

**DEVELOPMENT OF CELL CULTURE AND INACTIVE VACCINE
FOR PREVENTION OF *Megalocytivirus* INFECTION IN
GURAMI (*Osphronemus goramy*)**

LILA GARDENIA



**POSTGRADUATE SCHOOL
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2020**

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

IPB University





PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul “Pengembangan Kultur Sel dan Vaksin Inaktif untuk Pencegahan Infeksi *Megalocytivirus* pada Ikan Gurami (*Osporonemus goramy*)” adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Mei 2020

Lila Gardenia
NIM C161150101

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
@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.



@Hak cipta milik *IPBUniversity*

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





RINGKASAN

LILA GARDENIA. Pengembangan Kultur sel dan Vaksin Inaktif untuk Pencegahan Infeksi *Megalocytivirus* pada Ikan Gurami (*Osphronemus goramy*).
Dibimbing oleh SUKENDA, MUHAMMAD ZAIRIN Jr., ALIMUDDIN dan ANGLA M. LUSIASTUTI.

Megalocytivirus merupakan anggota dari *family Iridoviridae* yang menjadi patogen penyebab infeksi sistemik fatal, menyebabkan kematian massal dan kerugian ekonomi yang tinggi pada berbagai spesies ikan budidaya air laut, air tawar dan ikan hias. Di Indonesia, sejak tahun 2011 *megalocytivirus* telah diketahui menjadi patogen penyebab infeksi di beberapa kasus wabah penyakit pada ikan gurami (*Osphronemus goramy*) khususnya di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Bali. Pesatnya ekspansi dan intensifikasi budidaya perikanan menimbulkan banyak munculnya kasus wabah penyakit. Tingkat kematian ikan akibat infeksi virus umumnya tinggi dan sampai saat ini 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 yang disebabkan oleh infeksi virus sampai saat ini masih sulit dilakukan. Salah satu usaha pencegahan yang cukup efektif dan aman bagi lingkungan budidaya adalah melalui vaksinasi. Tujuan penelitian ini adalah melakukan pengembangan vaksin inaktif berbasis kultur sel terhadap infeksi *megalocytivirus* yang menyerang ikan gurami.

Tahap pertama penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi *megalocytivirus* pada budidaya ikan gurami. Identifikasi virus 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 *fragment* MCP dari genom lengkap ISKNV. Infeksi buatan dilakukan melalui injeksi secara *intraperitoneal* menggunakan *supernatant homogenate* yang terbuat dari organ dalam ikan yang terinfeksi dari wabah penyakit dan menghasilkan mortalitas sebesar 93% dalam waktu 12 hari. Hasil infeksi buatan menunjukkan gejala klinis terinfeksi seperti lemah, kehilangan nafsu makan, warna tubuh gelap/pucat dan hemoragi. Hasil nekropsis menunjukkan 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 limpa dan ginjal dan adanya sel-sel hipertropi yang merupakan karakteristik infeksi *megalocytivirus*.

Pada tahap II dilakukan pengembangan kultur sel primer dari limpa ikan gurami sebagai sel inang untuk memperbanyak GGIV secara *in vitro*. Pembuatan kultur sel primer dari limpa ikan gurami ini dilakukan melalui disosiasi sel secara enzimatis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel primer dari limpa ikan gurami (*gourami primary cell from spleen/GPs*) ini dapat tumbuh dengan baik pada suhu 27 °C dan penambahan 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL Life Technologies) dalam medium L-15 cukup baik untuk pertumbuhan sel. Sel GPs

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.



yang diinfeksi dengan GGIV yang diisolasi dari ikan gurami 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. Infeksi buatan secara kohabitasi menghasilkan mortalitas 97% dalam waktu 11 hari dengan abnormalitas pada hati dan limpa. Sel primer GPs telah berhasil dilakukan subkultur hingga lebih dari 30 pasase dan sel primer ini suseptibel terhadap infeksi GGIV yang merupakan patogen penyebab infeksi ISKNV pada budidaya ikan gurami.

