian ini diperoleh nilai batas (*cut off value/CV*) dari nilai *optical density* (OD) sebesar 0.405 nm yang digunakan sebagai nilai penentuan ada atau tidaknya antibodi spesifik di dalam serum yang dihasilkan ikan uji sebagai respons pemberian vaksin. Ikan kelompok kontrol tidak menunjukkan nilai OD yang lebih tinggi dari nilai CV selama periode induksi vaksinasi selama 3 minggu. Sebaliknya kelompok vaksinasi menghasilkan nilai OD yang lebih tinggi dari nilai CV sejak minggu pertama periode induksi vaksinasi hingga periode akhir pasca-ujiantang. Hasil analisis *indirect*-ELISA menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi anti-*megalocytivirus* dengan pemberian vaksin, baik yang dinaktivasi dengan formalin (FKC) maupun dengan pemanasan (HKC) seperti yang terlihat pada Gambar 27. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin dapat menginduksi respons imun spesifik pada ikan gurami. Perlakuan pemberian vaksin FKC menghasilkan titer antibodi yang lebih tinggi dalam serum ikan uji, sehingga memberikan proteksi yang lebih baik terhadap infeksi *megalocytivirus* dibandingkan vaksin HKC. Hasil penelitian Zhang *et al.* (2015) menghasilkan peningkatan antibodi dalam serum ikan turbot yang divaksinasi dengan vaksin DNA ORF075. Protein rP444 yang terekspresi pada ikan yang divaksin tersebut secara nyata menghambat replikasi virus (diduga respons imun yang dihasilkan oleh antibodi yang dimediasi sel B berkontribusi pada efek perlindungan dari vaksin tersebut).

Peningkatan titer antibodi pada kelompok perlakuan vaksin FKC mulai teramati pada satu minggu pertama dan mencapai maksimal pada minggu ke-2 pasca-vaksinasi. Ujiantang dilakukan pada minggu ke-3 pasca-vaksinasi dan penurunan titer antibodi teramati pada hari ke-4 pasca-ujiantang. Pada pengambilan sampel hari ke-7 dan ke-14 pasca-ujiantang terlihat titer antibodi mulai mengalami sedikit peningkatan. Semakin tinggi nilai titer antibodi maka diharapkan kemampuan antibodi dalam memberikan perlindungan terhadap infeksi *megalocytivirus* juga menjadi lebih tinggi. Menurut Plumb (1984), titer antibodi yang tinggi tidak selalu dapat diartikan akan memberikan tingkat perlindungan atau kekebalan yang tinggi juga.



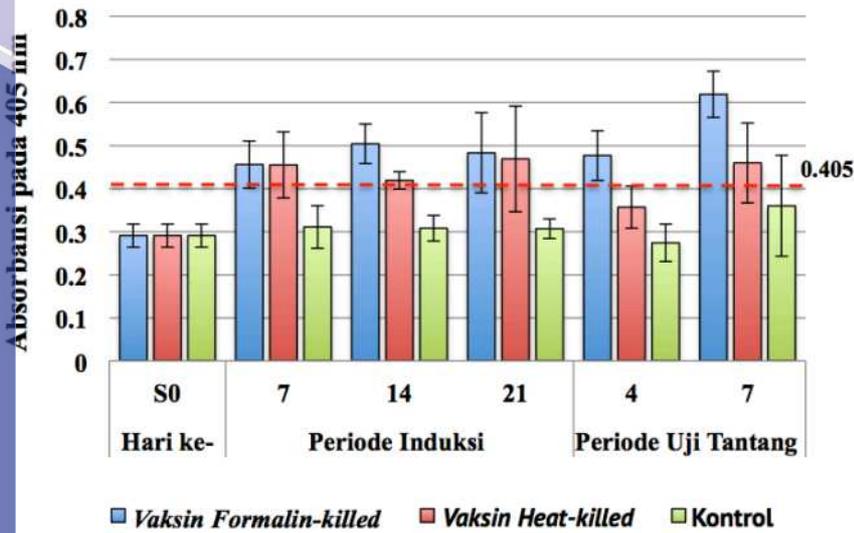
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

IPB University



Gambar 27 Hasil analisis titer antibodi ikan gurami menggunakan *indirect*-ELISA dari serum ikan uji kelompok kontrol dan kelompok vaksinasi (vaksin *formalin-killed* dan *heat-killed*) pada uji tantang. Garis putus-putus pada kerapatan optik 0.405 nm menggambarkan *cut-off value*.

Kemampuan melindungi ikan dari infeksi *megalocytivirus* melalui vaksinasi menunjukkan respons imun berperan penting dalam perlindungan terhadap virus tersebut (Nakajima *et al.* 1999). Respons kekebalan tubuh ikan terkait kontak langsung antara ikan dengan lingkungan yang membawa patogen penyebab infeksi (Ellis 1997). Inisiasi dan amplifikasi dari respons imun non-spesifik maupun spesifik diatur oleh sitokin yang mengatur banyak sel dan juga berperan sebagai efektor imun.

Hasil analisis ekspresi gen TNF- α relatif terhadap gen beta-aktin ikan gurami memperlihatkan tidak ada perbedaan nyata antara perlakuan vaksin maupun kontrol pada hari ke-21 pasca-vaksinasi. Pada hari ke-4 pasca-uji tantang, ekspresi gen TNF- α pada perlakuan vaksin *formalin-killed* berbeda nyata dibandingkan vaksin *heat-killed* dan kontrol. TNF- α (*tumor necrosis factor*) merupakan salah satu sitokin utama dalam respons inflamasi akut yang diinduksi oleh infeksi mikroorganisme (sitokin proinflamasi). Infeksi tersebut apabila berlanjut dapat memicu produksi TNF- α dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF- α disekresikan oleh makrofag dan berfungsi mengerahkan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi, meningkatkan ekspresi molekul adhesi (selektin dan ligan) sel endothelium pembuluh darah untuk integrin leukosit, kembali merangsang makrofag mensekresikan kemokin dan menginduksi kemotaksis dan pengerahan leukosit, merangsang fagosit *mononuclear* untuk mensekresi IL-1, menginduksi apoptosis sel terinfeksi, merangsang hipotalamus memproduksi panas sehingga dapat menginduksi TNF- α dan IL-1 dan lainnya (Bratawidjaja dan Rengganis 2014).

Analisis ekspresi gen interleukin-1 β (IL-1 β) relatif terhadap gen beta-aktin ikan gurami memperlihatkan tidak ada perbedaan nyata antara perlakuan vaksin maupun kontrol pada hari ke-21 pasca-vaksinasi. Ekspresi gen IL-1 β pada

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

perlakuan vaksin FKC berbeda nyata dibandingkan vaksin HKC dan kontrol pasca-ujiantang hari ke-7. Sitokin interleukin-1 (IL-1) berperan sebagai mediator inflamasi sebagai respons imun non-spesifik terhadap adanya infeksi maupun rangsangan lainnya. Sitokin ini disekresikan oleh monosit, makrofag, sel endotel dan sel epitel. Interleukin berperan dalam pengaturan respons imun, reaksi inflamasi dan hematopoiesis. Efek sitokin IL-1 pada limfosit T, antara lain merangsang proliferasi, diferensiasi dan produksi limfokin. Pada limfosit B efek yang ditimbulkan di antaranya merangsang proliferasi, diferensiasi dan sebagai kemotaktan sel tersebut. Sedangkan pada makrofag, fibroblast, osteoblast dan sel epitel, IL-1 menginduksi proliferasi dan aktivasi sel-sel tersebut. IL-1 merupakan *neutrophil chemotactic factor* yang berfungsi menginduksi kemotaksis dari sel neutrofil dan granulosit lain untuk bermigrasi ke daerah yang terinfeksi dan kemudian menginduksi fagositosis. Selain itu juga menginduksi respons fisiologi yang diperlukan untuk migrasi dan fagositosis.

