



SALINAN

**KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOMOR 214/UN3.1.6/2022**

Tentang

**PENGANGKATAN DOSEN PENGUJI UJIAN TERBUKA DISERTASI MAHASISWA
PROGRAM STUDI S3 SAINS VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
JULI 2022**

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA,

- Menimbang : a. Bahwa dalam rangka melaksanakan Tri Dharma Perguruan Tinggi dipandang perlu mengangkat Dosen Penguji Ujian Terbuka Disertasi Mahasiswa Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Juli 2022;
- b. Sehubungan dengan butir (a) tersebut di atas, dipandang perlu menerbitkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4301);
2. Undang-Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5336);
3. Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954 tentang Penetapan Universitas Airlangga di Surabaya sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 1955 tentang Pengubahan Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954 (Lembaran Negara RI Tahun 1954 Nomor 99, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 695 juncto Lembaran Negara RI Tahun 1955 Nomor 748);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5500);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 30 Tahun 2014 tentang Statuta Universitas Airlangga. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 100, Tambahan Negara Nomor 5535);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 8 Tahun 2020 tentang Perubahan Atas Peraturan Pemerintah Nomor 26 Tahun 2015 tentang Bentuk dan Mekanisme Pendanaan Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2020 Nomor 28, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 6461);
7. Surat Keputusan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia Nomor: 055/O/1972 tanggal 25 Maret 1972 tentang Pendirian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga;
8. Keputusan Menteri Pendidikan Nasional Republik Indonesia Nomor:232/U/2000 tentang Pedoman Penyusunan Kurikulum Pendidikan Tinggi dan Penilaian Hasil Belajar Mahasiswa;
9. Peraturan Rektor Nomor 39 Tahun 2017 tentang Perubahan atas Peraturan Rektor Nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga;



10. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor : 2158/H3/KR/2011 tanggal 7 Nopember 2011 tentang Izin Penyelenggaraan Program Studi Sains Veteriner Jenjang S-3 Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga;
11. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor : 762/UN3/2020 tanggal 30 September 2020 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas dan Direktur Sekolah Pascasarjana Periode 2020-2025 di lingkungan Universitas Airlangga.

Memperhatikan : Surat keputusan Rektor Nomor 698/UN3/2019 tentang Perpanjangan Izin Penyelenggaraan Program Studi di Lingkungan Universitas Airlangga,

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : **KEPUTUSAN DEKAN TENTANG PENGANGKATAN DOSEN PENGUJI UJIAN TERBUKA DISERTASI MAHASISWA PROGRAM STUDI S3 SAINS VETERINER FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA JULI 2022**

PERTAMA : Mengangkat para Dosen Penguji Ujian Terbuka Mahasiswa Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Bulan Juli 2022 seperti tercantum dalam daftar lampiran Keputusan ini ;

KEDUA : Dosen Penguji Ujian Terbuka Mahasiswa Program Studi S3 Sains Veteriner dalam melaksanakan tugasnya berpedoman pada peraturan dan ketentuan yang berlaku dan mempertanggung jawabkan tugasnya kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga;

KETIGA : Keputusan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Surabaya
Pada tanggal 1 Juli 2022

DEKAN,

itd.

MIRNI LAMID
NIP. 196201161992032001

Salinan disampaikan kepada Yth. :

1. Rektor Universitas Airlangga
2. Yang bersangkutan

Salinan sesuai dengan aslinya
Kepala Bagian Tata Usaha



Hendro Gunarto, SE, M. PSDM
NIP. 198002052000031002

Lampiran : Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Nomor 214/UN3.1.6/2022 tanggal 1 Juli 2022 tentang Dosen Penguji Ujian Terbuka Disertasi Mahasiswa Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Bulan Juli 2022.

**DOSEN PENGUJI UJIAN TERBUKA DISERTASI MAHASISWA
PROGRAM STUDI S3 SAINS VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
JULI 2022**

No.	Nama/NIM	Hari/Tanggal	Judul	Penguji	
1	Muhammad Khaliim Jati Kusala / 061817117308	Kamis/ 28 Juli 2022	Analisis Infeksi <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)</i> Pada Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>) Sebagai Dasar Pengembangan <i>Seed Virus</i> Vaksin COVID-19	Prof. Dr. Mirni Lamid, drh., MP Prof. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS Dr. Kadek Rachmawati, drh., M. Kes Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M. Si Prof. Dr. Budi Utomo, drh., M. Si Prof. Dr. Widjiati, drh., M. Si Dr. Epy Muhammad Luqman, drh., M. Si Dr. Jola Rahmahani, drh., M. Kes Prof. Ir. Didiek Hadjar Goenadi, M. Sc., Ph. D. Inv	(Ketua) (Anggota) (Anggota) (Anggota) (Anggota) (Anggota) (Anggota) (Anggota) (Anggota) (Anggota)

Ditetapkan di Surabaya
Pada tanggal 1 Juli 2022

DEKAN,

ttd.

MIRNI LAMID
NIP. 196201161992032001

Salinan sesuai dengan aslinya
Kepala Bagian Tata Usaha



Hendro Gunarto, SE, M. PSDM
NIP. 198002052000031002

DISERTASI

ANALISIS INFEKSI *SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS 2* (SARS COV-2) PADA IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN SEED VIRUS VAKSIN COVID-19

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



OLEH:

MUHAMMAD KHALIIM JATI KUSALA

NIM. 061817117308

**PROGRAM DOKTOR
PROGRAM STUDI SAINS VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2022

**ANALISIS INFEKSI *SEVERE ACUTE RESPIRATORY
SYNDROME CORONAVIRUS 2 (SARS-COV-2)* PADA IKAN
ZEBRA (*Danio rerio*) SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN
SEED VIRUS VAKSIN COVID-19**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

DISERTASI

**untuk memperoleh gelar Doktor
dalam Program Studi Sains Veteriner
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

**MUHAMMAD KHALIIM JATI KUSALA
NIM. 061817117308**

**PROGRAM DOKTOR
PROGRAM STUDI SAINS VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Disertasi berjudul:

“ANALISIS INFEKSI *SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS 2 (SARS-COV-2)* PADA IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN *SEED VIRUS VAKSIN COVID-19*”

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Doktor di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 24 Juni 2022

A photograph of a 10,000 Indonesian Rupiah banknote. The note is yellow and red, with the number '10.000' printed vertically on the left side. The signature of Muhammad Khaliim Jati Kusala is written in black ink across the center of the note. A horizontal line is drawn over the signature.

Muhammad Khaliim Jati Kusala
NIM. 061817117308

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

Oleh:

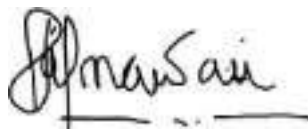
Promotor



Prof. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., M.S

NIP. 195803081984031003

Ko-Promotor



Dr. Kadek Rachmawati, drh., M.Kes

NIP. 196807251997022001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sains Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P

NIP. 196208281989032001

Disertasi ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 07 Juli 2022

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Dr. Jola Rahmahani, drh., M.Kes.

Anggota : Prof. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., M.S

Dr. Kadek Rachmawati, drh., M.Kes

Prof. Dr. Tita Damayanti Lestari, drh.,M.Sc

Dr. Eduardus Bimo Aksono HP, drh., M.Kes

Dr. Kuncoro Puguh Santoso, drh., M.Kes.

Prof. Dr. NiLuh Putu Indi Dharmayanti, drh., M.Si

Ditetapkan dengan Surat Keputusan

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

No: 2297/UN3.1.6/PK/2022

Tanggal: 07 Juli 2022

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan Disertasi dengan judul **Analisis Infeksi Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Pada Ikan Zebra (Danio rerio) Sebagai Dasar Pengembangan Seed Virus Vaksin COVID-19.**

Pada kesempatan kali ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Mirni Lamid, drh., M.P dan ketua Program Studi S3 Sains Veteriner Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan di Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Chairul Anwar Nidom., drh selaku Promotor dan Dr. Kadek Rachmawati, drh., M.Kes selaku Ko-Promotor yang telah memberikan bimbingan keilmuan, membantu membangun kerangka berpikir, memberikan bimbingan dan pengarahan dengan penuh kesabaran, perhatian dan memerikan dorongan semangat percaya diri sehingga mampu menyelesaikan pendidikan ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat-Nya dan melipatgandakan pahala kepada beliau.

Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Sumber Daya Ilmu Pengetahuan, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan beasiswa kesempatan dan bantuan dana melalui Program Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) sehingga dapat menempuh pendidikan dan melaksanakan penelitian ini.

Keluarga besar beserta staf peneliti pada Professor Nidom Foundation Ibu Achmamiék Hariati, Dr. Reviany Vibrianita Nidom, S.Farm., Apt., M.Farm, Dr. M. Yusuf Alamudi, S.Si., M.Kes, Dr. Ema Qurnianingsih, dr., M.Ked, Dr. Kuncoro Puguh Santoso, drh., M.Kes, Dr. Setyarina Indrasasri, drh., M.Vet, Dr. Irine Normalina, S.Pi., M.Ked, Anis Fidiah, S.Si., M.Si, Valdy Lazuardy Nidom, S.Psi, M.Psi, drh. Novi, drh. Kartika yang telah memberikan fasilitas untuk dapat menggunakan laboratorium dan peralatan laboratorium serta memberikan bantuan dan bimbingan dalam melaksanakan penelitian ini.

Kedua orang tua saya ayahanda Drh. Tulus Suka dan Ibunda Drh.Sumaryuni, M.Kes beserta mertua saya ayahanda Ustadzi Rois, SH., M.Pd dan Ibunda Sri Hidayati, S.Pd (Almh) yang selalu penuh kasih sayang mencurahkan perhatian kepada saya, membantu memberikan doa dan bantuan moril, dukungan penuh motivasi serta suri tauladan yang baik bagi saya sehingga dapat menyelesaikan pendidikan Doktor ini.

Kakak - kakak saya Drestanta Harya Kusala , S.E, Triana Tungga Dewi, S. Sos, LetKol. Czi. Adityo Bangun Pratomo, Rachmafelia Puspita Nikasari, S.P, Diptyanta Hanif Dharma Kusala, S.T, Drh. Wulan Andayni beserta adik Krisna Aditya Beladina, S.H yang telah membantu, memberikan doa, dorongan dan motivasi sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Istri saya tercinta dr. Fitria Intan Beladina yang senantiasa memberikan dorongan, semangat dan pengertiannya untuk menyelesaikan pendidikan ini. Anak saya Raffasya Khaltan Jatikusala. Semoga Allah SWT senantiasa meridhoi doa-doa kita. Aamiin.

Teman - teman angkatan Program Studi S3 Sains Veteriner dan teman-teman angkatan program PMDSU yang bersama - sama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Arif Nur Muhammad Ansori, S.Si, M.Si, Dr. Amaq Fadholly, drh., M.Si, Dr. Naimah Putri, drh., M.Si, Dr. Annise Proboningrat, drh., M.Si yang selalu kompak dan memberikan semangat untuk menyelesaikan Disertasi ini.

RINGKASAN

“Analisis Infeksi Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Pada Ikan Zebra (*Danio rerio*) Sebagai Dasar Pengembangan Seed Virus Vaksin COVID-19”

Muhammad Khaliim Jati Kusala

Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pertama kali muncul di China kemudian ditularkan secara sporadis di seluruh dunia. Pada Maret 2020, WHO mengumumkan bahwa infeksi virus korona ini telah menjadi wabah pandemi. Wabah dan penularan COVID-19 yang sangat cepat ini telah membahayakan kesehatan terutama bagi manusia dan mempengaruhi ekonomi secara global (Nidom *et al*, 2020). Hal ini juga telah memperbarui minat umum untuk mempelajari virus corona secara biologi dan ekologi. Lingkungan akuatik dapat menjadi sumber mikroorganisme patogen yang tak terhitung jumlahnya untuk hewan air dan darat yang berbeda, serta manusia (Oidtmann *et al*, 2018).

Salah satu hewan dari lingkungan perairan yang banyak digunakan sebagai hewan model dalam berbagai penelitian adalah dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*). Saat ini, pengembangan virus SARS CoV-2 yang banyak dilakukan adalah dengan menggunakan media kultur sel Vero. Sebagaimana diketahui bahwa sel vero merupakan sel yang berasal dari ginjal monyet dan bersifat non halal. Salah satu media pertumbuhan virus yang diharapkan dapat digunakan sebagai basis kehalalan adalah ikan zebra (*Danio rerio*).

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorium yang secara umum bertujuan untuk melakukan upaya pengembangan penelitian dalam mengembangkan virus SARS CoV-2 dan produksi seed virus vaksin covid-19 untuk manusia dengan menggunakan ikan zebra. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk menganalisis apakah virus SARS CoV-2 dapat tumbuh dan berkembang di dalam tubuh ikan zebra, menganalisis gambaran infeksi virus SARS CoV-2 pada tubuh ikan zebra, menganalisis perbedaan pengaruh rute infeksi terhadap gambaran pertumbuhan virus SARS-CoV-2 di dalam tubuh ikan zebra dan

menganalisis kemampuan ikan zebra dalam menyebarkan virus SARS-CoV-2 ke lingkungan / air.

Penelitian ini menunjukkan hasil bahwa virus SARS-CoV-2 dapat tumbuh dan berkembang di dalam tubuh ikan zebra. Hasil pemeriksaan uji RT PCR dalam penelitian ini menunjukkan hasil positif pada hari pertama dan ketiga post infeksi dari tiga jalur infeksi. Ikan Zebra menunjukkan infeksi yang dapat diperoleh dari lingkungan perairan dengan pemberian titer virus SARS-CoV-2 pada air sebesar $2,25 \times 10^4$ pfu/mL sampai dengan 3×10^4 pfu/mL sudah dapat menginfeksi ikan zebra. Selain didapatkan dari lingkungan, pemberian virus SARS-CoV-2 juga diinfeksi langsung ke dalam tubuh ikan zebra pada Jalur intra peritoneal dengan titer virus sebesar $6,75 \times 10^2$ sampai dengan 9×10^2 pfu/mL sedangkan melalui tetes insang dengan titer virus mulai dari 9×10^2 pfu/mL sampai dengan 18×10^2 pfu/mL sudah dapat masuk menginfeksi ikan zebra.

Infeksi virus SARS-CoV-2 dapat masuk dan ditemukan pada organ Insang, Hepar, Usus, Organ Reproduksi, Otot dan Mata dari ikan zebra. Hasil dalam penelitian ini melalui metode pemeriksaan Imunohistokimia (IHC) menunjukkan bahwa ketiga jalur infeksi tersebut dapat memberikan persentase positif di atas 50% dari semua Kelompok perlakuan. Hasil yang menunjukkan persentase positif terbesar dalam penelitian ini yakni pada ikan zebra yang diinfeksi melalui jalur injeksi intraperitoneal dengan titer virus mulai dari $6,75 \times 10^2$ pfu/mL dan jalur tetes insang dengan titer virus mulai dari 9×10^2 pfu/mL dimana memiliki persentase positif sebesar 100% pada semua organ yang dilakukan pemeriksaan.

Hasil pemeriksaan RT PCR pada sampel air akuarium menunjukkan bahwa ikan zebra yang diinfeksi virus SARS-CoV-2 dapat menularkan virus ke lingkungan perairan. Pada jalur injeksi Intraperitoneal, pada penelitian ini menunjukkan bahwa ikan zebra memiliki kemampuan dalam menularkan virus SARS-CoV-2 ke lingkungan perairan pada titer infeksi sebesar 9×10^2 pfu/mL, sedangkan pada jalur infeksi melalui tetes insang pada titer infeksi mulai dari 9×10^2 pfu/mL sampai dengan 18×10^2 pfu/mL

SUMMARY

“Analysis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection in Zebrafish (*Danio rerio*) As a Basis for the Development Seed Virus for COVID-19 Vaccine”

Muhammad Khaliim Jati Kusala

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) first appeared in China and then spread sporadically around the world. In March 2020, WHO announced that this corona virus infection had become a pandemic outbreak. This very fast outbreak and transmission of COVID-19 has endangered health, especially for humans and affected the economy globally (Nidom et al, 2020). It has also renewed the general interest in studying coronaviruses biologically and ecologically. The aquatic environment can be a source of countless pathogenic microorganisms for different aquatic and terrestrial animals, as well as humans (Oidtmann et al, 2018).

One of the animals from the aquatic environment that is widely used as a model animal in various studies is the zebrafish (*Danio rerio*). Currently, the development of the SARS CoV-2 virus is mostly done using Vero cell culture media. As it is known that vero cells are cells that come from monkey kidneys and are non-halal. One of the virus growth media that is expected to be used as a halal basis is zebrafish (*Danio rerio*).

This research is an exploratory laboratory research that generally aims to carry out research development efforts in developing the SARS CoV-2 virus and the production of Covid-19 vaccine virus seeds for human using zebrafish. In particular, this study aims to analyze whether the SARS CoV-2 virus can grow and develop in the zebrafish body, to analyse SARS-CoV-2 virus infection in the zebrafish body, analyze the difference in the effect of the infection route on the growth of the SARS-CoV-2 virus in zebrafish body and analyzed the ability of zebrafish to spread the SARS-CoV-2 virus into the environment/water.

This study shows that the SARS-CoV-2 virus can grow and develop in the zebrafish body. The results of the RT PCR test in this study showed positive results

on the first and third post-infection days of the three infection pathways. Zebrafish showed that infections that could be obtained from the aquatic environment by giving the SARS-CoV-2 virus in water with the titer of virus 2.25×10^4 pfu/mL up to 3×10^4 pfu/mL were able to infect zebrafish. In addition to being obtained from the environment, the SARS-CoV-2 virus was also infected directly into the zebrafish body on the intra-peritoneal route with a virus titer of 6.75×10^2 to 9×10^2 pfu/mL while through gill drops with virus titers ranging from 9×10^2 pfu/mL up to 18×10^2 pfu/mL can infect zebrafish.

Infection with the SARS-CoV-2 virus can enter and be found in the gills, liver, intestines, reproductive organs, muscles and eyes of zebrafish. The results in this study through the Immunohistochemistry (IHC) examination method showed that the three infection pathways could give a positive percentage of above 50% of all treatment groups. The results that showed the largest positive percentage in this study were zebrafish infected through the intraperitoneal injection route with a virus titer starting from 6.75×10^2 pfu/mL and a gill drip line with a virus titer starting from 9×10^2 pfu/mL which had a percentage of 100% positive in all organs tested.

The results of the RT PCR examination on aquarium water samples showed that zebrafish infected with the SARS-CoV-2 virus could transmit the virus to the aquatic environment. In the Intraperitoneal injection route, this study showed that zebrafish have the ability to transmit the SARS-CoV-2 virus to the aquatic environment at an infection titer of 9×10^2 pfu/mL, while in the infection route through gill drops the infection titer ranged from 9×10^2 pfu/mL up to 18×10^2 pfu/mL

ABSTRACT

ANALYSIS OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS 2 (SARS-COV-2) INFECTION IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) AS A BASIS FOR THE DEVELOPMENT SEED VIRUS FOR COVID-19 VACCINE

Muhammad Khaliim Jati Kusala

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) first occurred in China and then spread sporadically around the world. One of the animals that is widely used as an model animal in various studies is the zebrafish (*Danio rerio*). This research aims to carry out research development efforts in developing the SARS-CoV-2 virus and the production of COVID-19 vaccine virus seeds using zebrafish. This study showed that the SARS-CoV-2 virus can grow and develop in the zebrafish body. Real Time PCR (qPCR) test in this study showed positive results from the infections that could be obtained from the aquatic environment by giving the SARS-CoV-2 virus in water with the titer of virus 2.25×10^4 pfu/mL up to 3×10^4 pfu/mL. In addition the SARS-CoV-2 virus was also infected directly into the zebrafish body on the intra-peritoneal route with a virus titer from 6.75×10^2 to 9×10^2 pfu/mL while through gill drops with virus titers ranging from 9×10^2 pfu/mL up to 18×10^2 pfu/mL can infect zebrafish. Infection with the SARS-CoV-2 virus can be found in the gills, liver, intestines, reproductive organs, muscles and eyes of zebrafish, through the immunohistochemistry (IHC) examination method showed that the three infection pathways could give a positive percentage of above 50% of all treatment groups. The largest positive percentage were zebrafish infected through the intraperitoneal injection route with a virus titer starting from 6.75×10^2 pfu/mL and a gill drip line with a virus titer starting from 9×10^2 pfu/mL which had a percentage of 100% positive in all organs tested. In summary, it can be concluded that zebrafish proposed as an animal model in the development attempt of COVID-19 vaccine seed.

Keywords : SARS-CoV-2, Zebrafish, Vaccine, Infection, Immunohistochemistry,

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Pernyataan	ii
Lembar Pengesahan	iii
Penetapan Panitia Penguji	iv
Ucapan Terimakasih.....	v
Ringkasan	vii
Summary	ix
Abstract	xi
Daftar Isi	xii
Daftar Gambar	xvi
Dadtar Tabel	xvii
Singkatan dan Arti Lambang	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang	1
1.2.Rumusan Masalah	7
1.3.Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2. Tujuan Khusus	8
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.4.1 Manfaat Teoritis	8
1.4.2 Manfaat Praktis	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 <i>Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2 (SARS CoV-2)</i>	10
2.1.1. Siklus Infeksi Virus SARS-CoV2	12
2.1.2 Respon Imun Terhadap Infeksi SARS CoV 2	15
2.2 Perkembangan Vaksin <i>Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2 (SARS CoV-2)</i>	18
2.2.1 Perkembangan Jenis-Jenis Vaksin	22
2.3 Ikan Zebra	38
2.3.1 Taksonomi dan Klasifikasi Ikan Zebra	38
2.3.2 Morfologi Ikan Zebra	38
2.3.3 Reproduksi Ikan Zebra	41
2.3.4 Habitat dan Kebiasaan Makan Ikan Zebra	41
2.3.5 Penelitian Virus dengan Menggunakan Ikan Zebra	42
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	44

3.1 Skema Kerangka Konseptual Penelitian	44
3.2 Kerangka Konseptual	45
BAB IV MATERI DAN METODE PENELITIAN	51
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	51
4.2 Variabel Penelitian	54
4.2.1 Variabel Bebas	54
4.2.2 Variabel Tergantung	54
4.2.3 Variabel Kendali	54
4.2.4 Definisi Operasional Variabel	55
4.2.4.1 Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	55
4.2.4.2 Hasil Real Time PCR <i>Cycles Tresshold</i> (Nilai CT)	55
4.2.4.3 Gambaran Histopatologi	55
4.2.4.4 Gambaran Imunohistokimia	56
4.2.4.5 Virus SARS CoV2	57
4.3 Materi Penelitian	57
4.3.1 Bahan Penelitian	57
4.3.2 Alat Penelitian	58
4.4. Tempat dan Waktu Penelitian	59
4.4.1 Tempat Penelitian	59
4.4.2 Waktu Penelitian	59
4.5 Prosedur Penelitian	59
4.5.1 Persiapan Akuarium	59
4.5.2 Persiapan Sampel Ikan	59
4.5.3 Preparasi Stok Virus SARS CoV2	60
4.5.4 Perlakuan Infeksi Virus SARS CoV2 pada Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	60
4.5.5. Pengambilan dan Preparasi Sampel Organ Ikan Zebra	61
4.5.6 Ekstraksi RNA	61
4.5.7 Real Time PCR (RT-PCR)	63
4.5.8 Histopatologi Organ Ikan Zebra	63
4.5.9 Pembuatan Preparat Imunohistokimia	65
4.5.10 Pembacaan Preparat Histopathology	67
4.5.11 Pembacaan Preparat Imunohistokimia	67
4.6 Analisa Data	67
4.7 Kerangka Alur Penelitian	68
BAB V HASIL PENELITIAN	69
5.1 Isolat Virus SARS CoV-2	69
5.2 Penggunaan Ikan Zebra	70
5.3 Pengukuran Kualitas Air Akuarium	72
5.3.1 Pengukuran pH Air Akuarium	72

5.3.2 Pengukuran suhu Air Akuarium	73
5.3.3 Pengukuran Kadar Oksigen Terlarut (DO) dalam Air Akuarium.....	74
5.3.4 Pengukuran Kadar Nitrat (NO ₃) dalam Air Akuarium	75
5.3.5 Pengukuran Kadar Nitrit (NO ₂) dalam Air Akuarium	75
5.3.6 Pengukuran Total Amonia Nitrogen (TAN) NH ₃ dan NH ₄ dalam Air Akuarium	76
5.4 Hasil Pemeriksaan <i>Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i> ..77	
5.4.1 Hasil <i>RT-PCR</i> Ikan Zebra	77
5.4.2 Hasil <i>RT-PCR</i> Air Zebra	80
5.5. Histopatologi Ikan Zebra	83
5.5.1 Gambaran Histopatologi Perlakuan Tetes Air	83
5.5.2 Gambaran Histopatologi Perlakuan Injeksi Intraperitoneal	86
5.5.3 Gambaran Histopatologi Perlakuan Tetes Insang	90
5.6. Immunohistokimia Ikan Zebra	94
5.6.1 Immunohistokimia Perlakuan Tetes Air	96
5.6.2 Immunohistokimia Perlakuan Injeksi Intra Peritoneal	101
5.6.3 Immunohistokimia Perlakuan Tetes Insang	106
BAB VI PEMBAHASAN	111
6.1 Kualitas Air Akuarium	111
6.1.1. pH Air Akuarium	112
6.1.2 Temperatur Air Akuarium	115
6.1.3 Kadar Oksigen Terlarut (DO) Dalam Air Akuarium	116
6.1.4 Kadar Nitrat (NO ₃) dalam Air Akuarium	118
6.1.5 Kadar Nitrit (NO ₂) dalam Air Akuarium	121
6.1.6 Kadar Amonia (NH ₃) dalam Air Akuarium	122
6. 2 Pemeriksaan <i>Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	123
6.2.1 Pembahasan Hasil <i>RT-PCR</i> Ikan Zebra	127
6.2.2 Pembahasan Hasil <i>RT-PCR</i> Air Akuarium	133
6.3 Pembahasan Histopatologi Ikan Zebra	136
6.4 Pembahasan Immunohistokimia Ikan Zebra	140
6.5 Kebaruan Penelitian	144
6.6 Keterbatasan Penelitian	145
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	146
7.1 Kesimpulan	146
7.2 Saran	146
DAFTAR PUSTAKA	147
LAMPIRAN	159

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Diagram Skematik Struktur Virus Korona	11
2.2. Mekanisme Infeksi Sars Cov2 dan Siklus Hidupnya	15
2.3. Gambaran Jalur pengembangan Vaksin secara Tradisional dan yang dipercepat	19
2.4. Diagram skema platform vaksin COVID-19	22
2.5. Gambaran pengembangan vaksin terhadap SARS-CoV2	37
2.6. Morfologi Ikan Zebra	39
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	44
4.1 Skema kerangka alur penelitian	68
5.1 Isolat Laboratorium Professor Nidom Foundation	69
5.2 Diagram Rata-rata berat badan Ikan Zebra yang digunakan	71
5.3 Ikan Zebra yang digunakan dalam penelitian ini	71
5.4 Diagram pH Air Akuarium	73
5.5 Diagram Suhu Air Akuarium	76
5.6 Diagram hasil RT PCR Ikan Zebra	79
5.7 Diagram hasil RT PCR Air Akuarium	82
5.8 Gambaran Histopatologi pada Organ Insang A3 dan Kontrol	85
5.9 Gambaran Histopatologi pada Organ Insang B3 dan Kontrol	88
5.10 Gambaran Histopatologi pada Organ Reproduksi B3 dan Kontrol	89
5.11 Gambaran Histopatologi pada Organ Mata B3 dan Kontrol	90
5.12 Gambaran Histopatologi pada Organ Insang kelompok C dan Kontrol	92
5.13 Gambaran Histopatologi pada Organ Reproduksi kelompok C dan Kontrol.	93
5.14 Gambaran Histopatologi pada Organ Mata Kelompok C dan Kontrol.	94
5.15 Gambaran imunohistologi organ insang kelompok A	98

5.16 Gambaran imunohistologi organ insang kelompok A	98
5.17 Gambaran imunohistologi organ usus kelompok A	99
5.18 Gambaran imunohistologi organ Reproduksi kelompok A	99
5.19 Gambaran imunohistologi organ Otot kelompok A	100
5.20 Gambaran imunohistologi organ Mata kelompok A	100
5.21 Gambaran imunohistologi organ Insang kelompok B	103
5.22 Gambaran imunohistologi organ Hepar kelompok B	103
5.23 Gambaran imunohistologi organ Usus kelompok B.	104
5.24 Gambaran imunohistologi organ Reproduksi kelompok B	104
5.25 Gambaran imunohistologi organ Otot kelompok B	105
5.26 Gambaran imunohistologi organ Mata kelompok B.	105
5.27 Gambaran imunohistologi organ Insang kelompok C	108
5.28 Gambaran imunohistologi organ Hepar kelompok C.	108
5.29 Gambaran imunohistologi organ Usus kelompok C	109
5.30 Gambaran imunohistologi organ Reproduksi kelompok C	109
5.31 Gambaran imunohistologi organ Otot kelompok C	110
5.32 Gambaran imunohistologi organ Mata kelompok C	110

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Perhitungan Titer Virus SARS COV	53
5.1 Hasil <i>RT-PCR</i> Ikan Zebra	78
5.2 Persentase positif Hasil RT PCR Ikan Zebra	79
5.3 Hasil <i>RT-PCR</i> Air	81
5.4 Hasil Histopatologi Kelompok A	84
5.5 Hasil Histopatologi Kelompok B	87
5.6 Hasil Histopatologi Kelompok C	91
5.7 Hasil Immunohistokimia Kelompok A	97
5.8 Hasil Immunohistokimia Kelompok B	102
5.9 Hasil Immunohistokimia Kelompok C	107

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

SARS CoV-2	: <i>Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2</i>
BALF	: <i>Bronchoalveolar lavage</i>
COVID-19	: <i>Coronavirus Disease 2019</i>
SARS CoV	: <i>Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus</i>
MERS CoV	: <i>Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus</i>
RNA	: <i>Ribonulceic Acid</i>
ACE 2	: <i>Angiotensin-converting enzyme 2</i>
GISAID	: <i>Global Initiative on Sharing ALL Influenza Data</i>
HCoV	: <i>Human Coronavirus</i>
ssRNA	: <i>Single Stranded Ribonucleic Acid</i>
ORF	: <i>Open Reading Frame</i>
S	: <i>Protein Spike</i>
E	: <i>Protein Envelope</i>
M	: <i>Protein Membran</i>
N	: <i>Nukleoprotein virus</i>
pp	: <i>Polyprotein</i>
TMPRSS	: <i>Transmembrane Protease Serin</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
nsps	: <i>Nonstructural Protein</i>
RTC	: <i>Replicase Trascriptase Complex</i>
RdRp	: <i>RNA Dependent RNA Polymerase</i>
ERGIC	: <i>Endoplasma Reticulum Golgi Intermediet Compartment</i>
IL	: <i>Interleukin</i>

TNF α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptors</i>
NLR	: <i>NOD Like Receptors</i>
RRL	: <i>RIG-I Like Receptors</i>
MHC	: <i>Major Hystocompatibilty Complex</i>
Sel NK	: <i>Sel Natural Killer</i>
Ig	: <i>Immunoglobulin</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
LAV	: <i>Live Attenuated Vaccines</i>
RBD	: <i>Receptors Binding Domain</i>
VLP	: <i>Virus Like Particle</i>
GALT	: <i>Gut Associated Limphoid Tissue</i>
LNP	: <i>Lipid Nanoparticle</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
PBMC	: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
RT-PCR	: <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
IHC	: <i>Imunohistokimia</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pertama kali muncul di China kemudian ditularkan secara sporadis di seluruh dunia. SARS-CoV-2 pertama kali diisolasi dari cairan *bronchoalveolar lavage* (BALF) pada tiga pasien COVID-19 yang berada di Rumah Sakit Wuhan Jinyintan pada tanggal 30 Desember 2019 (Zhu *et al*, 2020). Pada Maret 2020, WHO mengumumkan bahwa infeksi virus korona ini telah menjadi wabah pandemi. Wabah dan penularan COVID-19 yang sangat cepat ini telah membahayakan kesehatan terutama bagi manusia dan mempengaruhi ekonomi secara global (Nidom R *et al*, 2020).

Analisis filogenetik seluruh genom menunjukkan bahwa SARS-CoV-2 memiliki kesamaan struktur dalam urutan nukleotida yaitu sekitar 79,5% terhadap SARS-CoV dan 50% terhadap MERS-CoV (Lu *et al*, 2020). Selain itu, sekitar 94,6% terdapat kemiripan struktur dalam urutan nukleotida antara ketujuh domain replicase di ORF1ab SARS-CoV-2 dan SARS-CoV, dan kurang dari 90% struktur urutan nukleotida antara SARS-CoV-2 dan β -CoV lainnya, hal ini menyiratkan bahwa SARS-CoV-2 termasuk dalam garis keturunan B (*Sarbecovirus*) dari β -CoVs (Wu *et al*, 2020)

Hewan dan manusia dapat terinfeksi oleh virus korona. SARS-CoV-2 Virus ini termasuk famili *Coronaviridae* yang terbagi menjadi dua subfamili yaitu *orthocoronavirinae* dan *torovirinae*. Berdasarkan analisa filogenetik dan kajian serologis *orthocoronavirinae* terdiri dari empat jenis genera yaitu *Deltacoronavirus*,

Gammacoronavirus, *Betacoronavirus*, dan *Alphacoronavirus* (Joseph & Fagbami, 2020). *Alphacoronavirus* dan *Betacoronavirus* dapat menginfeksi hewan dan manusia, sedangkan *Deltacoronavirus* dan *Gammacoronavirus* hanya menginfeksi hewan (Nidom *et al*, 2020). Genom SARS-CoV-2 adalah RNA rantai tunggal *positive sense* yang tersusun dari sekitar 30.000 nukleotida. Genom ini mengkode empat struktur protein yaitu protein membran (M), amplop (E), nukleokapsid (N), dan spike (S) (Harapan *et at*, 2020).

Saat ini, database nukleotida pada GISAID EpiCoV™ telah ditemukan tujuh sub tipe SARS-CoV-2 yaitu S, L, V, G, GR, GH, dan O. Menariknya, semua isolat Indonesia tergolong dalam Klade L kecuali EJ-ITD3590NT (GH) dan JKT-EIJK2444 (O). Virus RNA ini memiliki kecenderungan mutasi yang jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya (Normalina *et al*, 2020). Tingkat mutasi yang tinggi menyebabkan meningkatnya dinamika virus termasuk virulensi dan kemampuan evolusi adaptif yang lebih besar terhadap kondisi lingkungan. Kemampuan ini menyebabkan meningkatnya peluang untuk menginfeksi inang yang lain sehingga virus bisa bersifat zoonosis dan terjadi penularan dari manusia ke manusia, serta memungkinkan virus ini berubah menjadi lebih ganas (Duffy, 2018).

