

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
INTISARI DAN ABSTRACT	xv

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang	1
2. Permasalahan	4
3. Tujuan Penelitian	4
4. Manfaat Penelitian.....	4
5. Keaslian Penelitian.....	5

II. TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI

1. Tinjauan Pustaka.....	7
1.1. <i>Lymphocystis Disease Virus</i>	7
1.2.1 Karakteristik dan Klasifikasi <i>Lymphocystis Disease Virus</i>	7
1.2.2 Replikasi Virus LCDV di Sel.....	8
1.2.3 Gejala Klinis LCDV	9
1.2.4 Patogenesis LCDV	10
1.2.5 Rentang Inang LCDV.....	11
1.2.6 Penyebaran LCDV.....	12
1.3 Pengelolaan Kesehatan Ikan	13
2. Landasan Teori.....	15

III. IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI *LYMPHOCYSTIS DISEASE VIRUS* (LCDV) DARI *Channa striata* DI INDONESIA

1. Pendahuluan	18
2. Kerangka Penelitian.....	19
3. Alat-Bahan dan Metode	20
3.1. Alat-Bahan.....	20
3.2. Metode	20

3.2.1. Laporan Kasus.....	20
3.2.2. Pemeriksaan Ante-Post Mortem dan Preservasi Jaringan	20
3.2.3. Pemeriksaan Histopatologis.....	21
3.2.4. Studi Bioinformatika dan Desain Primer.....	22
3.2.5. Ekstraksi DNA.....	22
3.2.6. Visualisasi DNA.....	23
3.2.7. Pengecekan Kualitas DNA.....	23
3.2.8. Amplifikasi PCR.....	24
3.2.9. Sekuensing DNA.....	24
3.2.10. Analisis Bioinformatika.....	24
3.2.11. Postulat Rivers.....	25
4. Hasil dan Pembahasan.....	26
4.1. Pengamatan Ante-Post Mortem.....	26
4.2. Analisis Histopatologis.....	27
4.3. Desain Primer.....	30
4.4. Isolasi DNA Genom.....	31
4.5. Deteksi LCDV dengan PCR.....	32
4.6. Hasil Sekuensing.....	33
4.7. Analisis Homologi.....	37
4.8. Analisis Pohon Filogenetik.....	38
4.9. Postulat Rivers.....	40
5. Kesimpulan.....	41

IV. KAJIAN RENTANG INANG *LYMPHOCYSTIS DISEASE VIRUS* (LCDV)

1. Pendahuluan.....	42
2. Kerangka Penelitian.....	43
3. Alat-Bahan dan Metode.....	44
3.1. Alat-Bahan.....	44
3.2. Metode.....	44
3.2.1. Koleksi Jaringan Kulit.....	44
3.2.2. Persiapan Filtrat Virus.....	44
3.2.3. Persiapan Hewan Coba.....	45
3.2.4. Infeksi Eksperimental.....	45
3.2.5. Isolasi DNA.....	45
3.2.6. Preparasi Plasmid Rekombinan.....	46

3.2.7. Kuantifikasi LCDV MCP Copy Number	46
4. Hasil dan Pembahasan.....	47
4.1. Perubahan Tingkah Laku.....	47
4.2. Perubahan Morfologis Eksternal dan Internal	47
4.3. Kematian Paska Infeksi	50
4.4. Kuantifikasi Viral Load	51
5. Kesimpulan	56
V. DESAIN PRIMER METODE DETEKSI LYMPHOCYSTIS DISEASE VIRUS (LCDV)	
1. Pendahuluan.....	57
2. Kerangka Penelitian	58
3. Alat-Bahan dan Metode.....	59
3.1. Alat-Bahan.....	59
3.2. Metode	59
3.2.1. Koleksi Sampel dan Preservasi.....	59
3.2.2. Ekstraksi DNA.....	60
3.2.3. Visualisasi DNA	60
3.2.4. Pengecekan Kualitas DNA	60
3.2.5. Kloning Gen Parsial Major Capsid Protein	60
3.2.5.1. Amplifikasi Gen Parsial MCP	60
3.2.5.2. DNA recovery Gen Parsial MCP	60
3.2.5.3. Ligasi DNA pada Vektor.....	61
3.2.5.4. Transformasi DNA-Tvektor	61
3.2.5.5. Isolasi Plasmid Rekombinan	62
3.2.6. 6. Preparasi Plasmid Rekombinan	63
3.2.6. Desain Primer.....	63
3.2.7. Optimasi Set Primer dan Penentuan Kurva Standar	63
3.2.8. Kuantifikasi Viral Load	64
4. Hasil dan Pembahasan	64
4.1. Ikan Gabus <i>Channa striata</i> Simptomatik dan Asimptomatik	64
4.2. Amplifikasi Gen Parsial MCP	65
4.3. Transformasi T-vektor pTA2 MCP-LCDV	65
4.4. Isolasi dan Sekuensing Plasmid Rekombinan	66
4.5. Desain Primer qPCR.....	67