Hasil analisis ekspresi gen *myeloid differentiation primary-respons protein* (MyD88) relatif terhadap gen beta-aktin ikan gurami memperlihatkan adanya perbedaan nyata antara perlakuan vaksin dengan kontrol pada hari ke-21 pasca-vaksinasi. Ekspresi gen MyD88 pada perlakuan vaksin *formalin-killed* berbeda nyata dibandingkan vaksin *heat-killed* dan kontrol pasca-ujiantang hari ke-7

Sitokin berikatan dengan reseptor spesifik pada membran sel. Reseptor permukaan sel (*toll-like receptor/TLR*) menerima sinyal awal untuk mengaktifkan respons imun non-spesifik dan transduksi sinyal dilanjutkan ke dalam sel yang dihubungkan dengan mekanisme efektor. Pada sistem imun non-spesifik, sinyal dapat berupa produk mikroba, reseptor berupa *pattern recognition receptor/PRR* dan sinyal akan ditransduksi melalui interaksi molekul intraselular spesifik. Ikatan ligan pada TLR (di bagian ekstraselular) memacu penggabungan MyD88 dengan domain intraselular, *translocated intimin receptor* (TIR) dan selanjutnya membentuk kompleks IRAK1/IRAK4 (*IL-1 receptor associated kinase*) dan selanjutnya terjadi fosforilase atas pengaruh protein kinase dan *cascade* enzim selanjutnya. Aktivasi jalur sinyal TLR menimbulkan berbagai efek seperti meningkatnya ekspresi gen yang berperan dalam inflamasi, meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan neutrofil, meningkatkan kemampuan menghancurkan patogen dan sebagainya. Hasil analisis ekspresi gen TNF- α , IL-1 β dan MyD88 relatif terhadap gen beta-aktin ikan gurami dapat dilihat pada Gambar 28 di bawah ini.

@Hakdipinaka IPB/University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB/University.

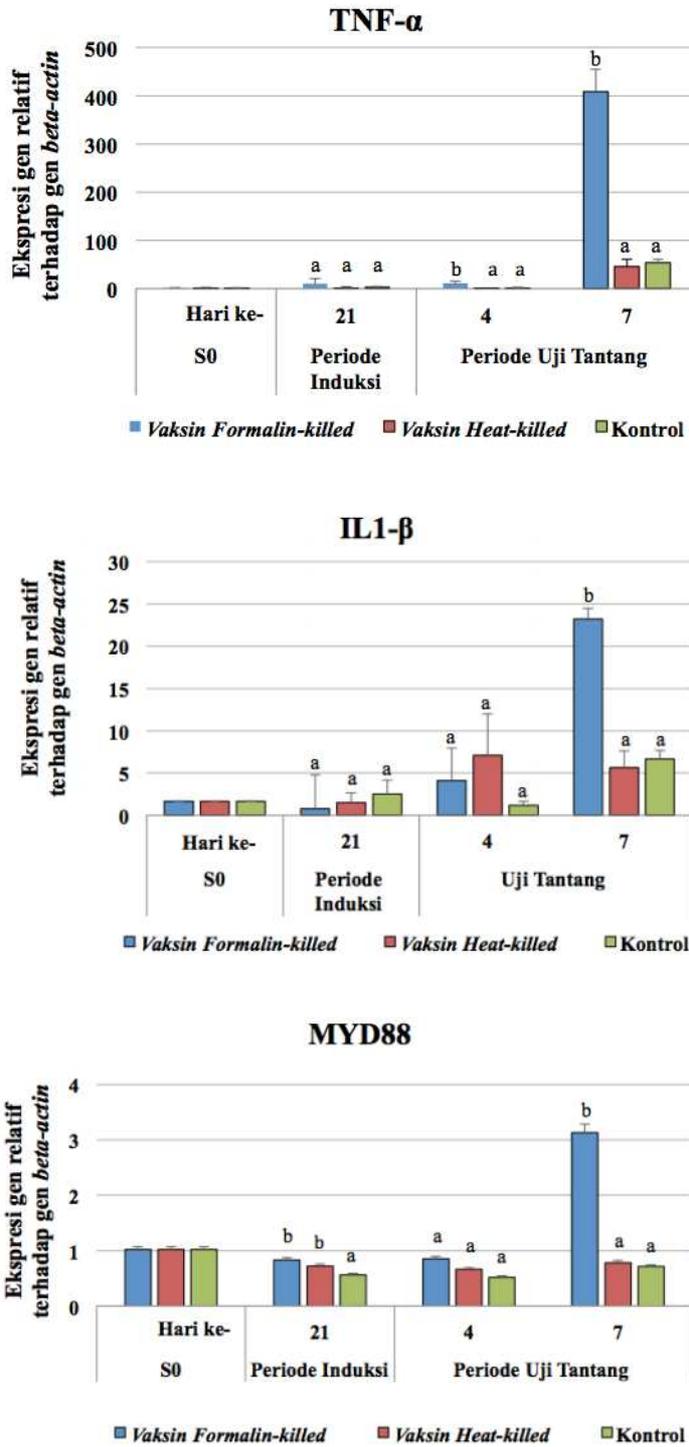
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB/University.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 28 Analisis ekspresi gen TNF- α , IL-1 β dan MyD88 relatif terhadap gen beta-aktin ikan gurami perlakuan yang divaksin (*formalin-killed* dan *heat-killed*) dan kontrol. Huruf berbeda yang tertera di histogram menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0.05$).

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini menunjukkan penggunaan vaksin dari suspensi virus yang diinaktivasi dengan formalin (*formalin-killed*) mampu meningkatkan respons imun spesifik pada ikan gurami yang terlihat dari terbentuknya antibodi spesifik serta nilai RPS sebesar 73.3%. Vaksinasi ikan gurami menggunakan vaksin *formalin-killed* juga meningkatkan ekspresi relatif gen imunitas TNF- α , IL-1 β dan MyD88 pada limpa ikan gurami pasca-ujiantang.

SARAN

Pada tahap ketiga ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis vaksinasi yang tepat dan metoda aplikasi vaksin yang paling efektif. Analisis ekspresi gen terkait imunitas lainnya perlu dilakukan khususnya ekspresi gen yang merespons inflamasi dalam organ lainnya seperti ginjal, hati dan usus pada proses melawan infeksi virus.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



6 PEMBAHASAN UMUM

Dua puluh tahun terakhir ini, wabah penyakit akibat infeksi virus penyebab mortalitas tinggi pada ikan budidaya telah banyak dilaporkan. Pada budidaya intensif dimana satu atau beberapa spesies dibudidayakan pada kepadatan tinggi maka patogen akan mudah menular antar individu dalam satu populasi. Budidaya berkaitan erat dengan tingkat munculnya penyakit dan penyebarannya. Pengendalian penyakit infeksi sangat sulit, bahkan pengobatan menggunakan antibiotik dan terapi lainnya tidak cukup efektif untuk menghilangkan patogen dari inang dan lingkungan budidaya.

Penyakit infeksi khususnya yang diakibatkan oleh infeksi virus merupakan kendala utama pada sektor akuakultur. Walaupun tingkat mortalitas yang disebabkan infeksi virus tersebut sangat tinggi hingga dapat mencapai 100%, namun sampai saat ini belum ada metode pengobatan efektif yang tersedia. Beberapa faktor yang mempengaruhi upaya pencegahan dan pengendalian wabah penyakit akibat infeksi virus antara lain seperti kerentanan inang, kondisi lingkungan budidaya, sifat dan patogenesitas virus serta cara penularan infeksi (Dong *et al.* 2013). Virus merupakan mikroorganisme parasit obligat yang hanya dapat memperbanyak diri di dalam inang/sel hidup. Virus memulai infeksi dengan menempel pada reseptor yang merupakan komponen permukaan sel spesifik pada sel hewan. Virus masuk ke dalam sel dan menggunakan mesin dan jalur metabolisme pada sel inang untuk membuat *copy* asam nukleat dan mensintesis protein subunit dari virus tersebut untuk memperbanyak diri. Selanjutnya komponen struktural dasar tersebut disusun menjadi partikel virus baru yang dilepaskan dari sel salah satunya melalui proses lisis. Virus baru yang dilepaskan dari sel terinfeksi kemudian menyebar dan menginfeksi sel disekitarnya. Menurut McDermott *et al.* (2013) viraemia menyebabkan penyebaran infeksi virus ke hampir semua organ ikan terinfeksi. Virus yang berhasil masuk ke sistem sirkulasi dan dapat menghindari sistem imunitas bawaan inang (*innate immunity*) dapat menyebar ke organ target lainnya sehingga menimbulkan kerusakan jaringan dan kegagalan fungsi organ yang pada akhirnya menyebabkan mortalitas ikan (Jung-Schroers *et al.* 2016).