Krisis pandemi ini membutuhkan mobilisasi studi ilmiah yang ekstensif mengenai SARS-CoV-2. Pengembangan penelitian terkait aspek klinis, karakteristik, dan mekanisme penularannya sangat penting untuk dilakukan saat ini. Meskipun banyak ilmuwan yang telah menerbitkan beberapa pilihan pengobatan untuk melawan wabah COVID-19, namun sampai saat ini belum terdapat obat yang diketahui secara

pasti ampuh dalam melawan Virus Corona tersebut. Upaya pengembangan vaksin COVID-19 telah dimulai di banyak pusat penelitian dan industri farmasi, menyusul setelah dilakukan identifikasi terhadap agen penyebab infeksi serta genom lengkap dari virus SARS-CoV-2 (Nidom R. *et.al*, 2020).

Saat ini berdasarkan data yang tersedia, terdapat 158 kandidat vaksin SARS-CoV-2 di seluruh dunia, 135 kandidat dalam tahap investigasi pengembangan atau di fase praklinis (Dharma *et al*, 2020). Proses vaksinasi diawali pada penentuan antigen yang sesuai untuk pencegahan yang diikuti formulasi pada tahap berikutnya. Penentuan antigen vaksin, akan disesuaikan dengan karakter antigen dan modulasi sistem antibodi yang akan ditimbulkan. Proses dari hulu ke hilir, harus mengikuti ketentuan regulasi nasional dan internasional, termasuk ketentuan proses halal agar umat muslim dapat menerima vaksin yang akan digunakan (Artois *et al.*, 2018 ; McIntosh, 2018).

Selain itu, tataran ke-halal-an telah menjadi perhatian tersendiri, mengingat pengguna vaksin sepertiga penduduk dunia beragama Islam. Beberapa vaksin menggunakan enzim berbasis-*porcine* dalam produksinya, menimbulkan kekhawatiran akan "halal" dari vaksin-vaksin tersebut. Namun, terlepas dari fakta bahwa enzim ini digunakan dalam beberapa proses pembuatan vaksin, Komisi Fatwa Agama Islam telah mengizinkan penggunaan vaksin ini (Abdullah, 2014).

Keputusan ini didasarkan pada beberapa prinsip dalam hukum Islam terkait dalam membedah isu tersebut. Pada "halal" dari produk vaksin itu sendiri, konsepnya bahwa "jumlah yang kecil" enzim ditambahkan ke jumlah yang besar, ini, sejalan dengan konsep "suci" atau "unsur murni" dalam Islam. Kedua, penghapusan enzim

yang digunakan dalam produksi akhir juga sejajar dengan konsep "kebersihan dan elemen murni" dalam Islam, sehingga membuat produk akhir sebagai "tidak mengandung" unsur-unsur "non-halal" melalui prinsip dari tampilan, bau dan rasa. Akhirnya, berdasarkan kebutuhan penting menggunakan vaksin dalam pencegahan penyakit dalam situasi di mana kita tidak memiliki alternatif "murni halal" lainnya, ulama Islam telah memutuskan bahwa penggunaan vaksin ini dapat diizinkan sesuai dengan keputusan berdasarkan konsep "dharurah" atau situasi darurat. Namun ada beberapa perbedaan pendapat mengenai hal ini, bahwa para ulama yang lebih ketat tidak dapat menerima "hukum" baru ini berdasarkan "ijma" atau "perjanjian" para sarjana, khususnya dalam kaitannya dengan konsep "halal" (Abdullah, 2014).

SARS-CoV-2 saat ini telah menjadi fokus minat penelitian meliputi bidang biologi molekuler, mekanisme masuknya virus ke dalam sel (*entry cell*), diagnostik, pemodelan epidemiologi, imunologi, terapi eksperimental dan pengembangan vaksin, pengobatan klinis, prediksi dan *xenophobia* dan efek psikologis dari pandemi (Jin *et al*, 2020). Hal ini juga telah memperbarui minat umum untuk mempelajari virus corona secara biologi dan ekologi. Lingkungan akuatik dapat menjadi sumber mikroorganisme patogen yang tak terhitung jumlahnya untuk hewan air dan darat yang berbeda, serta manusia (Oidtmann *et al*, 2018). Danau dan sungai merupakan habitat penting bagi kelelawar dan burung (termasuk unggas air), yang merupakan salah satu sumber utama untuk berbagai virus korona. Telah diketahui bahwa hewan-hewan ini dapat melepaskan RNA virus corona melalui kotoran, walaupun hal ini masih harus diteliti

kembali apakah ini terkait dengan keberadaan partikel virus yang menular (Milek *et al*, 2018).

Namun demikian, sangat menarik untuk meneliti hubungan antara lingkungan perairan dan kelompok virus ini. Selain itu, perlu diupayakan hewan coba selain hewan mamalia, sebagai alternatif untuk digunakan sebagai hewan coba. Salah satu hewan dari lingkungan perairan yang banyak digunakan sebagai hewan model dalam berbagai penelitian terkait penyakit infeksi maupun berbagai alternatif terapi pengobatannya adalah dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*). Saat ini, pengembangan virus SARS-CoV-2 yang banyak dilakukan adalah dengan menggunakan media kultur sel Vero. Sebagaimana diketahui bahwa sel vero merupakan sel yang berasal dari ginjal monyet dan bersifat non halal. Salah satu media pertumbuhan virus yang diharapkan dapat digunakan sebagai basis kehalalan adalah ikan zebra (*Danio rerio*).

Ikan zebra adalah organisme kecil dan serbaguna yang sangat mudah untuk ditangani dan mekanisme pensinyalannya. Interaksi dengan perubahan kimiawi, dan komunikasi antara inang dengan virus pada jaringan mukosa dapat digunakan untuk analisis secara detail. Ikan zebra telah menjadi hewan model pilihan untuk mempelajari berbagai penyakit manusia termasuk yang disebabkan oleh virus, selain itu dapat digunakan sebagai hewan model untuk menemukan alternatif obat baru dan atau untuk peninjauan kembali fungsi obat yang sudah ada (Galindo & Villegas, 2020). Ikan zebra diketahui memiliki sistem kekebalan bawaan (*Innate*) dan adaptif yang terdefinisi dengan baik serta memiliki beberapa kesamaan dengan sistem imun yang ada pada manusia (Varela *et al*, 2017).

Meskipun manusia lebih dekat hubungannya dengan mamalia lain daripada ikan, namun ikan zebra dapat membantu mempercepat penelitian tentang mekanisme kesehatan dan penyakit vertebrata. Embrio dan larva ikan zebra dapat diakses dengan mudah, dikembangkan dalam sebuah wadah dan menguntungkan secara optik, sehingga mekanisme penyakit dapat divisualisasikan melalui pencitraan fluoresen transgenik dari organ yang berfungsi pada hewan hidup misalnya pada ikan zebra transgenik yang mengekspresikan GFP dalam sel TNFA positif dan mCherry dalam neutrophil memungkinkan visualisasi komponen 'badai sitokin' yang dapat menyebabkan kematian pada manusia (pasien dewasa) COVID-19 dan sindrom inflamasi multisistem yang mempengaruhi infeksi SARS-CoV-2 pada anak-anak. Ikan zebra memiliki vertebrata, organ dan sistem organ tertentu yang mirip pada manusia dan mereka berkembang serta berfungsi dengan mekanisme yang serupa pada manusia. Selain itu, ukurannya yang kecil membuat ikan zebra cocok untuk menyaring molekul terapeutik dalam skala yang tidak dimungkinkan pada mamalia (Zhang *et al*, 2020).

Sama halnya dengan virus corona lainnya, SARS-CoV-2 perlu pemrosesan proteolitik dari protein S untuk mengaktifkan rute endositik. Telah terbukti bahwa protease inang berpartisipasi dalam pembelahan protein S dan membantu masuknya SARS-CoV-2, termasuk *transmembrane protease serine protease 2* (TMPRSS2), cathepsin L dan furin. Data sekuensing RNA sel tunggal menunjukkan bahwa TMPRSS2 banyak diekspresikan di beberapa jaringan dan tubuh dan diekspresikan bersama dengan ACE2 di sel epitel hidung, paru-paru dan cabang bronkial (Lukassen *et al*, 2020).

Ikatan reseptor yang diekspresikan oleh sel inang adalah langkah pertama infeksi virus yang kemudian diikuti oleh fusi dengan membran sel, dalam hal ini bahwa sel epitel paru adalah target utama dari virus ini. Telah dilaporkan bahwa penularan SARS-CoV dari manusia ke manusia terjadi oleh ikatan antara domain reseptor virus protein spike dan reseptor seluler yang telah diidentifikasi sebagai reseptor *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2). Data ini menunjukkan bahwa masuknya virus SARS CoV-2 ke dalam sel inang kemungkinan besar melalui reseptor ACE2 (Jaimes *et al*, 2020).

Genom ikan zebra berisi ortolog gen yang mengkode ACE2, sebagaimana diketahui bahwa ACE2 merupakan reseptor dari SARS-CoV-2. Namun, konservasi sederhana asam amino pada permukaan ikatan protein ACE2 ikan tidak mungkin mengikat protein spike virus secara efisien (Damas *et al.*,2020). Terlepas dari prediksi *in silico* ini, kerentanan inang memerlukan validasi eksperimental terutama mengingat bahwa banyak reseptor dan koreseptor lain untuk SARS-CoV-2 telah diidentifikasi (Zamorano Cuervo & Grandvaux, 2020). Dalam larva ikan zebra, berdasarkan sel tunggal transkriptomik, ACE2 sangat diekspresikan dalam sub tipe enterosit, sejalan dengan hal tersebut telah dilaporkan bahwa usus juga merupakan organ dengan ekspresi ACE2 terkuat pada manusia (Postlethwait *et al.*,2020).

Pada penelitian terdahulu melalui sel kultur (*primary cell culture*) Ikan Zebra, telah berhasil mengembangkan pertumbuhan virus H5N1 *reverse genetic* sebagai kandidat seed vaksin H5N1 (Muhammad *et al.*,2020).

Berdasarkan Uraian fakta di atas, dirasa perlu melakukan penelitian alternatif pengembangan virus SARS-CoV-2 dengan menggunakan Ikan Zebra (*Danio rerio*). Penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu upaya sebagai basis untuk mengembangkan cara baru dalam memproduksi vaksin halal di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

- 1) Apakah virus SARS CoV-2 dapat tumbuh dan berkembang di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*)?
- 2) Bagaimana gambaran infeksi virus SARS CoV-2 pada tubuh ikan zebra (*Danio rerio*) ?
- 3) Apakah terdapat pengaruh perbedaan jalur infeksi terhadap gambaran pertumbuhan virus SARS-CoV-2 di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*)?
- 4) Apakah ikan zebra (*Danio rerio*) memiliki kemampuan untuk menyebarkan virus ke lingkungan /air?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk melakukan upaya pengembangan penelitian dalam mengembangkan virus SARS CoV-2 dan produksi seed virus vaksin covid-19 untuk manusia dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*).

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Menganalisis virus SARS CoV-2 dapat tumbuh dan berkembang di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
- 2) Menganalisis gambaran infeksi virus SARS CoV-2 pada tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
- 3) Menganalisis perbedaan pengaruh jalur infeksi terhadap gambaran pertumbuhan virus SARS-CoV-2 di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
- 4) Menganalisis kemampuan ikan zebra (*Danio rerio*) dalam menyebarkan virus SARS-CoV-2 ke lingkungan / air.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah mengenai perkembangan virus SARS CoV-2 pada ikan zebra (*Danio rerio*) sehingga dapat digunakan sebagai acuan basis pengembangan produksi vaksin SARS CoV-2 untuk manusia dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*).

1.4.2 Manfaat Praktis

Ikan Zebra (*Danio rerio*) dapat digunakan sebagai alternatif media kultur untuk virus SARS CoV-2 yang diharapkan mampu memberikan solusi terhadap upaya pengembangan seed virus vaksin SARS CoV-2 untuk manusia.

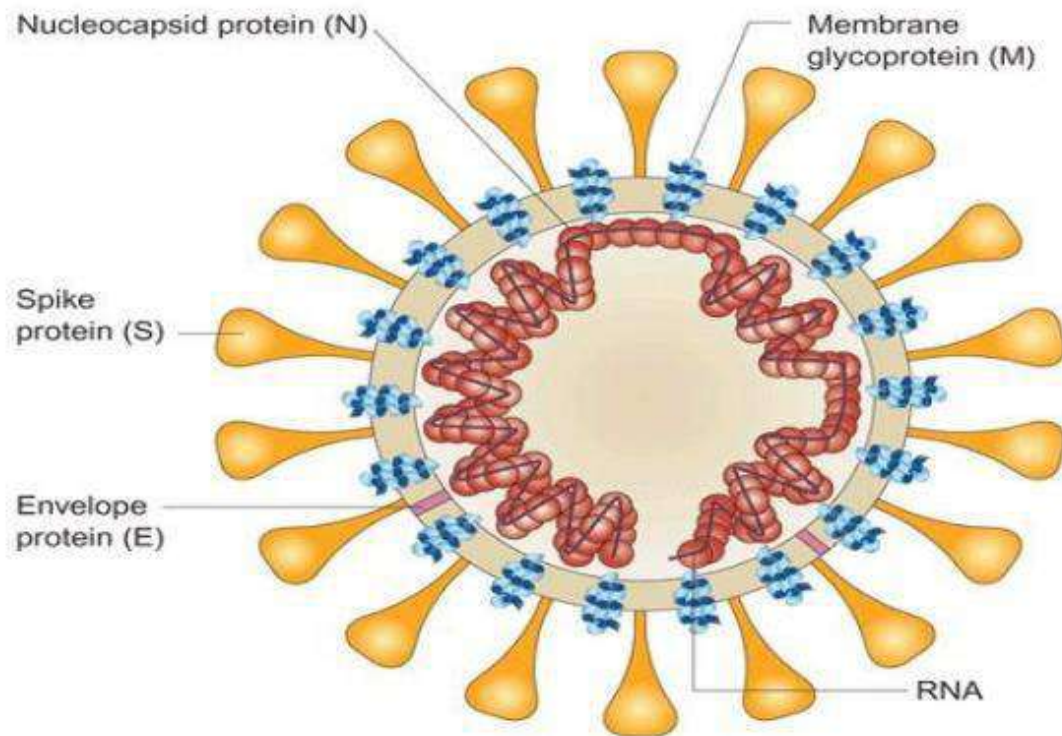
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*

SARS-CoV-2 masuk dalam golongan famili *Coronaviridae* dan ordo *Nidovirales*. *Coronaviridae* terdiri dari dua subfamili yaitu, *Coronavirinae* dan *Torovirinae*. Sementara ubfamili *Coronavirinae* mempunyai empat genera: (a) *Alphacoronavirus* termasuk human coronavirus (HCoV) -229E dan HCoV-NL63; (b) *Betacoronavirus* termasuk HCoV-OC43, *Severe Acute Respiratoru Syndriome Human Coronavirus* (SARS-HCoV), HCoV-HKU1, dan *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)*; (c) *Gammacoronavirus* termasuk virus ikan paus dan burung dan; (d) *Deltacoronavirus* termasuk virus yang diisolasi dari babi dan burung. SARS-CoV-2 tergolong dalam *Betacoronavirus* bersama dengan dua virus yang memiliki tingkat patogenitas tinggi yakni, SARS-CoV dan MERS-CoV. SARS-CoV-2 adalah virus RNA untai tunggal sense positif (+ ssRNA) dan memiliki kapsul (Harapan *et al*, 2020).

Coronavirus berbentuk bola dengan diameter 80-160 nm dan amplop yang ditutupi oleh klub dengan jarak lebar atau proyeksi berbentuk kelopak bunga, dengan diameter 20 nm Susunan struktur memberikan penampilan ciri khas pada amplop seperti mahkota dari mana nama keluarga 'korona' diturunkan. Virus ini memiliki satu rantai RNA untai tunggal dengan sense positif berukuran 27-32 kb dan dari semua genom RNA, file Genom virus corona adalah yang terbesar. Genome ini mengkode empat protein struktural yakni, protein membran(M), protein spike (S), protein envelope (E), dan nukleoprotein virus (N). Beberapa betacoronaviruses memiliki

glikoprotein struktural kelima yaitu haemagglutinin-esterase (HE) yang terletak pada permukaan virion yang secara genetik terkait dengan protein serupa dengan protein fusi haemagglutininesterase virus influenza C. Protein S berinteraksi dengan reseptor spesifik pada sel inang untuk memfasilitasi perlekatan, masuknya virus, dan menginduksi respon imun. Genom juga mengkode protein nonstruktural yang termasuk dua poliprotein replikasi, ORF1a dan ORF1b, dan antara satu atau lebih protein aksesori yang memiliki fungsi penting dalam replikasi virus corona dan patogenesis secara in vivo (Joseph & Fagbami, 2020).



Gambar 2.1. Diagram Skematik Struktur Virus Korona (Joseph & Fagbami, 2020)

Sebagai virus betacoronavirus baru, SARS-CoV-2 memiliki kemiripan identitas urutan genom sebesar 79% dengan SARS-CoV dan 50% dengan MERS-CoV. Enam fungsional *Open Reading Frame* (ORF) diatur dalam urutan dari 5' to 3': replicase (ORF1a / ORF1b), spike (S), envelope (E), membran (M) dan nukleokapsid (N). Kebanyakan protein yang dikodekan oleh SARS-CoV-2 memiliki panjang yang sama dengan protein yang sesuai dalam SARS-CoV. Dari empat gen struktural, SARS-CoV-2 memiliki kemiripan identitas asam amino sebesar 90% dengan SARS-CoV kecuali untuk gen S, yang menyimpang (Lu *et al*, 2020). Gen replikasi mencakup dua pertiga dari genom 5', dan mengkode polyprotein besar (pp1ab), yang secara proteolitik dibelah menjadi 16 protein non-struktural yang terlibat dalam transkripsi dan replikasi virus. Sebagian besar protein non-struktural SARS-CoV-2 ini memiliki lebih dari 85% kemiripan identitas urutan asam amino dengan SARS-CoV (Chan *et al*, 2020).

2.1.1. Siklus Infeksi Virus SARS-CoV2

Sebagai anggota keluarga Nidovirus, infeksi virus corona (SARS-CoV2) dapat ditularkan dari hewan seperti kelelawar, dan sesama manusia. Virus ini dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui reseptor, ACE2 yang ditemukan di berbagai organ seperti jantung, paru-paru, ginjal, dan saluran pencernaan, sehingga memfasilitasi virus masuk ke sel target. Proses masuknya CoV ke dalam sel inang dimulai melalui perlekatan glikoprotein S ke reseptor, ACE2 dalam sel inang (seperti pada pneumosit tipe II di paru-paru). Penempelan ini terjadi di domain pengikatan S protein reseptor SARS-CoV-2 yang ada pada residu 331 hingga 524, dan dapat mengikat kuat ke ACE2

pada manusia dan kelelawar. Proses masuk dan pengikatan kemudian diikuti oleh fusi membran virus dan sel inang. Setelah fusi terjadi, *protease serin transmembran tipe II* (TMPRSS2) yang ada di permukaan sel inang akan menghapus ACE2 dan mengaktifkan protein S (Rabi *et al*, 2020).

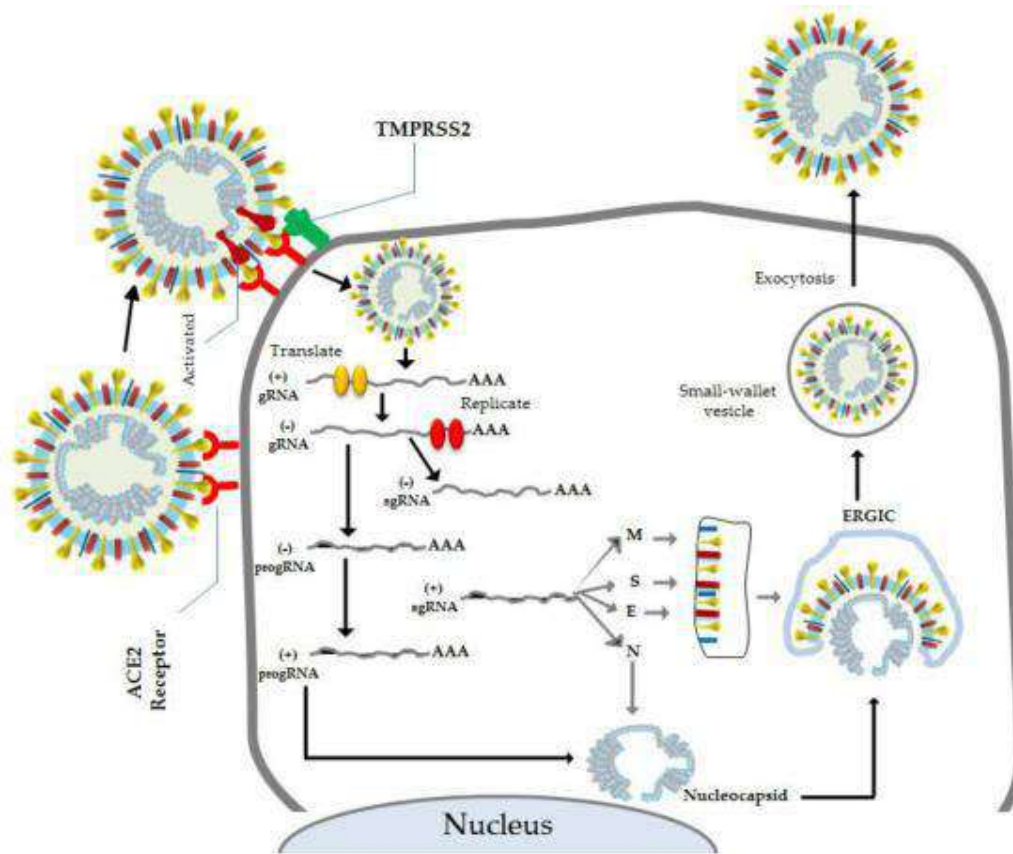
Aktivasi protein S menyebabkan perubahan konformasi dan memungkinkan virus memasuki sel. Kedua protein tersebut (TMPRSS2 dan ACE2) adalah penentu utama masuknya virus ini. Berdasarkan penelitian Sungnak *et al*. sel epitel hidung, secara khusus sel goblet / sekretori dan sel bersilia, yang mengekspresikan ACE2 tertinggi pada seluruh saluran pernapasan. Selanjutnya setelah masuk, SARS-CoV-2 akan merilis materi genom di sitoplasma dan diterjemahkan ke dalam inti sel (Sungnak *et al*, 2020).

Materi genom yang dikeluarkan oleh virus ini adalah mRNA yaitu siap diterjemahkan menjadi protein. Dalam rentang genomnya, virus ini dilengkapi dengan sekitar 14 *Open Reading Frame* (ORF), yang masing-masing mengkode berbagai protein, baik struktural maupun nonstruktural yang berperan dalam kelangsungan hidupnya serta daya virulensinya. Dalam fase transformasinya, segmen gen yang menyandi poliprotein nonstruktural melalui proses yang pertama kali diterjemahkan menjadi ORF1a dan ORF1b untuk menghasilkan dua poliprotein besar yang tumpang tindih, pp1a dan pp1ab dengan menyumbangkan kerangka ribosom (Master, 2006; Indwiani & Ysrafil, 2020).

Poliprotein dilengkapi dengan protease enzim yaitu protease mirip papain (PLpro) dan sejenis serin Protease mpro (chymotrypsin-like protease (3CLpro))

dikodekan dalam nsp3 dan nsp 5. Selanjutnya, terjadi pembelahan antara pp1a dan pp1ab masing-masing menjadi protein nonstruktural (nsps) 1e11 dan 1e16. Nsps memainkan peran penting dalam banyak proses di virus dan sel inang. Banyak dari nsps kemudian membentuk replicase-transcriptase kompleks (RTC) dalam vesikula membran ganda (DMV), yaitu terutama perakitan oleh RNA polimerase yang bergantung pada RNA (RdRp) dan subunit yang mengandung helikase, domain RdRp kanonik yang berada di CoV nsp 12 dan AV nsp9. Selanjutnya kompleks mentranskripsi template genom endogen dari entri virus gen ke sense negatif pada genom yang diturunkan dan subgenomik RNA sebagai produk antara dan diikuti dengan transkripsi ke mRNA sense positif yang terutama dimediasi oleh RdRp (Posthuma *et al*, 2017).

Selanjutnya protein subgenom ditranslasikan menjadi protein struktural dan aksesoris seperti protein M, S, dan E. selanjutnya diisolasi dalam retikulum endoplasma dan kemudian pindah ke retikulum endoplasma-Golgi intermediet kompartemen (ERGIC). Sedangkan yang sebelumnya direplikasi. Program genom dapat langsung menggabungkan protein N ke nukleokapsid terbentuk dan pindah ke ERGIC. Di kompartemen ini, nukleokapsid akan bertemu dengan beberapa protein struktural lain dan berbentuk kecil yang kemudian melalui vesikula untuk diekspor keluar sel melalui eksositosis (Indwiani & Ysrafil, 2020).



Gambar 2.2. Mekanisme Infeksi Sars Cov2 dan Siklus Hidupnya (Rabi *et al*, 2020)

2.1.2 Respon Imun Terhadap Infeksi SARS CoV 2

Secara umum, respon imun tubuh terhadap SARS-CoV2 dan SARS-CoV sebenarnya hampir sama yakni dimediasi oleh sitokin (Yi *et al*, 2020). Laporan kasus di Wuhan dari 99 pasien COVID-19 mengungkapkan terdapat peningkatan jumlah total neutrofil, serum Interleukin-6 (IL-6) dan protein c-reaktif masing-masing sekitar 38%, 52% dan 86% dan 35% penurunan dari total limfosit (Chen *et al*, 2019). Penelitian lain menemukan peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi dan kemokin IP-10, MCP-1,

MIP-1A, dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF α). Kondisi tersebut berkorelasi dengan keparahan dan mortalitas penyakit ini yang menunjukkan potensi pembentukan sitokin seperti yang ditemukan terjadi pada infeksi SARS-CoV dan MERS-CoV (Prompetchara *et al*, 2020).

Masuknya virus ke dalam sel inang memicu rangsangan respon imun inang, yang pertama kali akan dihadapi oleh sel sistem imun bawaan melalui *antigen presenting cells* (APC), misalnya sel dendritik dan makrofag sebagai garis depan sistem kekebalan. APC memiliki *Pattern Recognition Receptors* (PRR) termasuk *Toll Like Reseptor* (TLR), *NOD Like Reseptor* (NLR), *RIG-I Like Reseptor* (RLR) dan molekul bebas kecil lainnya yang berada di berbagai tempat pada sel inang seperti membran plasma, membran endosom, lisosom, endositolisosom, dan sitosol. Mereka mengenali PAMP yang terdiri dari asam nukleat, gugus karbohidrat, glikoprotein, lipoprotein dan molekul kecil lainnya yang ditemukan dalam komponen struktural virus atau produk perantara seperti dsRNA dan menginduksi pensinyalan kaskade untuk memproduksi sel efektor sistem kekebalan. Masing-masing PRR dapat menimbulkan respon biologis yang berbeda untuk aktivasi protein selanjutnya (Li *et al*, 2020).

Sebagai sel penyaji antigen asing, APC akan mempresentasikan antigen CoV ke sel T-helper CD4 oleh MHC kelas 1, dan ini menyebabkan pelepasan IL-12 sebagai molekul ko-stimulator yang kemudian merangsang aktivasi sel Th1. Selain stimulasi Th1, pelepasan interleukin-12 dan IFN- α , peningkatan ekspresi MHC Kelas I dan aktivasi sel NK juga diperlukan untuk resistensi replikasi virus untuk pemberantasan

sel yang terinfeksi virus serta memulai produksi sitokin proinflamasi melalui jalur pensinyalan NF-kB. IL-17 juga merupakan sitokin proinflamasi yang meningkat ketika infeksi SARS-CoV2 terjadi. Sitokin ini merekrut neutrofil dan monosit ke tempat infeksi dan mengaktifkan beberapa sitokin dan kemokin pro-inflamasi lainnya termasuk IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF-b, dan MCP-1 (Zumla *et al*, 2019).

Selanjutnya, aktivasi sel Th1 dapat merangsang sel T CD8, yang mana adalah salah satu efektor sel T yang akan menargetkan dan membunuh sel terinfeksi CoV. Pada saat yang sama, sel T CD4 dapat merangsang respon imun humoral dengan memproduksi antibodi spesifik antigen melalui aktivasi sel B (Janeway *et al*, 2008; Indwiani & Ysrafil, 2020). Antibodi yang dihasilkan umumnya adalah IgM dan IgG yang memiliki pola unik sebagai respons terhadap keberadaan virus corona. Umumnya infeksi ini akan menghasilkan IgM spesifik yang hanya bertahan 12 minggu, tetapi IgG dengan periode yang lebih lama. Selain itu pembentukan antibodi dari paparan virus ini juga menyebabkan pembentukan sel T CD4 dan memori CD8 yang dapat bertahan selama empat tahun. Padahal, berdasarkan temuan pada pasien yang sembuh enam tahun yang lalu dari infeksi virus Corona, sel T memori masih bisa mengenai peptida spike saat paparan pertama terjadi. Hal ini menjelaskan dan mengarahkan peneliti untuk pengembangan vaksin terhadap virus corona, khususnya SARS-COV-2 yang sekarang menjadi wabah pandemi di seluruh dunia (Li *et al*, 2020).

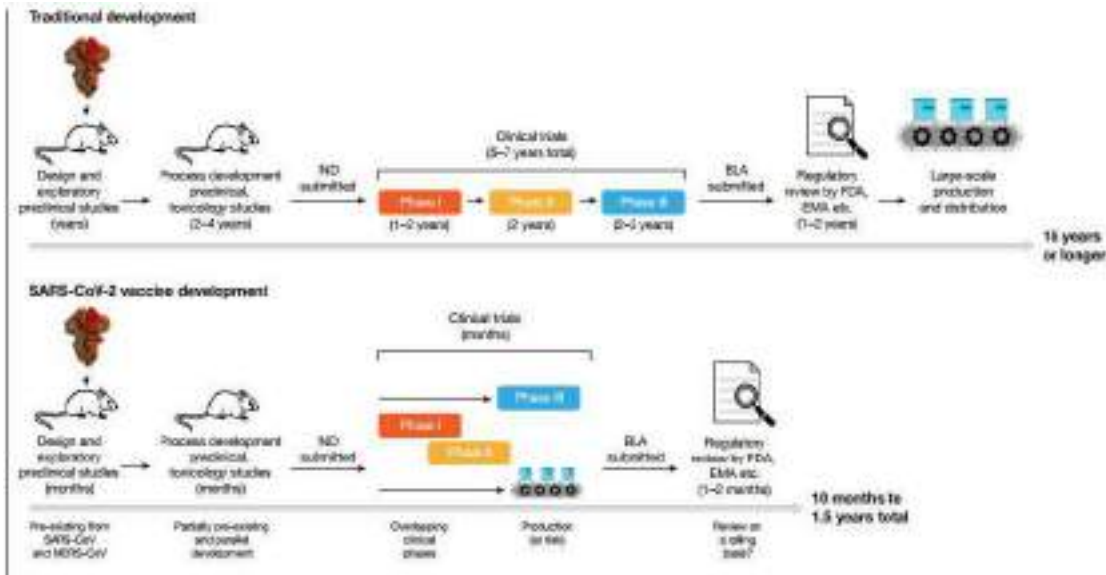
2.2 Perkembangan Vaksin *Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2* (SARS CoV-2)

Vaksin adalah bahan antigenik yang digunakan untuk menghasilkan kekebalan aktif pada tubuh. Hal ini dimaksudkan agar tubuh dapat mencegah atau mengurangi infeksi dari suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan virus. Pengertian Vaksin menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 42 tahun 2013 adalah suatu antigen yang berwujud mikroorganisme yang tidak hidup atau sudah mati atau juga yang masih hidup namun dilemahkan, yang beberapa bagiannya masih utuh dan telah di olah. Dapat juga berupa mikroorganisme yang sudah diubah menjadi toksoid ataupun protein rekombinan yang bisa menimbulkan efek kekebalan spesifik terhadap suatu penyakit infeksi tertentu (Sumber Pengertian, 2018).

Vaksinasi adalah pilihan terbaik yang ada saat ini untuk pengendalian COVID-19. Plasmid DNA, epitop, mRNA, dan *Antigen Presenting Cells (aAPC)* adalah beberapa platform bioteknologi yang menjadi fokus penelitian global sebagai dasar pembuatan vaksin (Chen *et al*, 2020). Informasi mengenai antigen spesifik yang digunakan dalam pengembangan vaksin melawan SARS-CoV-2 saat ini masih sangat terbatas. Sebagian besar kandidat vaksin ditujukan untuk menginduksi antibodi untuk menetralkan terhadap protein virus *spike* (S), yang mencegah penyerapannya melalui reseptor ACE2 (Ansori *et al*, 2020).

Rantai peristiwa dari konsepsi hingga ketersediaan vaksin di pasaran biasanya terjadi lebih dari sepuluh tahun, dan hanya memiliki kemungkinan 6% kesuksesan untuk dapat diterima di pasaran. Jika vaksin SARS-CoV-2 yang tersedia secara

komersial akan tersedia untuk dapat digunakan dalam 12-18 bulan, dengan asumsi jalurnya dari laboratorium ke pasar terjadi tanpa hambatan, itu akan mewakili perubahan seismik dari jalur pengembangan vaksin tradisional. Ini akan membutuhkan strategi multi cabang yang melibatkan paradigma pengembangan vaksin baru, fase pengembangan yang fleksibel, meningkatkan kapasitas produksi yang ada, skala dan kecepatan *Research and Development (R&D)* secara global yang belum pernah terjadi sebelumnya, dan perubahan radikal dalam proses regulasi. Ini juga membutuhkan evaluasi yang cermat terhadap keamanan dan kemanjuran di setiap tahapannya (Ansori *et al*, 2020).



Gambar 2.3 Gambaran Jalur pengembangan Vaksin secara Tradisional dan yang dipercepat (Vaksin SARS CoV-2) (Krammer, 2020)

Pengembangan vaksin secara tradisional adalah proses yang panjang, dan waktu pengembangan biasanya berkisar 15 tahun. Prosesnya dimulai dengan pekerjaan

eksplorasi desain dan evaluasi vaksin pada model hewan, yang bisa memakan waktu bertahun-tahun. Ini kemudian diikuti oleh tahap di mana lebih banyak percobaan praklinis formal dilakukan, sebuah proses untuk produksi vaksin dirancang dan studi toksikologi formal dilakukan; tahap ini juga bisa berlangsung selama beberapa tahun (Krammer, 2020).