Pada tahap III penelitian ini dilakukan perbanyakan GGIV pada kultur sel primer GPs dalam pengembangan vaksin *megalocytivirus* pada ikan gurami. Tujuan penelitian tahap III ini adalah untuk mengembangkan vaksin dan mengukur efektivitas vaksin menggunakan nilai *relative percent survival* (RPS), parameter serologi (titer antibodi), dan molekuler (ekspresi gen terkait imunitas ikan gurami). Virus diperbanyak pada kultur sel GPs dan menghasilkan titer virus sebesar $10^{5.9}$ TCID₅₀/ml. Inaktivasi virus dilakukan menggunakan dua metode yaitu *heat-killed* dan *formalin-killed*. Vaksinasi dilakukan pada ikan gurami secara injeksi *intraperitoneal* selama tiga minggu periode induksi vaksin dan ujiantang dilakukan dengan metode kohabitasi. Hasil percobaan menunjukkan nilai RPS sebesar 17.7-73.3% dimana vaksin *formalin-killed* menghasilkan RPS yang lebih tinggi. Akumulasi virus pada limpa ikan uji vaksin *formalin-killed* lebih rendah dibandingkan kelompok vaksin *heat-killed* dan kontrol. Pengukuran *differential* leukosit pasca-ujiantang menunjukkan penurunan persentase limfosit, peningkatan persentase monosit dan neutrofil namun tidak terlihat adanya perbedaan signifikan antara perlakuan vaksinasi dengan kontrol. Titer antibodi vaksin *formalin-killed* memperlihatkan kenaikan mulai hari ke-7 pasca-vaksinasi dan menurun setelah hari ke-14. Pasca-ujiantang terlihat peningkatan titer antibodi pada hari ke-7. Ekspresi gen imunitas mengalami peningkatan pada perlakuan vaksin *formalin-killed* menunjukkan bahwa pemberian vaksin menginduksi ekspresi sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1 β) dan MyD88 yang berperan dalam transduksi sinyal aktivasi jalur sinyal *toll-like receptor* (TLR). Hasil efikasi vaksin *formalin-killed* cukup baik dengan menghasilkan proteksi pasca-ujiantang yaitu nilai RPS tinggi, adanya peningkatan titer antibodi dan ekspresi gen imunitas pasca-ujiantang.

Simpulan akhir dari penelitian ini adalah GGIV, isolat virus yang menginfeksi ikan gurami, merupakan strain ISKV dari genus *megalocytivirus*. Kultur sel primer GPs yang dikembangkan dari limpa ikan gurami suseptibel terhadap infeksi GGIV dan virus tersebut berhasil diperbanyak pada kultur sel primer tersebut. Vaksin yang dibuat menggunakan metode *formalin-killed* dan *heat-killed* aman diaplikasikan pada ikan gurami. Hasil vaksinasi menunjukkan bahwa vaksin *formalin-killed* GGIV dapat digunakan dalam pengendalian dan pencegahan infeksi *megalocytivirus* pada ikan gurami.

Kata kunci: efikasi vaksin, ISKNV, kultur sel primer, *megalocytivirus*, *Osphronemus goramy*



SUMMARY

LILA GARDENIA. Development of Cell Culture and Inactivated-Vaccine for Prevention of Megalocytivirus Infection in Giant Gourami (*Osphronemus goramy*).
Supervised by SUKENDA, MUHAMMAD ZAIRIN Jr., ALIMUDDIN dan ANGELA M. LUSIASTUTI.

Megalocytivirus of family Iridoviridae is a known pathogen that caused fatal systemic infection lead to massive death and significant economic losses of numerous fish species in marine, fresh water and ornamental fish industries. In Indonesia, since 2011 megalocytivirus had been found as main pathogen in some cases of giant gourami outbreak especially in West Java, Central Java and Bali. Rapid expansion and intensification in aquaculture has led to many cases of disease outbreaks. Mortality rates of fish due to viral infections is high and up to now there's no effective treatment methods to overcome the problem. Prevention is a better choice than treatment although efforts to prevent and control diseases caused by viral infections are still difficult to do. The aim of this study was to develop a primary cell culture and an inactivated vaccine for megalocytivirus infection in giant gourami.

The first stage of this study was conducted to identify and characterized megalocytivirus in cultured giant gourami. The virus was identified using universal and specific 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 also 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.

On the second stage of this 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. GPs cell was successfully subcultured for more than 30 passages and was found to be susceptible to GGIV as a pathogen of ISKNV infection in cultured-giant gourami.

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



GGIV was propagated in GPs cells for megalocytivirus vaccine development for giant gourami. On the third stage 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 a 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 showed RPS value of 17.7-33.3% 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, increased 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 showed better efficacy than heat-killed vaccine which showed higher protection from viral infection after challenge test, higher RPS value and increased antibody titer and expression of immune genes after challenge test.