Tingginya tingkat mortalitas *megalocytivirus* pada ikan yang terinfeksi tidak lepas dari sifat *broad host range* virus tersebut yang memungkinkan menginfeksi banyak spesies ikan baik ikan air tawar maupun air laut, ikan konsumsi maupun ikan hias dan menyebarkannya ke ikan lain (Go *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007; Jeong *et al.* 2008). Di Indonesia, *megalocytivirus* pada ikan gurami ini dapat menjadi ancaman pada budidaya ikan gurami khususnya sehingga perlu adanya kerjasama antara akademisi, pelaku usaha budidaya, para pengambil kebijakan dan praktisi untuk memperoleh solusi terbaik untuk pengendaliannya. Vaksinasi merupakan salah satu solusi untuk pencegahan penyakit yang paling murah dan efektif. Hal ini yang menjadikan pentingnya pengembangan vaksin sebagai salah satu upaya untuk mengontrol penyakit infeksi agar kerugian yang diakibatkannya tidak berlanjut dan infeksi dapat ditekan (Ou-yang *et al.* 2012; Hazreen-nita *et al.* 2019). Pengembangan dan aplikasi vaksin berbasis kultur sel merupakan metode yang tradisional namun efektif khususnya untuk penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan kultur sel dan vaksin inaktif untuk pencegahan penyakit *megalocytivirus*. Pembuatan vaksin *megalocytivirus* ini memerlukan virus dalam jumlah besar dan sel kultur yang suseptibel yang digunakan sebagai inang untuk perbanyak virus. Kultur sel *Grunt Fin* (GF) tidak berhasil memperbanyak *megalocytivirus* yang menginfeksi ikan gurami sehingga dikembangkan kultur sel primer dari limpa ikan tersebut (sel GPs). Sel GPs digunakan dalam proses pembuatan vaksin yang dapat memberikan proteksi pada ikan gurami terhadap infeksi *megalocytivirus* dan dapat menjadi produk yang efektif dan aplikatif serta dapat menjadi produk unggulan nasional. Berdasarkan alasan tersebut di atas maka penelitian ini dilakukan dalam empat tahap yaitu (i) identifikasi dan karakteristik *megalocytivirus* asal ikan gurami, (ii) pembuatan kultur sel primer dari jaringan ikan gurami, (iii) preparasi vaksin *megalocytivirus* dan (iv) uji efikasi vaksin pada ikan gurami.

Karakterisasi dan identifikasi virus yang menginfeksi ikan gurami pada tahap I penelitian ini menghasilkan pohon filogenetik dari gen *major capsid protein* (MCP) berupa tiga *clade* dari genus *megalocytivirus* (ISKNV, RSIV dan TRBIV). *Giant gourami iridovirus* (GGIV), isolat virus dari ikan gurami, membentuk *cluster* dengan ISKNV dan memiliki 100% homologi dengan genom lengkap ISKNV. Pemberian nama strain ISKNV yang baru ditemukan sesuai dengan nama asal spesies inangnya seperti *African lampeye virus* (Sudthongkong *et al.* 2002), *Banggai cardinalfish iridovirus* (Weber *et al.* 2009) dan *dwarf gourami iridovirus* (Go *et al.* 2006; Sudthongkong *et al.* 2002). GGIV selanjutnya digunakan sebagai kandidat dalam pengembangan vaksin.

Strain kandidat vaksin merupakan faktor yang sangat penting dalam pengembangan dan aplikasi vaksin berbasis kultur sel yang sangat mempengaruhi respons imunitas inang yang dihasilkan pada proses vaksinasi. Walaupun belum diketahui apakah ada perbedaan serologis di antara strain *megalocytivirus* namun terdapat variasi fenotipik yang dapat menyebabkan perbedaan pada kemampuan replikasi virus secara *in vitro*, virulensi pada inang dan antigenisitas virus dalam pengembangan vaksin (Shinmoto *et al.* 2009). Kandidat vaksin yang cocok digunakan dalam pembuatan vaksin inaktif berbasis kultur sel antara lain titer virus hasil perbanyak *in vitro* dapat dipertahankan tetap stabil dan menghasilkan virulensi yang tinggi pada infeksi buatan serta tidak terjadi banyak perubahan/variasi pada isolat tersebut (Dong *et al.* 2013).

Uji infeksi buatan menggunakan GGIV pada ikan gurami pada penelitian ini menghasilkan mortalitas tinggi hingga mencapai 100%. Ikan yang terinfeksi memperlihatkan gejala klinis yang khas infeksi *megalocytivirus* antara lain limpa dan ginjal membesar dan hati pucat. Pengamatan sayatan histologi memperlihatkan banyak sel hipertropi pada limpa dan ginjal serta nekrosis pada limpa. Selain limpa yang merupakan organ dengan kandungan virus terbanyak, pada ginjal juga ditemukan kandungan virus yang cukup tinggi. Hal ini sesuai dengan kondisi dimana limpa dan ginjal merupakan organ target infeksi yang direkomendasikan untuk digunakan dalam diagnosa *megalocytivirus* karena banyaknya partikel virus di dalamnya (Ito *et al.* 2013; Mahardika *et al.* 2004; Fauquet *et al.* 2005; Choi *et al.* 2006). Di dalam sel terinfeksi virus terbentuk badan inklusi yang menandakan siklus replikasi sedang berlangsung. Badan inklusi tersebut merupakan hasil akumulasi virion atau komponen virus, walaupun tidak semua badan inklusi





mengandung virus. Satu atau lebih badan inklusi intrasitoplasmik ataupun intranuklear dapat teramati pada sayatan histologi jaringan sel terinfeksi (Lio-Po 2001). Karakteristik histopatologi yang khas infeksi *megalocytivirus* terlihat pada jaringan ikan seperti nekrosis dan sel basofilik hipertropi dengan inklusi sitoplasmik yang juga merupakan indikasi adanya infeksi sistemik yang disebabkan oleh *megalocytivirus* (Sudthongkong *et al.* 2002; Jancovich *et al.* 2012). Pada penelitian ini, limpa dan ginjal ikan terinfeksi juga memperlihatkan adanya partikel virus berbentuk *icosahedral* dengan ukuran 150-200 nm pada pewarnaan *negative staining* maupun sayatan jaringan menggunakan ultramikrotom dan pengamatan TEM pada kedua organ tersebut, namun partikel virus tersebar di dalam sitoplasma sel terinfeksi dan pembatas membran yang memisahkan badan inklusi dengan membran sel tidak terlihat jelas.

Protein struktural virus merupakan molekul kunci yang berhubungan dengan respons imun terhadap infeksi virus (Sommerset *et al.* 2005). Pada penelitian ini, analisis profil protein sel utuh GGIV menggunakan SDS-PAGE diperoleh lebih dari 20 pita protein dengan ukuran antara 7.7 hingga 204 kDa. Pita protein paling tebal dengan berat molekul sekitar 40-50 kDa diduga merupakan protein *major capsid protein* (MCP) dari virus tersebut. MCP pada RSIV dan kandidat vaksin DNA *singapore grouper iridovirus* (SGIV), merupakan antigen imunogenik (Qin *et al.* 2002; Caipang *et al.* 2006; Ou-yang *et al.* 2012). MCP merupakan protein utama (*predominat structural component*) yang dihasilkan oleh iridovirus selama berlangsungnya infeksi. Sekuen lengkap gen MCP (1362 bp) menghasilkan protein dengan berat 48-55 kDa yang dapat mencakup lebih dari 40-45% dari total protein virus (Williams 1996; Fauquet *et al.* 2005). Pada umumnya protein imunogenik dari Iridovirus berkaitan dengan permukaan virus dan tempat penyusunan virus seperti protein *envelope* (Qin *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2011). Protein struktural virus tersebut berikatan langsung dengan sel inang sehingga memiliki peran yang sangat penting pada proses infeksi dan umumnya berkaitan erat dengan induksi respons imun dan pengenalan antigen (Xiong *et al.* 2011). Walaupun profil protein sel utuh GGIV telah diketahui namun fungsi masing-masing protein belum dapat diidentifikasi.