Aplikasi untuk file obat baru investigasi diajukan dan uji klinis fase I (pengujian dalam format kurang dari 100 individu; sekitar 2 tahun) dilakukan untuk menghasilkan profil keamanan awal dari kandidat vaksin dan untuk memperoleh data imunogenisitas awal. Jika hasilnya menjanjikan dan dana tersedia, calon vaksin kemudian dipindahkan ke tahap II uji klinis (pengujian pada beberapa ratus individu, juga berlangsung sekitar 2 tahun) untuk menyelidiki imunogenisitas lebih lanjut dan untuk menentukan dosis yang tepat dan regimen vaksin yang optimal. Jika hasil fase percobaan II menunjukkan hasil yang baik, keputusan mungkin bisa dibuat untuk lanjut ke tahap uji klinis fase III yang sangat mahal (pada ribuan individu; kira-kira 2 tahun) di mana khasiat dan keamanan dievaluasi. Jika hasil dari uji coba fase III memenuhi titik akhir yang telah ditentukan sebelumnya, permohonan lisensi diajukan ke badan pengatur (misalnya, Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (FDA) atau Badan Obat di Eropa). Proses perizinan dapat memakan waktu 1–2 tahun lagi, terutama jika diperlukan data tambahan. Penting, karena produksi vaksin ini sangat mahal, dimana keseluruhan proses pengembangan vaksin menjadi lambat dengan penilaian risiko ekonomi di setiap langkahnya. Pengembangan vaksin berkembang melalui tahap-tahap

ini hanya jika pengembang yakin akan hal itu (datanya menjanjikan), bahwa risiko kegagalan relatif rendah dan masih ada pasar untuk vaksin tersebut (Krammer, 2020).

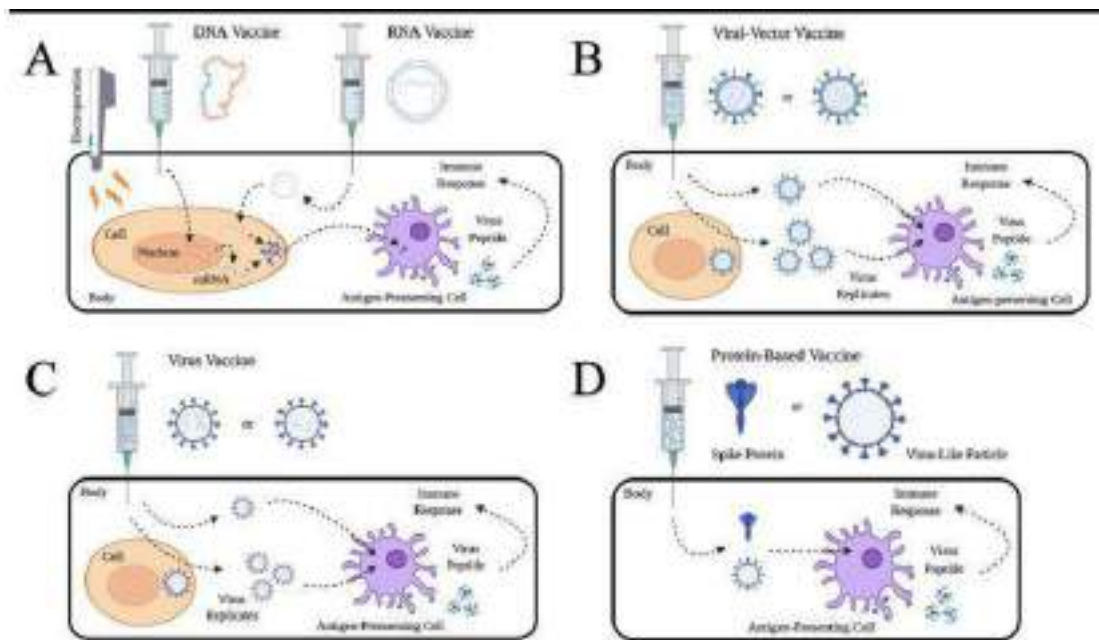
Pandemi SARS-CoV-2 membutuhkan tindakan cepat dan pengembangan vaksin dalam jangka waktu yang belum pernah terjadi sebelumnya. Data dari pengembangan praklinis calon vaksin SARS-CoV dan MERS-CoV memungkinkan sebagai langkah awal eksplorasi desain vaksin, menghemat banyak waktu. Pada banyak kasus, proses produksi hanya diadaptasi dari vaksin itu atau kandidat vaksin yang ada, dan dalam kasus tertentu data praklinis dan toksikologi dari vaksin terkait dapat digunakan. Sebagai Hasilnya, uji klinis pertama calon vaksin untuk SARS-CoV-2 dimulai pada Maret 2020 (NCT04283461). Pengujian dirancang dengan fase klinis yang tumpang tindih. Uji coba fase I / II awal diikuti dengan perkembangan cepat ke fase III uji coba setelah analisis sementara dari data fase I / II. Saat ini, ada beberapa produsen sudah memulai produksi komersial vaksin berisiko (tanpa hasil apa pun dari uji coba fase III) (FDA, 2020).

Meskipun jalur perizinan belum sepenuhnya jelas, ada kemungkinan tinjauan dapat dipercepat dan vaksin bahkan dapat disetujui melalui otorisasi penggunaan darurat. FDA telah merilis file dokumen pedoman pengembangan dan perizinan vaksin SARS-CoV-2, serta memberikan rincian tambahan menyatakan kemanjuran minimal 50% akan dibutuhkan. Ini sangat penting menunjukkan bahwa bergerak maju dengan risiko finansial adalah faktor utama telah memungkinkan percepatan pengembangan kandidat vaksin SARS-CoV-2, dan tidak ada jalan pintas yang harus dipotong terkait dengan evaluasi keamanan (FDA, 2020).

Saat ini, para ilmuwan di seluruh dunia sedang berusaha untuk menghasilkan vaksin untuk melawan SARS-CoV-2, dengan vaksin berbasis protein yang menjadi jenis vaksin paling mutakhir dan sektor swasta saat ini berada di garis depan studi ini (Jean *et al*, 2020).

2.2.1 Perkembangan Jenis-Jenis Vaksin

Pengembangan vaksin COVID-19 saat ini telah dimulai di berbagai tempat pusat penelitian dunia dan industri farmasi seiring dengan pengumuman mikroorganisme agen penyebab SARS-CoV-2 dan susunan genom secara lengkap. Saat ini sudah tersedia data assemble menyatakan bahwa calon vaksin COVID-19 telah dikelompokkan menjadi beberapa jenis berikut:



Gambar 2.4 Diagram skema platform vaksin COVID-19 (diilustrasikan dan dirakit menggunakan BioRender). A. DNA dan vaksin RNA; B. Vaksin vektor virus; C. Vaksin virus; dan D. Vaksin berbasis protein (Nidom R. *et al*, 2020).

A). Vaksin Inaktif

Virus yang dimatikan, juga disebut sebagai vaksin yang tidak aktif (inaktif), adalah vaksin yang terkenal berpotensi menghentikan replikasi virus dan langsung memberikan perlakuan terhadap virus melalui pemanasan atau radiasi, dan formaldehida (bahan kimia). Selain itu, vaksin inaktif dipromosikan sebagai vaksin yang efektif dan aman, yang tersedia sangat banyak dengan harga yang jauh lebih murah dibandingkan dengan vaksin DNA / RNA (Pandey *et al*, 2020). Vaksin dengan virus yang dimatikan yang terpenting adalah mengandung subunit virus dari protein amplop dan spike, matriks, dan bagian *open reading frames (ORF)*, dan dapat mendorong munculnya sistem kekebalan. Vaksin inaktif telah mendapat perhatian selama beberapa dekade sebagai konsekuensi dari manfaatnya melawan virus, yang mungkin dengan mudah menangkal virus (Schaecher *et al*, 2007; Nidom R. *et al*, 2020).

Vaksin inaktif diproduksi dengan menumbuhkan SARS-CoV-2 pada kultur sel, biasanya sel yang digunakan adalah sel Vero, kemudian diikuti dengan inaktivasi kimiawi terhadap virus. Mereka dapat diproduksi dengan relatif mudah; Namun, hasil yang mereka dapat dibatasi oleh produktivitas virus dalam kultur sel dan persyaratan fasilitas produksi pada tingkat keamanan hayati 3 (*Biosafety level 3*). Contoh kandidat vaksin inaktif termasuk CoronaVac (awalnya dikenal sebagai PiCoVacc), yang sedang dikembangkan oleh Sinovac Biotech di Cina (Gao *et al*, 2020).

Beberapa kandidat lainnya sedang dikembangkan di Cina, oleh Bharat Biotech di India dan oleh Lembaga Penelitian untuk Masalah Keamanan Biologis di

Kazakhstan. Vaksin ini biasanya diberikan secara intramuskular dan dapat berisi tawas (aluminium hidroksida) atau bahan pembantu lainnya. Karena secara keseluruhan virus disajikan ke sistem kekebalan, kemungkinan besar ada respons kekebalan yang tidak hanya merujuk pada protein spike SARS-CoV-2 tetapi juga matriks, amplop dan nukleoprotein. Beberapa kandidat vaksin inaktif telah memasuki uji klinis, dengan tiga kandidat dari China dalam fase Uji coba III, dan satu dari India, satu dari Kazakhstan dan dua dari China dalam uji klinis fase I atau II (Krammer, 2020).

Penelitian terhadap hewan primata non manusia, tikus, dan mencit dengan berbagai dosis dengan fokus pada imunogenisitas dan potensi perlindungan dari kandidat vaksin inaktif (PiCoVacc). Kelompok yang menemukan PiCoVacc dapat menetralkan virus baru secara signifikan dan membangun potensi perlindungan terhadap virus terbaru pada primata non manusia. PiCoVacc mungkin ditetapkan sebagai calon vaksin baru. Selain itu, vaksin inaktif menunjukkan daya protektif terhadap SARS-CoV yang mungkin menjadi kuat melawan virus penyebab COVID-19 (Amanat & Krammer, 2020).

B) *Live Attenuated Vaccines (LAV)*

Vaksin dengan Virus hidup yang dilemahkan atau disebut *Live Attenuated Vaccines (LAV)* didemonstrasikan sebagai salah satu vaksin yang efektif dan teraman melawan influenza berdasarkan data. LAV mungkin dikembangkan dengan kemungkinan patogenesis yang lebih sedikit, seperti infeksi paru-paru, masuknya neutrofil, dan sitokin antiinflamasi (Shang *et al*, 2020).

Sebuah penelitian yang meneliti LAV menyarankan pengurangan replikasi virus dengan memulai perubahan menjadi nsp14 pada hewan model (Liu *et al*, 2020). Penelitian saat ini mengusulkan kemajuan Vaksin LAV oral dapat menurunkan infeksi paru-paru yang disebabkan oleh SARS-CoV-2 dan berkorelasi dengan saluran sistem imun selama reaksi melawan COVID-19. LAV mungkin dikelola dan disajikan kepada masyarakat yang diharapkan mempromosikan kekebalan kawanan (*herd immunity*) dengan cepat untuk menyembuhkan SARS-CoV-2 (Nidom R. *et al*, 2020).

Vaksin virus hidup yang dilemahkan diproduksi dengan menghasilkan versi virus yang dilemahkan secara genetik yang bereplikasi sampai batas tertentu, tidak menyebabkan penyakit tetapi memicu respons imun yang mirip dengan yang disebabkan oleh infeksi alami. Atenuasi bisa dicapai dengan mengadaptasi virus ke kondisi yang tidak menguntungkan (misalnya, pertumbuhan pada suhu yang lebih rendah, pertumbuhan dalam sel non-manusia) atau dengan modifikasi virus secara rasional (misalnya, dengan de-optimasi kodon atau dengan menghapus gen yang bertanggung jawab untuk menangkai pengenalan sistem imun bawaan (Broadbent *et al*, 2016).

Keuntungan penting dari vaksin ini adalah mereka dapat diberikan secara intranasal, setelah itu mereka dapat menginduksi respon kekebalan mukosa yang dapat melindungi saluran pernapasan bagian atas, dimana merupakan tempat portal masuk utama virus. Selain itu, karena virus bereplikasi pada individu yang divaksinasi, respons imun kemungkinan besar akan menargetkan baik protein virus struktural dan non-struktural melalui terbentuknya antibodi dan respons imun seluler. Namun,

kerugian dari vaksin ini termasuk masalah keamanan dan kebutuhan untuk memodifikasi virus memakan waktu yang lama jika dilakukan dengan cara tradisional dan teknis yang menantang ketika harus menggunakan teknologi genetika terbalik (*reverse genetic*). Saat ini Hanya tiga vaksin dari virus hidup yang dilemahkan sedang dalam pengembangan praklinis, semuanya dilemahkan oleh de-optimasi kodon dan yang sedang dikembangkan bekerja sama antara Codagenix dan Serum Institute of India (Krammer, 2020)

Saat ini, LAV mungkin adalah vaksin COVID-19 berlisensi yang pertama, saat ini, banyak pusat penelitian dan universitas di China berhasil menemukan strain virus SARS-CoV-2 dan memulai aktivitas formulasi LAV (Nuismer *et al*, 2019). Serum Institute of India, Ltd. juga mempromosikan LAV bekerja sama dengan Codagenix, Inc. untuk melawan SARS-CoV-. Bagaimanapun, pada beberapa kasus perlu diperhatikan beberapa batasan selama penggunaan LAV untuk melawan SARS CoV-2 (Chen *et al*, 2020).

C) Vaksin Rekombinan Berbasis Protein

Vaksin protein rekombinan dapat dibagi menjadi rekombinan vaksin berbasis protein *spike*, vaksin berbasis *receptor binding domain* (RBD) rekombinan dan vaksin berbasis *virus-like particle* (VLP). Protein rekombinan ini dapat diekspresikan dalam sistem ekspresi yang berbeda-beda pada sel serangga, sel mamalia, ragi dan tumbuhan (Chen *et al*, 2020). Hasil virus dan jenis serta luas modifikasi pasca-translasi, bervariasi bergantung pada sistem ekspresi. Khususnya untuk vaksin rekombinan berbasis protein

spike, modifikasi seperti penghapusan polybasa pada situs pembelahan, penambahan dua (atau lebih) mutasi penstabil, dan penambahan domain trimerisasi seperti halnya cara pemurnian (protein terlarut dengan ekstraksi membran) dapat mempengaruhi respons imun yang ditimbulkan (Hsieh *et al*, 2020).

Keuntungan dari vaksin ini adalah bahwa mereka dapat diproduksi tanpa menangani virus hidup. Selain itu, beberapa vaksin protein rekombinan seperti FluBlok vaksin untuk influenza, telah memiliki izin, dan jumlahnya cukup banyak pengalaman dalam memproduksinya. Namun, vaksin semacam itu juga memiliki kekurangan. Protein spike relatif sulit untuk diekspresikan, dan memang demikian kemungkinan akan berpengaruh pada hasil produksi dan berapa banyak dosis yang bisa diproduksi (Amanat *et al*, 2020).

Partikel mirip virus (VLP) adalah protein kapsid (tidak menular) terkonjugasi dengan struktur virus protein yang direkayasa untuk dimanfaatkan dengan nanoteknologi. Struktur VLP sesuai dengan virus alami tanpa genom virus. Selain itu, VLP memiliki ukuran partikel mulai dari 20 hingga 100 nm. VLP aktif secara biologis, imunogenik kuat, dan adekuat untuk membuat timbulnya respon imun humoral dan seluler. VLP mungkin lebih mudah dibuat dengan biaya rendah dan lebih aman jika dibandingkan dengan vaksin virus konvensional, seperti vaksin hidup yang dilemahkan atau vaksin inaktif. VLP memiliki imunogenisitas yang lebih beragam daripada vaksin asam nukleat atau subunit (Huang *et al*. 2020).

Saat ini, Vaksin VLP sangat dianggap sebagai kandidat yang efektif untuk menghentikan pandemi COVID-19. Sebelumnya, vaksin virus corona berbasis VLP

sudah ada dibangun dengan menerapkan berbagai sistem ekspresi atau kombinasi antigen. Produk ini menunjukkan kemampuannya dalam mencegah virus corona dan menunjukkan potensi yang sangat menjanjikan dalam penggunaan klinis. Berbagai studi mengeksplorasi adjuvan untuk meningkatkan kemanjuran Vaksin berbasis VLP. Sedangkan studi terbaru juga mengungkapkan bahwa protein rekombinan dengan menggunakan Platform nanoteknologi dapat digunakan untuk menghasilkan kandidat vaksin COVID-19. Adjuvan Matrix-M™ pada vaksin dilaporkan dapat meningkatkan respon imun selama vaksinasi. Saat ini, ada kandidat vaksin Covid-19 di bawah platform VLP dan memasuki fase uji klinis (Nidom R. *et al*, 2020)

RBD lebih mudah untuk diekspresikan. Namun, ini merupakan protein yang relatif kecil jika diekspresikan sendiri dan meskipun berpotensi menetralkan antibodi mengikat RBD, ia tidak memiliki epitop penetral lainnya seperti yang ada pada protein spike, hal ini kemungkinan menyebabkan vaksin berbasis RBD lebih rentan terhadap dampak dari *antigenic drift* daripada vaksin yang menyertakan protein spike secara genome penuh. Banyak kandidat vaksin protein rekombinan melawan SARS-CoV-2 saat ini sedang dalam pengembangan praklinis, dan beberapa vaksin berbasis protein spike dan RBD telah masuk uji klinis (Krammer, 2020).

D) Vaksin Subunit

Imunisasi vaksin berbasis subunit setidaknya satu protein dengan imunogenisitas yang kuat tersedia untuk menjadi vaksin yang efektif untuk dapat menimbulkan respon imun. Jenis antibodi ini lebih mudah dan lebih aman untuk

dikembangkan karena tidak memiliki substansi virus hidup dalam pembuatan vaksin. Namun demikian, seringkali membutuhkan adjuvan untuk dapat meningkatkan respon imun yang memiliki daya protektif. Di sisi lain, vaksin subunit tidak begitu memiliki efek imunogenik yang efektif, dengan demikian perlu ditambahkan bahan adjuvant yang sesuai untuk dapat meningkatkan respon imun yang ditimbulkan (George *et al*, 2020).

Vaksin subunit protein dihasilkan melalui sintesis rekombinan antigen protein atau isolasi dan metode pemurnian protein setelah membudidayakan patogen dalam jumlah besar. Strategi ini dapat menghilangkan kemungkinan efek samping yang parah, tetapi sering meningkatkan kebutuhan untuk meningkatkan dosis booster dan mengoptimalkan adjuvan yang ditambahkan untuk mencapai efek imunisasi yang lebih kuat dan tahan lama. Antigen yang diberikan bersamaan dengan adjuvant mengaktifkan sel penyaji antigen (APC) untuk kemudian disajikan kepada sel imun adaptif (Kyriakidis *et al*, 2021).

E) Vaksin Asam Nukleat

Salah satu tren terbaru dalam pengembangan vaksin adalah pengembangan platform asam nukleat yang menyandikan antigen patogen. Tidak ada vaksin DNA atau mRNA yang telah disetujui untuk digunakan pada manusia. Vaksin berbasis DNA yang telah dilisensikan oleh USDA adalah untuk penggunaan pada hewan, diantaranya, ada vaksin terhadap virus West Nil pada kuda³⁹ dan terhadap melanoma anjing. Vaksin asam nukleat adalah penginduksi yang kuat untuk respon imun adaptif humoral dan

seluler dan sangat cepat untuk digunakan sejak satu-satunya bahan yang dibutuhkan untuk produksinya adalah urutan genetik yang mengkodekan antigen virus dan platform penyalurannya. Desain dan produksi jalur cepat vaksin ini memungkinkan mereka untuk muncul sebagai kandidat vaksin melawan virus corona baru SARS-CoV-2. Molekul DNA dan mRNA memiliki perbedaan stabilitas dan juga termasuk langkah-langkah berbeda yang digunakan untuk produksi antigen (Kyriakidis *et al*, 2021).

Vaksin DNA didasarkan pada DNA plasmid yang dapat diproduksi dalam skala besar pada bakteri. Biasanya, plasmid ini mengandung ekspresi promotor mamalia dan gen yang mengkode protein spike, yang diekspresikan pada saat individu divaksinasi. Keuntungan dari teknologi ini adalah kemungkinan untuk memproduksi dengan skala besar pada *E. coli*, serta stabilitas tinggi dari DNA plasmid. Namun, DNA vaksin seringkali menunjukkan imunogenisitas yang rendah, dan harus diberikan tambahan zat pada saat diberikan untuk membuatnya lebih efisien. Saat ini terdapat empat kandidat vaksin DNA untuk melawan SARS-CoV-2 yang sedang dalam fase uji klinis I / II (Krammer, 2020).

Antibodi yang merupakan sintetik DNA dianggap lebih banyak disukai dibandingkan dengan antibodi lainnya. Molekul DNA menyandikan paling sedikit satu gen asing (Phelan *et al*, 2020). Vaksin berbasis DNA mungkin berhasil mengatasi berbagai macam virus corona termasuk domain transmembran, RBD, protein spike, ekor sitoplasma, dan domain S1 (Kirchdoerfer *et al*, 2016). Konfigurasi vaksin berbasis DNA adalah teknik mutakhir dan dianggap mahal. Teknik ini tersusun dari plasmid yang umumnya tersusun dengan perangkat pintar yang membantu mengungkapkan

sistem kekebalan untuk mengalahkan virus. Saat ini, beragam institusi telah memulai studi untuk mengembangkan vaksin untuk menyembuhkan virus corona baru (Nidom *et al*, 2020).

Vaksin DNA dapat memiliki rute aplikasi yang berbeda. Vaksin ini \ dapat disampaikan secara intradermal dengan elektroporasi dapat mengoptimalkan serapannya oleh sel penyaji antigen (APC) kulit seperti makrofag, monosit, dan sel dendritik yang akan memproses dan menampilkannya untuk naif sel T pada organ getah bening sekunder, sehingga meningkatkan sel respon imun adaptif. Antigen yang baru disintesis juga akan mencapai organ-organ ini dan memulai aktivasi sel B naif yang akan menghasilkan produksi antibodi. Administrasi subkutan akan menyebabkan serapan fibroblast dan keratinosit. Sel-sel ini selanjutnya akan mensintesis dan melepaskan antigen yang bisa dikenali dan difagositosis oleh APC. Pemberian DNA transdermal terutama akan dilakukan oleh sel Langerhans yang akan mengekspresikan, memproses, dan menyajikan transgen (Hobernik & Bros, 2018).

Di sisi lain, DNA diberikan melalui injeksi intravena secara sistematis mencapai organ limfatik sekunder, sedangkan aplikasi vaksin DNA intramuskular yang ditingkatkan dengan elektroporasi pada prinsipnya dapat menyebabkan pengiriman miosit. Miosit akan selanjutnya mensintesis dan mengeluarkan antigen baru yang akan lahir selanjutnya diambil oleh APC yang dapat memulai respon imun adaptif. Akhirnya, vaksin DNA akan nebulisasi menghasilkan aktivasi APC paru yang menginduksi mukosa kekebalan, sedangkan, dengan cara yang sama, DNA yang diberikan secara oral dalam bentuk plasmid bakteri akan memancing serapan oleh sel

epitel usus. Mediator ini akan mengungkapkan sejumlah besar antigen oleh APC usus dan selanjutnya presentasi dalam jaringan limfoid usus (Gut Associated Lymphoid Tissue / GALT), seperti Peyer Patch. Molekul DNA umumnya cukup stabil, memungkinkan adanya penyimpanan vaksin DNA pada +4°C, sehingga menyederhanakan distribusi jenis vaksin ini (Hobernik & Bros, 2018).

Vaksin RNA merupakan perkembangan yang relatif baru. Mirip dengan vaksin DNA, informasi genetik untuk antigen adalah berasal antigen itu sendiri, dan antigen kemudian diekspresikan di dalam sel individu yang divaksinasi. Vaksin mRNA (dengan modifikasi) atau RNA yang menggandakan diri sendiri semuanya dapat digunakan. Dosis yang lebih tinggi diperlukan untuk mRNA dibandingkan dengan RNA yang menggandakan diri dan menguatkan dirinya sendiri (Vogel *et al*, 2018).

RNA biasanya dikirim melalui *lipid nanoparticles* (LNP). Vaksin RNA telah menunjukkan harapan besar dalam beberapa tahun terakhir dan banyak di antaranya memang menjanjikan dalam perkembangannya, misalnya untuk virus Zika atau cytomegalovirus. Vaksin RNA memiliki potensi sebagai vaksin untuk melawan SARS-CoV-2, hasil praklinis yang menjanjikan telah diterbitkan untuk sejumlah kandidat vaksin RNA Pfizer dan Moderna saat ini memiliki kandidat dalam uji coba fase III, CureVac dan Arcturus memiliki kandidat dalam uji coba fase I/II, dan kandidat vaksin dari Imperial College London dan Cina Liberation Army sedang dalam uji coba fase I. Keuntungan dari teknologi ini adalah bahwa vaksin tersebut dapat diproduksi sepenuhnya secara *in vitro*. Namun, teknologi masih baru, dan belum diketahui secara pasti masalah apa yang akan dihadapi dalam hal produksi skala besar dan stabilitas

penyimpanan jangka panjang, karena penyimpanan beku diperlukan. Selain itu, vaksin ini juga diberikan melalui suntikan dan oleh karena itu tidak mungkin menimbulkan kekebalan mukosa yang tinggi (Krammer, 2020).

Aplikasi vaksin mRNA memiliki konsep yang sama dengan vaksin DNA, perbedaannya mRNA perlu mencapai sitoplasma atau ribosom retikulum endoplasma untuk diterjemahkan menjadi protein. Molekul mRNA dapat diberikan dalam kapsul *lipid nanoparticles* (LNP) vektor yang dapat mengenkapsulasi asam nukleat secara efisien dan kuat sehingga memungkinkan penetrasi jaringan untuk memfasilitasi pengiriman informasi genetic dalam sel inang sehingga sintesis protein antigen asing dapat dimulai. Induksi selanjutnya dari respon imun sama dengan induksi vaksin DNA. Namun, molekul mRNA secara signifikan lebih tidak stabil dibandingkan dengan molekul DNA. Oleh karena itu, vaksin mRNA biasanya membutuhkan suhu antara -70°C dan -20°C untuk penyimpanan jangka panjang yang mempersulit logistik distribusi vaksin semacam ini. Penambahan mutasi spesifik dan modifikasi penstabil kimia pada molekul vaksin mRNA secara khusus bertujuan untuk mengatasi masalah-masalah ini, untuk penyimpanan jangka pendek (hingga 6 bulan) calon vaksin mRNA pada suhu antara 2°C dan 8°C (Pardi *et al*, 2018).

F) Vaksin Vektor Virus

Vektor virus merupakan salah satu strategi terbaru dalam pengembangan vaksin. Virus yang berbeda dimodifikasi untuk mengurangi virulensi dan biasanya potensi replikasi mereka tetap dipertahankan kapasitasnya untuk menginfeksi sel

manusia. Ini dirancang untuk menyampaikan informasi genetik patogen ke sel kekebalan untuk mengekspresikan dan menyajikan protein antigenik ke limfosit. Vektor adenovirus, campak, dan *vesicular stomatitis virus* (VSV) biasanya digunakan untuk desain seperti itu yang telah terbukti memprovokasi respons imun yang kuat dengan satu kali pemberian (Kyriakidis *et al*, 2021).

Komplikasi yang diamati dalam penggunaan vaksin vektor virus adalah kekebalan yang sudah ada sebelumnya terhadap vektor yang kemudian dapat berpengaruh terhadap besarnya respon imun yang ditimbulkan. Antibodi yang terbentuk terhadap vektor virus yang dihasilkan pada vaksinasi pertama dapat menurunkan imunogenisitas pemberian vaksinasi booster. Menggunakan serotipe vektor yang kurang umum atau vektor virus non-manusia (misalnya, adenovirus yang berasal dari simpanse) dapat membantu menghindari permasalahan imunologi ini (Zhu *et al*, 2020).

Vektor replikasi tidak kompeten mewakili sebagian besar pengembangan vaksin. Vaksin semacam itu biasanya didasarkan pada virus yang lain yang telah direkayasa untuk mengekspresikan protein spike dan telah dinonaktifkan dari replikasi *in vivo* dengan penghapusan beberapa bagian genom. Mayoritas pendekatan ini didasarkan pada vektor *adenovirus* (AdV), *Modified Vaccinia Ankara* (MVA), vektorvirus parainfluenza pada manusia, virus influenza, virus adeno terkait dan virus Sendai juga digunakan (Krammer, 2020). Mayoritas dari vektor ini disampaikan secara intramuskular, memasuki sel-sel pada individu yang divaksinasi dan kemudian mengekspresikan protein spike, yang ditimbulkan oleh respon imun inang. Pendekatan

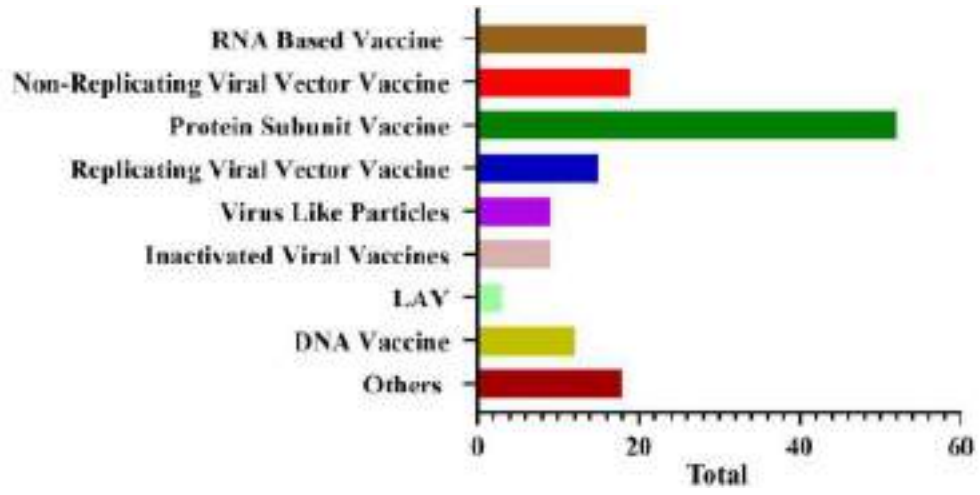
ini memiliki banyak keuntungan, diantaranya tidak memerlukan SARS-CoV-2 yang hidup selama proses produksi, terdapat pengalaman yang cukup banyak dengan memproduksi dalam jumlah yang lebih besar dari beberapa vektor seperti vaksin berbasis Ad26 MVA untuk melawan virus Ebola baru-baru ini dilisensikan di Uni Eropa, dan vektor ini menunjukkan stimulasi yang baik dari respon sel B dan sel T. Kerugiannya adalah beberapa dari vektor ini terpengaruh dan sebagian dinetralkan oleh imunitas vektor yang sudah terbentuk sebelumnya, hal ini dapat dihindari dengan menggunakan jenis vektor yang jarang ditemukan pada manusia atau yang berasal dari virus hewan, atau dengan menggunakan virus yang tidak menimbulkan banyak kekebalan sendiri (misalnya, virus adeno) (Folegatti *et al*, 2020).

Imunitas vektor dapat menjadi masalah jika regimen yang sama digunakan pada vaksinasi pertama dan booster, meskipun ini dapat dihindari dengan satu vektor pada vaksinasi pertama dan booster dengan vektor yang berbeda. Beberapa replikasi-tidak kompeten Kandidat vaksin vektor terhadap SARS-CoV-2 telah berkembang pesat dalam pengembangan klinis: hasil dari uji coba NHP dan / atau uji klinis di manusia telah dilaporkan untuk ChAdOx1 nCoV-19 (berdasarkan simpanse AdV), oleh Janssen (menggunakan vektor berbasis AdV26) dan oleh CanSino (AdV5). Selain itu, kandidat dari Gamaleya Research Institute (Ad5 / Ad26) sedang dalam uji klinis fase III dan satu lagi dari ReiThera (gorilla AdV) sedang dalam uji coba fase I (Krammer, 2020).

Vektor replikasi kompeten biasanya diturunkan dari vaksin virus yang dilemahkan atau strain vaksin dari virus yang telah direkayasa untuk mengekspresikan transgen, dalam hal ini adalah protein spike. Dalam beberapa kasus, virus hewan yang

tidak berkembang biak secara efisien dan tidak menyebabkan penyakit pada manusia dapat digunakan juga. Pendekatan ini dapat menghasilkan induksi kekebalan yang lebih kuat, karena vektor menyebar sampai batas tertentu pada individu yang divaksinasi dan sering juga memicu respon kekebalan bawaan yang kuat. Beberapa dari vektor ini juga dapat diberikan melalui permukaan mukosa, yang mungkin memicu respons imun mukosa (Krammer, 2020).

Saat ini, hanya dua vektor replikasi kompeten yang berada dalam fase I uji klinis: strain vaksin campak yang direkayasa yang dikembangkan oleh Institute Pasteur dan Themis (sekarang diakuisisi oleh Merck), dan berbasis vektor virus influenza yang sedang dikembangkan oleh Beijing Wantai Farmasi Biologi. Namun, beberapa lainnya, termasuk vektor berdasarkan virus stomatitis vesikuler (VSV), cacar kuda dan Virus Newcastle Disease (NDV) saat ini sedang dalam pengembangan. Vektor berbasis NDV menarik karena virus ini tumbuh hingga titer tinggi pada telur, dan vektor dapat diproduksi dengan menggunakan virus influenza. Berbeda dengan vektor campak dan VSV, mereka mungkin cukup aman untuk diberikan secara intranasal, yang diharapkan dapat menimbulkan sistem kekebalan mukosa (Krammer, 2020).