The final conclusion of this study was that giant gourami iridovirus (GGIV), virus isolate from infected giant gourami, was a strain of ISKNV from megalocytivirus genus. Primary cell culture (GPs cells) which developed from spleen of giant gourami found susceptible to GGIV infection and it can propagated on successfully on thoses primary cells. Vaccine was made by formalin-killed and heat-killed methods and it were safe for application in fish. Formalin-killed vaccine can be used for megalocytivirus infection prevention and disease control in giant gourami.

Keywords: inactivated-vaccine, megalocytivirus, primary cell culture, *Osphronemus goramy*

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2020 Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB

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.



**DEVELOPMENT OF CELL CULTURE AND INACTIVE VACCINE
FOR PREVENTION OF *Megalocytivirus* INFECTIOUS
BROODER (Osphronemus goramy)**

LILA GARDENIA

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor
pada
Program Studi Ilmu Akuakultur

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2020**

Hak cipta milik 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 mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

**Penguji Luar Komisi
Pada Ujian Tertutup:**

- Dr Ir Slamet Soebjakto, MSi
(Direktur Jenderal Perikanan Budidaya,
Kementerian Kelautan dan Perikanan)
- Dr Sri Nuryati, SPi MSi
(Departemen Budidaya Perairan Fakultas
Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian
Bogor)

**Penguji Luar Komisi
Pada Sidang Promosi:**

- Dr Ir Slamet Soebjakto, MSi
(Direktur Jenderal Perikanan Budidaya,
Kementerian Kelautan dan Perikanan)
- Dr Sri Nuryati, SPi MSi
(Departemen Budidaya Perairan Fakultas
Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian
Bogor)

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.





Judul Disertasi : Pengembangan Kultur Sel dan Vaksin Inaktif untuk Pencegahan Infeksi *Megalocytivirus* pada Ikan Gurami (*Osphronemus goramy*).

Nama : Lila Gardenia
NIM : C161150101

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Komisi Pembimbing

Prof Dr Ir Sukenda, MSc
Ketua

Prof Dr Ir Muhammad Zairin Jr., MSc
Anggota

Dr Alimuddin, SPi MSc
Anggota

Dr drh Angela Mariana Lusiastuti, MSi
Anggota

Diketahui oleh

Ketua Program Studi
Ilmu Akuakultur

Dekan Sekolah Pascasarjana

Dr Alimuddin, SPi MSc

Prof Dr Ir Anas Miftah Fauzi, MEng

Tanggal Ujian Tertutup: 09 April 2020
Tanggal Sidang Promosi: 08 Mei 2020

Tanggal Lulus:

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.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga disertasi ini berhasil diselesaikan. Tema penelitian difokuskan pada pengembangan vaksin *megalocytivirus* untuk pencegahan penyakit viral pada ikan gurami melalui beberapa tahap identifikasi dan karakterisasi *megalocytivirus*, pengembangan kultur sel primer dari limpa ikan gurami yang dapat digunakan sebagai tempat hidup (inang) dan perbanyakan virus, preparasi vaksin megalocytivirus dan uji efikasi vaksin *megalocytivirus*.

Terima kasih penulis ucapkan kepada ketua komisi pembimbing Prof Dr Sukenda, MSc dan anggota komisi pembimbing Prof Dr Muhammad Zairin Jr, MSc, Dr Alimuddin, MSc dan Dr Angela Mariana Lusastuti, MSi yang telah memberikan masukan, saran dan koreksi dalam penyusunan disertasi ini. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada Dr Mia Setiawati dan Dr Munti Yuhana yang berkenan menjadi penguji pada ujian prelim lisan, Dr Slamet Soebjacto MSi dan Dr Sri Nuryati, MSi yang bersedia menjadi penguji pada ujian tertutup dan sidang promosi. Juga kepada Rektor IPB, Dekan Sekolah Pascasarjana IPB, Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) IPB, Ketua Program Studi Ilmu Akuakultur FPIK IPB, serta semua staf pengajar, tenaga kependidikan dan administrasi atas fasilitas pendidikan, bantuan, dan dukungan sehingga kegiatan pengajaran di kampus dapat berjalan dengan baik.

Penghargaan dan terimakasih juga ditujukan kepada Pusat Pendidikan Kelautan dan Perikanan, BRSDMKP Kementerian Kelautan dan Perikanan, Pusat Riset Perikanan Kelautan dan Perikanan, serta Balai Riset Penelitian Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan yang telah memberikan beasiswa tugas belajar dan kesempatan untuk melanjutkan studi di Sekolah Pascasarjana IPB. Ungkapan terimakasih juga penulis ucapkan kepada teman-teman seperjuangan penulis yaitu para peneliti, teknisi dan administrasi di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan-Depok untuk dukungan dan segala bantuan dalam pelaksanaan penelitian.