Pada tahap II penelitian ini dilakukan pengembangan kultur sel primer dari limpa ikan gurami. Kultur sel dari berbagai jaringan dari berbagai spesies inang sangat berguna untuk meneliti respons spesies spesifik dari infeksi virus pada tingkat selular. Kultur sel yang cocok merupakan media penting untuk isolasi, proliferasi, purifikasi dan karakterisasi virus lebih lanjut. Namun, dikarenakan sebab yang tidak diketahui, semua anggota *megalocytivirus* sulit diperbanyak dalam kultur sel yang umum digunakan dalam isolasi virus (Dong *et al.* 2008). Menurut Sobhana *et al.* (2008), kultur sel asal inang dengan spesies yang sama atau dekat kekerabatannya kemungkinan besar memiliki sensitivitas dan kerentanan tinggi terhadap infeksi virus tertentu. Lebih lanjut Lakra *et al.* (2011) menyatakan bahwa beberapa virus patogenik merupakan organ/jaringan spesifik sehingga perlu dilakukan pengembangan kultur sel dari organ dan jaringan yang berbeda dari inang. Selain limpa pada penelitian ini juga telah mencoba mengembangkan kultur sel primer dari ginjal dan hati namun hanya kultur sel dari limpa (sel GPs) yang tumbuh dengan baik. Sel GPs mampu dipertahankan lebih dari 30 pasase dan berhasil berproliferasi setelah dilakukan penyimpanan beku pada suhu -86 °C.

Kultur sel primer yang berasal dari limpa ikan gurami sehat (sel GPs) telah berhasil dilakukan menggunakan metode *explants* melalui disosiasi sel secara

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

enzimatis. Sel GPs pada awalnya bercampur antara sel berbentuk epitel (*epithelial-like*) dan fibroblas (*fibroblast-like*), namun pada subkultur selanjutnya sel berbentuk epitel menjadi lebih dominan. Sel GPs dapat tumbuh dengan baik dan berproliferasi dengan cepat dalam medium L-15 dengan penambahan 20% FBS pada rentang suhu 22-32 °C, dengan suhu optimal pada 27 °C dan hasil ini sesuai dengan suhu infeksi *megalocytivirus*. Menurut Oh *et al.* (2006) kecepatan replikasi bervariasi tergantung pada suhu, dimana pada suhu 20 °C dan 25 °C *megalocytivirus* bereplikasi dengan cepat baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan He *et al.* (2002) bahwa suseptibilitas ISKNV merupakan *temperature dependent* dan infeksi terjadi pada suhu di atas 25 °C. Pada suhu 15 dan 20 °C tidak dijumpai adanya mortalitas ikan uji, sedangkan pada suhu di atas 25 °C ikan yang terinfeksi menunjukkan gejala klinis dan mortalitas mencapai 100%. Infeksi RSIV dilaporkan terjadi pada *red sea bream* pada suhu di atas 25 °C (Nakajima *et al.* 2002), sementara wabah RSIV pada *rock bream* terjadi di Korea pada suhu 23-27 °C (Jung & Oh 2000). *Rock bream* yang dipelihara pada suhu 13 °C tidak menunjukkan gejala klinis namun DNA virus tersebut terdeteksi menggunakan analisis *nested-PCR* (Jun *et al.* 2009) sehingga dikhawatirkan *megalocytivirus* bersifat infeksi laten pada sel inang dan infeksi dapat terjadi sewaktu-waktu dimana suhu lingkungan sesuai untuk replikasi virus tersebut. Kecepatan infeksi dan tingkat keparahan bervariasi dan tergantung pada spesies inang. Selain faktor lingkungan, umur, padat tebar, transport dan penanganan yang kurang baik dapat menginduksi stres dan menurunkan tingkat imunitas ikan serta meningkatkan suseptibilitas ikan terhadap *megalocytivirus* (Choi *et al.* 2006; Chinchar *et al.* 2009)

Uji suseptibilitas kultur sel terhadap GGIV memperlihatkan sel GPs rentan terhadap virus tersebut dengan munculnya *cytophatic effect* dan meningkatnya jumlah *copy* DNA virus di dalam media kultur sel pasca-inokulasi virus. Medium kultur sel yang berisi GGIV tersebut digunakan dalam infeksi buatan secara injeksi *intraperitoneal* dengan pengenceran serial menghasilkan mortalitas 100% dalam waktu 7-11 hari setelah infeksi. Infeksi buatan secara kohabitasi menghasilkan mortalitas 97% dalam waktu 21 hari pasca-infeksi. Hasil ini memperlihatkan bahwa perbanyakkan GGIV secara *in vitro* pada kultur sel GPs tetap mempertahankan virulensi virus tersebut. Hasil percobaan infeksi buatan dengan pengenceran memperlihatkan infeksi GGIV tergantung pada dosis infeksi, dimana semakin tinggi konsentrasi virus maka infeksi terjadi lebih cepat. Sementara infeksi buatan secara kohabitasi juga menghasilkan mortalitas tinggi dan hal ini sesuai dengan hasil penelitian He *et al.* (2002) serta Go & Whittington (2006) dimana *megalocytivirus* dapat menular secara horizontal dari satu individu ke individu lainnya baik pada spesies yang sama maupun spesies yang berbeda. Selain melalui ikan yang terinfeksi, penularan virus juga dapat terjadi melalui air yang terkontaminasi virus atau pemberian pakan ikan *carrier* ISKNV (He *et al.* 2002). Perdagangan ikan hias global merupakan sumber penyebaran Iridovirus pada spesies-spesies baru yang rentan dalam industri akuakultur ke wilayah geografi yang berjauhan (Go & Whittington 2006; Go *et al.* 2006).

Kultur sel yang dipelihara dalam jangka waktu panjang dapat bermutasi sehingga merubah karakteristik asal dari sel tersebut. Kelalaian dalam dokumentasi mengenai asal sel, kondisi dan jumlah pasase dari kultur sel dapat menyebabkan kesalahan pada penggunaan kultur sel sehingga hasil yang diperoleh tidak akurat.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Pada penelitian ini digunakan analisis PCR menggunakan primer gen *beta-actin* ikan gurami sebagai metode konfirmasi mengenai asal sel GPs. Primer gen *beta-actin* ikan gurami menghasilkan pita DNA positif pada berat molekul 410 bp. Hasil sekuensing DNA dan analisis nukleotida (BLASTN) menunjukkan bahwa sekuens *beta-actin* yang teramplifikasi dari sampel sel GPs memiliki kemiripan 99% dengan sekuens referensi dari *Osphronemus goramy* yang ada di *GeneBank*.

Pada tahap III penelitian ini dilakukan preparasi vaksin yaitu perbanyakan GIV pada kultur sel GPs dan proses inaktivasi vaksin menggunakan dua metode yaitu dengan formalin dan pemanasan. Vaksin yang dikembangkan dari virus inaktif banyak digunakan untuk pencegahan dan mengontrol penyakit virus pada ikan (Wilton *et al.* 2015). Proses inaktivasi dilakukan hingga dipastikan kerusakan permukaan pada infeksi virus, namun imunogenisitas virus tetap terjaga. Hasil penelitian yang dilakukan Wilton *et al.* (2014) menunjukkan inaktivasi dengan formaldehid (1:4000 pada suhu 37 °C selama 12 hari) mempengaruhi tahap awal replikasi *poliovirus* (PV) yang menurunkan kemampuan virus berikatan dengan *human poliovirus receptor* (hPVR), menurunkan sensitivitas PV dengan berubah menjadi partikel 135S dan menghilangkan infeksi RNA virus yang terbentuk. Perubahan-perubahan tersebut diduga bertanggung-jawab terhadap hilangnya infeksi PV setelah diinaktivasi. Hasil proses inaktivasi berupa hilangnya imunogenisitas virus terjadi akibat kerusakan parsial pada epitop antigenik spesifik yang disebabkan penambahan formaldehid.