Gambar 2.5 Gambaran pengembangan vaksin terhadap SARS-CoV2 (Kaur & Gupta, 2020)

2.3 Ikan Zebra

2.3.1 Taksonomi dan Klasifikasi Ikan Zebra

Klasifikasi ikan Zebra menurut Eschmeyer (1997) adalah sebagai berikut ;

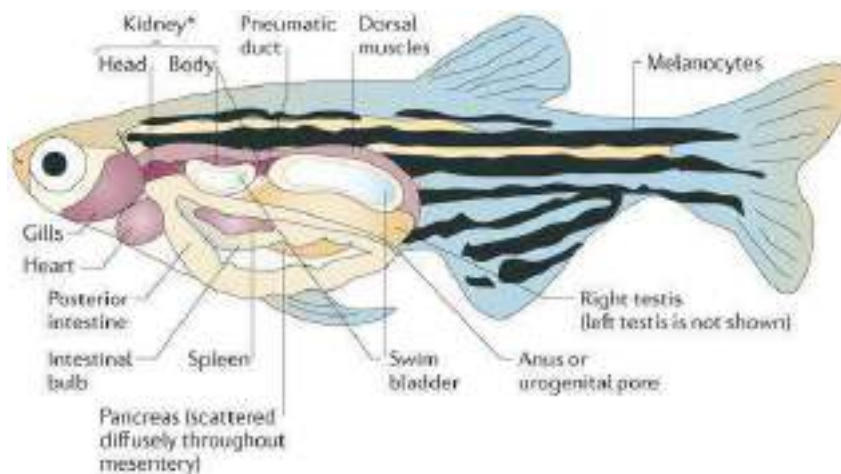
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Class	: Actynopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Family	: Cyprinidae
Genus	: Brachydanio
Spesies	: <i>Danio rerio</i>

2.3.2 Morfologi Ikan Zebra

Ikan Zebra merupakan ikan teleostei yang termasuk dalam keluarga cyprinid dan class actynopterygii. Nama ikan zebra digunakan berdasarkan ciri tubuhnya yang memiliki lima garis seragam pada tubuh yang meluas hingga ke sirip anal dan sirip ekor. Ikan zebra memiliki bentuk tubuh fusiform dan lateral dengan mulut pada bagian atas tubuh dengan dua pasang sungut yang berfungsi untuk mencari makanan pada dasar perairan. Garis-garis pada tubuh ikan zebra biasa berwarna hitam biru yang mengandung dua jenis sel pigmen berupa melanophores dan iridiophore sedangkan garis berwarna kuning keperakan mengandung sel pigmen xanthophores dan iridophore. Ikan zebra betina umumnya memiliki ukuran tubuh yang lebih besar

dibandingkan ikan zebra jantan dan warna yang lebih pudar. Ikan zebra termasuk ikan yang sangat gesit serta lincah dan tidak memiliki sifat predator (Axelrod, 1982).

Ikan zebra memiliki sirip dorsal atau sirip punggung 8-9, sirip anal atau sirip dubur 15-16, sirip pectoral atau sirip perut 12-13, memiliki 10 hingga 13 buah gill rakers pada gill arch, terdapat dua barbles yaitu *rostral barbles* dan *maxillary barbles*. Barbels ini dimiliki baik oleh ikan zebra jantan maupun betina dengan garis-garis yang sama (Apritasari, 2017)



Gambar 2.6 Morfologi Ikan Zebra Sumber : White *et al* (2013)

Ikan zebra memiliki sirip dorsal (sirip punggung) 8 – 9, sirip anal 15 – 16, sirip pectoral 12 – 13, memiliki 10 – 13 buah gill rakers pada gill arch. Sistem hemapoietik pada ikan zebra berbeda dengan sebagian besar mamalia, tulang ikan zebra tidak

memiliki *medullary cavity*. Jaringan hematopoetik berlokasi di stroma dari limpa dan interstitium ginjal. Sistem respirasi ikan zebra terdiri dari jaringan insang dan gas bladder. Organ penyusun sistem digesti antara lain mulut, faring, gigi, intestine. Insang mempunyai peran yang sangat penting yaitu sebagai alat pertukaran O₂ pada darah. Air yang masuk melalui mulut, melewati insang dan keluar melalui operculum. Air dapat mengalir dikarenakan kontraksi dari rongga mulut dan ruang operkular. Darah yang masuk melalui arteri *filament afferent* dari lamella primer menuju ke lamella sekunder, dimana CO₂ rilis ke air dan O₂ diambil. Darah yang mengandung oksigen keluar dari lamella sekunder melalui arteri lamella efferent kemudian masuk ke aorta dorsal dan diedarkan ke seluruh jaringan tubuh (Menke *et al.*, 2011).

Jantung dari ikan zebra terletak pada anterior rongga tubuh dan berada di ventral dari esophagus. Darah yang mengandung CO₂ masuk ke dalam atrium melalui katub sino-atrial. Atrium mempunyai dinding yang tebal, berotot, trabekula tebal. Kontraksi dari atrium dan dilatasi ventrikel menyebabkan darah masuk ke dalam ventrikel melalui atrioventricular valve. Darah dipompa dari ventrikel dengan tekanan yang tinggi (Apritasari, 2017).

Mulut dan rongga mulut merupakan gabungan dari system digestif maupun respirasi. Fungsi digestif dari mulut dan rongga mulut adalah untuk seleksi, melembutkan dan jalur masuk ke dalam intestine. Mulut dari ikan zebra mempunyai taste bud dan rongga mulutnya terdiri dari epitel mukoid yang tebal dan terdapat sel goblet. Intestine dari ikan zebra terdiri dari saluran yang panjang dan terlipat dua kali pada rongga perut. Intestine dibagian anterior berlumen lebar dan semakin mengecil

pada rostral-caudal. Tidak ada pembagian lambung, usus kecil dan usus besar dalam hal ini. Hepar dari ikan zebra terdiri dari tiga lobus dan terletak di sepanjang saluran digestif. Hepar ikan mempunyai fungsi yang sama dengan mamalia, yaitu sebagai homeostatis metabolisme tubuh, antara lain memproses karbohidrat, protein, lipid (Arpitasari, 2017).

2.3.3 Reproduksi Ikan Zebra

Betina dewasa akan menunjukkan papilla genital kecil di depan sirip dubur, reproduksi ikan zebra diawali dengan proses ikan betina melepaskan telurnya pada perairan terbuka yang kemudian akan dibuahi oleh ikan jantan, dan setelah terbuahi telur akan berada di dasar perairan di luar jangkauan induk jantan maupun betina. Pemijahan bisa berlangsung lima hari hingga beberapa minggu, telur ikan zebra memiliki diameter 0,05 hingga 1,37 mm dengan jumlah 300 hingga 500 butir dalam sekali siklus reproduksi (Axelrod, 1982).

Ikan zebra dapat tumbuh dengan panjang sampai 6,4 cm meskipun jarang tumbuh lebih besar dari 4 cm untuk pemeliharaan di dalam akuarium. Pada penangkaran usia ikan zebra dapat mencapai usia dua hingga tiga tahun dan dalam kondisi ideal bisa mencapai lima tahun (Lahay, 2017).

2.3.4 Habitat dan Kebiasaan Makan Ikan Zebra

Ikan Zebra berasal dari Myanmar, India, Srilangka dan sudah tersebar ke seluruh wilayah Asia Tenggara hingga Indonesia, ikan zebra menyukai daerah yang bersuhu

dingin dan dapat dipelihara pada suhu 25 °C - 28 °C dengan pH 6,5- 7 ppt. Ikan zebra membutuhkan adanya sinar matahari yang cukup dan adanya tanaman air (Lahay, 2017).

Ikan Zebra merupakan ikan omnivora yang memakan zooplankton, fitoplankton, serangga, larva serangga hingga cacing dan krustasea kecil yang menjadi sumber makanan bila sumber makanan utama tidak tersedia. Pakan alami larva pertama ikan zebra dapat berupa *artemia*, *rotifer*, untuk stadia dewasa dapat berupa cacing sutera dan cacing darah (Lahay, 2017).

2.3.5 Penelitian Virus dengan Menggunakan Ikan Zebra

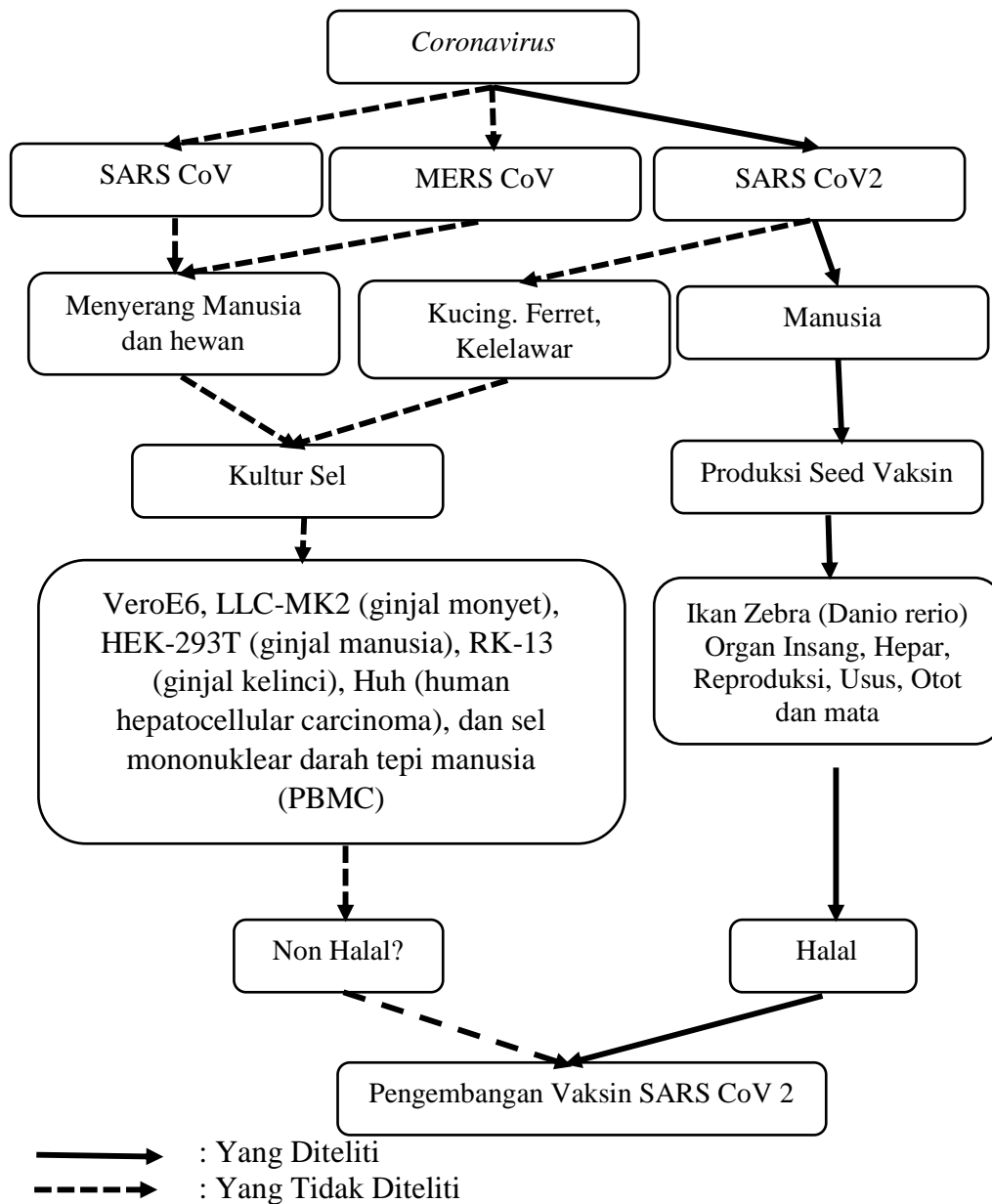
Penggunaan Ikan Zebra terkait dengan infeksi virus telah banyak dilakukan baik pada fase larva, dewasa dan juga pada kultur sel. Telah dihasilkan sel kultur primer dari bagian kepala dan badan ikan zebra (*Danio rerio*) yang dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada suhu 37 °C dengan kadar CO₂ sebesar 5%. Kondisi ini telah menghasilkan sel yang konfluen serta dapat dilakukan pasase untuk dilakukan inokulasi dengan menggunakan virus influenza H5N1 *reverse genetic* (Kusala, 2019). Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Nidom R.V pada 2016 dengan menggunakan virus influenza H5N1 *reverse genetic* dapat tumbuh dan berkembang dengan baik di dalam kultur sel *Madine Darby Canine Kidney* (MDCK) dan juga sel Vero yang diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kadar CO₂ sebesar 5% yang merupakan suhu optimum untuk perkembangan virus influenza (Nidom *et al.*,2016).

Hasil Penelitian ini menggambarkan bahwa virus influenza H5N1 *reverse genetic* telah berhasil tumbuh dan berkembang di dalam kultur sel primer ikan zebra pada sel bagian kepala dan juga sel bagian badan. Hal ini terlihat dari adanya gambaran *cytopathogenic effect (CPE)* pada kultur sel primer bagian kepala dan badan yang mengindikasikan bahwa virus tersebut dapat tumbuh dan bereplikasi di dalam kultur sel primer tersebut (Muhammad *et al*, 2020). Hasil ini sesuai dengan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Lahay (2017) pada ikan zebra, menunjukkan bahwa ikan zebra dapat terinfeksi virus Flu Burung H5N1 yang diinfeksi melalui perendaman atau *dipping*. Penelitian oleh (Nidom *et al.*, 2018) juga menyatakan bahwa infeksi ikan zebra dengan virus H5N1 *reverse genetic* telah dilakukan dan menunjukkan bahwa Virus H5N1 bisa menginfeksi ikan zebra pada hampir semua organ.

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Skema Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

3.2 Kerangka Konseptual

Coronavirus adalah kelompok virus yang dapat menginfeksi berbagai jenis hewan, dan virus ini dapat menyebabkan infeksi saluran pernapasan ringan hingga yang parah pada manusia. Pada tahun 2002 dan 2012, masing-masing, dua virus korona yang sangat patogen dan bersifat zoonosis, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV)* dan *Middle East Respiratory Coronavirus (MERS-CoV)*, muncul menginfeksi pada manusia dan menyebabkan penyakit pernafasan yang fatal. Hal ini menyebabkan virus korona muncul sebagai masalah kesehatan masyarakat yang baru di abad kedua puluh satu. Di akhir tahun 2019, sebuah *novel coronavirus* yang ditunjuk sebagai SARS-CoV-2 muncul di kota Wuhan, Cina, dan menyebabkan wabah virus penyebab pneumonia yang tidak biasa. Virus ini sangat mudah ditularkan, penyakit *coronavirus* ini, juga dikenal sebagai penyakit coronavirus 2019 (COVID-19) dan telah menyebar dengan cepat ke seluruh dunia (Wu *et al*, 2020).

SARS-CoV-2 menggunakan reseptor yang sama dengan SARS-CoV, *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)*. Selain ACE2 manusia (hACE2), SARS-CoV-2 juga mengenali ACE2 dari babi, musang, monyet rhesus, kucing, trenggiling, kelinci dan anjing (Zhao *et al*, 2020). Penggunaan reseptor yang luas pada SARS-CoV-2 menyiratkan bahwa virus ini mungkin memiliki jangkauan *host* yang luas, dan variasi efisiensi penggunaan ACE2 pada hewan yang berbeda dapat menunjukkan kerentanan yang berbeda terhadap infeksi SARS-CoV-2. Subunit S1 dari virus korona dibagi lagi menjadi dua domain fungsional, domain N-terminal dan domain C-terminal. Analisis struktural dan biokimia mengidentifikasi 211 daerah asam amino (asam amino 319-

529) di S1 Domain C-terminal SARS-CoV-2 sebagai RBD, yang memiliki peran kunci dalam masuknya virus dan merupakan target antibodi penetral (Walls *et al*, 2020)

Vaksinasi merupakan metode paling efektif untuk strategi jangka panjang pencegahan dan pengendalian COVID-19 di masa depan. Banyak platform vaksin yang berbeda untuk melawan SARS-CoV-2 yang saat ini sedang dalam pengembangan, antara lain vektor rekombinan, DNA, mRNA dalam nanopartikel lipid, virus yang tidak aktif, virus hidup yang dilemahkan dan subunit protein (Gao *et al*, 2020). Baru-baru ini, WHO (2020) menyiapkan dokumen tentang semua kandidat vaksin untuk uji klinis COVID-19, melaporkan 35 kandidat vaksin di evaluasi klinis dan sedikitnya 166 calon vaksin dalam pengujian praklinis dan klinis (Bianca *et al*, 2020).

Identifikasi terhadap virus SARS CoV, SARS-CoV-2, dan MERS-CoV, serta kebutuhan untuk mengkarakterisasi dan mengembangkan vaksin untuk melawan virus tersebut menuntut agar virus dapat beradaptasi dengan kultur sel sehingga didapatkan jumlah yang cukup dari virus infeksi untuk dapat dilakukan studi lebih lanjut. Virus corona sulit untuk diperbanyak dalam kultur sel dan virus korona manusia secara tradisional tumbuh dalam kultur organ dan sel manusia. HCoV-229E tumbuh dengan mudah dalam kultur primer atau sekunder dari embrio manusia atau sel line fibroblast, jauh lebih baik daripada HCoVOC43. Sel line yang paling sensitif untuk isolasi virus ini dari spesimen klinis yakni sel line usus diploid, MA-177 (Joseph & Fagbami 2020).

Studi tentang virus korona yang baru menunjukkan bahwa isolat klinis SARS-CoV direplikasi secara efisien dalam berbagai kultur sel seperti VeroE6 dan LLC-MK2 (ginjal monyet), HEK-293T (ginjal manusia), RK-13 (ginjal kelinci), Huh (human

hepatocellular carcinoma), dan sel mononuklear darah tepi manusia (PBMC). Demikian pula, MERS-CoV tumbuh pada kultur sel ginjal monyet dan sel line Huh, tetapi tidak tumbuh di berbagai jenis sel lainnya. Studi terbaru menunjukkan bahwa SARSCoV-2 dapat dikembangkan di sel yang sama untuk menumbuhkan SARS-CoV, dan sel kultur dari epitel saluran pernafasan manusia adalah yang paling sensitif untuk menumbuhkan virus (Peerlman, 2020).

Melihat fenomena yang ada saat ini, tentunya penelitian terkait SARS CoV2 masih sangat diperlukan. Dimana ketersediaan bahan yang ada sampai saat ini untuk kepentingan mengembangkan SARS-CoV-2 baik dalam keperluan riset maupun sebagai strategi pengembangan vaksin adalah berasal dari bahan-bahan yang sifatnya non halal jika di asumsikan untuk masuk ke dalam tubuh bagi umat Islam. Alternatif yang bisa digunakan salah satunya adalah dengan menggunakan bahan yang memiliki basis kehalalan bagi umat Islam yakni salah satunya dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*).

Ikan Zebra (*Danio rerio*) saat ini telah banyak digunakan sebagai model hewan coba yang menjanjikan untuk berbagai penyakit pada manusia, menguji efektifitas obat dan juga study yang berkaitan dengan terapi kanker. Ikan zebra bisa menjadi model alternatif baru untuk menguji kandidat vaksin praklinis untuk COVID-19, mencari strategi untuk menilai keamanan dan toksisitas untuk kandidat vaksin. Perbandingan antara susunan fungsional genom ikan zebra dan manusia memiliki kemiripan sebesar 70% kesamaan genetik dengan manusia (Howe *et al*, 2013).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar gen *Renin-Angiotensin-Aldosterone System* (RAAS) pada manusia memiliki satu atau lebih ortolog atau co-ortolog pada gen ikan zebra. Hasil menunjukkan jenis enterosit tertentu sebagai situs spesifik ekspresi ortolog komponen RAAS utama pada ikan zebra, termasuk ACE, ACE2, Slc6a19 (reseptor untuk SARS-CoV-2), dan pembelahan peptida terkait Angiotensin enzim Anpep (reseptor flu biasa coronavirus HCoV-229E), dan Dpp4 (reseptor untuk MERS-CoV). Hasil mengidentifikasi sub tipe sel vaskular tertentu mengekspresikan reseptor Ang II, apelin, dan gen reseptor apelin. Hasil ini mengidentifikasi gen dan tipe sel untuk mengeksploitasi ikan zebra sebagai hewan model untuk memahami mekanisme penyakit COVID-19 (Postlethwait *et al.*, 2020).

Ikan zebra telah digunakan sebagai model untuk mempelajari keamanan vaksin dan untuk menilai toksikologi yang mungkin berkorelasi dengan kesehatan manusia. Analisis docking menunjukkan bahwa ikan zebra memiliki IgM chain 4 (CH4) dengan kemiripan sebesar 43,3% dengan IgM CH4 pada manusia dan mungkin memiliki potensi yang mirip dalam mengenali protein S seperti antibodi pada manusia. Salah satu target protein Spike SARS-CoV-2 yang diketahui adalah reseptor *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2) pada manusia dianggap sebagai gerbang utama masuknya infeksi virus. Mempertimbangkan efek protein Spike pada ikan menggunakan analisis bioinformatik, menariknya, ikan zebra memiliki protein ACE2 yang memiliki kesamaan identitas urutan primer sebesar 58 dan 72% dengan ACE2 pada manusia (Bianca *et al.*, 2020).

ACE2 memiliki 22 residu yang menjadi bagian dari interaksi protein-protein dan kebanyakan dari mereka berada di wilayah N-terminal ACE2. 77% dari residu ACE2 manusia terketak serupa dalam urutan ACE2 pada ikan zebra yang menunjukkan bahwa ikan zebra juga dapat mengikat protein Spike SARS-CoV-2. Dimensi pohon struktur ACE2 ikan zebra berdasarkan model homologi menunjukkan kesamaan struktural yang tinggi dengan ACE2 pada manusia. Analisis komputasi dari interaksi protein-protein menggunakan ACE2 dan RBD dari SARS-CoV-2 Spike protein mengungkapkan nilai yang sama dari energi bebas pengikatan yang menunjukkan bahwa ikan zebra rentan terhadap infeksi virus (Bianca *et al*, 2022).

Analisis PCR kuantitatif real-time dari beberapa jaringan dari ikan zebra jantan dan ikan zebra betina dewasa menunjukkan bahwa ACE2 sebagian besar diekspresikan di otak dan otot pada kedua jenis kelamin. Meskipun tingkat yang lebih tinggi terlihat di ginjal pada ikan betina, banyaknya transkrip ACE2 di organ ini adalah cukup bervariasi dan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan jaringan lain. Analisis lebih lanjut membandingkan ekspresi relatif dari zebrafish ACE2 antara jantan dan betina untuk jaringan yang sama. Analisis ini mengungkapkan ekspresi ACE2 yang lebih tinggi pada jantan jika dibandingkan dengan betina untuk organ berikut: otak, gonad, jantung, otot, dan jaringan adiposa (tubuh gemuk) (Bianca *et al*, 2022).

Menariknya, ikan zebra yang disuntik dengan rSpike menghasilkan respon peradangan yang mirip dengan kasus COVID-19 yang parah pada manusia. Perubahan histologis dianalisis di hati sebagai infiltrasi lobular ringan oleh limfosit kecil, dilatasi

sinusoidal sentrilobular, nekrosis, steatosis mikrovesikular sedang, infiltrasi sel radang ringan di lobulus hati, dan saluran portal. Perubahan ini serupa dengan yang diamati pada pasien dengan COVID-19 (Tian *et al.*, 2020). Meskipun fungsi biokimia dari hati ikan zebra tidak diuji, peningkatan kadar ALT, AST, dan GGT tiga kali lipat telah dilaporkan selama rawat inap untuk manusia. Perubahan ini dapat dikaitkan dengan efek sitopatik langsung dari virus dan dapat dikaitkan dengan kematian yang lebih tinggi (Jothimani *et al.*, 2020).

Sehubungan dengan jaringan reproduksi, ikan zebra betina disuntik dengan rSpike menunjukkan kerusakan parah pada ovarium (atresia folikel, infiltrasi seluler, dan matriks ekstraseluler yang tidak teratur) setelah 7 hari inokulasi protein. Di sisi lain, hal yang luar biasa bahwa kerusakan ovarium tidak terjadi (kembali membaik) setelah 14 hari, ketika ikan zebra menerima suntikan kedua rSpike. Pada manusia, ada bukti bahwa ACE2 mRNA diekspresikan pada tingkat rendah, selama semua tahap pematangan folikel di ovarium, dan juga di endometrium. Pola ekspresi ACE2 ini, sejalan dengan pengamatan kami dan menunjukkan bahwa SARS-CoV-2 mempengaruhi kesuburan wanita pada manusia dan ikan zebra (Zupin *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian fakta diatas, oleh karena itu diperlukan pengembangan penelitian dengan menggunakan virus SARS-CoV-2 yang dikembangkan dengan menggunakan model hewan coba Ikan Zebra (*Danio rerio*) sebagai model proses formulasi vaksin yang berbasis vaksin halal.

BAB IV MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorium. Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap,

Tahap pertama melakukan koleksi sampel virus SARS-CoV-2. Spesimen yang mengandung Virus SARS-CoV-2, dari nasotracheal swab di Laboratorium Molekular Professor Nidom Foundation (LM-PNF). Spesimen yang diuji dengan realtime-PCR, untuk yang positif dilakukan pemurnian guna mendapatkan virus.

Tahap kedua, adalah melakukan pengujian virus SARS CoV2 dengan menggunakan model hewan coba. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*). Pada tahap ini dilakukan dengan menginfeksi virus SARS-CoV-2 pada hewan coba untuk melihat kemampuan virus dapat menginfeksi hewan coba dan berkembang biak di dalam tubuh hewan coba. Terdapat tiga jalur infeksi yang dilakukan dalam penelitian ini masing-masing jalur infeksi diberikan tiga perbedaan dosis infeksi. Penelitian ini bersifat eksperimental untuk mengetahui variabel tertentu terhadap suatu kelompok dalam kondisi yang terkontrol. Percobaan ini terdapat kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, dimana kelompok kontrol berperan sebagai pembanding hingga terjadi perubahan akibat berbagai eksperimen tersebut (Nasution, 2003). Media dan bahan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini dianggap seragam, yang membedakan hanya berbeda pada masing-masing perlakuan sebagai berikut :

- Perlakuan A1 : Jalur Infeksi dengan menebarkan virus langsung pada air (Tetes Air) sebanyak 0,1 mL
- Perlakuan A2 : Jalur Infeksi dengan menebarkan virus langsung pada air (Tetes Air) sebanyak 0,15 mL
- Perlakuan A3 : Jalur Infeksi dengan menebarkan virus langsung pada air (Tetes Air) sebanyak 0,2 mL
- Perlakuan B1 : Jalur Infeksi injeksi virus secara Intra Peritoneal dengan 0,3 μ L / ekor setelah dilakukan anastesi terlebih dahulu
- Perlakuan B2 : Jalur Infeksi injeksi virus secara Intra Peritoneal dengan 0,45 μ L / ekor setelah dilakukan anastesi terlebih dahulu
- Perlakuan B3 : Jalur Infeksi injeksi virus secara Intra Peritoneal dengan 0,6 μ L / ekor setelah dilakukan anastesi terlebih dahulu
- Perlakuan C1 : Jalur Infeksi dengan meneteskan virus sebanyak 0,6 μ L melalui insang ikan zebra setelah dilakukan anastesi terlebih dahulu
- Perlakuan C2 : Jalur Infeksi dengan meneteskan virus sebanyak 0,9 μ L melalui insang ikan zebra setelah dilakukan anastesi terlebih dahulu
- Perlakuan C3 : jalur Infeksi dengan meneteskan virus sebanyak 0,12 μ L melalui insang ikan zebra setelah dilakukan anastesi terlebih dahulu
- Kontrol A : Jalur Infeksi dengan menebarkan PBS langsung pada air (Tetes Air) sebanyak 0,2 mL
- Kontrol B : Jalur Infeksi injeksi PBS secara Intra Peritoneal dengan 0,6 μ L / ekor setelah dilakukan anastesi terlebih dahulu

Kontrol C : Jalur Infeksi dengan meneteskan PBS sebanyak 0,12 μ L melalui insang ikan zebra setelah dilakukan anestesi terlebih dahulu

Tabel 4.1 Perhitungan Titer Virus SARS-CoV-2

Perlakuan	Rute Pemberian	Titer Virus
A1	Tetes Air	$1,5 \times 10^4$ pfu/mL
A2	Tetes Air	$2,25 \times 10^4$ pfu/mL
A3	Tetes Air	3×10^4 pfu/mL
B1	Injeksi Intra Peritoneal	$4,5 \times 10^2$ pfu/mL
B2	Injeksi Intra Peritoneal	$6,75 \times 10^2$ pfu/mL
B3	Injeksi Intra Peritoneal	9×10^2 pfu/mL
C1	Tetes Insang	9×10^2 pfu/mL
C2	Tetes Insang	$13,5 \times 10^2$ pfu/mL
C3	Tetes Insang	18×10^2 pfu/mL

Pada penelitian ini virus yang digunakan adalah virus SARS-CoV-2 utuh dengan *type betacoronavirus clade GH* dari Laboratorium Molekular Professor Nidom Foundation (PNF) yang sudah terdaftar di GISAID dengan kode teregister: **hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211352/2021** dan *Accession ID* EPI_ISL_6425650, yaitu varian WUHAN. Dalam penelitian ini digunakan virus SARS-CoV-2 secara utuh (*wildtype*) mengingat penggunaan Virus SARS-CoV-2 secara utuh belum pernah dilakukan penelitian pada ikan zebra. Beberapa penelitian yang telah dilakukan adalah dengan menggunakan virus SARS-CoV-2 rekombinan. Valerio *et al* (2021) telah berhasil menginfeksi virus rekombinan SARS-CoV-2 protein N

pada larva ikan zebra dengan titer sebesar 8×10^4 pfu/mL melalui metode perendaman dan dengan titer sebesar $1,13 \times 10^8$ pfu/mL serta $1,6 \times 10^7$ pfu/mL melalui injeksi.

Tahap ketiga, adalah melakukan pengujian molekuler terhadap hasil infeksi virus pada hewan coba. Untuk menganalisis hasil pertumbuhan dan gambaran infeksi virus pada tubuh hewan coba. Pemeriksaan molekuler dilakukan dengan metode *Realtime PCR* sedangkan pemeriksaan gambaran infeksi dilihat berdasarkan gambaran Histopatologi dan gambaran secara Immunohistokimia.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Jalur infeksi pada ikan zebra dan Dosis Infeksi yang digunakan.

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah

- Hasil *Realtime PCR Cycles Treshold* (Nilai CT) yang diperoleh dari pertumbuhan virus SARS-CoV-2 pada tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
- Gambaran Histopatologi yang diperoleh dari gambaran pertumbuhan virus SARS-CoV-2 pada tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
- Gambaran Immunohistokimis yang diperoleh dari gambaran pertumbuhan virus SARS-CoV-2 pada tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).

4.2.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah Strain Virus SARS-CoV-2 yang digunakan dalam penelitian ini

4.2.4 Definisi Operasional Variabel

4.2.4.1 Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Ikan Zebra merupakan ikan teleostei yang termasuk dalam keluarga *cyprinid* dan Klas *actynopterygii*. Nama ikan zebra digunakan berdasarkan ciri tubuhnya yang memiliki lima garis seragam pada tubuh yang meluas hingga ke sirip anal dan sirip ekor (Axelrod, 1982). Ikan zebra yang digunakan rata-rata berukuran 3-5 cm stadia umur dewasa.

4.2.4.2 Hasil Realtime PCR *Cycles Tresshold* (Nilai CT)

Pengujian SARS-CoV-2 dengan menggunakan RT-qPCR di mana sinyal fluoresensi meningkat secara proporsional sesuai dengan jumlah asam nukleat yang digandakan, memungkinkan penghitungan RNA yang akurat pada sampel. Jika fluoresensi mencapai ambang yang ditentukan dalam jumlah tertentu dari siklus PCR (nilai Ct), sampelnya dianggap sebagai hasil yang positif. Nilai Ct berbanding terbalik dengan viral load dan setiap ~ 3,3 peningkatan nilai Ct mencerminkan pengurangan 10 kali lipat dalam bahan awal. Banyak pengujian qPCR melibatkan batas nilai Ct 40 untuk menganggap tes positif, hal ini memungkinkan untuk dapat deteksi lebih awal dengan jumlah molekul RNA yang sangat sedikit (Michael & Michael, 2020).

4.2.4.3 Gambaran Histopatologi

Histopatologi merupakan cabang dari ilmu patologi yang mempelajari perubahan pada suatu jaringan. Pemeriksaan histopatologi ditujukan untuk

mengetahui perubahan yang terjadi pada jaringan baik yang disebabkan mikroorganisme patogen, senyawa, maupun agen kimia/toksik. Sebagai salah satu metode diagnosa, pemeriksaan histopatologi mempunyai arti yang sangat penting untuk menentukan tindakan kuratif maupun preventif terhadap patogen tertentu. Selain itu, dalam dunia riset, perubahan histopatologi dapat memberikan jawaban tentang pengaruh atau dampak yang ditimbulkan dari suatu senyawa atau perlakuan suatu penelitian.

4.2.4.4 Gambaran Imunohistokimia

Imunohistokimia atau ihk adalah suatu metode untuk mendeteksi antigen tertentu dalam suatu sampel/jaringan (umumnya sampelnya berupa preparat/parafin section) dengan berprinsip pada pengikatan antibodi spesifik terhadap antigen yang akan diamati. Visualisasi interaksi antigen dengan antibodi dapat dicapai dalam beberapa cara. Contoh yang paling umum, sebuah antibodi yang terkonjugasi menggunakan enzim, seperti peroksidase (HRP) yang dapat mengkatalisis reaksi sehingga dapat memproduksi warna. Atau, antibodi dapat ditandai juga menggunakan fluorophore, seperti fluorescein atau rhodamine.

Jika antibodi terlabel menggunakan HRP maka pewarna yang umum digunakan adalah DAB sehingga terbentuk reaksi perubahan warna menjadi coklat.

Jika antibodi terlabel menggunakan fluorophore:

rhodamin → berwarna merah

fluorescein → berwarna hijau

4.2.4.5 Virus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 masuk dalam golongan famili *Coronaviridae* dan ordo *Nidovirales*. *Coronaviridae* terdiri dari dua subfamili yaitu, *Coronavirinae* dan *Torovirinae* dan anggota subfamili *Coronavirinae*. dibagi lagi menjadi empat genera: (a) *Alphacoronavirus* termasuk *human coronavirus (HCoV) -229E* dan *HCoV-NL63*; (b) *Betacoronavirus* termasuk *HCoV-OC43*, *Severe Acute Respiratoru Syndriome Human Coronavirus (SARS-HCoV)*, *HCoV-HKU1*, dan *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)*; (c) *Gammacoronavirus* termasuk virus ikan paus dan burung dan; (d) *Deltacoronavirus* termasuk virus yang diisolasi dari babi dan burung. SARS-CoV-2 tergolong dalam *Betacoronavirus* bersama dengan dua virus yang memiliki tingkat patogenitas tinggi yakni, SARS-CoV dan MERS-CoV. SARS-CoV-2 adalah virus RNA untai tunggal sense positif (+ ssRNA) dan memiliki kapsul (Harapan *et al*, 2020).

Virus yang digunakan adalah stok virus SARS CoV2 dengan *type betacoronavirus clade GH* dari Laboratorium Professor Nidom Foundation (PNF) yang sudah terdaftar di GISAID dengan nama isolate hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211352/2021 dan *Accession ID EPI_ISL_6425650* (Varian Wuhan). Titer isolat virus yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1×10^5 pfu/ml.