Terimakasih yang tidak terhingga kepada papa mama tercinta dr Syukri Sahab, MSi dan Arfah Mardiana, bapak ibu tercinta Mayjen (Pur) TNI AL Aminullah Ibrahim serta drg Priyati Srilaksmi, MSi, suami tercinta Achmad Abimanyu ST dan anak-anak kesayangan Ahmad Naufali Azmi, Ahmad Akmal Zaidan, Amaryllis Putri Khadeeja dan Arundina Putri Fatheema atas segala doa dan kasih sayangnya yang memotivasi untuk menyelesaikan pendidikan ini.

Ungkapan terimakasih kepada teman-teman IPB AKU 2015 Dr Ferdinand Hukama Taqwa, Dr Achmad Suhermanto, Dr Muzahar, Dr Prama Hartami, Dr Samsu Adhi Rahman, Dr Rasidi, Dr Hanny Handajani, Dr Wahyu Pamungkas, Dr Dewi Puspaningsih atas kebersamaan, kekeluargaan, dorongan semangatnya selama menempuh pendidikan program doktor ini. Ungkapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada Dra Isti Koesharyani, Dendi Hidayatullah, MSi dan Hasan Nasrullah, MSi atas segala bantuannya sehingga penelitian dan publikasi ilmiah dapat berjalan lancar.

Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat.

Bogor, Mei 2020

Lila Gardenia

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.



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Perumusan Masalah	2
Kerangka Pemikiran	3
Tujuan Penelitian	6
Manfaat Penelitian	6
Kebaruan	6
2 METODOLOGI UMUM	
Waktu dan Tempat Penelitian	7
Ikan Uji	7
Isolat <i>megalocytivirus</i>	7
Alur Pelaksanaan Penelitian	7
3 IDENTIFIKASI <i>GIANT GOURAMI IRIDOVIRUS</i> (GGIV): <i>INFECTIOUS SPLEEN AND KIDNEY NECROSIS VIRUS</i> (ISKNV) PADA IKAN GURAMI (<i>Osphronemus goramy</i>)	9
Pendahuluan	10
Bahan dan Metode	11
Hasil dan Pembahasan	15
Simpulan	28
4 PENGEMBANGAN KULTUR SEL PRIMER DARI LIMPA IKAN GURAMI (<i>Osphronemus goramy</i>) UNTUK PERBANYAKAN <i>GIANT</i> <i>GOURAMI IRIDOVIRUS</i> (GGIV)	29
Pendahuluan	30
Bahan dan Metode	31
Hasil dan Pembahasan	35
Simpulan	43
5 EFIKASI VAKSIN <i>MEGALOCYTIVIRUS</i> INAKTIF PADA IKAN GURAMI (<i>Osphronemus goramy</i>)	44
Pendahuluan	45
Bahan dan Metode	47
Hasil dan Pembahasan	53
Simpulan	67
6 PEMBAHASAN UMUM	68
7 SIMPULAN DAN SARAN	74
SIMPULAN	74



SARAN 74

DAFTAR PUSTAKA 75

LAMPIRAN 84

RIWAYAT HIDUP 89

@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.

DAFTAR TABEL

1	Urutan primer yang digunakan identifikasi virus secara molekuler	12
2	Analisis komparatif jarak genetik dari gen <i>major capsid protein</i> (MCP) diantara strain <i>megalocytivirus</i>	18
3	Persentase matriks urutan nukleotida dari gen <i>major capsid protein</i> (MCP) antara isolat <i>giant gourami iridovirus</i> (GGIV) dan 18 isolat virus referensi dari genus <i>megalocytivirus</i> (ISKNV, RSIV dan TRBIV)	19
4	Urutan primer untuk analisis respons gen imunitas ikan gurami	52
5	Nilai kelangsungan hidup relatif (<i>relative percent survival/RPS</i>) dari ikan gurami yang divaksinasi	55