Secara umum formaldehid banyak digunakan dalam preparasi vaksin untuk menstabilkan komponen protein atau menginaktifkan molekul toksin dari bakteri (Pilstrom dan Bengten 1996). Formaldehid akan bereaksi dengan gugus asam amino lisin (ikatan tidak stabil) yang membentuk ikatan metilen (methylen bridge) sehingga menjadi gugus asam amino yang stabil. Reaksi tersebut dapat terbentuk antara asam amino dengan molekul yang sama sehingga membentuk ikatan silang antar internal protein atau antara dua molekul membentuk ikatan dimer (Tommaso *et al.* 1994). Formaldehid dapat meningkatkan proteksi respons antibodi namun dapat berpengaruh pada proses pengenalan sel T terhadap antigen sebagai ikatan peptida yang dipresentasikan oleh *major histocompatibility complex* (MHC) untuk membentuk kompleks peptida-MHC dan juga mempengaruhi presentasi antigen dengan mengintervensi pada saat degradasi proteolitik menjadi peptida (Seder dan Hill 2000).

Hasil penelitian He *et al.* (2002) menunjukkan suhu dapat digunakan dalam proses inaktivasi virus (ISKNV sensitif terhadap suhu 56 °C selama 30 menit). Selain itu juga virus tersebut sensitif terhadap klorin, potasium permanganat, paparan UV dan pH 3 – pH 11. *Nervous necrosis virus* (NNV) yang diinaktivasi dengan pemanasan (*heat denaturation*/HD pada 100 °C selama 5 menit) tidak dapat berikatan dengan NNV-*neutralizing antibodies*. Menurut Gye *et al.* (2017), proses inaktivasi dengan pemanasan tersebut merusak epitop (terjadi perubahan konformasi struktural karena pemanasan/*heat-denaturation*). Proses pemanasan menyebabkan denaturasi protein sehingga terjadi konformasi struktural yang menyebabkan virus tidak dapat berikatan dengan reseptor pada inang. Menurut Zhang *et al.* (2004) protein *envelope* virus sangat penting untuk pengenalan dan pengikatan virus pada reseptor inang serta penting dalam proses fusi dengan membran inang pada saat infeksi virus. Walaupun awalnya diduga *megalocytivirus* masuk ke dalam sel inang melalui endositosis yang dimediasi oleh reseptor, namun

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

saat ini diketahui ISKNV masuk ke dalam sel MFF-1 melalui *caveola-dependent* endositosis (Guo *et al.* 2012).

Tahap IV penelitian ini dilakukan efikasi vaksin *megalocytivirus*. Uji efikasi vaksin didasarkan pada nilai kelangsungan hidup relatif/*relative percentage survival* (RPS) dan penekanan mortalitas yang efektif pada ujiantang sehingga diperoleh nilai proteksi yang cukup tinggi (Hazreen-nita *et al.* 2019). Untuk dapat menginduksi respons imun dan proteksi yang diinginkan, selain dibutuhkan kandidat vaksin (isolat virus) yang memiliki imunogenitas yang tinggi, metode inaktivasi juga sangat berpengaruh pada kualitas antigen yang dihasilkan (Seder *et al.* 2000). Pada penelitian ini, hasil vaksinasi memperlihatkan vaksin *formalin-killed* menghasilkan RPS yang baik yang menunjukkan bahwa protein struktural GGIV bersifat imunogenik dan metode inaktivasi *formalin-killed* dapat merusak kemampuan virus dalam proses replikasi dan infeksi, namun tetap dapat dikenali oleh sistem imun dari inang (Hazreen-nita 2019). Pada penelitian ini dikarenakan waktu dan *stock* virus yang terbatas, tidak dilakukan optimasi terhadap besarnya suhu dan lama proses inaktivasi pada pembuatan vaksin *heat-killed* yang menjadikan proses inaktivasi menjadi kurang optimal sehingga diperoleh nilai RPS yang kurang baik.

Menurut Zhang *et al.* (2016) vaksin dapat menginduksi sistem kekebalan dan proteksi dalam dua tahap yaitu: proteksi non-spesifik (berlangsung lebih awal) dan proteksi spesifik (berlangsung lebih belakangan). Sel-sel darah perifer, lisozim dan superoksida dismutase serta sitokin dapat diaktivasi dengan cepat pada awal infeksi virus. Sementara antibodi yang dihasilkan dari sel plasma berperan dalam proteksi spesifik terhadap infeksi virus (Burton 2002; Byon *et al.* 2006). Vaksinasi menggunakan vaksin *formalin-killed* pada ikan gurami dapat menginduksi sistem pertahanan non-spesifik dan memberikan proteksi yang cukup baik. Hal ini dapat terlihat dari peningkatan ekspresi mRNA dari gen terkait imunitas pada limpa antara lain sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1 β) dan MyD88 yang berperan dalam transduksi sinyal aktivasi jalur *toll-like receptor* (TLR). Vaksinasi menggunakan vaksin *formalin-killed* juga memberikan proteksi spesifik terhadap GGIV yang terlihat dari peningkatan titer antibodi anti-GGIV setelah ujiantang.

Hak Cipta dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



7 SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari beberapa tahapan penelitian, maka dapat disimpulkan antara lain:

1. Hasil analisis molekuler dan pohon filogenetik memperlihatkan GGIV merupakan spesies baru ISKNV dari genus *megalocytivirus*.
2. Sel primer GPs telah berhasil dikembangkan dari limpa ikan gurami dan suseptibel terhadap *giant gourami iridovirus*/GGIV (*megalocytivirus* penyebab infeksi pada ikan gurami).
3. Proses preparasi dan pembuatan vaksin inaktif berlangsung dengan efektif dan vaksin aman untuk diaplikasikan pada ikan gurami. Vaksin *formalin-killed* menunjukkan proteksi yang baik dengan nilai RPS yang tinggi, peningkatan titer antibodi dan peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1 β) serta gen MyD88 yang berperan dalam transduksi sinyal aktivasi jalur sinyal *toll-like receptor* (TLR).

Saran

Vaksin *megalocytivirus* pada penelitian ini masih dalam tahap pengembangan sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut sebelum vaksin dapat dimanfaatkan untuk pencegahan penyakit virus khususnya pada ikan gurami. Perlu dilakukan optimasi pada proses inaktivasi vaksin *heat-killed* agar memperoleh informasi besarnya suhu dan lama waktu inaktivasi agar protein imunogenik pada GGIV tidak terdenaturasi. Penelitian skala laboratorium masih dilanjutkan untuk mengetahui dosis optimum dan efektivitas vaksin *formalin-killed* melalui aplikasi melalui injeksi, perendaman dan oral melalui pakan. Penelitian lanjutan skala lapang dan multi-lokasi serta *strain* ikan gurami yang paling tahan terhadap infeksi *megalocytivirus*.

@Hakcipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

line susceptible to grouper nervous necrosis virus GNNV. *J Fish Dis.* 22: 173-182

- Chinchar VG, Essbauer S, He JG, Hyatt A, Miyazaki T, Seligy V, Williams T. 2005. Family Iridoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus taxonomy*. 8th Rep *Int Comm Taxon Viruses*. Academic Press. San Diego, CA. p 145-162
- Chinchar VG, Hyatt A, Miyazaki T, Williams T. 2009. Family Iridoviridae: poor phylogenetic relations no longer. *Curr Top Microbiol Immunol.* 328: 123-170.
- Chinchar VG. 2011. Megalocytivirus: Iridoviridae, Chordiridovirinae. In: Tidona D, Darai G. (eds) *The Springer Index of Viruses*. Springer Science+Business Media, LLC. p 763-768
- Choi SK, Kwon SR, Nam YK, Kim SK, KH Kim. 2006. Organ distribution of red sea bream iridovirus (RSIV) DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on the transition of RSIV into acute phase. *Aquaculture.* 256: 23-26
- Chou HY, Hsu CC, Peng TY. 1998. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus sp.*) in Taiwan. *Fish Pathol.* 33: 201-206
- Crane MStJ, Davies KR. 2006. Aquatic animal health subprogram: establishment of diagnostic expertise for detection and identification of red sea bream iridovirus (RSIV). Project number 2003/620. Fisheries Research and Development Corporation, Canberra
- Dadar M, Dhama K, Vakharia VN, Hoseinifar SH, Karthik K, Tiwari R, Khandia R, Munjal A, Salgado-Miranda C, Joshi SK. 2017. Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: global status and current trends. *Rev Fish Sci Aquac.* 25(3): 184-217
- Dong C, Weng S, Luo Y, Huang M, Ai H, Yin Z, He J. 2010. A new marine megalocytivirus from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Virus Res.* 147 (1): 98-106
- Dong C, Weng S, Shi X, Xu X, Shi N, He J. 2008. Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Virus Res.* 135: 273-281
- Dong CF, Xiong XP, Shuang F, Weng SP, Zhang J, Zhang Y, Luo YW, He JG, 2011. Global landscape of structural proteins of infectious spleen and kidney necrosis virus. *J Virol.* 85: 2869-2877
- Dong YS, Weng J, He C. Dong, 2013. Field trial tests of FKC vaccines against RSIV genotype Megalocytivirus in cage-cultured mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) in an inland reservoir. *Fish Shellfish Immunol.* 35 (5): 1598-1603
- Ellis AE. 1997. Immunization with bacterial antigens: furunculosis. *Dev Biol Stand.* 90: 107-116.
- Ellis AE. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol.* 25: 827-839
- Evensen Ø. 2009. Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants and formulations. In: Basurco B, Roger C (eds) *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean Aquaculture*. Zaragoza: CIHEAM (Options Mediterraneennes; Vol A pp 177-186)
- Evensen Ø, Brudeseth B, Mutoloki S. 2005. The vaccine formulation and its role in