4.3 Materi Penelitian

4.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Virus SARS CoV2 yang diperoleh dari stok **Laboratorium Molekuler Professor Nidom Foundation**

(LM-PNF) terdaftar pada GISAID dengan *type betacoronavirus clade GH hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211352/2021* dan *Accession ID EPI_ISL_6425650* (Varian Wuhan), ikan zebra (*Danio rerio*), Hi-Di™ Formamide AB System cat.no. 4311320, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) gibco Lot 990436, *Aquadest*, *Buffer AVL* (*lysis buffer*), MgSO₄, *primer forward*, *primer reverse*, enzyme *RT Taq Polymerase* Invitrogen cat.no. GI 18080-044, DDW (*Distilated water*, Crystal Violet weldeck GmbH Lot 382419, larutan Diva, universal link, trekavidin HRP label, DAB, Alkohol 80 %, Antibodi SARS CoV2, *ice pack*, *DO test kit*, *amoniak test kit*, *nitrat test kit*, *nitrit test kit*, *Aqua pro injection*, *Phosphate Buffer Formalin* (PBF), SARS-CoV-2 Spike1 antibody GT263 monoklonal Cat.No GTX635708.

4.3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium dengan ukuran 20 x 30 cm, plastik klip, pot organ, timbangan digital, thermometer digital, *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase®, Tiongkok), mikropipet 1000 µl, 200 µl, dan 50 µl, pipet 5 ml dan 10 ml, pipettor, konikal 15 ml, konikal 50 ml, *ependof* 1,5 µl, *screw tube*, *centrifuge* (myFuge™), *microcentrifuge* (Thermo Fisher Scientific, Amerika), *blue tip*, *yellow tip yellow*, *white tip* (Tarsons Product Pvt. Ltd., India), *inverted microscope* (Olympus CKX 31, CKX 41), kaca pembesar, alat bedah minor, *water bath*, *microcentrifuge tube*, *QIAmp mini spin column*, *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems™, Amerika), pH Paper, Ph Pen, 3130 xL Applied Biosystems® Genetic Analyzers (Applied Biosystems™, Amerika), *microwave* (*decloaking chamber*), hot plate, oven 60°C, aerator, selang oksigen, batu aerator, mikrotom,

gelas , obyek dan *cover glass, slide holder*, mikroskop cahaya *vortex (Vortex-Genie™ 2)*, Kulkas (Modena), Timbangan (Krisbow KW 0600376), *Tissue Rupture*.

4.4. Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di *Laboratorium Molecular Professor Nidom Foundation (LM - PNF)* dan *Animal Laboratorium Biosafety Level 3 (ABSL-3) Professor Nidom Foundation (PNF)*.

4.4.2 Waktu Penelitian

Waktu Penelitian dimulai dari bulan Januari 2021 – April 2022

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Persiapan Akuarium

Akuarium yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dengan dicuci menggunakan sabun sampai bersih kemudian, diautoclave dan dikeringkan di dalam inkubator. Setelah kering akuarium selanjutnya akuarium diisi dengan air steril dan diberi selang serta batu aerasi yang telah dicuci dan diautoclave.

4.5.2 Persiapan Sampel Ikan

Ikan zebra yang digunakan rata-rata berukuran 3-5 cm umur dewasa. Ikan yang diperoleh adalah ikan yang terbebas dari segala penyakit baik parasit bakteri

jamur maupun virus dengan ciri morfologi yang sehat ikan kemudian dikemas dan dibawa ke labotarium. Setelah itu ikan diaklimatisasi ke akuarium selama 5 hari. Melakukan pengelompokkan ikan dengan menimbang ikan yang akan digunakan dengan berat antara 0,3-0,7 gram ke dalam wadah yang telah disiapkan. Masing – masing wadah berisikan 15 ekor ikan. Pengelompokkan ikan didasarkan pada rute infeksi yang akan dilakukan yaitu Tetes Air, Tetes Insang dan Injeksi Intraperitoneal, dimana masing-masing rute infeksi memiliki 3 perbedaan dosis infeksi.

4.5.3 Preparasi Stok Virus SARS-CoV-2

Virus SARS-CoV-2 yang digunakan dalam penelitian ini adalah virus yang diperoleh dari stok virus *Laboratorium Molecular Professor Nidom Foundation* (LM - PNF).

4.5.4 Perlakuan Infeksi Virus SARS-CoV-2 pada Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Melakukan pengenceran sampel virus SARS-CoV-2 yang akan digunakan. Stok virus diencerkan 10x sebelum digunakan untuk diinfeksi kepada ikan. Hal ini merujuk pada penelitian sebelumnya telah melakukan inokulasi intraperitoneal (IP) dari larutan yang mengandung 1 µg rSpike murni yang diencerkan dalam 10 µL buffer inokulasi (7 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, dan 1 mM EDTA) (Bianca *et al.*, 2022). Pengenceran stok virus dalam penelitian ini dengan menggunakan larutan *Phospate Buffer Saline (PBS)*. Setelah semua peralatan yang diperlukan telah siap, maka langkah selanjutnya adalah melakukan Anastesi (pada

kelompok injeksi dan tetes insang) terhadap ikan zebra dewasa dengan memasukkan ke dalam air es. Setelah ikan pingsan, kemudian dilakukan Injeksi Intra peritoneal dan tetes insang. Injeksi dilakukan dengan menggunakan spuit insulin 0,05 ml sedangkan tetes insang dilakukan dengan menggunakan pipet serta white tip ukuran 1-10 μ l. Kelompok dengan rute infeksi tetes air tidak dilakukan pemingsanan. Infeksi tetes air dilakukan dengan menggunakan pipet dan yellow tipe ukuran 10-200 μ l. Setelah dilakukan infeksi, maka segera kembalikan ikan ke dalam wadah akuarium yang telah disiapkan untuk masing-masing perlakuan dan diberi oksigen dengan aerator.

4.5.5. Pengambilan dan Preparasi Sampel Organ Ikan Zebra

Koleksi sampel ikan zebra dilakukan pada 24 jam, 3, 7, 9 dan 14 hari setelah infeksi. Ikan zebra yang telah diinfeksi oleh virus, dikoleksi dalam konikal 15 ml dan dicuci dengan PBS dengan vortex sebanyak 2x pengulangan untuk mengurangi kontaminan dari lingkungan yang ada. Sampel ikan yang telah dicuci digerus/dihancurkan dengan menggunakan *tissue raptor* dengan tambahan PBS dengan perbandingan 1gram ikan : 5ml PBS hingga halus menjadi suspensi yang tercampur dengan PBS. Setelah digerus sampel ikan di*sentrifuge* dengan kecepatan 3.000 rpm, suhu 4°C selama lima menit. Hasil *sentrifuge* berupa supernatan dipindahkan ke dalam *eppendof*.

4.5.6 Ekstraksi RNA

Sampel ikan yang telah digerus dan juga sampel air yang dikoleksi pada 24 jam, 3 hari, 7 hari, 9 hari, dan 14 hari setelah infeksi selanjutnya dilakukan ekstraksi

RNA. Ekstaksi RNA dilakukan dengan cara mengambil 560 μL *Buffer AVL (lysis buffer)* yang telah disiapkan sebelumnya mengandung *carrier RNA*, masukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1 mL dan 5 mL. Tambahkan 140 μL sampel cairan supernatan sel lalu diletakkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL. Vortex selama 15 detik dan kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Tambahkan 560 μL *ethanol* (96-100%) pada *tube* sampel. Vortex selama 15 detik. Ambil 630 μL sampel masukan ke dalam *QIAamp mini spin column* kemudian sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Setelah *QIAamp mini spin column* dibuka dengan hati-hati, kemudian cairan pada tabung penampung dibuang. Mengulangi langkah memasukkan 630 μL sampel masukkan ke dalam *QIAamp mini spin column* sampai semua larutan dalam *tube* sampel terambil semua dan sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Menambahkan 500 μL *Buffer AW 1 (Wash buffer 1)*, lalu sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. dan menambahkan 500 μL *AW 2 (Wash buffer 2)*, lalu sentrifus dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit suhu 20°C. Setelah dibuang cairan pada tabung penampung, dan sentrifus kembali 14000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Meletakkan *QIAamp mini spin column* pada tabung *ependorf* 1,5 mL dan menambahkan 30 μL *Buffer AVE* kemudian sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Memeriksa jika sudah ada cairan pada tabung *ependorf* penampung menunjukkan bahwa ekstrak RNA sudah tertampung. Melabel sesuai dengan nama sampe untuk kemudian dapat dilanjutkan dengan uji PCR (Qiagen, 2011).

4.5.7 Real Time PCR (RT-PCR)

RNA yang telah didapatkan ditambahkan *master mix* dalam *ependof* yang baru yaitu 2xrf buffer sebanyak 12,5µL, 2x enzyme 1µL, primer F 1µL, primer R 1µl, probe 1µL, *distillated water* 3,5µl, dan *template* yang berupa sampel ikan sebanyak 5µl. Sampel RNA yang telah ditambahkan *master mix* dispindown untuk menurunkan cairan yang tertempel di dinding *ependof*. Sampel RNA yang telah tercampur *master mix* dimasukkan ke dalam plate RT-PCR, dimana pada baris pertama well diberikan kontrol standar berupa sampel yang positif sesuai dengan tujuan target virus dan kontrol negatif. Plate yang telah terisi dimasukkan ke dalam instrument mesin RT-PCR, pada tab instrument diberi label sesuai pekerjaan dan pilih menu “*start run*” untuk memulai proses RT-PCR. Mesin RT-PCR akan berjalan selama dua jam dalam membaca sampel yang diujikan yang mana akan didapatkan hasil berupa nilai CT dan kuantifikasi sampel uji yang akan dibandingkan dengan sampel kontrol positif.

4.5.8 Histopatologi Organ Ikan Zebra

Spesimen organ dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm dengan ketebalan 2-3 mm dan diletakkan dalam *cassette*. Organ yang telah dipotong direndam dalam larutan fiksasi BNF 10% minimal 24 jam, untuk mencegah terjadinya perubahan *post mortem*, mengeraskan jaringan agar mudah dipotong, membunuh kuman serta penyakit, meningkatkan perbedaan indeks refraksi komponen jaringan dan meningkatkan afinitas protoplasma terhadap bahan pewarna tertentu (Nurani, 2015) Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi, yaitu proses untuk menarik air

dari jaringan dengan merendam organ hasil fiksasi ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat, yaitu mulai dari alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95% dan alkohol absolut 100%. (Humason 1967), perendaman dalam masing-masing konsentrasi alkohol dilakukan selama dua jam. Pada perendaman alkohol 95% dan alkohol absolute 100% dilakukan dengan menggunakan dua beaker *glass* dengan tujuan untuk menarik air dalam jaringan dan diganti dengan alkohol.

Tahap selanjutnya adalah *clearing* (Penjernihan), yaitu proses yang dilakukan dengan cara merendam organ hasil dehidrasi pada larutan penjernih. Larutan yang biasa digunakan sebagai *clearing agent* adalah larutan xylol yang berfungsi membuat jaringan menjadi transparan Setelah dilakukan proses *clearing* dilanjutkan dengan proses *Embedding* yang merupakan proses pengisian paraffin ke dalam jaringan, yang dilakukan dengan memasukan potongan jaringan dan paraffin ke dalam oven untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong setipis mungkin untuk kemudian dilakukan pencetakan menggunakan suatu atau *tissue cassette* dengan sisi jaringan yang hendak dipotong menghadap ke bagian bawah, menuangkan paraffin cair dalam cetakkan dan dibiarkan hingga paraffin mengeras dan menjadi blok paraffin dari jaringan. Setelah paraffin menjadi blok, maka selanjutnya spesimen dipotong dengan ketebalan 3-10 μ M menggunakan rotary mikrotom. Potongan diletakkan di atas pengangas air dengan suhu 37 °C untuk menghindari terjadinya artefak lipatan pada specimen dan mencairkan paraffin yang terpotong bersama jaringan.

Tahap selanjutnya adalah tahap pewarnaan (*staining*) bertujuan untuk meningkatkan kontras yang sudah ada dan menonjolkan sel maupun komponen jaringan dan bahan ekstrinsik yang hendak diteliti atau diamati. Pewarnaan diawali dengan menghilangkan sisa paraffin dengan menggunakan larutan xylol I dan xylol II yang dilakukan masing-masing selama dua menit dilanjutkan dengan hidrasi alkohol absolute 100% dua menit, alkohol 95% dan alkohol 80% masing-masing selama satu menit. Preparat yang selesai di hidrasi dicuci dengan menggunakan air keran yang mengalir selama satu menit dan dimasukkan ke dalam larutan pewarna Mayer's Haematoxyllin selama 10 menit, dicuci kembali dengan air keran selama 30 detik, dimasukkan ke dalam larutan lithium karbonat selama 15 hingga 30 detik dan dicuci kembali dengan air kran selama dua menit. Preparat yang sudah dicuci dimasukkan ke dalam larutan pewarnaan eosin selama dua hingga tiga menit, dicuci dalam air selama 30 hingga 60 detik, preparat yang telah diwarnai kemudian dimasukkan ke dalam larutan alkohol 95 % dan alkohol absolute I sebanyak 10 kali celupan dan alkohol absolute II selama dua menit. Kelebihan zat warna pada proses pewarnaan dapat dibersihkan dengan air atau alkohol kemudian diberi Canada *balsam* secukupnya dan ditutup dengan *cover glass* untuk kemudian diamati di bawah mikroskop.

4.5.9 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Pembuatan preparat imunohistokimia ikan zebra dengan cara dibuat preparat secara utuh. Ikan difikasi dengan PBF 10% selama 24 jam, untuk mencegah terjadinya perubahan *post mortem*, memfiksasi jaringan dan mencegah kontaminasi

bakteri. Selanjutnya dilakukan proses *embedding* dengan paraffin, kemudian dipotong dengan menggunakan mikrotom setebal 4 μm dan dimasukkan ke dalam *waterbath* 55°C. Potongan jaringan yang mengapung di dalam *waterbath* diambil dengan gelas obyek dan dikeringkan pada *hot plate* suhu 40°C selama *overnight*.

Proses selanjutnya adalah deparafinisasi dan rehidrasi. Slide diletakkan pada *slide holder*. Slide kemudian di rendam dalam larutan xylol tiga kali masing – masing lima menit, alkohol bertahap (96%, 80% dan 70%) masing – masing empat menit kemudian dicuci dengan air (direndam) selama lima menit. Untuk proses pembuatan preparat histopat dilanjutkan dengan rehidrasi dan pewarnaan menggunakan haematoxilin eosin. Langkah selanjutnya adalah *blocking endogen peroksidase* dengan cara slide ditetesi dengan H₂O₂ 3% selama 30 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama lima menit. Proses selanjutnya dari imunohistokimia adalah dengan *antigen retrieval*. *Antigen retrieval* menggunakan *decloaking chamber* dengan cara slide diletakkan pada *staining box* yang berisi larutan Diva dengan suhu 80°C selama 30 menit. langkah selanjutnya adalah bloking protein non spesifik dengan *Normal Horse Serum* 5% selama 30 menit, kemudian di tetesi dengan antibodi primer anti SARS CoV2 dengan pengenceran 1 : 100. *Universal link* ditetaskan dan diinkubasi selama 30 menit. *Treakvidin HRP Label* diberikan setelah dicuci dengan PBS selama 30 menit, selanjutnya diberikan DAB substrat pada slide dan di inkubasi 2 – 5 menit. Pencucian perlu dilakukan sebelum diberikan counterstain (*Meyer Haematoxylin*). Proses selanjutnya adalah dehidrasi, clearing dan mounting

4.5.10 Pembacaan Preparat Histopatologi

Histopatologi dilakukan untuk meneguhkan gambaran infeksi virus SARS-CoV-2 pada ikan zebra dengan mengetahui kerusakan pada jaringan ikan dan juga mengetahui target organ virus SARS-CoV-2 pada ikan zebra. Dilakukan pengamatan preparat histopat dengan menggunakan Mikroskop perbesaran 200-400x untuk melihat apakah ada perubahan gambaran organ akibat adanya infeksi seperti peradangan, perbesaran organ (proliferasi), terjadinya degenerasi, kongesti yang dijabarkan secara deskriptif.

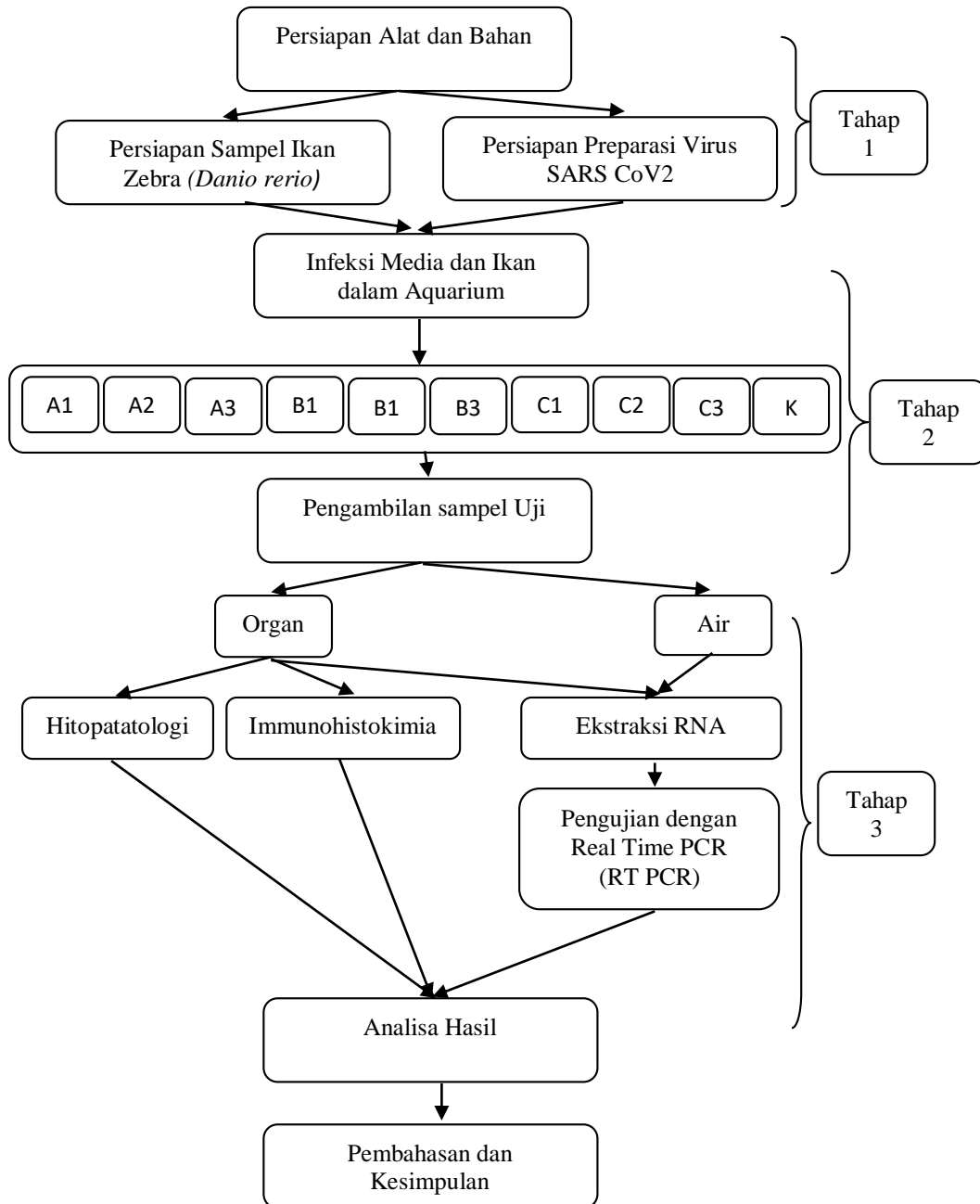
4.5.11 Pembacaan Preparat Imunohistokimia

Pewarnaan jaringan ikan dengan metode imunohistokimia digunakan untuk mendeteksi adanya protein Virus SARS-CoV-2 yang tersebar di seluruh jaringan maupun organ ikan zebra. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi monoklonal SARS-CoV2 *Spike1 antibody* (subtipe spesifik). Pewarnaan imunohistokimia menggunakan pelabelan antibodi biasanya ditemukan pada sitoplasma atau membran sel. Jaringan yang positif ditandai dengan perubahan warna pada jaringan yaitu berwarna kecoklatan

4.6 Analisa Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini, hasil infeksi virus SARS-CoV-2 pada Ikan Zebra (*Danio rerio*) akan dibandingkan dengan kontrol yang disajikan dalam bentuk deskriptif, grafik, dan tabel.

4.7 Kerangka Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema kerangka alur penelitian

BAB V HASIL PENELITIAN

5.1 Isolat Virus SARS-CoV 2

Virus yang digunakan adalah stok virus SARS CoV2 dengan *type betacoronavirus clade GH* dari Laboratorium Professor Nidom Foundation (PNF) yang sudah terdaftar di GISAID dengan nama isolate hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211352/2021 dan *Accession ID* EPI_ISL_6425650 (Varian Wuhan). Titer isolat virus yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1×10^5 pfu/mL.



Virus name	Passage desc	Accession ID	Collection date	Submission date	Length	Host	Location	Originating lab
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211352/2021	Original	EPI_ISL_12770838	2021-01-13	2022-05-18	30,773	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211352/2021	Original	EPI_ISL_3425650	2021-02-18	2021-11-18	29,705	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211352/2021	Original	EPI_ISL_3425658	2021-02-18	2021-11-18	29,705	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211373/2021	Original	EPI_ISL_3425645	2021-06-30	2021-11-18	29,701	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-211374/2021	Original	EPI_ISL_3425643	2021-09-30	2021-11-18	29,701	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-214354/2021	Original	EPI_ISL_3425638	2021-07-21	2021-11-18	29,701	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-218138/2021	Original	EPI_ISL_12770826	2021-08-02	2022-05-18	29,705	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-218175/2021	Original	EPI_ISL_12770815	2021-08-02	2022-05-18	29,700	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom
hCoV-19/Indonesia/JI-PNF-217145/2021	Original	EPI_ISL_12777388	2021-08-15	2022-05-18	29,706	Human	Asia/Indonesia	Professor Nidom

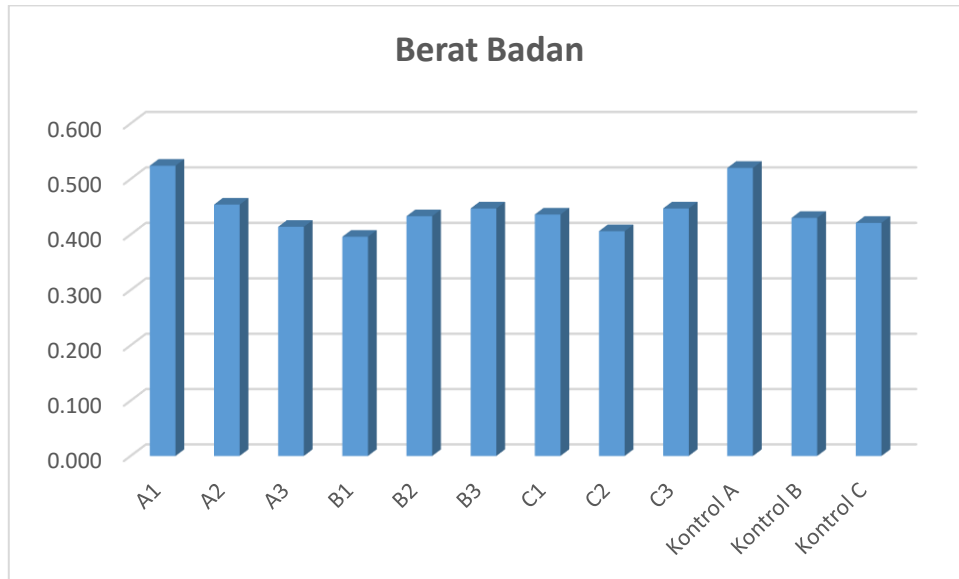
Gambar 5.1 Isolat SARS-CoV-2 milik Laboratorium Professor Nidom Foundation (PNF) (GISAID, 2022)

5.2 Penggunaan Ikan Zebra

Ikan Zebra yang digunakan adalah ikan zebra stadium dewasa berukuran 3-5 cm. Sebelum penelitian dilakukan penimbangan berat badan dan pengelompokan ikan zebra berdasarkan perlakuan yang akan diberikan. Pada penelitian ini kelompok A adalah kelompok ikan zebra yang akan diberikan perlakuan infeksi virus SARS CoV2 dengan cara melakukan tetesan langsung isolat virus pada air akuarium pada masing-masing kelompok dengan tiga dosis yang berbeda (A1, A2 dan A3). Tabel berat badan Ikan Zebra Kelompok A dapat dilihat pada Lampiran 1.

Pada penelitian ini kelompok B adalah kelompok ikan zebra yang akan diberikan perlakuan infeksi virus SARS CoV2 dengan cara melakukan injeksi isolat virus secara *Intraperitoneal* pada masing-masing ikan dengan tiga dosis injeksi yang berbeda (B1, B2 dan B3). Tabel Berat badan Ikan Zebra Kelompok B dapat dilihat pada Lampiran 2.

Pada penelitian ini kelompok C adalah kelompok ikan zebra yang akan diberikan perlakuan infeksi virus SARS CoV2 dengan cara meneteskan isolat virus pada insang masing-masing ikan dengan tiga dosis injeksi yang berbeda (C1, C2 dan C3). Tabel Berat badan Ikan Zebra Kelompok B dapat dilihat pada Lampiran 3.



Gambar 5.2 Diagram Rata-rata berat badan Ikan Zebra yang digunakan

Dari hasil penimbangan berat badan ikan zebra yang digunakan dalam penelitian ini rata-rata setiap kelompok memiliki berat antara 0,3-0,6 gram dapat dilihat pada Gambar 5.2 dan ikan zebra yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5.3.



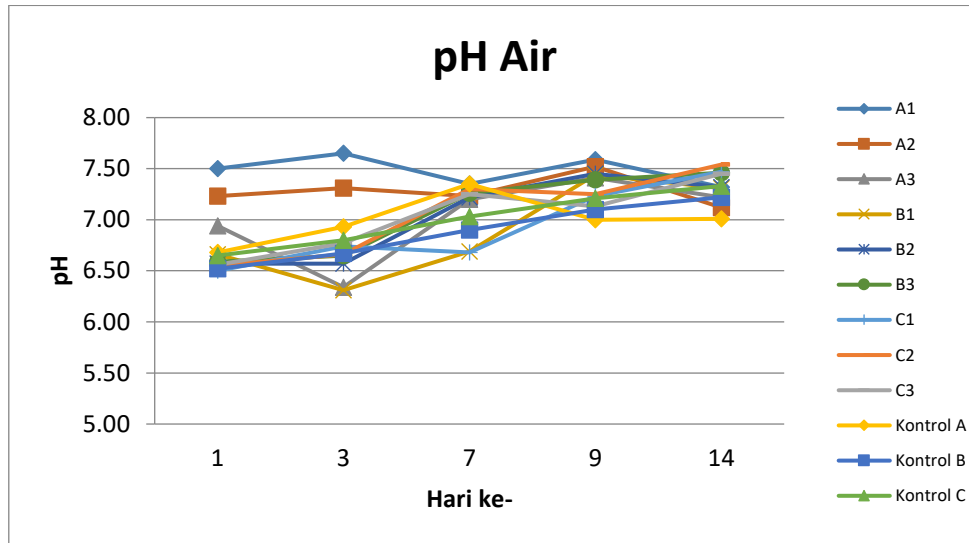
Gambar 5.3 Ikan Zebra yang digunakan dalam penelitian ini

5.3 Pengukuran Kualitas Air Akuarium

5.3.1 Pengukuran pH Air Akuarium

Pengukuran pH air akuarium dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui besaran pH lingkungan Air yang digunakan sebagai tempat hidup ikan zebra selama dalam masa penelitian dan dalam lingkungan fasilitas penelitian *Animal Biosafety Level-3*. Pengambilan sampel Air akuarium masing-masing kelompok perlakuan dilakukan secara periodik yaitu pada hari ke-1,3,7,9 dan hari ke-14 setelah dimulainya perlakuan pada kelompok hewan coba. Pengukuran pH air dilakukan dengan menggunakan alat pH Pen.

Pengukuran nilai pH air akuarium ikan zebra menunjukkan nilai berkisar 6 dan 7 yakni seperti yang tampak pada Gambar 5.4, menunjukkan bahwa pH air akuarium selama masa penelitian berada pada pH yang normal dan baik digunakan untuk lingkungan hidup Ikan Zebra. Tabel Hasil Pengukuran pH Air Akuarium dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 4.

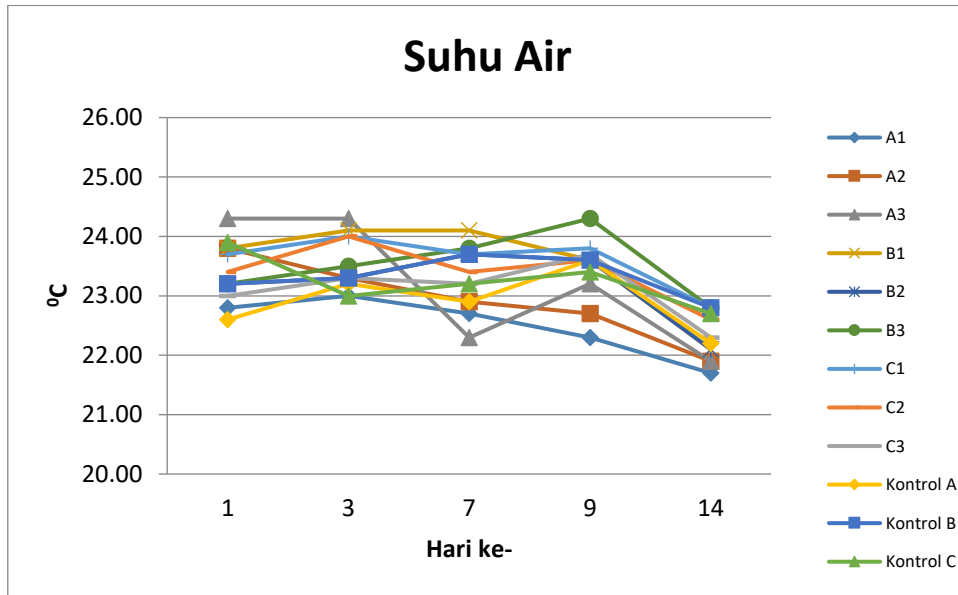


Gambar 5.4 Diagram pH Air Akuarium

5.3.2 Pengukuran suhu Air Akuarium

Pengukuran suhu air akuarium dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui besaran pH lingkungan Air yang digunakan sebagai tempat hidup ikan zebra selama dalam masa penelitian dan dalam lingkungan fasilitas penelitian *Animal Biosafety Level-3*. Pengambilan sampel Air akuarium masing-masing kelompok perlakuan dilakukan secara periodik yaitu pada hari ke-1,3,7,9 dan hari ke-14 setelah dimulainya perlakuan pada kelompok hewan coba. Pengukuran suhu air dilakukan dengan menggunakan alat thermometer air digital. Tabel hasil pengukuran suhu air akuarium dapat dilihat pada Lampiran 5.

Pengukuran suhu Air Akuarium ikan zebra pada masing-masing kelompok perlakuan dalam masa penelitian berkisar antara 22 °C dan 24 °C seperti yang tampak pada Gambar 5.5. Nilai suhu ini merupakan nilai suhu yang optimal dan baik digunakan dalam pemeliharaan ikan zebra.



Gambar 5.5 Diagram Suhu Air Akuarium (°C)

5.3.3 Pengukuran Kadar Oksigen Terlarut (DO) dalam Air Akuarium

Pengukuran kadar oksigen terlarut dalam air akuarium dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan oksigen dalam lingkungan Air yang digunakan sebagai tempat hidup ikan zebra selama dalam masa penelitian dan dalam lingkungan fasilitas penelitian *Animal Biosafety Level-3*. Pengambilan sampel Air dilakukan secara periodik yaitu pada hari ke-7 dan hari ke-14 setelah dimulainya perlakuan pada kelompok hewan coba. Pengukuran kadar oksigen terlarut dalam air dilakukan dengan menggunakan *DO test kit*. Hasil pengukuran pada sampel air kelompok A, B, C dan Kontrol menunjukkan nilai yang sama yakni antara 5 sampai dengan 8 ppm. Tabel hasil pengukuran kadar oksigen terlarut dalam air dalam satuan ppm (*parts per million*) dapat dilihat pada Lampiran 6.

5.3.4 Pengukuran Kadar Nitrat (NO₃) dalam Air Akuarium

Pengukuran kadar Nitrat (NO₃) dalam air akuarium dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan Nitrat (NO₃) dalam lingkungan Air yang digunakan sebagai tempat hidup ikan zebra selama dalam masa penelitian dan dalam lingkungan fasilitas penelitian *Animal Biosafety Level-3*. Pengambilan sampel Air dilakukan secara periodik yaitu pada hari ke 7 dan 14 setelah dimulainya perlakuan pada kelompok hewan coba. Pengukuran kadar Nitrat (NO₃) dalam air dilakukan dengan menggunakan Nitrat (NO₃) *test kit*. Tabel hasil pengukuran kadar Nitrat (NO₃) dalam air dalam satuan mg/L yang dilakukan dapat dilihat pada Lampiran 7.

Kadar kadar Nitrat (NO₃) dalam air akuarium harus dijaga dalam nilai yang serendah mungkin. Dari hasil pengukuran sampel air dari setiap perlakuan perbedaan jalur infeksi didapatkan hasil pada hari ke-7 kadar nitrat menunjukkan angka nol mg/l, sedangkan pada hari ke 14 untuk kelompok kontrol menunjukkan angka nol mg/l dan untuk kelompok perlakuan A, B, dan C menunjukkan adanya peningkatan yaitu pada skala 0-12,5 mg/L

5.3.5 Pengukuran Kadar Nitrit (NO₂) dalam Air Akuarium

Pengukuran kadar Nitrit (NO₂) dalam air akuarium dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan Nitrit (NO₂) dalam lingkungan air yang digunakan sebagai tempat hidup ikan zebra selama dalam masa penelitian dan dalam lingkungan fasilitas penelitian *Animal Biosafety Level-3*. Tabel hasil pengukuran kadar Nitrit (NO₂) dalam air yang dilakukan dapat dilihat pada Lampiran 8.

Pengambilan sampel Air dilakukan secara periodik yaitu pada hari ke-7 dan -14 setelah dimulainya perlakuan pada kelompok hewan coba. Pengukuran kadar Nitrit (NO_2) dalam air dilakukan dengan menggunakan *test kit* Nitrit (NO_2). Hasil pengukuran pada hari ke-7 dan ke -14 dari perlakuan A, B, C dan Kontrol menunjukkan nilai kurang dari 3 ppm (mg/L).