DAFTAR GAMBAR

1	Kerangka pemikiran vaksin <i>megalocytivirus</i> untuk pencegahan penyakit pada ikan gurami	5
2	Tahapan pelaksanaan penelitian	8
3	Amplifikasi PCR dari gen <i>major capsid protein</i> /MCP <i>megalocytivirus</i> dari ikan gurami	15
4	Analisis filogenetik gen MCP <i>megalocytivirus</i> dari ikan gurami dengan beberapa <i>megalocytivirus</i> lainnya	16
5	Hasil analisis qPCR dari <i>giant gourami iridovirus</i> (GGIV) pada beberapa organ (ginjal, limpa, hati dan insang)	20
6	Persentase mortalitas kumulatif pada uji infeksi buatan. Ikan yang diinjeksi secara <i>intraperitoneal</i> dengan <i>supernatant homogenate</i> limpa dan ginjal dari ikan gurami yang terinfeksi alami	21
7	Limpa normal ikan gurami sehat dibandingkan dengan limpa membesar pada ikan terinfeksi virus dan hati normal dibandingkan dengan hati pucat pada ikan gurami terinfeksi pada uji infeksi buatan	22
8	Hasil analisis PCR campuran jaringan limpa dan ginjal dari ikan yang mengalami mortalitas	23
9	Limpa ikan gurami menunjukkan nekrosis parah dengan banyak badan inklusi intrasitoplasmik dan intranuklear. Hemoragi dan banyak sel basofilik hipertropi teramati pada sayatan jaringan limpa dan ginjal	23
10	Partikel seperti virus (<i>virus-like particle</i>) pada pengamatan <i>negative staining</i> (uranil asetat) menggunakan <i>transmission electron microscope</i> (TEM)	24
11	Partikel seperti virus (<i>virus-like particle</i>) terlihat pada pengamatan sayatan ultra dari jaringan ginjal dan limpa ikan gurami menggunakan <i>transmission electron microscope</i> (TEM)	25
12	Profil protein giant gourami iridovirus (GGIV) menggunakan analisis SDS-PAGE	26
13	Perkembangan sel GPs yang berasal dari jaringan limpa ikan gurami	36
14	Pengaruh suhu inkubasi bagi pertumbuhan optimum sel GPs <i>in vitro</i>	37

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.

15	Pengaruh medium kultur dan konsentrasi serum yang berbeda untuk pertumbuhan optimal sel primer dari limpa gurami	38
16	Pengamatan <i>cytopathic effect</i> (CPE) pada sel primer GPs	39
17	Identifikasi asal sel GPs menggunakan analisis PCR dengan primer gen mRNA <i>beta-actin</i> ikan gurami	40
18	Analisis qPCR jumlah <i>copy</i> genom virus dalam sel GPs	41
19	Mortalitas kumulatif dari percobaan infeksi buatan dengan injeksi secara <i>intraperitoneal</i> dan kohabitasi	42
20	Persentase mortalitas kumulatif kelompok perlakuan vaksin dan kontrol saat ujiantang dengan kohabitasi	43
21	Sel kultur primer GPs sebelum dan setelah inokulasi giant gourami iridovirus/GGIV	53
22	Persentase mortalitas kumulatif kelompok perlakuan vaksinasi dan kontrol pada saat ujiantang	56
23	Analisis PCR untuk mendeteksi <i>megalocytivirus</i> dari <i>pooled</i> sampel limpa ikan uji yang mengalami mortalitas setelah ujiantang	57
24	Jumlah (<i>copy</i> DNA) virus pada limpa ikan uji pra-perlakuan (S0), kelompok kontrol dan kelompok perlakuan vaksin <i>formalin-killed</i> (FKC), vaksin <i>heat-killed</i> (HKC) setelah divaksinasi selama 21 hari, yang dikoleksi pada hari ke-4 dan ke-7 setelah ujiantang	57
25	Elektroforesis hasil qPCR jumlah (<i>copy</i> DNA) virus pada limpa ikan uji pada H4 dan H7 pasca-ujiantang	58
26	Persentase limfosit, monosit dan neutrophil ikan gurami sebelum perlakuan, pasca-vaksinasi dan periode pasca-ujiantang	61
27	Hasil analisis titer antibody ikan gurami menggunakan <i>indirect-ELISA</i> dari serum ikan uji	64
28	Analisis ekspresi gen TNF- α , IL-1 β dan MyD88 relatif terhadap gen <i>beta-actin</i> ikan gurami perlakuan vaksinasi	66

@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.

DAFTAR LAMPIRAN

1	Hasil pengukuran protein virus dengan metode BCA	84
2	Penggunaan TEM: teknik preparasi spesimen biologi (Prosedur pada Lembaga Eijkman)	85