

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xv
INTISARI	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xviii
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Keaslian Penelitian	8
Perumusan Masalah	11
Tujuan Penelitian.....	14
Manfaat Penelitian.....	14
TINJAUAN PUSTAKA	15
Virus Bovine Viral Diarrhea.....	15
Klasifikasi Virus	15
Morfologi dan Struktur Virus	17
Organisasi Genom Virus	19
Replikasi Virus	22
Genotipe dan Biotipe Virus.....	25
Patogenesis Virus	28
Diagnosa BVD	31
Sistem Imun terhadap Bovine Viral Diarrhea	35
Landasan Teori	37

	Halaman
Hipotesis	41
Alur Penelitian	42
MATERI DAN METODA.....	43
Tempat dan Waktu.....	43
Bahan dan Alat	43
Prosedur Penelitian	45
Koleksi Sampel Serum dan Uji ELISA Ag BVD	45
Isolasi Virus BVD pada sel MDBK.....	46
Identifikasi menggunakan Imunositokimia	47
<i>Multiplex nested</i> RT-PCR BVD	48
<i>Realtime</i> RT-PCR	51
Ekstraksi RNA virus BVD dari cairan kultur sel.....	52
Sintesis cDNA.....	53
Sekuensing genom virus BVD.....	54
PCR <i>full genome</i> virus BVD	55
Purifikasi ampikon/produk PCR genomik	57
Pengukuran konsentrasi DNA yang dipurifikasi	58
Analisis Data.....	59
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	60
Tahap Pertama	60
Deteksi antigen Erns dan antibodi p80.....	60
Genotyping virus BVD	65
Tahap Kedua	70
Isolasi virus dan <i>biotyping</i>	70
Tahap Ketiga	83
PCR genomik dan sekuensing.....	83
Analisis hasil sekuensing	87
Regio 5'UTR	89
Regio NPro	90

Regio kapsid	93
Regio Erns	94
Regio E1	96
Regio E2	97
Regio NS2-NS3	98
Regio NS4A	104
Regio NS4B	105
Regio NS5A	107
Regio NS5B	108
Regio 3'UTR	109
Karakterisasi Molekular dan Variasi Asam Amino	110
Protein NPro	111
Protein Erns	112
Protein E2	113
KESIMPULAN DAN SARAN	122
Kesimpulan	122
Saran	123
RINGKASAN	124
<i>SUMMARY</i>	135
DAFTAR PUSTAKA	146
LAMPIRAN	164

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Sekuen primer <i>genotyping</i> pada <i>multiplex</i> nRT-PCR virus BVD	50
Tabel 2. Primer dan ukuran ampikon PCR genomik virus BVD.....	56
Tabel 3. Kondisi PCR untuk amplifikasi gen dan fragmen target	56
Tabel 4. Hasil pengujian <i>multiplex</i> nRT-PCR terhadap ACE	67
Tabel 5. Sampel serum yang diuji ACE dan ELISA Ab p80 serta <i>geno- typing</i> BVDV dari tahun 2013-2017.....	69
Tabel 6. Perbandingan hasil pengujian <i>realtime</i> RT-PCR terhadap IPMA dari 65 hasil biak sel MDBK	82
Tabel 7. Tingkat kesamaan isolat virus BVD dengan subgenotipe -1a dan -1c berdasarkan 5 gen secara utuh (<i>full gene</i>).....	87
Tabel 8. Tingkat kesamaan isolat virus V7_BVDV-1/Indonesia-CJ-Bms/04151167-16/2015 dengan acuan subgenotipe BVDV	117
Tabel 9. Variasi asam amino pada region NPro (<i>catalytic triad</i>), Erns (epitop linear dan GAG <i>binding site</i>), dan E2 (sisi antigenik dan sistein) dari isolat virus BVD	120

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Pohon filogenetik dan klasifikasi pestivirus berdasarkan regio Npro	15
Gambar 2. Pohon filogenetik dan klasifikasi BVDV berdasarkan regio Npro	16
Gambar 3. Struktur dan morfologi pestivirus	17
Gambar 4. Struktur organisasi genom dan ekspresi protein pestivirus..	20
Gambar 5. Diagram alur penelitian	42
Gambar 6. Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan asal lokasi dan tahun koleksi	61
Gambar 7. Distribusi umur sapi terinfeksi persisten dengan proporsi seropositif dan seronegatif p80 virus BVD	63
Gambar 8. <i>Multiplex</i> nPCR gen NS5B untuk genotyping BVDV-1.....	66
Gambar 9. Kultur sel MDBK <i>in vitro</i> yang terinfeksi virus cpBVD galur Singer sebagai kontrol positif. Pada sitoplasma sel MDBK terlihat berwarna coklat (BVDV / IPMA, 1000X)	74
Gambar 10. Kultur sel MDBK <i>in vitro</i> yang terinfeksi virus cpBVD galur Singer sebagai kontrol positif. Pada sitoplasma sel MDBK terlihat berwarna coklat (BVDV / IPMA, 2000X)	74
Gambar 11. Kultur sel MDBK <i>in vitro</i> non infeksi sebagai kontrol sel. Pada sitoplasma sel MDBK tidak tampak warna coklat (BVDV/IPMA, 1000X)	75
Gambar 12. Kultur sel MDBK <i>in vitro</i> non infeksi sebagai kontrol sel. Pada sitoplasma sel MDBK tidak tampak warna coklat (BVDV/IPMA, 2000X)	75
Gambar 13. Kultur sel MDBK <i>in vitro</i> yang terinfeksi virus ncpBVD sampel kode 147. Pada sitoplasma sel MDBK terlihat berwarna coklat (BVDV / IPMA, 1000X)	76