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

inflammatory processes in fish – effects and adverse effects. In: Progress in Fish Vaccinology (ed. by P.J. Midtlyng). *Dev Biol Stand.* 121: 117-125.

- FAO Asia-Pacific Fishery Commission. 2014. Regional overview of aquaculture trends in the Asia-Pacific Region 2014. *RAP Publication* 2014/26. 45 p
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. 2005. Virus Taxonomy. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, USA pp. 145-161
- Huang X, Li N, Lai Y, Luo X, Wang Y, Shi C, Huang Z, Wu S, Su J. 2015. A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization. *J Fish Biol.* 86: 32–45
- Huang X, Li N, Lai Y, Liu L, Lin Q, Shi C, Huang Z, Wu S. 2012. Protective immunity against iridovirus disease in mandarin fish, induced by recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.* 33: 880-885
- Gibson-Kueh S, Netto P, Ngoh-Lim GH, Chang SF, Ho LL, Qin QW, Chua FHC, Ng ML, Ferguson HW. 2003. The pathology of systemic iridoviral disease in fish. *J Comparative Pathol.* 129: 111-119
- Go J, Lancaster M, Deece K, Dhungyel O, Whittington R. 2006. The molecular epidemiology of iridovirus in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) from distant bio-geographical regions suggests a link between trade in ornamental fish and emerging iridoviral diseases. *Mol Cell Probes.* 20 (3-4): 212-222
- Go J, Whittington R. 2006. Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family Iridoviridae) of Dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. *Aquaculture.* 258: 140-149
- Guo CJ, Wu YY, Yang LS, Yang XB, He J, Mi S, Jia KT, Weng SP, Yu XQ, JG He. 2012. Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (a Fish Iridovirus) Enters Mandarin Fish Fry Cells via Caveola-Dependent Endocytosis. *J. Virol.* 86 (5): 2621-2631
- Guidotti LG, Chisari FV. 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Ann Rev Immunol.* 19: 65-91.
- Gye HJ, Park MJ, Kim WS, Oh MJ, Nishizawa T. 2017. Heat-denaturation of conformational structures on nervous necrosis virus for generating neutralization antibodies. *Aquaculture.* 484: 65-70
- Hazreen-Nita M, Azila A, Mukai Y, Firdaus-Nawi M & Nur-Nazifah M. 2019. A review of betanodavirus vaccination as preventive strategy to viral nervous necrosis (VNN) disease in grouper. *Aquac Int.* <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00410-5>.
- He JG, Zeng K, Weng SP, Chan SM. 2002. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture.* 204: 11–24
- He JG, Wang SP, Zeng K, Huang ZJ, Chan SM. 2000. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *J Fish Dis.* 23: 219–222
- He JG, Weng SP, Huang ZJ, Zeng K. 1998. Identification of outbreak and infectious diseases pathogen of *Siniperca chuatsi*. *Acta Sci Natur Univ Sunyatseni.* 5: 74–77
- Huang X, Huang Y, Sun J, Han X, Qin Q. 2009. Characterization of two grouper

Epinephelus akaara cell lines: Application to studies of Singapore grouper iridovirus (SGIV) propagation and virus–host interaction. *Aquaculture*. 292: 172–179

Imajoh M, Ikawa T, Oshima S. 2007. Characterization of a new fibroblast cell line from a tail fin of red sea bream, *Pagrus major*, and phylogenetic relationships with a recent RSIV isolate in Japan. *Virus Res*. 126: 45–52

Inouy K, Yamano K, Nakajima K, Matsuoko M, Wada Y, Sorimachi M. 1992. Iridovirus infection of cultured Red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol*. 27: 19-27

Ito T, Yoshiura Y, Kamaishi T, Yoshida K, Nakajima K. 2013. Prevalence of red sea bream iridovirus among organs of Japanese amberjack (*Seriola lalandi*) exposed to cultured red sea bream iridovirus. *J Gen Virol*. 94: 2094-2101

Lancovsch JK, Chinchar VG, Hyatt A, Miyazaki T, Williams T, Zhang QY. 2012. Family Iridoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus taxonomy: 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, p. 193–210

Jeong JB, Kim HY, Jun LJ, Lyu JH, Park NG, Kim JK, Jeong HD. 2008. Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes. *Dis Aquat Org*. 78: 209–215

Jin JW, Kim YK, Hong S, Kim YC, Kwon WJ, Jeong HD. 2017. Identification and characterization of megalocytivirus type 3 infection with low mortality in starry flounder, *Platichthys stellatus*, in Korea. *J World Aquacult Soc*. doi: 10.1111/jwas.12439

Jun LJ, Jeong JB, Kim JH, Nam JH, Shin KW, Kim JK, Kang JC, Jeong HD. 2009. Influence of temperature shifts on the onset and development of red sea bream iridoviral disease in rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Dis Aquat Org*. 84: 201-208.

Jung SJ, Oh MJ. 2000. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *J Fish Diseases*. 23: 223-226.

Jung-Schroers V, Adamek M, Wohlsein P, Wolter J, Wedekind H, Steinhagen D. 2016. First outbreak of an infection with infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in ornamental fish in Germany. *Dis Aquat Org*. 119: 239-244

Kawato Y, Yamashita H, Yuasa K, Miwa S, Nakajima K. 2017. Development of a highly permissive cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) for red sea bream iridovirus. *Aquaculture*. 473: 291-298

Kelly DC, Tinsley TW. 1972. The proteins of iridescent virus types 2 and 6. *J Invertebr Pathol*. 19: 273-275

Kim YJ, Jung SJ, Choi TJ, Kim HR, Rajendran KV, Oh MJ. 2002. PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. *J Fish Dis*. 25:121–12.

Koesharyani I, Gardenia L. 2013. New megalocytivirus infected to the cultured freshwater giant gourami, *Osphronemus gourami* Lac. in Indonesia. *J Aquac Indones*. 8 (1): 93-99.

Koesharyani I, Mahardika K, Sugama K and Yuasa. 2001. Iridovirus caused mortality in *Epinephelus coioides*. Detection using polymerase chain reaction (PCR). *Proceedings of Mariculture Technology and Sea Farming*

Development. Ministry of Fisheries and Marine Affairs of Indonesia in cooperation with Japan International Cooperation Agency. p 228-234

Koesharyani I, Santika A, Zainun Z, Jaelani AS, Maskur, Novita H. 2009. Infeksi iridovirus infection in freshwater ornamental fish Dwarf gourami (*Colisa lalia*) in Indonesia. *Aquaculture Technology Inovation Forum*. p 93-99

Liu S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 35: 1547-1549

Murita J, Nakajima K, Hirono I, Aoki T. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol*. 33: 17-23

Murita J, Nakajima K. 2012. Review Megalocytiviruses. *Viruses*. 4: 521-538

Ngai YS, John JA, Lin CH, Guo IC, Chen SC, Fang K, Chang CY. 2003. Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck and Schlegel), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses. *J Fish Dis*. 26: 31-42

Lakra WS, Swaminathan TR, Joy KP. 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish Physiol Biochem*. 37:1-20

Lakra WS, Sivakumar N, Goswami M, Bhonde RR. 2006. Development of two cell culture systems from Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquacult Res*. 37: 18-24

Lin Q, Fu XZ, Liu LH, Liang HR, Guo HZ, Yin SW, Kumaresan V, Huang ZB, Li NQ. 2017. Application and development of a TaqMan real-time PCR for detecting *Infectious spleen and kidney necrosis virus* in *Siniperca chuatsi*. *Microb Pathog*. 107: 98-105

Lio-Po, GD. 2001. Viral diseases. In G. D. Lio-Po, C. R. Lavilla, & E. R. Cruz-Lacierda (Eds.), *Health management in aquaculture* (pp. 9-24). Tigbauan, Iloilo, Philippines: SEAFDEC Aquaculture Department.