5.3.6 Pengukuran Total Amonia Nitrogen (TAN) NH_3 dan NH_4 dalam Air Akuarium

Pengukuran kadar Total Amonia Nitrogen (TAN) NH_3 dan NH_4 dalam air akuarium dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan TAN dalam lingkungan Air yang digunakan sebagai tempat hidup ikan zebra selama dalam masa penelitian dan dalam lingkungan fasilitas penelitian *Animal Biosafety Level-3*. Pengambilan sampel Air dilakukan secara periodik yaitu pada hari ke 7 dan 14 setelah dimulainya perlakuan pada kelompok hewan coba. Pengukuran kadar Total Amonia Nitrogen (NH_3 dan NH_4) dalam air dilakukan dengan menggunakan Total Amonia Nitrogen (NH_3 dan NH_4) *test kit*. Hasil pemeriksaan kadar TAN pada hari ke 7 adalah nol, sedangkan pada hari ke 14 adalah 0,25 ppm (mg/L), hasil pada kelompok perlakuan A, B, C dan Kontrol menunjukkan nilai yang sama. Tabel hasil pengukuran kadar Total Amonia Nitrogen (NH_3 dan NH_4) dalam air yang dilakukan dapat dilihat pada Lampiran 9.

5.4 Hasil Pemeriksaan *Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan sampel gerusan organ ikan zebra dan sampel air akuarium dengan menggunakan metode RT-PCR. Pemeriksaan RT-PCR pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 3 gen target sebagai tanda identifikasi terhadap adanya virus SARS CoV 2 pada sampel uji, yakni gen Orf1b (*Open reading frame 1b*), gen RdRP (*RNA dependent RNA Polymerase*), dan RPP 30 (*ribonuclease P/MRP subunit p30*). Batas nilai CT dari hasil RT PCR yang dianggap positif pada penelitian ini adalah 40.

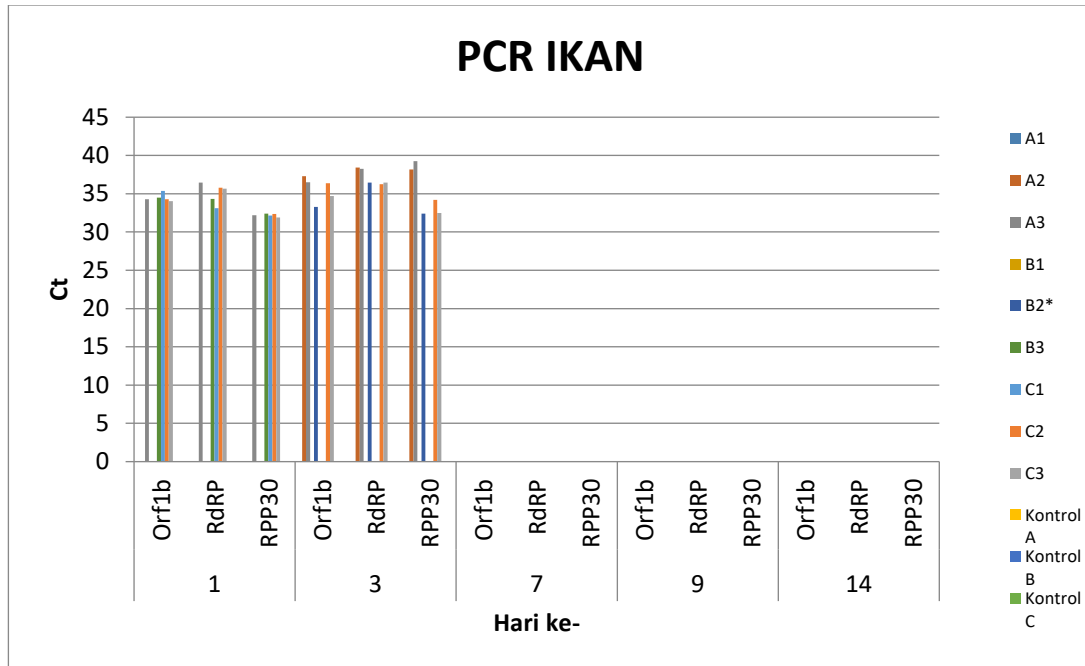
5.4.1 Hasil *RT-PCR* Ikan Zebra

Hasil pemeriksaan gerusan organ ikan zebra dengan menggunakan 3 gen yakni gen orf1b, gen RdRP dan gen RPP30 seperti yang tampak pada Tabel 5.1 menunjukkan bahwa pada hari Pertama setelah dilakukan infeksi didapatkan hasil yang positif pada sampel ikan kelompok A3, B3, C1, C2 dan C3. Pada hari ketiga kelompok didapatkan hasil yang positif pada kelompok A2, A3, B2, C2 dan C3 sedangkan pada kelompok yang lain didapatkan hasil yang negatif. Diagram hasil RT PCR Ikan Zebra dapat dilihat pada Gambar 5.6.

Tabel 5.1 Hasil *RT-PCR* Ikan Zebra

Kelompok	Hari ke 1 (Nilai CT)			Hari ke 3 (Nilai CT)			Hari ke 7 (Nilai CT)			Hari ke 9 (Nilai CT)			Hari ke 14 (Nilai CT)		
	Orf1b	RdRP	RPP30	Orf1b	RdRP	RPP30	Orf1b	RdRP	RPP30	Orf1b	RdRP	RPP30	Orf1b	RdRP	RPP30
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	0	0	0	37,28	38,44	38,18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	34,28	36,44	32,18	36,48	38,26	39,26	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	33,28	36,44	32,28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	34,48	34,33	32,42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1	35,37	33,13	32,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	34,27	35,78	32,34	36,38	36,24	34,18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C3	34,05	35,67	31,9	34,68	36,44	32,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: Nilai CT Positif bila kurang dari 40



Gambar 5.6 Diagram hasil RT PCR Ikan Zebra

Berikut adalah Tabel 5.2 yang menunjukkan tabel persentase positif terhadap adanya SARS-CoV2 pada ikan zebra dengan metode pemeriksaan RT PCR.

Tabel 5.2 Persentase positif Hasil RT PCR Ikan Zebra

Perlakuan (Persentase Positif)		
Tetes Air	Injeksi Intra Peritoneal	Tetes Insang
A1 (0 %)	B1 (0 %)	C1 (20 %)
A2 (20 %)	B2 (20 %)	C2 (40 %)
A3 (40 %)	B3 (20 %)	C3 (40 %)
Kontrol A (0 %)	Kontrol B (0%)	Kontrol C (0 %)

Hasil pemeriksaan RT PCR penelitian ini menunjukkan bahwa virus SARS CoV-2 dapat menginfeksi ikan zebra. Infeksi virus SARS CoV-2 pada ikan zebra dapat diperoleh dari lingkungan perairan maupun yang diinfeksi secara langsung masuk ke dalam bagian tubuh ikan zebra. Pada kelompok A menunjukkan infeksi yang diperoleh dari lingkungan perairan dengan pemberian titer virus SARS CoV-2 pada air sebesar $2,25 \times 10^4$ pfu/mL sudah dapat menginfeksi ikan zebra. Pemberian virus yang diinfeksi langsung ke dalam tubuh ikan zebra pada jalur intra peritoneal dengan titer virus sebesar $6,75 \times 10^2$ pfu/ml sudah dapat menginfeksi ikan zebra, sedangkan melalui jalur tetes insang dalam penelitian ini dapat masuk dan menginfeksi ikan zebra dengan titer virus mulai dari 9×10^2 pfu/mL.

5.4.2 Hasil *RT-PCR* Air Zebra

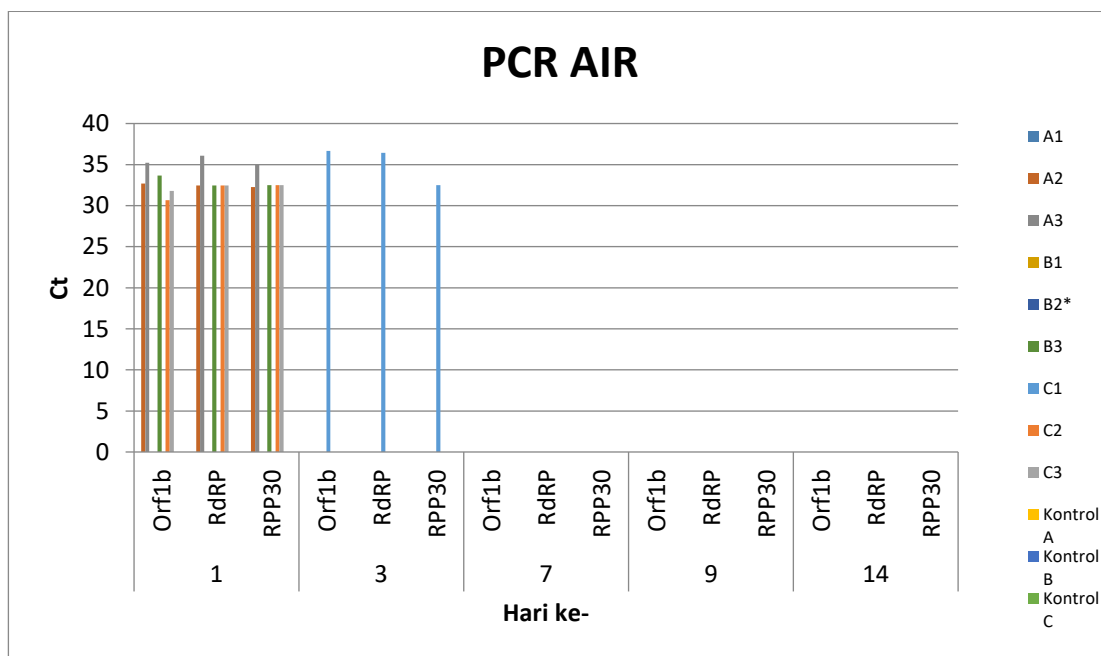
Selain melakukan pemeriksaan RT PCR terhadap ikan zebra yang telah diinfeksi, dalam penelitian ini juga dilakukan pemeriksaan terhadap sampel air dari akuarium ikan zebra masing-masing kelompok perlakuan. Hasil pemeriksaan sampel air akuarium sesuai yang tampak pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa didapatkan hasil yang positif pada sampel air akuarium kelompok A2, A3, B3, C2 dan C3 pada hari pertama serta kelompok C1 pada hari ketiga setelah dilakukan proses awal infeksi.

Tabel 5.3 Hasil RT-PCR Air

Kelompok	Hari ke 1 (Nilai CT)			Hari ke 3 (Nilai CT)			Hari ke 7 (Nilai CT)			Hari ke 9 (Nilai CT)			Hari ke 14 (Nilai CT)		
	Orf1b	RdRP	RPP30	Orf1b	RdRP	RPP30	Orf1b	RdRP	RPP30	Orf1b	RdRP	RPP30	Orf1b	RdRP	RPP30
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	32,68	32,44	32,28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	35,21	36,1	35,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	33,68	32,44	32,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1	0	0	0	36,68	36,44	32,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	30,68	32,44	32,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C3	31,78	32,44	32,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan : Nilai CT positif bila kurang dari 40.

Hasil pemeriksaan RT PCR pada sampel air akuarium menunjukkan bahwa ikan zebra yang diinfeksi virus SARS CoV-2 dapat menularkan virus ke lingkungan perairan, hal ini terlihat dari Kelompok B3 maupun Kelompok C1 sampai C3 yang dilakukan infeksi secara langsung ke dalam tubuh ikan zebra namun ditemukan kandungan virus SARS CoV-2 pada lingkungan air akuarium. Sedangkan pada kelompok A didapatkan kandungan virus SARS-CoV-2 pada air akuarium yang ditetesi virus SARS CoV-2 dengan titer sebesar $2,25 \times 10^4$ pfu/mL dan 3×10^4 pfu/mL. Diagram hasil RT PCR Air Akuarium dapat dilihat pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7 Diagram hasil RT PCR Air Akuarium

5.5. Histopatologi Ikan Zebra

Pemeriksaan Histopatologi pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya gambaran perubahan patologis pada jaringan organ ikan zebra yang telah diinfeksi dengan menggunakan virus SARS-CoV-2. Pengambilan sampel jaringan untuk pemeriksaan histopatologi dilakukan secara periodik yakni pada hari ke 1, 3, 7, 9, dan 14 hari setelah proses infeksi. Beberapa organ yang dilakukan pengamatan histopatologi dalam penelitian ini meliputi Insang, Usus, Hepar, Organ Reproduksi, Otot dan Mata.

5.5.1 Gambaran Histopatologi Perlakuan Tetes Air

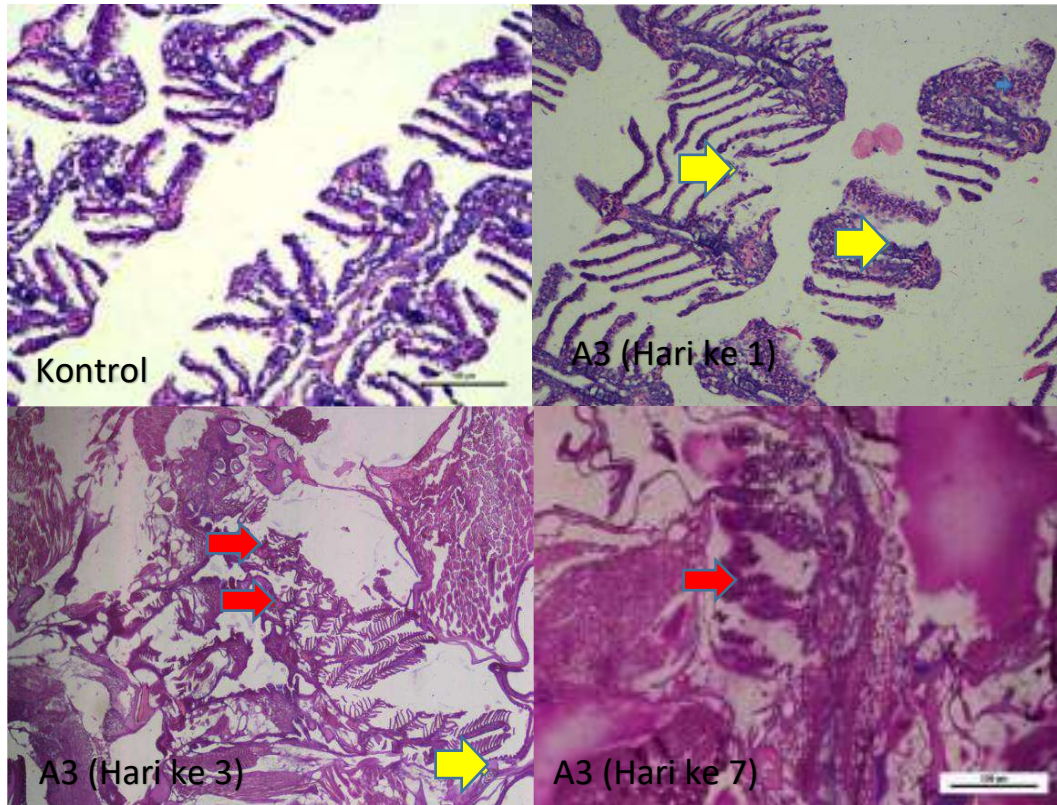
Pada kelompok perlakuan tetes insang dalam penelitian ini seperti yang dilihat pada Tabel 5.4, di temukan adanya kelainan histopatologi hanya pada kelompok A3 dengan pemberian virus SARS-CoV-2 sebesar 3×10^4 pfu/mL yakni pada organ insang di hari ke 1, ke 3 dan ke 7 setelah infeksi, sedangkan pada organ-organ lainya tidak ditemukan adanya perubahan histopatologi.

Tabel 5.4 Hasil Histopatologi Kelompok A

Organ	Hari ke 1			Hari ke 3			Hari ke 7			Hari ke 9			Hari ke 14			Hari ke 1, 3, 7,9 dan 14 Kontrol
	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Insang	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hepar	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Repro	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Usus	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Otot	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Mata	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK

Keterangan: TAK (Tidak Ada Kelainan), AK (Ada Kelainan)

Pada organ insang gambaran histopatologi yang ditemukan pada penelitian ini yaitu adanya infiltrasi sel radang dan haemorrhagi. Berikut adalah gambaran histopatologi insang kelompok A yang terdapat pada Gambar 5.8



Gambar 5.8 Gambaran Histopatologi pada Organ Insang A3 dan Kontrol. Terdapat kelainan infiltrasi sel radang ditandai dengan warna kuning, Haemorrhagi ditandai dengan warna merah (Perbesaran 400x).

5.5.2 Gambaran Histopatologi Perlakuan Injeksi Intraperitoneal

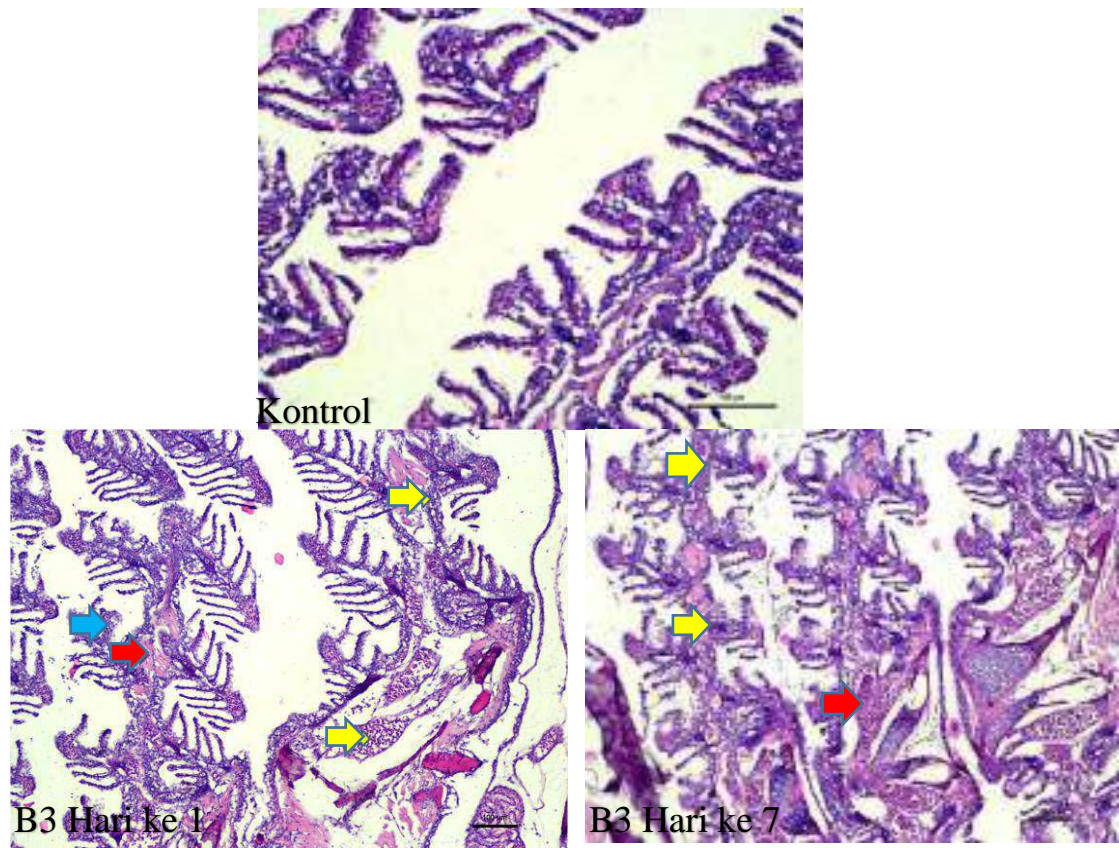
Pada kelompok perlakuan injeksi peritoneal seperti yang dilihat pada Tabel 5.5 ditemukan kelainan histopatologi hanya pada Kelompok B3 dengan pemberian virus SARS-CoV-2 sebesar 9×10^2 pfu/mL. Kelainan histopatologi yang ditemukan terdapat pada organ insang, organ reproduksi dan mata.

Pada organ insang Kelompok B3 kelainan histopatologi ditemukan pada hari ke 1, 3, 7, 9 dan 14 setelah infeksi berupa adanya infiltrasi sel radang, hiperplasia epitel dan hemorrhagi. Berikut adalah gambaran kelainan histopatologi pada organ insang seperti yang dapat dilihat pada Gambar 5.9.

Tabel 5.5 Hasil Histopatologi Kelompok B

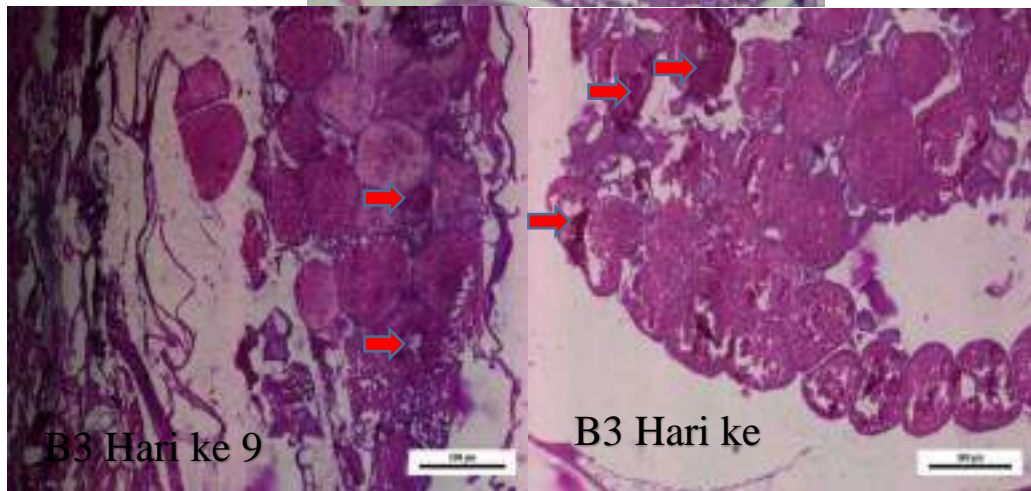
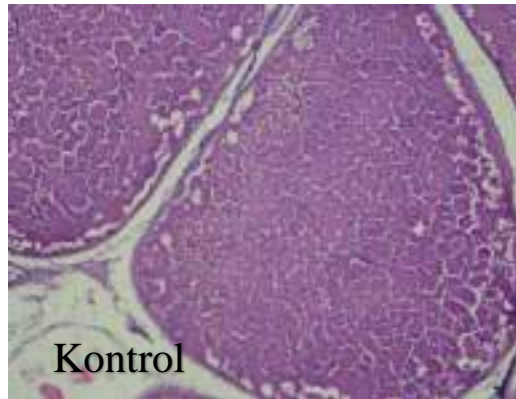
Organ	Hari ke 1			Hari ke 3			Hari ke 7			Hari ke 9			Hari ke 14			Hari ke 1,3,7,9 dan 14 Kontrol
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3	
Insang	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	AK	TAK
Hepar	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Repro	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	AK	TAK
Usus	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Otot	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Mata	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	AK	TAK	TAK	AK	TAK

Keterangan: TAK (Tidak Ada Kelainan), AK (Ada Kelainan)

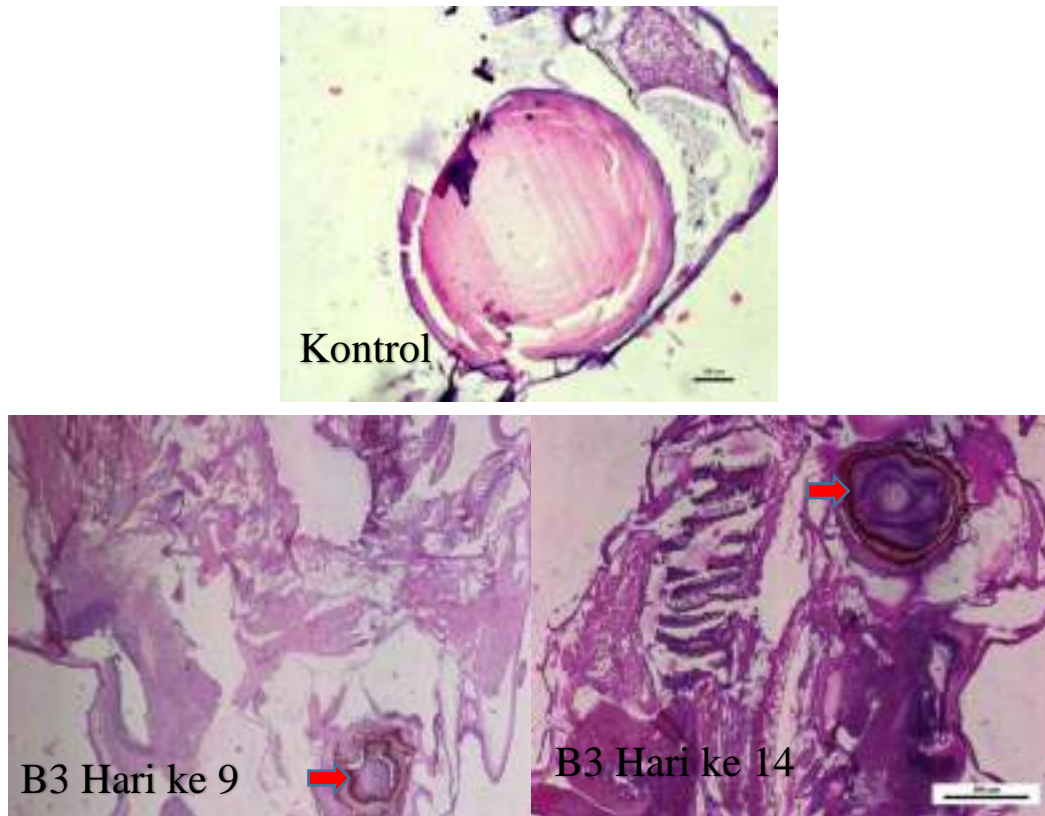


Gambar 5.9 Gambaran Histopatologi pada Organ Insang B3 dan Kontrol. Terdapat kelainan infiltrasi sel radang ditandai dengan warna kuning, Haemorrhagi ditandai dengan warna merah, dan hyperplasia epitel ditandai dengan warna biru (Perbesaran 400x).

Pada organ reproduksi Kelompok B3 kelainan histopatologi ditemukan pada hari ke 9 dan 14 setelah infeksi virus SARS-CoV-2 yakni berupa Haemorrhagi, hal ini juga ditemukan pada organ mata kelompok B3 yakni pada hari ke 9 dan 14 setelah infeksi virus SARS CoV-2 juga berupa Haemorrhagi. Berikut adalah gambaran kelainan histopatologi seperti yang dapat dilihat pada Gambar 5.10 (organ reproduksi) dan gambar 5.11 (mata).



Gambar 5.10 Gambaran Histopatologi pada Organ Reproduksi B3 dan Kontrol. Terdapat kelainan Haemorrhagi ditandai dengan warna merah (Perbesaran 400x).



Gambar 5.11 Gambaran Histopatologi pada Organ Mata B3 dan Kontrol. Terdapat kelainan Haemorrhagi ditandai dengan warna merah (Perbesaran 400x).

5.5.3 Gambaran Histopatologi Perlakuan Tetes Insang

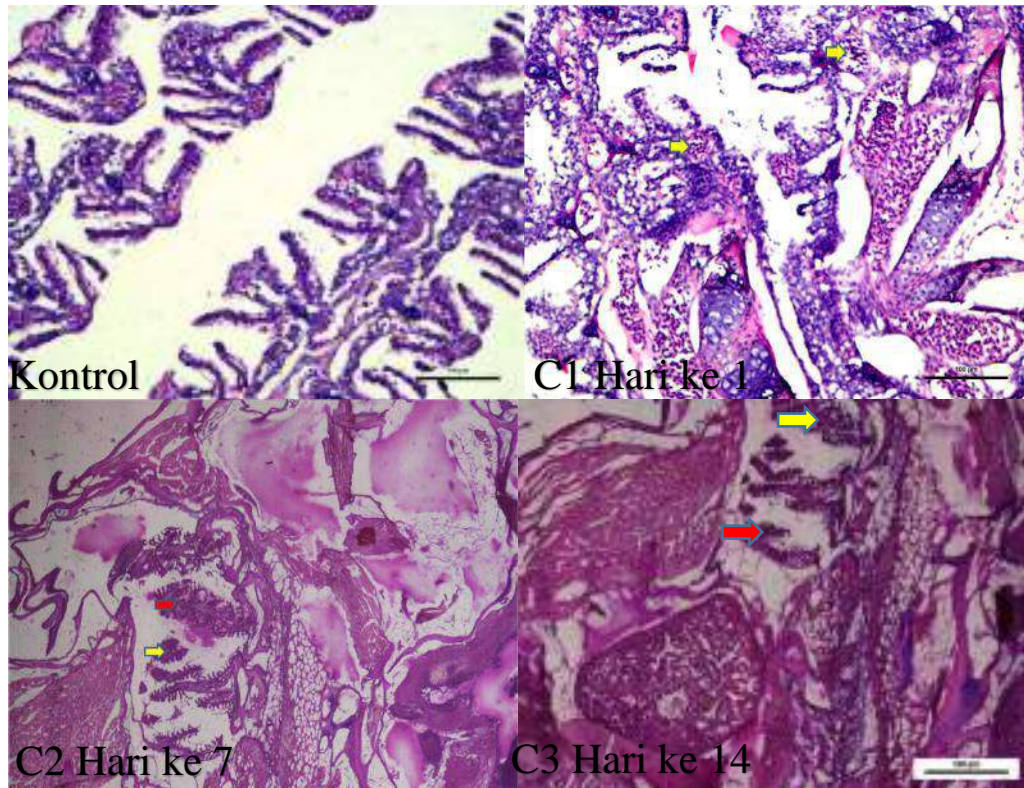
Pada kelompok perlakuan tetes insang seperti yang terlihat pada Tabel 5.6, didapatkan kelainan histopatologi pada organ insang, organ reproduksi dan organ mata, sedangkan pada organ lainnya tidak ditemukan kelainan histopatologi. Pada organ insang didapatkan adanya kelainan histopatologi pada semua kelompok C1 (9×10^2 pfu/mL), C2 ($13,5 \times 10^2$ pfu/mL), dan C3 (18×10^2 pfu/mL) sampai dengan hari ke 7 setelah proses infeksi, sedangkan pada hari ke 9 dan 14 yang menunjukkan adanya kelainan histopatologi hanya pada kelompok C2 dan C3.

Tabel 5.6 Hasil Histopatologi Kelompok C

Organ	Hari ke 1			Hari ke 3			Hari ke 7			Hari ke 9			Hari ke 14			Hari ke 1,3,7,9, dan 14
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	Kontrol
Insang	AK	AK	AK	AK	AK	AK	AK	AK	AK	TAK	AK	AK	TAK	AK	AK	TAK
Hepar	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Repro	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	AK	AK	TAK	AK	AK	TAK
Usus	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Otot	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Mata	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK	AK	AK	TAK	AK	AK	TAK

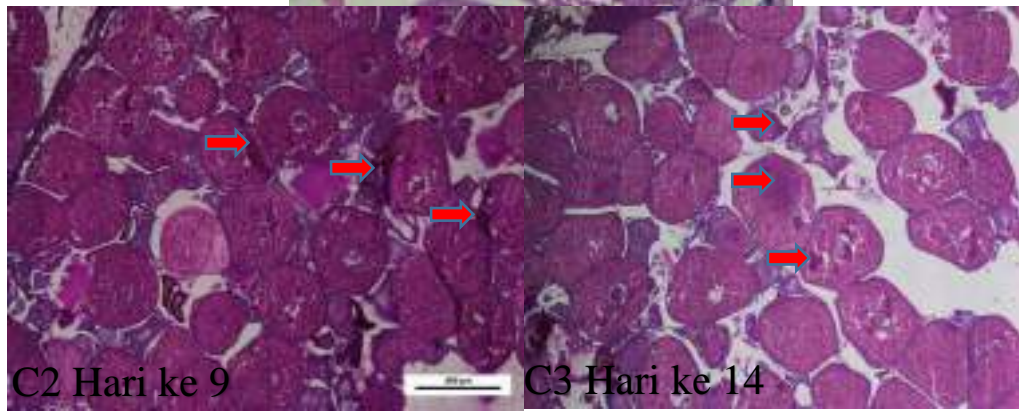
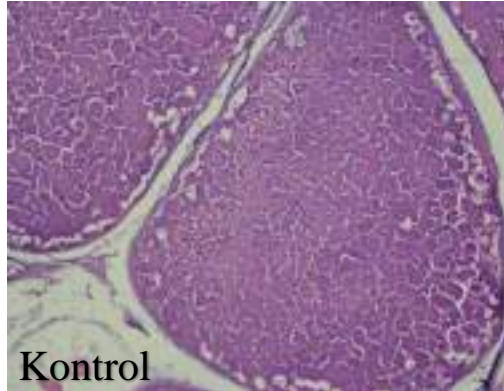
Keterangan: TAK (Tidak Ada Kelainan), AK (Ada Kelainan)

Pada organ insang kelainan histopatologi yang ditemukan yakni berupa adanya infiltrasi sel radang dan haemorrhagi. Berikut gambaran kelainan histopatologi organ insang seperti yang tampak pada Gambar 5.12

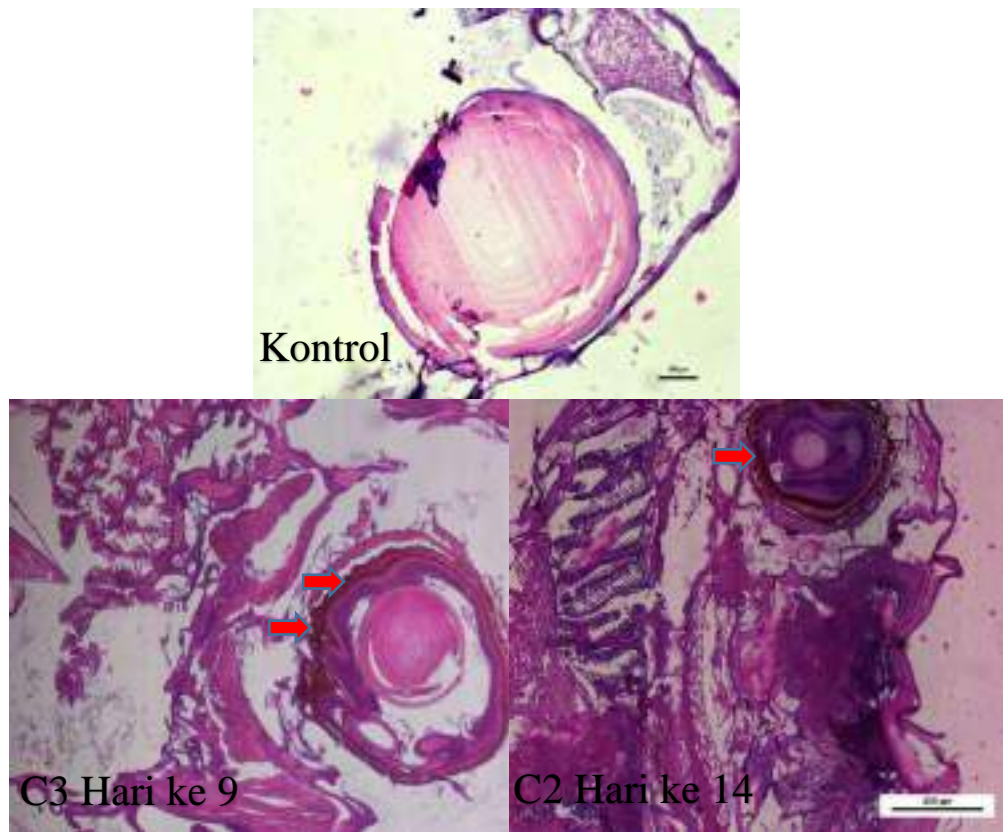


Gambar 5.12 Gambaran Histopatologi pada Organ Insang kelompok C dan Kontrol. Terdapat kelainan infiltrasi sel radang ditandai dengan warna kuning dan kelainan Haemorrhagi ditandai dengan warna merah (Perbesaran 400x).