4.6. Optimasi Set Primer dan Determinasi Kurva Standar.....	67
4.7. Kuantifikasi Viral Load	69
5. Kesimpulan	71

VI. OVER EKSPRESI GEN PENYANDI MCP SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN *LYMPHOCYSTIS DISEASE VIRUS (LCDV)*

1. Pendahuluan	72
2. Kerangka Penelitian.....	73
3. Alat-Bahan dan Metode	74
3.1. Alat-Bahan.....	74
3.2. Metode	75
3.2.1. Ekstraksi DNA Genom LCDV	75
3.2.2. Penyusunan Primer	75
3.2.3. Amplifikasi Gen MCP LCDV	75
3.2.4. Visualisasi DNA	76
3.2.5. Kloning DNA MCP ke dalam Vektor Kloning pET 32a	76
3.2.5.1. Pemotongan DNA Produk PCR	76
3.2.5.2. Preparasi pET 32a	76
3.2.5.3. Ligasi dan Transformasi.....	77
3.2.5.4. Seleksi pET 32a Rekombinan	77
3.2.5.5. Sekuensing dan Analisis Data.....	77
3.2.6. Analisis Protein Hasil Ekspresi MCP LCDV.....	79
3.2.6.1. Transformasi MCP pET 32a pada <i>E. coli</i> BL21	79
3.2.6.2. Induksi Protein MCP LCDV dengan IPTG	80
3.2.6.3. Isolasi Protein MCP LCDV	80
3.2.6.4. Analisis Proten MCP LCDV dengan SDS	
Page.....	80
3.2.6.5. Analisis Proten MCP LCDV dengan Western	
Blotting	81
3.2.6.6. Purifikasi Protein MCP LCDV dengan Nikel Resin	
dan Kobalt Resin.....	82
4. Hasil dan Pembahasan	83
4.1. Amplikasi MCP LCDV	83
4.2. Preparasi Plasmid pET 32a	84
4.3. Kloning MCP LCDV ke pET 32a	84



4.4. Sekuensing dan Analisis Data	86
4.5. Transformasi Plasmid Rekombinan MCP pET 32a ke <i>E. coli</i> BL21	89
4.6. Analisis Protein Hasil Ekspresi.....	91
5. Kesimpulan	97
VII. DISKUSI UMUM.....	98
VII. KESIMPULAN DAN SARAN	
1. Kesimpulan	103
2. Saran	103
DAFTAR PUSTAKA.....	104