Livak, KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 25 (4): 402-408

Ma H, Xie J, Weng S, Zhou T, He J. 2012. Co-infection of megalocytivirus and viral nervous necrosis virus in a very severe mass mortality of juvenile orange-spotted groupers (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*. 358: 170-175

Magnadottir B, Gudmundsdottir S, Gudmundsdottir BK, Helgason S. 2009. Natural antibodies of cod (*Gadus morhua* L.): specificity, activity and affinity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 154: 309-316

Mahardika K, Mastuti I, Muzaki A, Sudewi. 2016. Addition of adjuvants in recombinant subunit vaccines for the prevention of grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV) infection in humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Indones Aquat J*. 11 (2): 87-95

Mahardika K, Zafran, Yamamoto A, Miyazaki T. 2004. Susceptibility of juvenile humpback grouper *Cromileptes altivelis* to grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV). *Dis Aquat Org*. 59: 1-9

Mahardika K, Koesharyani I, Sugama K, Priyono A, Yuasa K. 2001. Histopathological study of iridovirus infection in *Epinephelus coioides* and *Epinephelus bleekeri*. *Proceedings of Mariculture Technology and Sea*



Farming Development. Jakarta, Indonesia. Japan International Cooperation Agency, Jakarta, p 334–341

- McDermott GP, Do D, Litterst CM, Maar D, Hindson CM, Steenblock ER, Legler TC, Jouvenot Y, Marrs SH, Bemis A, Shah P, Wong J, Wang S, Sally D, Olivier L, Dinio T, Han C, Brackbill TP, Hodges SP, Ling Y, Klitgord N, Harman, GJ, Berman JR, Koehler RT, Hiddessen, AL, Walse P, Bousse L, Zonev S, Hefner E, Hindson BJ, Cauly 3rd TH, Hamby K, Patel VP, Regan P, Wyatt PW, Karlin-Neumann GA, Stumbo DP, Lowe AJ. 2013. Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Anal Chem.* 85: 11619–11627
- Midtvedt PJ. 1997. Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects. *Dev Biol Stand.* 90: 371-379
- Murray A, Peeler EJ. 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Prev Vet Med.* 67: 223-235.
- Nagasima Y, Sendo A, Shimakura K, Shiomi K, Kobayashi T, Kimura B & Fujii T. 2001. Antibacterial factors in skin mucus of rabbitfishes. *J Fish Biol.* 58: 1761-1765.
- Nakajima K, Ito T, Kurita J, Kawasaki H, Itano T, Fukuda Y, Aoi Y, Tooriyama T, Manabe S. 2002. Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in various cultured marine fish under laboratory conditions. *Fish Pathol.* 37: 90-91
- Nakajima K, Maeno Y, Honda A, Yokoyama K, Tooriyama T, Manabe S. 1999. Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis Aquat Org.* 36: 73-75
- Nakajima K, Maeno Y, Kurita J, Inui Y. 1997. Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathol.* 32: 205-209
- Nicholson BL, Danner DJ, Wu JL. 1987. Three new continuous cell lines from marine fishes of Asia. *In Vitro Cell Dev Biol.* 23: 199-204
- Nowak BF. 1999. Significance of environmental factors in aetiology of skin diseases of teleost fish. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* 19: 290–292
- Nuryati S, Aulia N, Rahman. 2015. Efectivity of *Musa paradisiaca* extract to control *Saprolegnia* sp. infection on giant gourami larvae. *J Aquac Indones.* 14 (2): 151-158
- Oh MJ, Kitamura SI, Kim WS, Park MK, Jung SJ, Miyadai T et al. 2006. Susceptibility of marine fish species to a megalocytivirus, turbot iridovirus, isolated from turbot, *Psetta maximus* (L.). *J Fish Dis.* 29: 415–421
- Oh SY, Nishizawa T. 2016. Establishment of rock bream *Oplegnathus fasciatus* embryo (RoBE-4) cells with cytolytic infection of red seabream iridovirus (RSIV). *J Virol Methods.* 238: 1–5
- Ou-yang Z, Wang P, Huang Y, Huang X, Wan Q, Zhou S, Wei J, Zhou Y, Qin Q. 2012. Selection and identification of Singapore grouper iridovirus vaccine candidate antigens using bioinformatics and DNA vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 149: 38–45
- Parameswaran V, Shukla R, Bhonde RR, Sahul Hameed AS. 2006 a. Establishment of embryonic cell line from sea bass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *J Virol Methods.* 137 (2): 309-316
- Parameswaran V, Shukla R, Bhonde, RR, Sahul Hameed AS. 2006 b. Splenic cell line from sea bass, *Lates calcarifer*: establishment and characterisation.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Aquaculture. 261: 43–53

Pilstrom L, Bengten E. 1996. Immoglobulin ins fish: genes, epression and structure. *Fish Shellfish Immunol*. 6: 243-262

Plant KP, LaPatra SE. 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Dev Comp Immunol*. 35(12): 1256–1262

Lumb IA. 1984. Immunization of warm water fish against five important pathogens. *Office Intern Epizoot*. 1: 199-222.

Pusat Penyuluhan Perikanan dan Kelautan. 2011. Statistics Data Series of Indonesian Fish Culture Production. Pusat Penyuluhan Perikanan dan Kelautan, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Jakarta.

Qin QW, Shi C, Gin KY, Lam TJ. 2002. Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus spp*. *J Virol Methods*. 106: 89-96

Reed JL, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end-points. *Am J Hyg*. 27: 493-497

Sahul Hameed AS, Parameswaran V, Shukla R, Singh ISB, Thirunavukkarasu AR, Bhonde RR. 2006. Establishment and characterisation of India's first marine fish cell line (SISK) from the kidney of sea bass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*. 257: 92-103

Secombes CJ. 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T, editors. The Fish immune system: organism, pathogen and environment. San Diego: Academic Press, 1996. p. 63 - 103

Seder RA, Hill AVS. 2000. Vaccines against intracellular infection requiring cellular immunity. *Nature*. 406: 793-797

Setijaningsih L, Arifin OZ, Gustiano R. 2007. Characterization of three strains of Giant gouramy (*Osphronemus gouramy* Lac.) based on truss morphometries method. *Indonesian J Ichtiol*. 7(1): 23-30

Shefat SHT. 2018. Vaccines for use in finfish aquaculture. *Acta Sci Pharm Sci*. 2 (11): 15–19

Shen YF, Liu L, Chen WC, Hu, Zhu B, Wang GX. 2018. Evaluation on the antiviral activity of arctigenin against spring viraemia of carp virus. *Aquaculture*. 483: 252–62

Shephard KL. 1994. Functions for fish mucus. *Rev Fish Biol Fisher*. 4: 401–429.