Untuk organ reproduksi dan organ mata di dapatkan kelainan histopatologi pada hari ke 9 dan 14 setelah infeksi pada kelompok C2 dan C3, kelainan histopatologi yang di dapatkan berupa haemorrhagi. Berikut adalah gambaran kelainan histopatologi seperti yang dapat dilihat pada Gambar 5.13 (organ reproduksi) dan gambar 5.14 (mata).



Gambar 5.13 Gambaran Histopatologi pada Organ Reproduksi kelompok C dan Kontrol. Terdapat kelainan Haemorrhagi yang ditandai dengan warna merah (Perbesaran 400x).



Gambar 5.14 Gambaran Histopatologi pada Organ Mata Kelompok C dan Kontrol. Terdapat kelainan Haemorrhagi pada retina ditandai dengan warna merah (Perbesaran 400x)

5.6. Immunohistokimia Ikan Zebra

Pemeriksaan dengan metode immunohistokimia bertujuan untuk mengetahui adanya reaksi ikatan antara antigen SARS-CoV-2 dan antibodi spesifik terhadap SARS-CoV-2 yang ada pada jaringan organ ikan zebra setelah dilakukan infeksi. Adanya ikatan antara antigen dan antibodi akan tampak terhadap perubahan warna yang timbul pada jaringan yang diperiksa menjadi berwarna kecoklatan. Pengambilan sampel untuk pemeriksaan immunohistokimia dilakukan secara periodik yakni pada

hari ke 1, 3, 7, 9, dan 14 hari setelah proses infeksi. Beberapa organ yang dilakukan pengamatan immunohistokimia dalam penelitian ini meliputi Insang, Hepar, Usus, Organ Reproduksi, Otot dan Mata.

Dari hasil pemeriksaan immunohistokimia dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa virus SARS-CoV-2 dapat menginfeksi ikan zebra melalui 3 jalur infeksi yakni tetes air (Kelompok A), injeksi intraperitoneal (Kelompok B), dan tetes insang (Kelompok C). Pada rute infeksi tetes air virus SARS-CoV-2 menunjukkan hasil yang positif mulai dari pemberian titer virus sebesar $1,5 \times 10^4$ pfu/ml sampai dengan 3×10^4 pfu/ml (A1 sampai dengan A3).

Jalur infeksi selanjutnya yaitu melalui injeksi intraperitoneal menunjukkan hasil yang positif pada semua kelompok dengan pemberian titer virus sebesar $4,5 \times 10^2$ pfu/mL sampai dengan 9×10^2 pfu/mL (B1 sampai dengan B3). Hasil yang sama juga didapatkan pada Jalur infeksi tetes insang, dimana menunjukkan hasil positif pada semua kelompok dengan pemberian titer virus sebesar 9×10^2 pfu/ml sampai dengan 18×10^2 pfu/mL (Kelompok C1 sampai dengan C3). Tabel hasil persentase positif dari gambaran immunohistokimia yang diperoleh dari perlakuan penelitian kelompok A, B, C dan Kontrol dapat dilihat pada (Lampiran 10)

5.6.1 Immunohistokimia Perlakuan Tetes Air

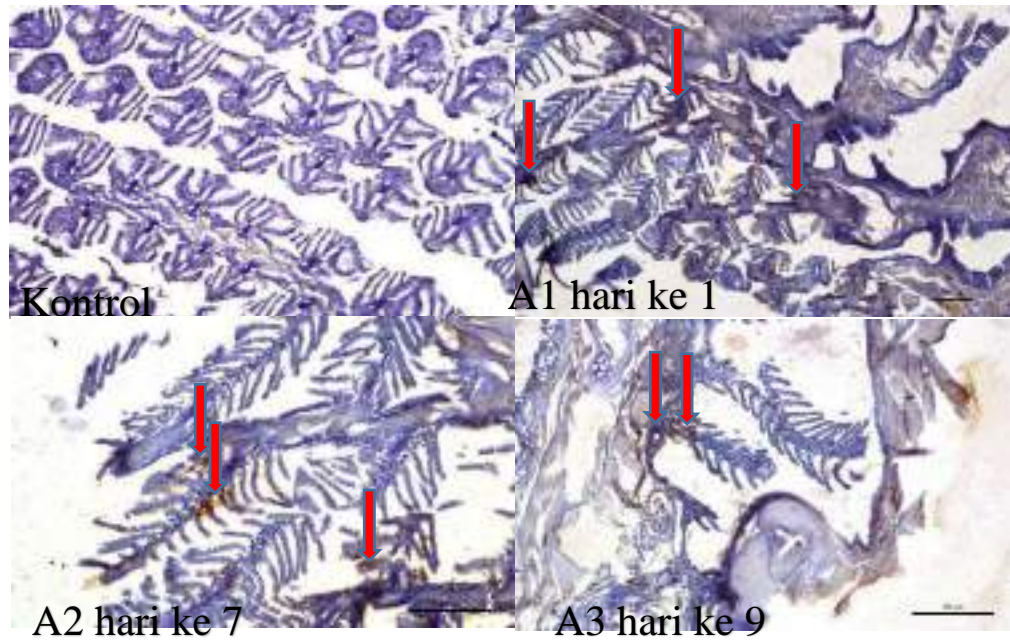
Hasil penelitian ini tampak pada Tabel 5.7, menunjukkan bahwa kelompok perlakuan pemberian virus SARS-CoV-2 melalui tetes air pada dosis A1 ($1,5 \times 10^4$ pfu/mL) menunjukkan hasil yang positif sampai dengan pengambilan sampel pada hari ke 7 setelah infeksi awal, sedangkan pada dosis A2 ($2,25 \times 10^4$ pfu/mL) dan A3 (3×10^4 pfu/mL) menunjukkan hasil yang positif sampai dengan pengambilan sampel hari ke 9 setelah infeksi awal.

Berikut adalah beberapa gambaran yang menunjukkan hasil positif pada penelitian ini dengan metode immunohistokimia tampak pada Gambar 5.15 (organ insang), Gambar 5.16 (organ hepar), Gambar 5.17 (organ usus), Gambar 5.18 (organ reproduksi), Gambar 5.19 (organ otot) dan Gambar 5.20 (organ mata).

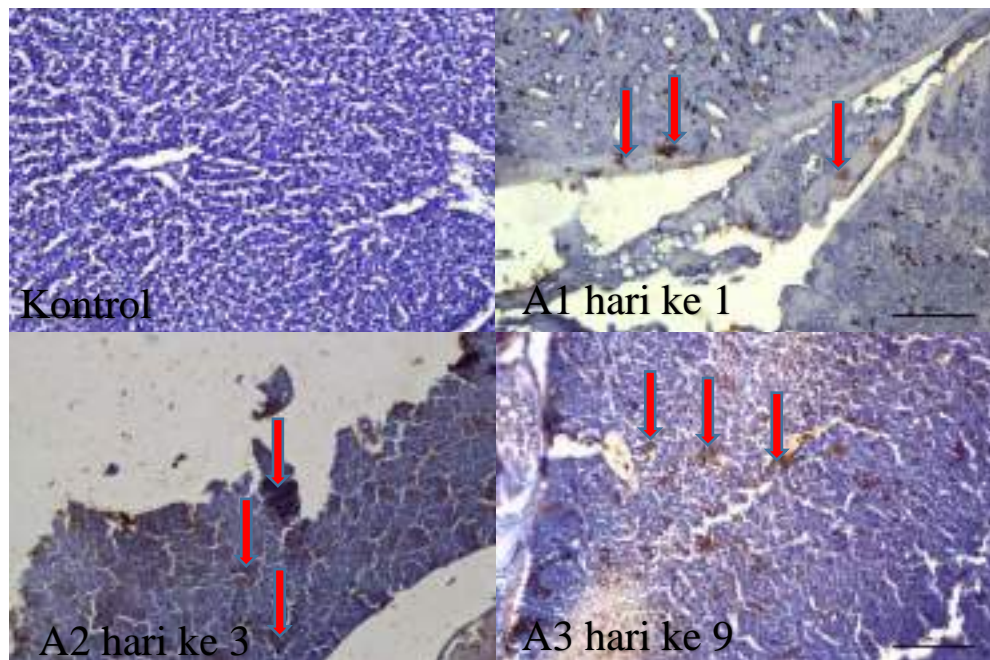
Tabel 5.7 Hasil Immunohistokimia Kelompok A

Organ	Hari ke 1				Hari ke 3				Hari ke 7				Hari ke 9				Hari ke 14			
	A1	A2	A3	K	A1	A2	A3	K	A1	A2	A3	K	A1	A2	A3	K	A1	A2	A3	K
Insang	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Hepar	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Repro	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Usus	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Otot	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Mata	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-

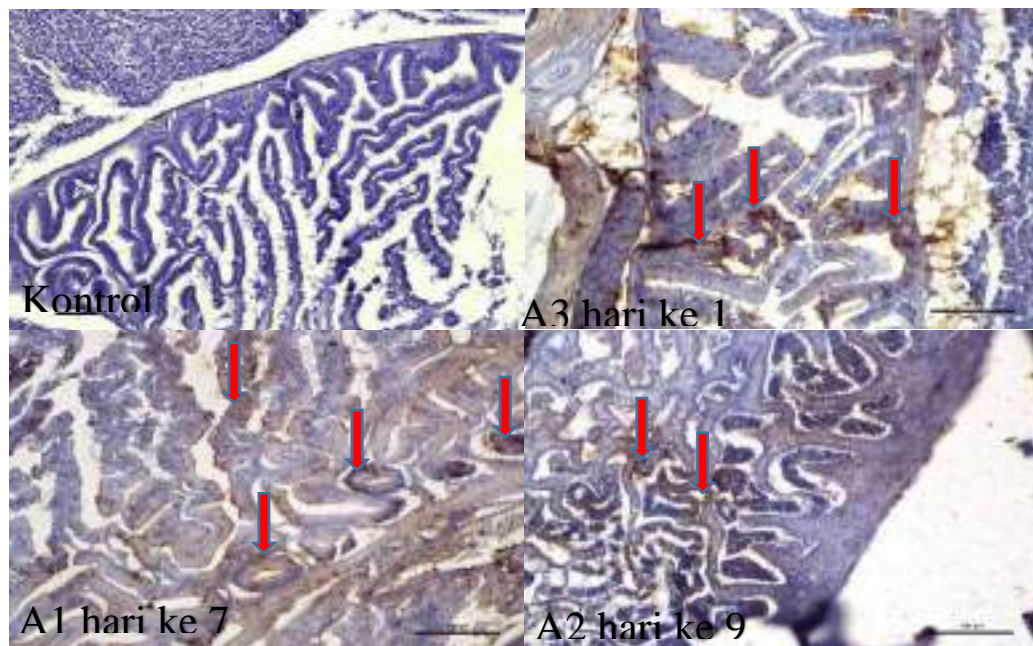
Keterangan: + (terdapat ikatan antigen dan antibodi Protein Spike SARS-CoV-2), - (tidak terdapat ikatan antigen dan antibodi Protein Spike SARS-CoV-2)



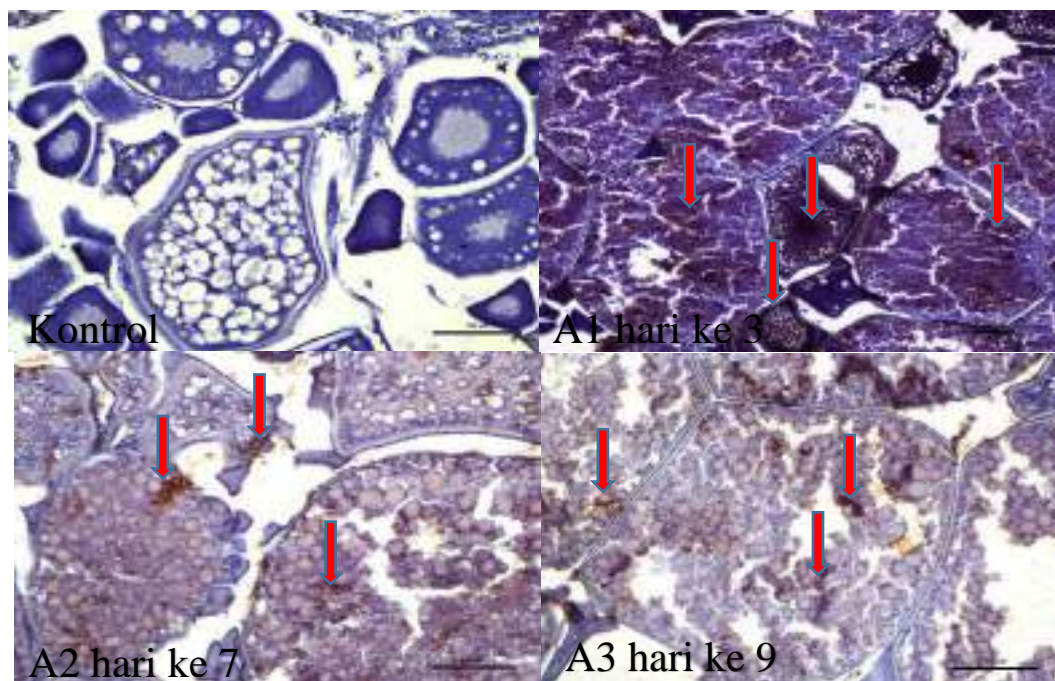
Gambar 5.15 Gambaran imunohistokimia organ Insang Kelompok A. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



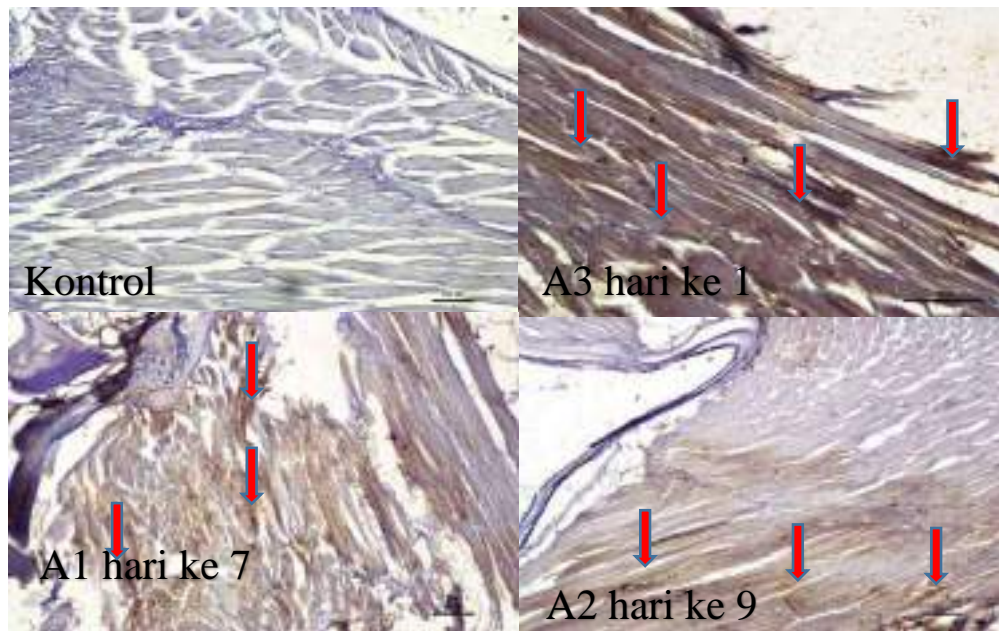
Gambar 5.16 Gambaran imunohistokimia organ Hepar Kelompok A. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



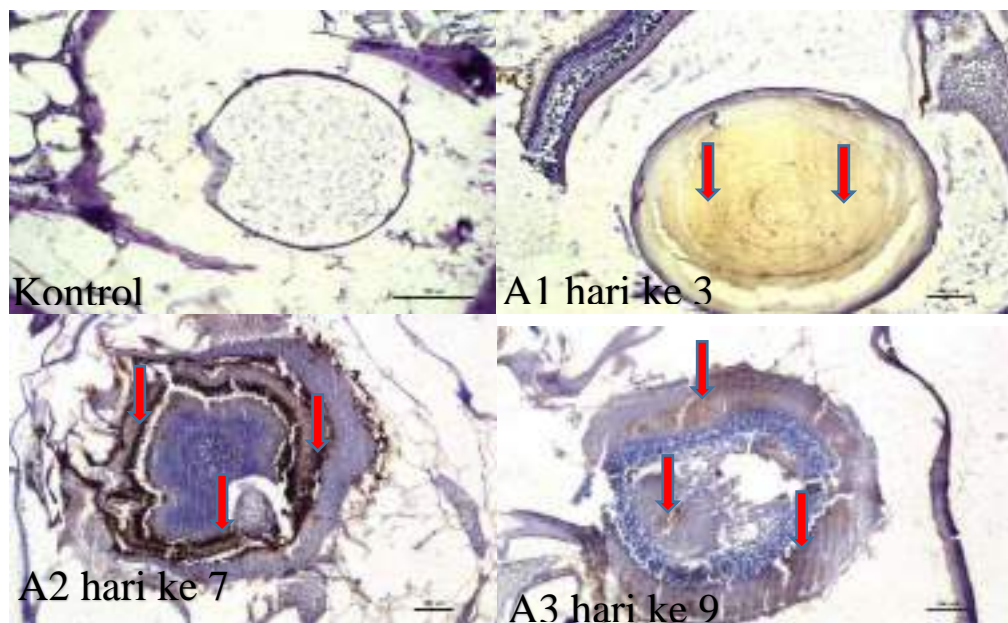
Gambar 5.17 Gambaran imunohistokimia organ usus Kelompok A. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



Gambar 5.18 Gambaran imunohistokimia organ Reproduksi Kelompok A. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



Gambar 5.19 Gambaran imunohistokimia organ Otot Kelompok A. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x)



Gambar 5.20 Gambaran imunohistokimia organ Mata Kelompok A. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).

5.6.2 Immunohistokimia Perlakuan Injeksi Intra Peritoneal

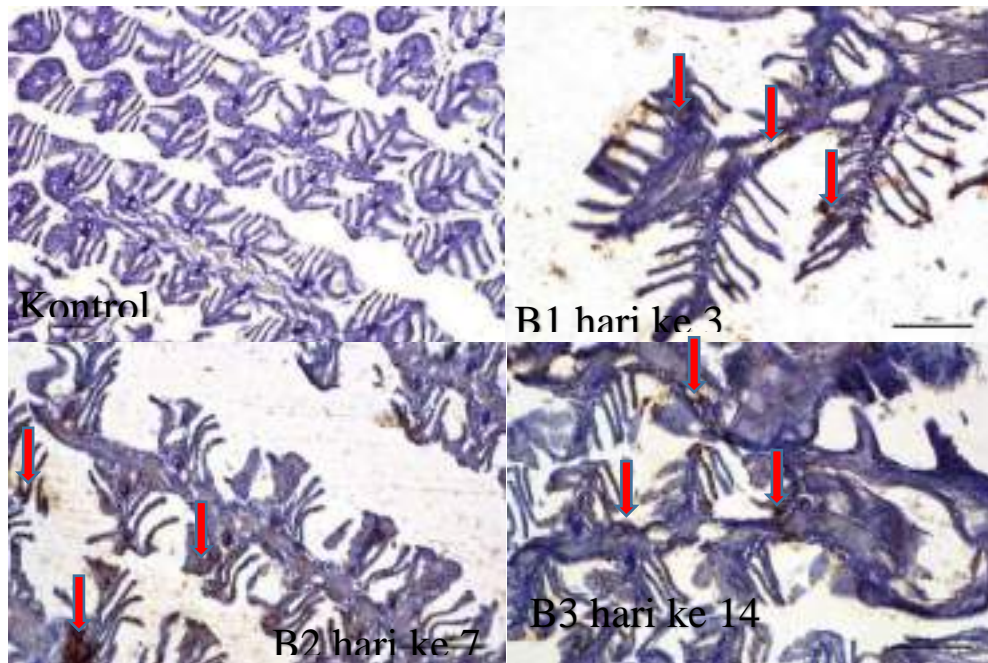
Hasil penelitian ini tampak pada Tabel 5.8 menunjukkan bahwa, kelompok perlakuan pemberian virus SARS-CoV-2 melalui rute injeksi intraperitoneal pada dosis B1 ($4,5 \times 10^2$ pfu/mL) menunjukkan hasil yang positif sampai dengan pengambilan sampel pada hari ke 7 setelah infeksi awal, sedangkan pada dosis B2 ($6,75 \times 10^2$ pfu/mL) dan B3 (9×10^2 pfu/mL) menunjukkan hasil yang positif sampai dengan pengambilan sampel hari ke 14 setelah infeksi awal.

Berikut adalah beberapa gambaran yang menunjukkan hasil positif pada penelitian ini dengan metode immunohistokimia tampak pada Gambar 5.21 (organ insang), Gambar 5.22 (organ hepar), Gambar 5.23 (organ usus), Gambar 5.24 (organ reproduksi), Gambar 5.25 (organ otot) dan Gambar 5.26 (organ mata).

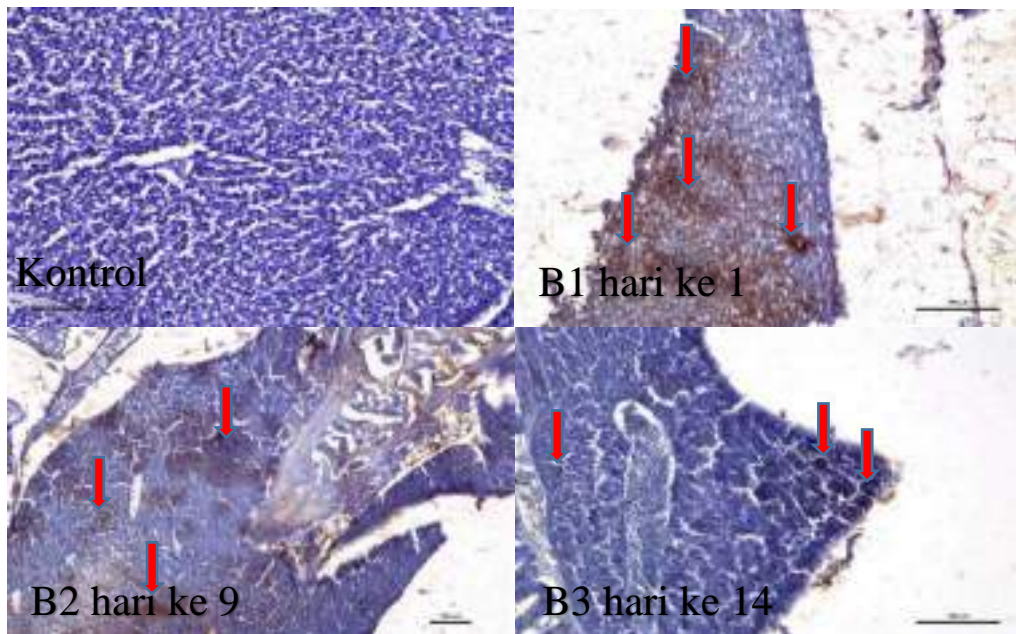
Tabel 5.8 Hasil Immunohistokimia Kelompok B

Organ	Hari ke 1				Hari ke 3				Hari ke 7				Hari ke 9				Hari ke 14			
	B1	B2	B3	K	B1	B2	B3	K	B1	B2	B3	K	B1	B2	B3	K	B1	B2	B3	K
Insang	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Hepar	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Repro	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Usus	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Otot	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Mata	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-

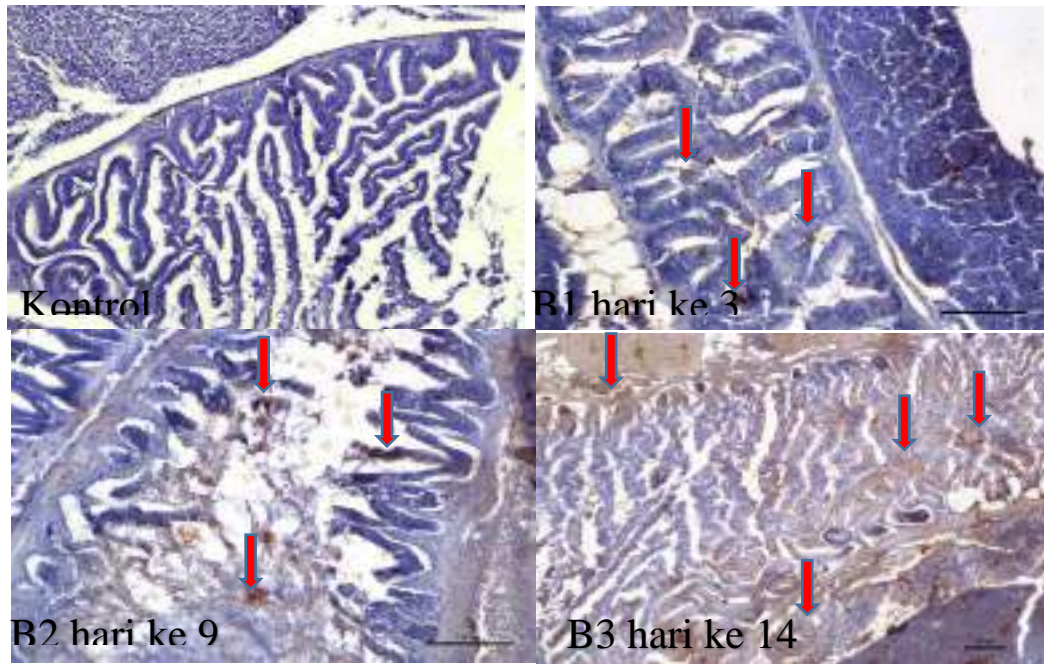
Keterangan: + (terdapat ikatan antigen dan antibodi Protein Spike SARS-CoV-2), - (tidak terdapat ikatan antigen dan antibodi Protein Spike SARS-CoV-2)



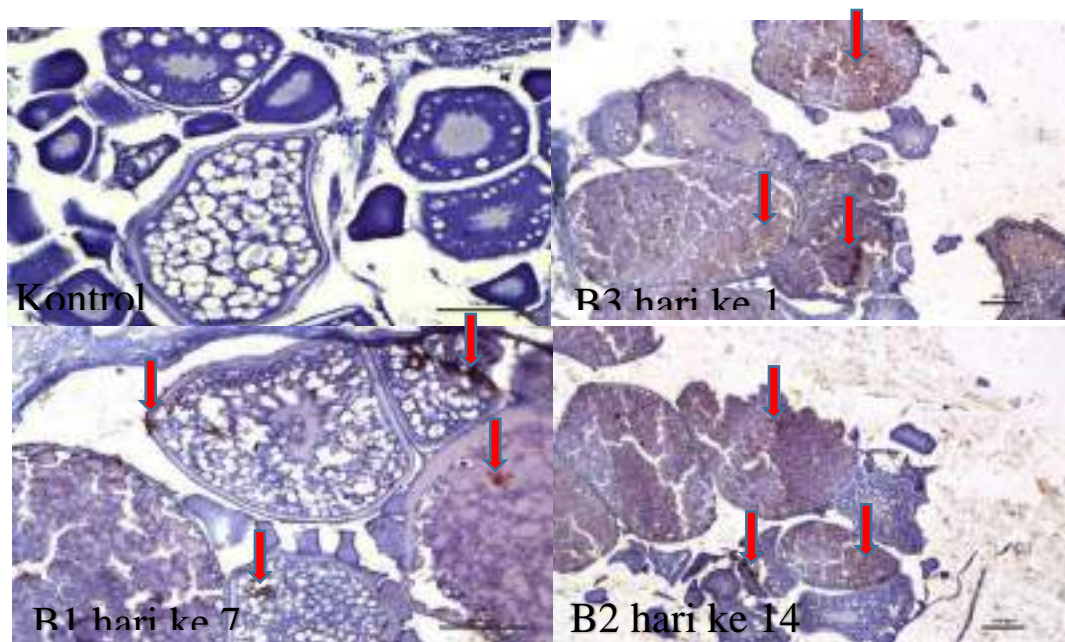
Gambar 5.21 Gambaran imunohistokimia organ Insang Kelompok B. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x)



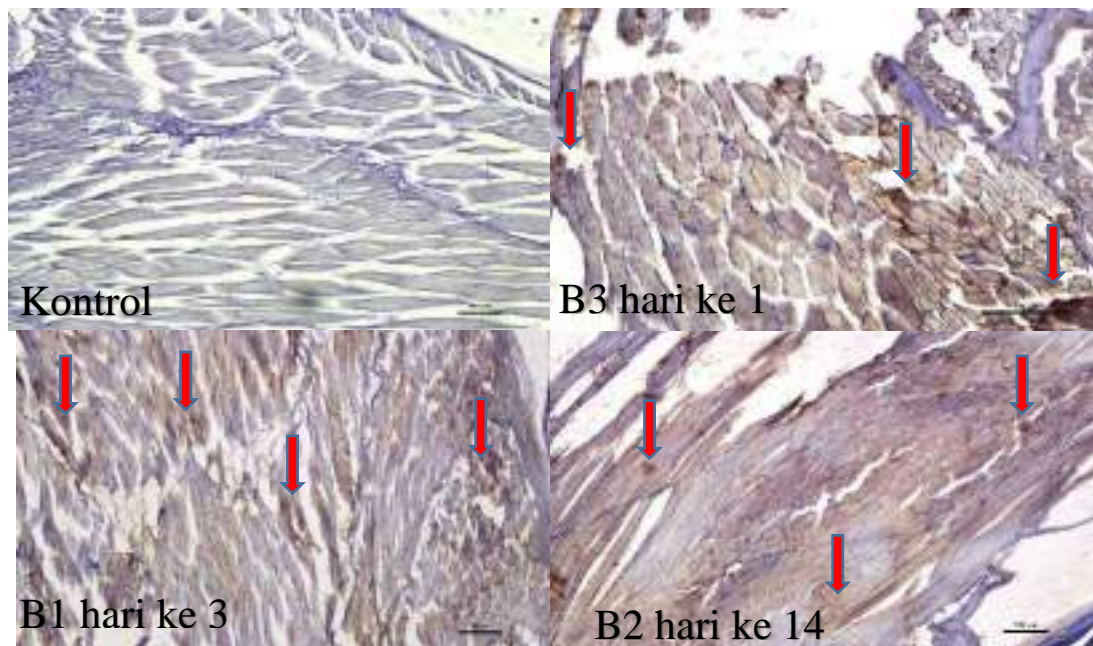
Gambar 5.22 Gambaran imunohistokimia organ Hepar Kelompok B. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x)



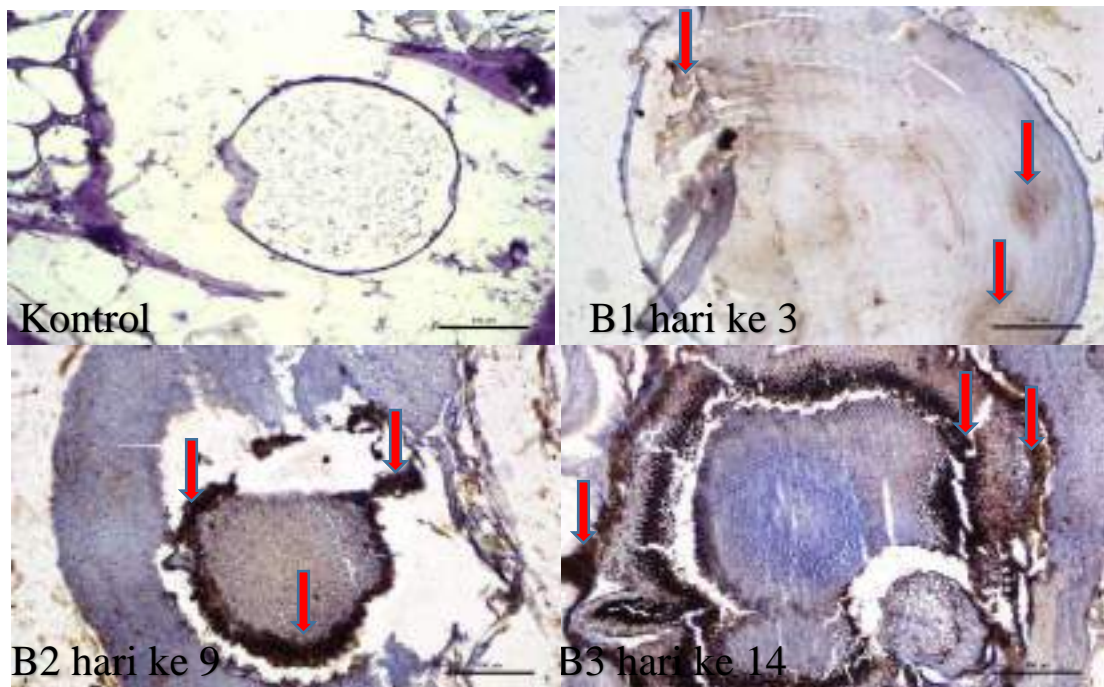
Gambar 5.23 Gambaran imunohistokimia organ Usus Kelompok B. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x)



Gambar 5.24 Gambaran imunohistokimia organ Reproduksi Kelompok B. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



Gambar 5.25 Gambaran imunohistokimia organ Otot Kelompok B. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x)



Gambar 5.26 Gambaran imunohistokimia organ Mata Kelompok B. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).