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Kajian terkait <i>Lymphocystis Disease Virus</i>	5
Tabel 3.1. Daftar primer beberapa gen LCDV dan <i>housekeeping</i> dalam penelitian ini	24
Tabel 3.2. Primer RNR, MT, MO, TNFr, Rpb2, DNAPrim, DNAMet, dan DNAPolB untuk deteksi LCDV pada <i>C. striata</i> di Kalimantan Selatan-Indonesia.....	31
Tabel 3.3. Hasil Spectrophotometers NanoDrop genom jaringan kutil <i>C. striata</i>	31
Tabel 3.4. Urutan nukleotida gen MCP, MMP, DNAMet, DNAPolB, RNR-L, dan DNAPrim	34
Tabel 3.5. Urutan amino gen MCP, MMP, DNAMet, DNAPolB, RNR-L, dan DNAPrim	36
Tabel 3.6. Persentase kemiripan urutan nukleotida gen MCP, MMP, DNAMet, RNR-L, DNAPolB, DNAPrim isolat LCDV Cs-Sk Dari <i>C. striata</i> di Kalimantan Selatan dengan spesies LCDV-1, LCDV-2, LCDV-3, dan LCDV-4 dengan acc number yang ditunjukkan dari Genbank.....	38
Tabel 5.1. Sekuen primer	67
Tabel 5.2. Analisis set primer	68
Tabel 6.1. Prediksi epitop CD4 sel T	89
Tabel 6.2. Prediksi epitop sel B	89

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Morfologi Virion LCDV	8
Gambar 2.2. Siklus replikasi Iridovirus pada <i>Frog Virus 3</i> (FV-3), sebagai permodelan siklus replikasi LCDV	9
Gambar 2.3. Gejala klinis LCDV	10
Gambar 2.4. Segitiga penyakit	13
Gambar 2.5. Kerangka pemikiran penelitian disertasi	17
Gambar 3.1. Gejala klinis ikan gabus <i>C. striata</i> di Kalimantan Selatan.....	21
Gambar 3.2. Histopatologis <i>warts</i> dengan pewanaan hematoxylin eosin	26
Gambar 3.3. Histopatologis limpa dengan pewarnaan hematoxylin eosin	27
Gambar 3.4. Histopatologis otak dengan pewarnaan hematoxylin eosin.....	28
Gambar 3.5. Histopatologis hati dengan pewarnaan hematoxylin eosin.....	28
Gambar 3.6. Histopatologis ginjal dengan pewarnaan hematoxylin eosin	29
Gambar 3.7. Histopatologis insang dengan pewarnaan hematoxylin eosin	29
Gambar 3.8. Hasil elektroforesis DNA genom jaringan <i>warts</i> ikan <i>C. striata</i>	29
Gambar 3.9. Hasil amplifikasi gen target LCDV dengan PCR dan pengukuran pita dengan elektroforesis gel agarosa	32
Gambar 3.10. Hasil amplifikasi gen target LCDV dengan PCR dan pengukuran pita dengan elektroforesis gel agarosa	33
Gambar 3.11. Pohon filogenetik isolat LCDV Cs-SK berdasarkan gen MCP, MMP, DNAmet, RNR-L, DNAPolB, dan DNAPrim	43
Gambar 3.12. Pohon filogenetik <i>concacenated</i> isolat LCDV Cs-SK dengan spesies LCDV	39
Gambar 3.13. Postulat Rivers dengan perubahan eksternal adanya kutil pada sirip ventral.....	39
Gambar 4.1. Morfologi eksternal dan internal ikan 2 dpi LCDV	40
Gambar 4.2. Morfologi eksternal dan internal ikan 4 dpi LCDV	48
Gambar 4.3. Morfologi eksternal dan internal ikan 7 dpi LCDV	48
Gambar 4.4. Morfologi eksternal dan internal ikan 14 dpi LCDV	48
Gambar 4.5. Morfologi eksternal dan internal ikan 21 dpi LCDV	49
Gambar 4.6. Morfologi eksternal dan internal ikan 30 dpi LCDV	49
Gambar 4.7. Morfologi eksternal dan internal ikan 60 dpi LCDV	49
Gambar 4.8. Kematian total (%) ikan giant gurami <i>Osphronemus goramy</i> , nila hybrid <i>Oreochromis</i> sp, koi <i>Cyprinus carpio</i> , betta <i>Betta</i> sp, dan lele hybrid <i>Clarias</i> sp.....	50