Shimmoto H, Kawai K, Ikawa T, Oshima S. 2010. Protection of red sea bream *Pagrus major* against red sea bream iridovirus infection by vaccination with a recombinant viral protein. *Microbiol Immunol*. 54: 135–142

Shinmoto H, Taniguchi K, Ikawa T, Kawai K, Oshima S. 2009. Phenotypic diversity of infectious red bream iridovirus isolates from cultured fish in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 75: 3535-41

Shuang F, Luo Y, Xiong X, Weng S, Li Y, He J, Dong, C. 2013. Virions proteins of an RSIV-type megalocytivirus from spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus* (SKIV- ZJ07). *Virology*. 437: 27-37

Sivasankar P, John KR, George MR, Mageshkumar P, Manzoor MM, Jeyaseelan MJP. 2017. Characterization of a virulent ranavirus isolated from marine ornamental fish in India. *Virus Dis*. DOI 10.1007/s13337-017-0408-2

Skinner LA, Schulte PM, Balfry SK, McKinley RS, LaPatra SE. 2010. The association between metabolic rate, immune parameters, and growth performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

the injection of DNA vaccine alone and concurrently with a polyvalent, oil-adjuvanted vaccine. *Fish Shellfish Immunol.* 28: 387-393

- Sobhana KS, George KC, Venkat Ravi G, Ittoop G, Paulraj R. 2008. A cell culture system developed from heart tissue of the greasy grouper, *Epinephelus surina* (Forsskal 1775) by enzymatic dissociation. *Indian J Fish.* 55(3): 251-266
- Tommeriset I, Krossøy B, Biering E, Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines.* 4: 89-101
- Song Y, Kitamura SI, Jung SJ, Miyadai T, Tanaka S, Fukada Y, Kim SR and Oh J. 2008. Genetic variation and geographic distribution of megalocytiviruses. *J Microbiol.* 46: 29-33
- Song WJ, Qin QW, Qiu J, Huang CH, Wang F, Hew CL. 2004. Functional Genomics Analysis of Singapore Grouper Iridovirus: Complete Sequence Determination and Proteomic Analysis. *J Virol.* 78 (22): 12576-12590
- Subramaniam K, Shariff M, Omar AR, Hair-Bejo M. 2012. Megalocytivirus infection in fish. *Rev Aquacult.* 4: 221-233.
- Sudthongkong C, Miyata M, Miyazaki T. 2002. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and Dwarf gourami. *Dis Aquat Org.* 48: 163-173
- Sukenda S, Gardenia L, Zairin MJ, Lusiastuti A, Alimuddin A. 2020. Identification of giant gourami iridovirus (GGIV): a new infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from natural outbreak in cultured *Osphronemus goramy*. *Aquat Int.* <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00513-4>
- Thorarinnsson R, Powell DB. 2006. Effects of disease risk, vaccine efficacy, and market price on the economics of fish vaccination. *Aquaculture.* 256: 42-49
- Tidona, CA, Schnitzler P, Kehm R, Darai G. 1998. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? *Virus Genes.* 16: 59-66.
- Tommaso AD, Magistris MTD, Bugnoli M, Marsili I, Rappuoli R, Abrignani S. 1994. Formaldehyde treatment of proteins can constrain presentation to T cells by limiting antigen processing. *Infect Immun.* 62(5): 1830-1834
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med-Czech.* 56 (10): 486-503.
- Waltzek TB, Marty GD, Alfaro ME, Bennett WR, Garver KA, Haulena M, Weber III ES, Hedrick RP. 2012. Systemic iridovirus from threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* represents a new megalocytivirus species (family Iridoviridae). *Dis Aquat Org.* 98: 41-56
- Wang YQ, Lu L, Weng SP, Huang JN, Chan SM and He JG. 2007. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. *Arch Virol.* 152: 763-773
- Weber ES III, Waltzek TB, Young DA, Twitchell EL, Gates AE, Vagelli A, Risatti GR, Hedrick RP, Frasca SJr. 2009. Systemic iridovirus infection in the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni* Koumans 1933) *J Vet Diagn Invest.* 21: 306-320
- Welcome RL. 1988. International introductions of inland aquatic species. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries Technical Paper Rome, Italy. 294:1-318
- Wen CM, Lee CW, Wang CS, Cheng YH, Huang HY. 2008. Development of two

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

cell lines from *Epinephelus coioides* brain tissue for characterization of betanodavirus and megalocytivirus infectivity and propagation. *Aquaculture*. 278: 14–21

- Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. 2004. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep*. 24:631–639
- Whitley DS, Yu K, Sample RC, Sinning A, Henegar J, Norcross E, Chinchar VG. 2010. Frog virus 3 ORF 53R, a putative myristoylated membrane protein, is essential for virus replication in vitro. *Virology*. 405: 448–456
- Williams T, Barbosa-Solomieu V, Chinchar VG. 2005. A decade of advances in iridovirus research. *Adv Virus Res*. 6: 173-248
- Williams T. 1996. The Iridoviruses. *Adv Virus Res*. 46: 345–412
- Willis DB, Goorha R, Chinchar VG. 1985. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. *Curr Top Microbiol Immunol*. 116: 77-106
- Wilton T, Dunn G, Eastwood D, Minor PD, Martin J. 2014. Effect of formaldehyde inactivation on Poliovirus. *J Virol*. 88 (23): 13928
- Winarno, F.G. 1992. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 253 Hlm.
- Xu X, Zhang L, Weng S, Huang Z, Lu J, Lan D, Zhong X, Yu X, Xu A, He J. 2008. A zebrafish (*Danio rerio*) model of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection. *Virology*. 376: 1-12
- Zhang L, Ma J, Fan Y, Zhou Y, Xu J, Liu W, Gu Z, Zeng L. 2016. Immune response and protection in gibel carp, *Carassius gibelio*, after 2 vaccination with β -propiolactone inactivated cyprinid herpesvirus 2. *Fish Shellfish Immunol*. 49: 344-350
- Zhang J, Li M. 2015. ORF75 of megalocytivirus RBIV-C1: A global transcription regulator and an effective vaccine candidate. *Fish Shellfish Immunol*. 45: 486-494
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*. 7(1-2): 203-14
- Zhou S, Wan Q, Huang Y, Huang X, Cao J, Ye L, Lim TK, Lin Q, Qin Q. 2011. Proteomic analysis of Singapore grouper iridovirus envelope proteins and characterization of a novel envelope protein VP088. *Proteomics*. 11, 2236–2248.

@Hak Cipta milik IPB University

IPB University

RIWAYAT HIDUP



@Hak cipta milik IPB University

Penulis merupakan putri pertama dari tiga bersaudara dari Bapak dr Syukri Sahab, MSi. dan Ibu Arfah Mardiana yang dilahirkan di Jakarta pada tanggal 15 Desember 1974. Penulis menikah pada tahun 1998 dengan Achmad Abimanyu, ST dan dikaruniai 4 orang anak yaitu Ahmad Naufali Azmi, Ahmad Akmal Zaidan, Amaryllis Putri Khadeeja dan Arundina Putri Fatheema.

Penulis menyelesaikan pendidikan dasar hingga menengah di SD Angkasa 3 Jakarta Timur lulus tahun 1986, SMPN 81 Jakarta Timur lulus tahun 1989 dan SMAN 67 Jakarta Timur lulus tahun 1992. Pendidikan sarjana (S1) diselesaikan di Jurusan Biologi Institut Teknologi Bandung dan dinyatakan lulus tahun 1997. Pendidikan magister (S2) ditempuh di Sekolah Pascasarjana Jurusan Biologi Institut Teknologi Bandung dan dinyatakan lulus pada tahun 2000. Pendidikan doktor (S3) ditempuh di Program Studi Ilmu Akuakultur Sekolah Pascasarjana IPB pada tahun 2015 hingga 2020 melalui beasiswa Badan Riset Sumberdaya Manusia Kelautan dan Perikanan (BRSDMKP) Kementerian Kelautan dan Perikanan.

Penulis bekerja sebagai peneliti di Pusat Riset Perikanan Budidaya dari tahun 2002 hingga 2014, Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan, Depok-Balai Penelitian Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan, Bogor dari tahun 2014 hingga sekarang. Selama menempuh program doktor penulis telah mempublikasikan sebagian dari hasil riset berupa dua artikel pada jurnal internasional terindex Scopus. Artikel ilmiah dengan judul “Identification of giant gourami iridovirus (GGIV): a new Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) from natural outbreak in cultured *Osphronemus goramy*” telah dipublikasikan di jurnal internasional bereputasi *Aquaculture International* (DOI: 10.1007/s10499-020-00513-4) dan “Development of primary cell culture from spleen of giant gourami (*Osphronemus goramy*) for propagation of giant gourami iridovirus (GGIV)” telah dipublikasikan di jurnal internasional bereputasi *Journal of Fish Diseases* (DOI: 10.1111/jfd.13155). Penulis juga mempresentasikan bagian dari disertasi pada kegiatan seminar internasional di *International Conference on Aquaculture Biotechnology* (ICAB) pada tanggal 11-12 Oktober 2018 di Bogor.