Gambar 14. Kultur sel MDBK <i>in vitro</i> yang terinfeksi virus ncpBVD sampel kode 147. Pada sitoplasma sel MDBK terlihat berwarna coklat (BVDV / IPMA, 2000X)	76
Gambar 15. Kultur sel MDBK <i>in vitro</i> yang terinfeksi virus ncpBVD sampel kode TU 1. Pada sitoplasma sel MDBK terlihat berwarna coklat (BVDV / IPMA, 1000X)	77
Gambar 16. Kultur sel MDBK <i>in vitro</i> yang terinfeksi virus ncpBVD sampel kode TU 1. Pada sitoplasma sel MDBK terlihat berwarna coklat (BVDV / IPMA, 2000X)	77
Gambar 17. Cakupan/kondisi hasil sekuensing genom virus BVD dari 14 sampel isolat virus berupa cairan biakan sel	85
Gambar 18. Cakupan/kondisi hasil sekuensing genom virus BVD dari 7 sampel serum.....	86
Gambar 19. Pohon filogenetik berdasarkan regio 5'UTR sepanjang 275nt dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model Kimura-2 parameter, dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	89
Gambar 20. Pohon filogenetik berdasarkan regio NPro utuh (504nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model Tamura-3 parameter, dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	91
Gambar 21. Pohon filogenetik berdasarkan regio kapsid sepanjang 306nt dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model Tamura-Nei, dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	93
Gambar 22. Pohon filogenetik berdasarkan regio Erns utuh (681nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model Kimura-2 parameter, dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	95
Gambar 23. Pohon filogenetik berdasarkan regio E1 utuh (585nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model Tamura-3 parameter, dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	97

Gambar 24. Pohon filogenetik berdasarkan regio E2 utuh (1.122nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model <i>General Time Reversible</i> , dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.	98
Gambar 25. Pohon filogenetik berdasarkan regio E2 parsial (757nt) dengan metode <i>Maximum Likelihood</i> , model <i>General Time Reversible</i> , dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	99
Gambar 26. Diagram substitusi <i>non-synonymous</i> dan <i>synonymous</i> (dN-dS) regio E2 isolat Indonesia dan acuan BVDV-1	101
Gambar 27. Pohon filogenetik berdasarkan regio NS2 (203nt) – NS3 (2.049nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model <i>General Time Reversible</i> , dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.	103
Gambar 28. Pohon filogenetik berdasarkan regio NS4A utuh (192nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model Kimura-2 parameter, dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	105
Gambar 29. Pohon filogenetik berdasarkan regio NS4B (1.031nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model Tamura-Nei, dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	106
Gambar 30. Pohon filogenetik berdasarkan regio NS5A (1.488nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model <i>General Time Reversible</i> , dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	107
Gambar 31. Pohon filogenetik berdasarkan regio NS5B (2.157nt) dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model <i>General Time Reversible</i> , dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	108
Gambar 32. Pohon filogenetik berdasarkan regio 3'UTR sepanjang 165nt dengan metoda <i>Maximum Likelihood</i> , model Tamura-3 parameter, dan angka <i>bootstrap</i> 1000x menggunakan MEGA-X.....	110
Gambar 33. Skema sisi aktif protein Erns virus BVD dan CSF	113

Halaman

Gambar 34. Perbandingan daerah gen yang lestari dan bervariasi dari virus BVD isolat Indonesia 2013 – 2018.	115
Gambar 35. Gambaran gen utuh hasil sekuensing dari virus BVD isolat Indonesia 2013 – 2018.....	115
Gambar 36. Pemeliharaan dan pemisahan biak sel MDBK di dalam <i>Laminar Airflow</i> (LAF).....	186
Gambar 37. Inokulasi sampel pada biak sel MDBK di dalam <i>Biological Safety Class II</i> (BSC)	186
Gambar 38. Mesin PCR (<i>thermal cycler</i>) konvensional gradien, (<i>peqSTAR®</i> , <i>peqlab</i> , UK).....	187
Gambar 39. Instrumen mesin PCR <i>realtime</i> , (<i>7500 Realtime PCR System</i> , <i>AB Applied Biosystems</i> , USA)....	187
Gambar 40. Mesin <i>sequencer</i> teknik <i>next generation sequencing</i> (MiSeq, Illumina, San Diego, California, USA).....	188

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Informasi sampel serum koleksi BBVet yang digunakan pada penelitian.....	164
Lampiran 2. Nextera® XT DNA <i>Library Prep Reference Guide</i>	166
Lampiran 3. MiSeq System <i>Denature and Dilute Libraries Guide</i>	176
Lampiran 4. Kegiatan pengujian yang dikerjakan di laboratorium virologi BBVet Wates-Yogyakarta.....	186
Lampiran 5. Mesin PCR dan <i>sequencer</i> di laboratorium bioteknologi BBVet Wates-Yogyakarta.....	187
Lampiran 6. Perbandingan Uji IPMA dan <i>realtime</i> RT-PCR untuk menskrining ke tahap sekuensing.....	189
Lampiran 7. Daftar isolat virus BVD yang dilakukan sekuensing dengan Teknik NGS.....	191
Lampiran 8. Hasil rekapitulasi sekuensing genom virus BVD dari 21 isolat koleksi BBVet Wates-Yogyakarta	192