Gambar 4.9. Viral load LCDV pada organ otak, limpa, sirip, insang, hati, dan ginjal ikan giant gurami <i>Osphronemus goramy</i>	51
Gambar 4.10. Viral load LCDV pada organ otak, limpa, sirip, insang, hati, dan ginjal ikan nila hybrid <i>Oreochromis sp.</i>	52
Gambar 4.11. Viral load LCDV pada organ otak, limpa, sirip, insang, hati, dan ginjal ikan koi <i>Cyprinus carpio</i>	52
Gambar 4.12. Viral load LCDV pada organ otak, limpa, sirip, insang, hati, dan ginjal ikan betta <i>Betta sp</i>	53
Gambar 4.13. Viral load LCDV pada organ otak, limpa, sirip, insang, hati, dan ginjal ikan lele hybrid <i>Clarias sp</i>	53
Gambar 5.1. <i>Channa striata</i> simptomatik dan asimtomatik.....	64
Gambar 5.2. Hasil amplifikasi gen parsial MCP dengan PCR dan pengukuran pita dengan elektroforesis gel agarosa	64
Gambar 5.3. Koloni hasil transformasi dengan koloni putih (lingkaran merah) dan koloni biru (lingkaran biru)	65
Gambar 5.4. Visualisasi hasil isolasi plasmid rekombinan dengan marker Lamda Hind III	66
Gambar 5.5. Hasil pengurutan nukleotida gen MCP sepanjang 1311 bp.....	66
Gambar 5.6. Hasil amplifikasi dengan primer qPCR dan pengukuran pita dengan elektroforesis gel agarosa.....	67
Gambar 5.7. Sensitivitas uji qPCR pada masing-masing set primer	68
Gambar 5.8. Viral load pada sampel dari berbagai organ <i>C. striata</i>	69
Gambar 6.1. Primer kloning MCP LCDV	74
Gambar 6.2. Hasil amplifikasi gen MCP LCDV dengan PCR dan pengukuran pita dengan elektroforesis gel agarosa	80
Gambar 6.3. Hasil pemotongan vektor pET 32a dengan enzim restriksi <i>Hind III</i> - <i>Eco R1</i> dan pengukuran pita dengan elektroforesis gel agarosa	83
Gambar 6.4. Kemurnian dan konsentrasi DNA MCP LCDV dan PET 32a H/E ..	84
Gambar 6.5. Hasil transformasi MCP-pET 32a ke bakteri <i>E. coli</i> DH5 α	84
Gambar 6.6. Hasil pemotongan plasmid rekombinan MCP-pET32a dengan enzim restriksi <i>Hind III</i> - <i>Eco R1</i> dan pengukuran pita dengan elektroforesis gel agarosa.....	85
Gambar 6.7. Hasil pengurutan nukleotida MCP LCDV dengan primer T7 dan T7T	86

Gambar 6.8. Analisis sekuen asam amino sampel dibandingkan dengan asam amino MCP spesies LCDV-1, LCDV-2, LCDV-3, dan LCDV-4	87
Gambar 6.9. Hasil transformasi MCP-pET 32a ke bakteri <i>E. coli</i> BL21	88
Gambar 6.10. Hasil pemotongan plasmid rekombinan MCP-pET32a dengan enzim restriksi <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> R1 dan pengukuran pita dengan elektroforesis gel	90
Gambar 6.11. Hasil induksi IPTG yang diinkubasi suhu 37°C selama 6 jam	92
Gambar 6.12. Hasil induksi IPTG yang diinkubasi suhu 20°C selama semalam	92
Gambar 6.13. Hasil analisis western blotting induksi IPTG yang diinkubasi suhu 37°C selama 6 jam.....	93
Gambar 6.14. Anasil analisis western blotting induksi IPTG inkubasi suhu 20°C selama semalam.....	93
Gambar 6.15. SDS Page MCP-pET 32a induksi 0.1 mM IPTG yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam dengan purifikasi menggunakan nikel resin.....	94
Gambar 6.16. Western blotting MCP-pET 32a induksi 0.1 mM IPTG yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam dengan purifikasi menggunakan nikel resin	95
Gambar 6.17. SDS Page MCP-pET 32a induksi 0.1 mM IPTG yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam dengan purifikasi menggunakan kobalt resin	95
Gambar 6.18. Western blotting MCP-pET 32a induksi 0.1 mM IPTG yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam dengan purifikasi menggunakan kobalt resin	96