5.6.3 Immunohistokimia Perlakuan Tetes Insang

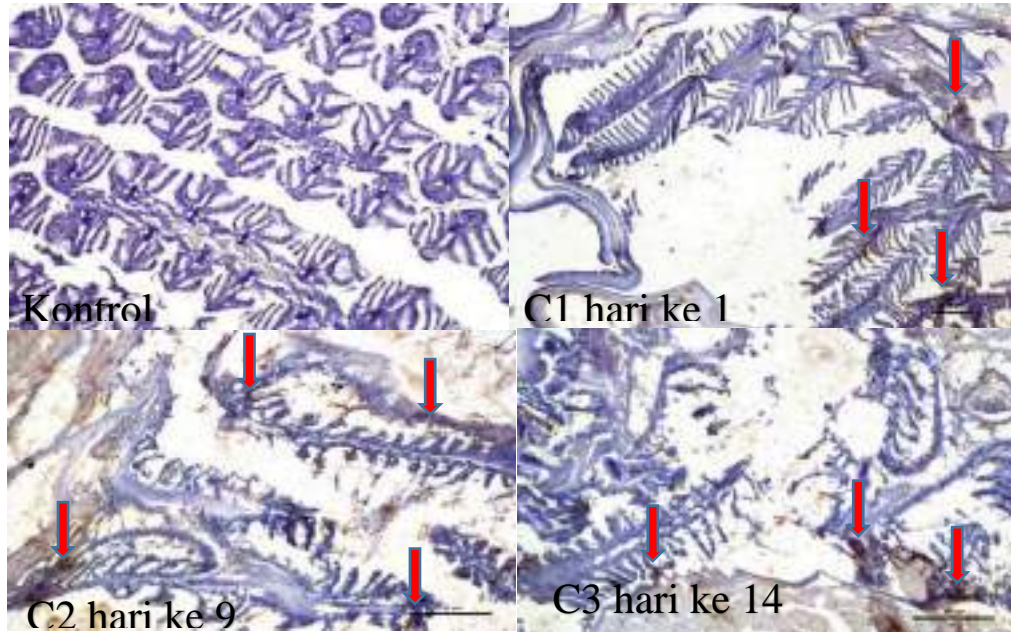
Hasil penelitian ini tampak pada Tabel 5.9 menunjukkan bahwa, kelompok perlakuan pemberian virus SARS-CoV-2 melalui jalur injeksi intraperitoneal pada dosis C1 (9×10^2 pfu/mL) menunjukkan hasil yang positif sampai dengan pengambilan sampel pada hari ke 7 setelah infeksi awal, sedangkan pada dosis C2 ($13,5 \times 10^2$ pfu/mL) dan C3 (18×10^2 pfu/mL) menunjukkan hasil yang positif sampai dengan pengambilan sampel hari ke 14 setelah infeksi awal.

Berikut adalah beberapa gambaran yang menunjukkan hasil positif pada penelitian ini dengan metode immunohistokimia tampak pada Gambar 5.27 (organ insang), Gambar 5.28 (organ hepar), Gambar 5.29 (organ usus), Gambar 5.30 (organ reproduksi), Gambar 5.31 (organ otot) dan Gambar 5.32 (organ mata).

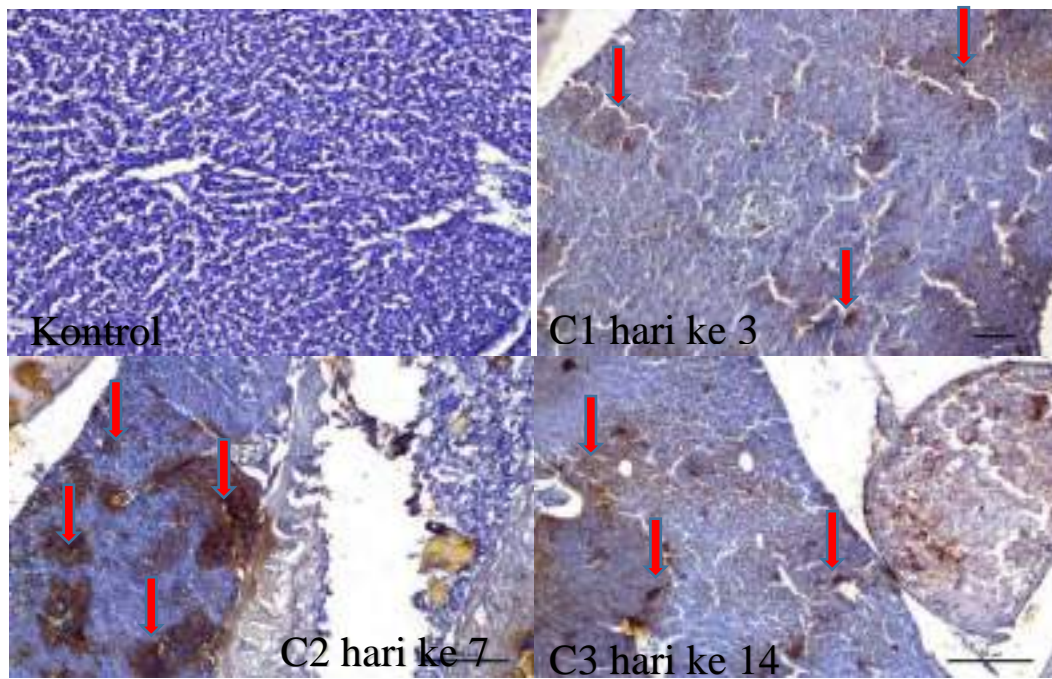
Tabel 5.9 Hasil Immunohistokimia Kelompok C

Organ	Hari ke 1				Hari ke 3				Hari ke 7				Hari ke 9				Hari ke 14			
	C1	C2	C3	K	C1	C2	C3	K	C1	C2	C3	K	C1	C2	C3	K	C1	C2	C3	K
Insang	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Hepar	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Repro	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Usus	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Otot	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Mata	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-

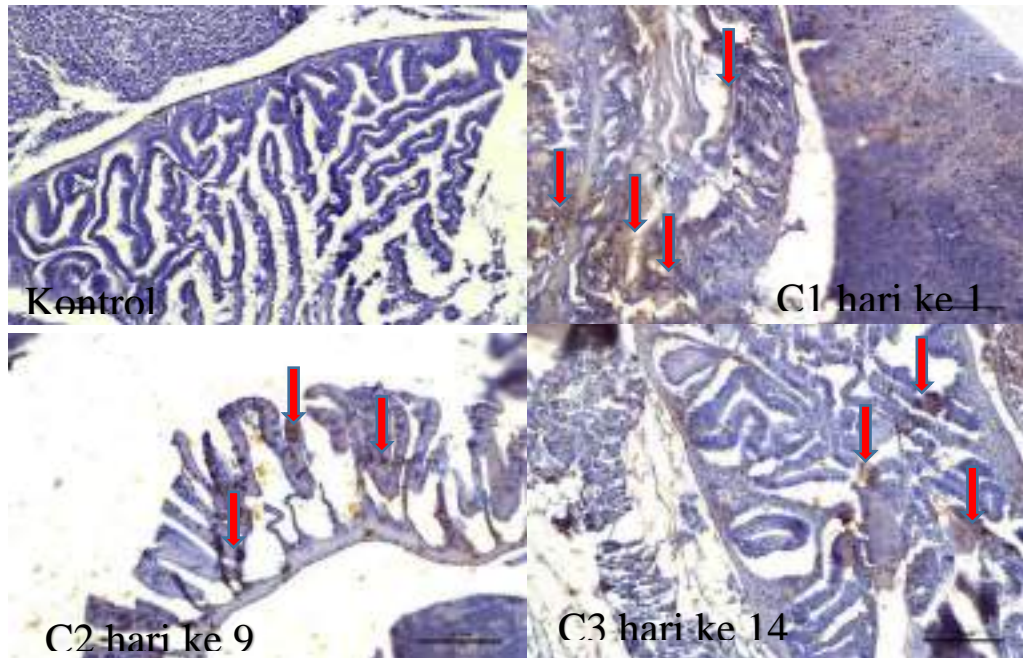
Keterangan: + (terdapat ikatan antigen dan antibodi Protein Spike SARS-CoV-2), - (tidak terdapat ikatan antigen dan antibodi Protein Spike SARS-CoV-2)



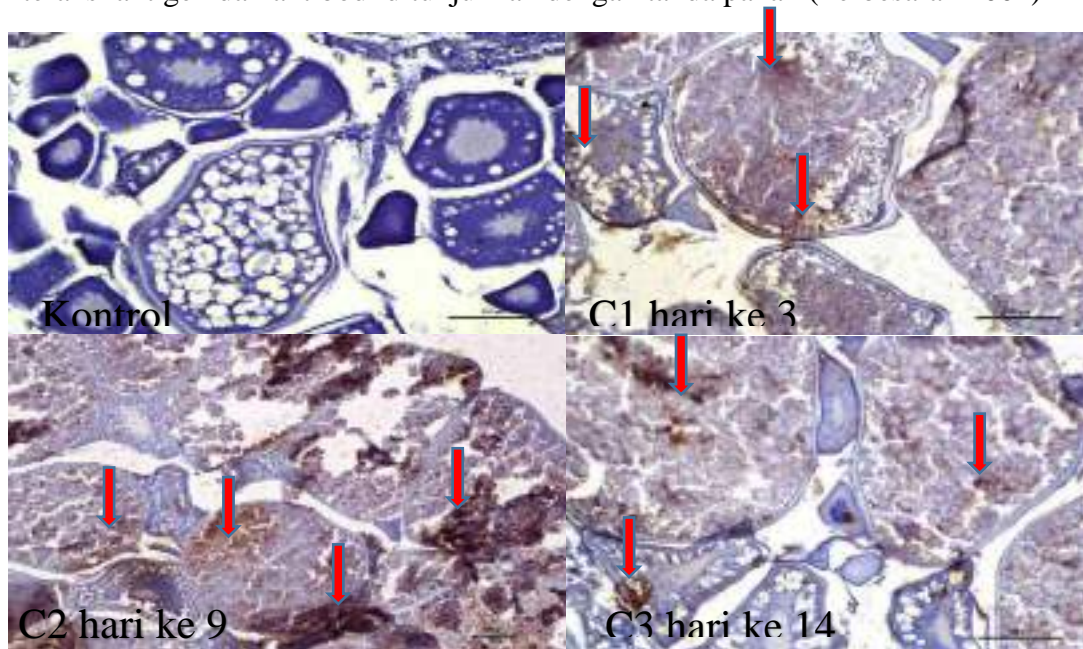
Gambar 5.27 Gambaran imunohistokimia organ Insang Kelompok C. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



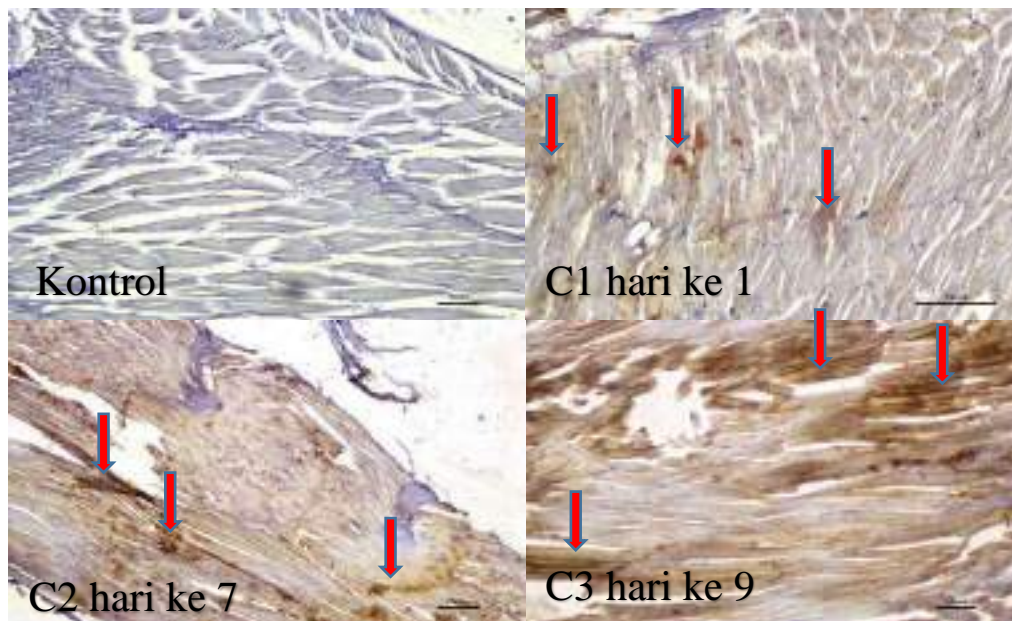
Gambar 5.28 Gambaran imunohistokimia organ Hepar Kelompok C. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



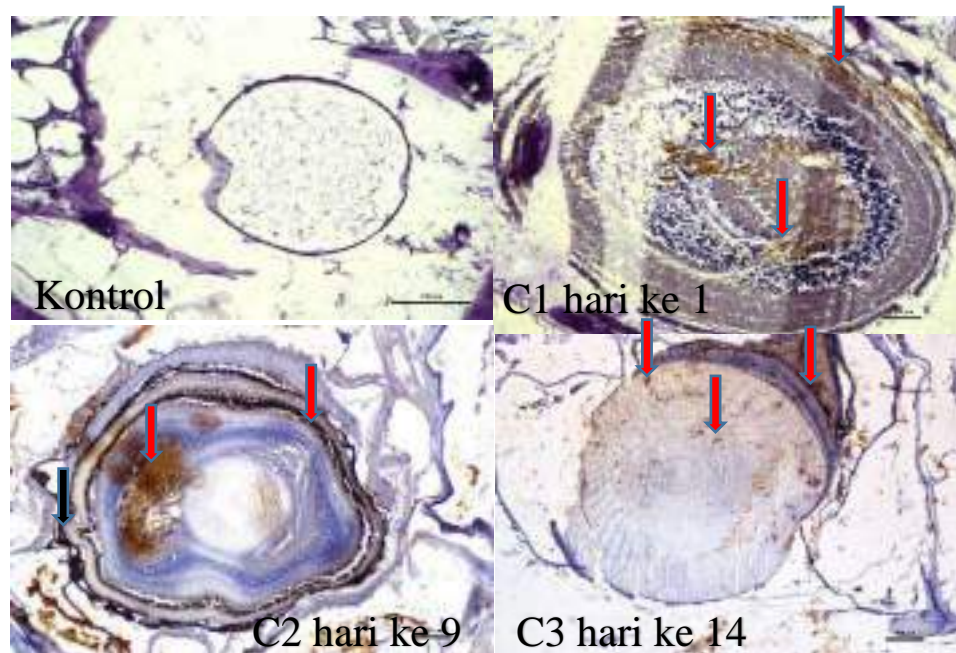
Gambar 5.29 Gambaran imunohistokimia organ Usus Kelompok C. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x)



Gambar 5.30 Gambaran imunohistokimia organ Reproduksi Kelompok C. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



Gambar 5.31 Gambaran imunohistokimia organ Otot Kelompok C. Adanya Interaksi antara antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).



Gambar 5.32 Gambaran imunohistokimia organ Mata Kelompok C. Adanya Interaksi antigen dan antibodi ditunjukkan dengan tanda panah (Perbesaran 400x).

BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Kualitas Air Akuarium.

Ikan hidup di dalam air, dan kualitas air berfungsi sebagai pengendalian lingkungan yang paling mendasar dan kritis dalam budidaya ikan zebra. Kualitas air yang buruk dapat memberikan dampak secara langsung pada pertumbuhan, metabolisme, perkembangan, kekebalan tubuh fungsi, fisiologi, perilaku, stres, reproduksi, dan banyak parameter lainnya. Selain efek pada ikan, kualitas air akan sangat mempengaruhi kinerja filter, karena proses ini membutuhkan kondisi yang sesuai untuk dapat berfungsi secara optimal (Hugs, 2020).

Pengukuran kualitas air akuarium penting dilakukan untuk mengetahui kondisi fasilitas, lingkungan perairan agar layak digunakan sebagai tempat tinggal ikan zebra sesuai dengan prosedur standarisasi pemeliharaan hewan coba sehingga dapat diterima dengan baik dalam hal fisiologis dan kesejahteraan hewan coba.

Ikan secara unik beradaptasi dengan air yang bersentuhan dengan mereka baik secara eksternal maupun internal melalui kulit, insang, saluran pencernaan, dan permukaan lainnya. Lingkungan hipotonik pada semua ikan air tawar, termasuk ikan zebra, menciptakan gradien konsentrasi yang memungkinkan terjadinya penetrasi air secara pasif masuk ke dalam lingkungan internal ikan (jaringan) dan kehilangan ion secara pasif dari jaringan keluar ke lingkungan eksternal secara terus menerus. Air membawa gas terlarut, garam, bahan kimia, dan organisme lainnya yang mungkin

dapat masuk atau keluar dari ikan pada berbagai permukaan terbuka (Evans *et al*, 2005; Hugs, 2020).

Air sebagai pelarut yang universal, artinya lebih banyak jenis molekul yang larut dalam air dibandingkan dengan pelarut lainnya. Ikan, yang terendam dalam air, terus-menerus berinteraksi dengan molekul terlarut dalam air. Pertukaran gas, osmoregulasi, dan pembuangan limbah merupakan beberapa contoh proses fisiologis yang bergantung pada konsentrasi relatif dari molekul terlarut dalam lingkungan hidup. Stabilitas dari konsentrasi molekul dalam lingkungan air sangat penting untuk kesehatan ikan, dan dapat digunakan untuk membantu validitas penelitian (Hugs, 2020).

Pada penelitian ini parameter pengukuran kualitas air akuarium dilihat melalui besaran nilai pH air, pengukuran suhu air, pengukuran kadar Oksigen Terlarut (DO), pengukuran kadar Nitrat (NO_3), pengukuran kadar Nitrogen Dioksida (NO_2) dan pengukuran kadar Amonia (NH_3).

6.1.1. pH Air Akuarium

Kestabilan nilai pH air dalam akuarium menjadi sangat penting bagi kesehatan ikan zebra. Hasil penelitian ini menunjukkan besaran nilai pH air akuarium berada pada kisaran nilai pH 7 sampai dengan pH 8. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi pH air dalam akuarium ikan zebra berada dalam kondisi yang optimal dan tidak memberikan dampak yang tidak baik bagi kesehatan ikan zebra yang digunakan menjadi hewan coba.

Keseimbangan asam basa (pH) didefinisikan sebagai konsentrasi log ion hidrogen (H^+) dan menggambarkan konsentrasi relatif dari asam dan basa dalam air budidaya. Skala pH logaritmik mulai dari nol (asam terkuat) hingga 14 (basa terkuat) dengan pH 7 mewakili larutan netral yang tidak bersifat asam atau basa. Perubahan satu satuan pH menunjukkan perubahan konsentrasi ion hidrogen sebesar 10 kali lipat sehingga perubahan 1 unit pH sangat signifikan (Timmons & Ebeling, 2013).

Air dalam sirkulasi sistem akuakultur terus menerus menjadi lebih asam dari waktu ke waktu karena produksi asam dan buffer dikonsumsi sebagai limbah nitrogen, seperti nitrogen amonia total (TAN) diubah menjadi nitrat yang lebih tidak membahayakan oleh bakteri nitrifikasi (Timmons & Ebeling, 2013). Natrium bikarbonat dapat ditambahkan ke air budidaya untuk melawan produksi asam dan meningkatkan kapasitas buffer untuk menjaga pH tetap mendekati tingkat optimal. Buffer adalah spesies kimia yang dapat menahan perubahan pH dengan menyumbang atau menerima ion hidrogen dari larutan. Sistem budidaya ikan air tawar biasanya menggunakan natrium bikarbonat sebagai penyangga utama, meskipun pada beberapa laboratorium akan menggunakan reaktor yang mengandung sumber kalsium karbonat, seperti aragonit, dolomit, karang hancur, atau batu kapur (Hugs, 2020).

Sebagian besar ikan air tawar mentolerir tingkat pH antara 6,5 dan 9. Ikan zebra yang ditemukan di alam berada dalam lingkungan perairan agak basa dengan pH berkisar antara 6,6-8,2, dan hal itu berfluktuasi terkait dengan kondisi musim (McClure *et al.*, 2006; Spence *et al.*, 2006). Median LC50 (*Lethal Concentration 50*) untuk paparan akut ikan zebra untuk pH selama 2 jam adalah 3,9, sedangkan tidak ada

perubahan perilaku yang diamati untuk pH akut eksposur antara pH 5,5 dan 9,0 (Zahangir *et al*, 2015). Pembudidaya ikan zebra biasanya berusaha untuk mempertahankan tingkat pH antara 7 dan 8 karena pH ini nilainya sesuai dengan kisaran pH alami untuk ikan zebra dan juga mendekati kondisi mikroba optimal untuk bakteri nitrifikasi dalam filter biologis (Timmons & Ebeling, 2013).

Efek fisiologis pH biasanya terjadi terutama pada epitel insang. Paparan pH menghasilkan beberapa stres fisiologis yang berbeda pada konsisi akut atau kronis seperti produksi lendir yang berlebihan sehingga dapat mengganggu pertukaran ion dan gas, kehilangan ion natrium dan klorida, peningkatan kadar kortisol, modulasi ekspresi gen, dan hilangnya keseimbangan asam-basa (Kwong *et al*, 2014; Zahangir *et al*, 2015). pH asam pada insang dapat menurunkan ikatan afinitas hemoglobin dan meningkatkan jumlah oksigen yang dibutuhkan hemoglobin untuk mencapai saturasi oksigen yang memadai, hal ini disebut juga dengan Efek Bohr. Dalam beberapa kasus nilai pH yang rendah, haemoglobin mungkin kehilangan kemampuan untuk mengikat oksigen sehingga menurunkan konsentasi oksigen dalam darah, hal ini disebut juga dengan Efek Akar (Burggren *et al*, 1991; Hugs, 2020). Semakin rendah nilai pH, maka akan semakin sulit bagi ikan untuk dapat mengikat dan mengangkut oksigen. Paparan akut terhadap ikan zebra dengan besaran nilai pH mendekati (pH 4) dan batas atas (pH 11) menghasilkan produksi lendir yang berlebihan sehingga dapat menutupi kulit dan insang, kerusakan sel epitel pernapasan, hilangnya keseimbangan berenang, perilaku kejang, dan bahkan sampai dengan kematian (Zahangir *et al*, 2015).

6.1.2 Temperatur Air Akuarium

Dari hasil penelitian ini, pengukuran suhu air akuarium ikan zebra dilakukan secara periodik. Pengukuran suhu Air Akuarium ikan zebra pada masing-masing kelompok perlakuan dalam masa penelitian berkisar antara 22 °C dan 24 °C. Hasil ini menunjukkan bahwa suhu dalam akuarium ikan zebra dalam penelitian ini masih termasuk ke dalam suhu yang baik bagi perkembangan kehidupan ikan zebra dimana ikan zebra pada habitat alami mereka dapat tumbuh dan berkembang pada kisaran suhu perairan 16,5 °C sampai dengan 33 °C (Benjamin *et al*, 2020).

Hewan *poikilothermic*, seperti ikan, menunjukkan berbagai tingkat toleransi terhadap perubahan suhu, serta kisaran suhu optimal yang cukup sempit untuk dapat menghasilkan performa yang terbaik bagi ikan. Namun ikan zebra dapat diklasifikasikan sebagai *eurythermal*, karena mereka menunjukkan toleransi terhadap rentang suhu yang cukup luas. Populasi ikan zebra pada habitat alami mereka telah diamati suhu air yang menunjukkan kisaran nilai suhu mulai dari 16,5 hingga 33 °C, sementara itu kontrol suhu pada penelitian di laboratorium telah menunjukkan ikan yang diberikan waktu aklimatisasi yang cukup dapat bertahan hidup pada suhu 6,7 hingga 41,7 °C (Cortemeglia & Beitinger, 2005; Benjamin *et al*, 2020).

Meskipun toleransi terhadap kisaran suhu ikan zebra cukup luas, kisaran suhu optimal untuk perkembangan embrio ikan zebra yang telah ditemukan menjadi cukup sempit. Meskipun tidak dicirikan dengan baik, ikan zebra dewasa juga mungkin memiliki kisaran suhu optimum yang sempit. Pertumbuhan larva terbesar biasanya ditemukan ketika ikan zebra disimpan pada suhu konstan 28,5 C. Suhu dapat

mempengaruhi banyak sekali mekanisme seperti diferensiasi jenis kelamin. Koloni ikan zebra menunjukkan penentuan jenis kelamin genetik yang sensitif terhadap pengaruh suhu lingkungan dan maskulinisasi terjadi pada suhu yang relatif lebih tinggi (Hugs, 2020). Suhu yang lebih tinggi juga dapat menyebabkan penurunan kemampuan bertahan hidup, malformasi struktur dan organ termasuk ekor, sistem kardiovaskular, kepala, sirip dada, dan dapat menyebabkan kondisi termasuk edema atau akumulasi darah abnormal pada organ tertentu (Benjamin *et al*, 2020). Ikan zebra menunjukkan pertumbuhan optimal pada kisaran nilai suhu antara 24 °C sampai dengan 28 °C dengan tingkat pertumbuhan tertinggi terjadi pada 28 °C (Hugs, 2020).

Suhu air tidak hanya berpengaruh terhadap tubuh ikan tetapi juga berpengaruh pada parameter kualitas air lainnya. Keseimbangan nitrogen amonia total (TAN) tergantung pada suhu dan pH. Peningkatan suhu air menggeser keseimbangan TAN menuju bentuk prevalensi yang tidak terionisasi dan lebih beracun dibandingkan dengan amonia (NH₃). Selain itu, peningkatan suhu air secara signifikan dapat mengurangi saturasi oksigen terlarut (DO) (Timmons & Ebeling, 2013). Efek suhu air pada DO dapat menjadi pembatas dalam beberapa keadaan, seperti ikan dan bakteri aerob dalam filter biologis yang bersaing untuk DO (Hugs, 2020).

6.1.3 Kadar Oksigen Terlarut (DO) Dalam Air Akuarium

Hasil pemeriksaan DO pada penelitian ini menunjukkan nilai 5-8 ppm, hal ini menunjukkan bahwa kondisi lingkungan perairan dalam akuarium perlakuan ikan

zebra mendapatkan cukup oksigen dan teraerasi dengan baik sehingga ikan dapat hidup dengan baik.

Oksigen hanya sebagian yang larut dalam air dalam kondisi standar, dan kelarutannya menjadi sangat menurun dengan sejalan meningkatnya suhu air, ketinggian, dan salinitas. Selain itu kelarutan air yang rendah dapat disebabkan kondisi saat meningkatnya kebutuhan DO oleh ikan dan bakteri aerobik seiring dengan meningkatnya suhu air, meningkatnya intensitas pemberian pakan, dan kepadatan ikan yang tinggi. Dalam sistem akuakultur ikan zebra, oksigen dapat menjadi terbatas ketika tangki / akuarium dikeluarkan dari system untuk dilakukan prosedur penelitian. Dalam keadaan ini, DO bisa turun ke level yang sangat rendah. Makanan yang tidak dimakan dan padatan yang membusuk dalam sistem resirkulasi juga dapat menciptakan kondisi pembatas DO karena bakteri aerob berkembang biak dan mengonsumsi DO dari sistem air. Oleh karena itu, tangki kultur, bak, dan filter harus benar-benar dibersihkan dari limbah padat pada jadwal waktu yang dilakukan secara rutin (Hugs, 2020).

Summerfelt dan Sharrer (2004) secara langsung memeriksa DO yang dikonsumsi oleh biofilter pasir terfluidisasi yang melekat pada sistem produksi salmonid dan didapatkan hasil kehilangan DO hampir 4 ppm dari biofilter saja. Perhitungan ini menyumbang 35% dari total DO dihilangkan dengan sistem budidaya. Mereka menyarankan bahwa air diaerasi terlebih dahulu setelah penggantian biofilter dan sebelum digunakan kembali untuk sistem budidaya. Dalam kondisi normal, DO harus dilakukan pemeriksaan setiap minggu dalam sistem ikan zebra dan lebih sering

dalam sistem dengan beban biologis yang berat (kepadatan ikan yang tinggi). Mereka merekomendasikan agar DO dipertahankan pada atau mendekati nilai saturasi (6-8 ppm) setiap saat meskipun secara tradisional sistem akuakultur menetapkan standar yang lebih rendah yaitu 5-6 ppm (Timmons & Ebeling, 2013).

6.1.4 Kadar Nitrat (NO₃) dalam Air Akuarium

Dalam penelitian ini telah dilakukan pengukuran kadar Nitrat (NO₃) pada air akuarium ikan zebra. Dari hasil pengukuran sampel air dari setiap perlakuan perbedaan jalur infeksi didapatkan hasil pada hari ke-7 kadar nitrat menunjukkan angka 0 mg/L, sedangkan pada hari ke 14 untuk kelompok kontrol menunjukkan angka 0 mg/L dan untuk kelompok perlakuan A, B, dan C menunjukkan adanya peningkatan yaitu pada skala 0-12,5 mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa kadar nitrat dalam air akuarium selama proses penelitian menunjukkan bahwa masih tergolong dalam batas kadar nitrat yang aman bagi kehidupan ikan zebra.

Nitrit dioksidasi menjadi nitrat (NO₃), produk akhir nitrifikasi, dan jauh lebih tidak beracun daripada amonia atau nitrit. Dalam sirkulasi sistem akuakultur, konsentrasi nitrat akan meningkat seiring waktu kecuali pertukaran air sering dilakukan atau perbaikan tambahan dengan denitrifikasi atau pemberian tanaman air yang dapat meningkatkan penyerapan. Peningkatan kadar nitrat dalam sistem ini terkait erat dengan jumlah ammonia yang memasuki sistem dan laju nitrifikasi. Beberapa variabel yang dapat mempengaruhi ekskresi ammonia antara lain yaitu suhu, laju pemberian

pakan, konsentrasi protein pakan, dan kepadatan populasi ikan juga akan mempengaruhi sintesis nitrat (Poxton, 2003; Hugs, 2020).

Mekanisme toksisitas untuk nitrat mirip dengan nitrit dalam hal ia mengubah hemoglobin menjadi met-hemoglobin, dan dengan demikian, mengurangi efisiensi transportasi oksigen. Nitrat kurang mampu menembus membran insang dibandingkan dengan nitrit, hal ini menjadikan untuk tingkat kadar nitrat yang relatif tinggi dapat menyebabkan toksisitas pada ikan. Toksisitas nitrat meningkat seiring dengan konsentrasi nitrat dan waktu paparan. Beberapa upaya dapat digunakan untuk menurunkan kadar nitrat yakni dengan meningkatkan ukuran tubuh ikan, salinitas air, dan adaptasi lingkungan. Selain itu, hewan air tawar tampaknya lebih sensitif terhadap nitrat jika dibandingkan dengan hewan laut (Noga, 2010; Hugs, 2020).

Efek racun nitrat sangat bervariasi di antara ikan spesies salmonids, tampaknya paling sensitif, menunjukkan masalah fisiologis pada konsentrasi nitrat kurang dari 10 ppm (mg/L). Beberapa spesies ikan menunjukkan kemampuan untuk dapat bertahan pada konsentrasi nitrat mulai dari 200 hingga 2000 ppm untuk eksposur 24-96 jam. Nitrat lebih merupakan masalah yang kronis sehingga studi mengenai penyakit toksisitas akut masih terbatas (Noga, 2010; Hugs, 2020).

Dalam beberapa penelitian menyarankan tingkat aman untuk kandungan nitrat dalam air adalah di bawah 10 ppm (mg/L) untuk sebagian besar spesies ikan air tawar dan kurang dari 2 ppm (mg/L) untuk spesies air tawar yang sensitive. Kandungan nitrat di bawah 50 ppm (mg/L) dianggap sebagai tingkat yang aman untuk sebagian besar spesies. Penelitian terdahulu telah mempelajari efek akut dan kronis terhadap paparan

nitrat pada ikan zebra dan ditemukan tidak ada efek negatif pada embrio, larva yang baru menetas atau larva yang berenang pada konsentrasi nitrat kurang dari 1000ppm (Learmonth & Paulo, 2015).

Studi yang sama tidak menemukan efek negatif pada ikan zebra selama 23 hari pertama setelah pembuahan (dpf) pada konsentrasi nitrit hingga 200 ppm. Studi lain menyebutkan bahwa konsentrasi nitrat 400 ppm menunjukkan dapat mengurangi kelangsungan hidup, pertumbuhan, dan perkembangan ikan zebra. (Learmonth & Paulo, 2015). Studi ini menyarankan tingkat keamanan 200 ppm (mg/L) untuk nitrat pada ikan zebra. Pereira *et al*, (2017) meneliti efek kronis paparan nitrat pada ikan zebra remaja dan melaporkan bahwa paparan kadar nitrat di atas 100 ppm selama 28 hari menunjukkan perbedaan histopatologi yang signifikan pada kulit, insang, ginjal, hati, dan usus. Meskipun pertumbuhan ikan tidak berbeda secara signifikan antara kelompok, penelitian ini menunjukkan korelasi negatif yang kuat dalam pertumbuhan dengan meningkatnya konsentrasi nitrat di atas 100 ppm (konsentrasi terendah yang diperiksa). Tidak ada kematian yang terdeteksi hingga 200 ppm, tetapi kematian dilaporkan sebesar 47% untuk ikan zebra yang terpapar 400 ppm selama 28 hari (konsentrasi tertinggi yang diuji). Beberapa penelitian yang telah dilakukan, merekomendasikan kadar nitrat yang aman yakni kurang dari 100 ppm (tingkat terendah yang diperiksa) sedangkan untuk paparan dalam jangka panjang merekomendasikan tingkat keamanan nitrat yakni kurang dari 50 ppm (Pereira *et al*, 2017).

6.1.5 Kadar Nitrit (NO₂) dalam Air Akuarium

Dalam penelitian ini pengukuran kadar Nitrit (NO₂) dalam air dilakukan dengan menggunakan Nitrit (NO₂) *test kit*. Hasil pengukuran pada hari ke 7 dan ke 14 dari perlakuan A, B, C dan Kontrol menunjukkan nilai <3 ppm (mg/L). Nilai yang di dapat adalah merupakan nilai indikator terendah pada test kit yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa kadar nilai Nitrit (NO₂) dalam air akuarium ikan zebra yang digunakan dalam penelitian ini berada dalam kondisi yang baik yakni menunjukkan pada nilai terendah dari alat uji yang digunakan.

Amonia dioksidasi dalam nitrifikasi menjadi nitrit (NO₂) bentuk lain dari limbah nitrogen yang beracun pada tingkat konsentrasi rendah. Toksisitas terjadi ketika molekul NO₂ dalam air secara aktif masuk melintasi epitel insang dan mengoksidasi molekul hemoglobin yang dihasilkan menjadi met-hemoglobin. Prevalensi dari met-hemoglobin dapat mengurangi efisiensi transfer oksigen dan dalam konsentrasi tinggi dapat mengakibatkan potensi sesak napas bahkan hingga kematian. Patologi untuk kondisi ini adalah sering disebut dengan penyakit darah coklat dan mengacu pada perubahan warna hemoglobin ketika diubah menjadi met-hemoglobin (Noga, 2010 ; Hugs, 2020). Masuknya nitrit dari lingkungan terjadi melalui protein saluran untuk ion monovalen, seperti Cl, Br, dan HCO₃, dengan demikian peningkatan kehadiran ion-ion ini akan berfungsi sebagai inhibitor kompetitif untuk nitrit dan mengurangi toksisitas. Toksisitas nitrit dapat dikurangi, tetapi tidak dapat hilang, yakni melalui penambahan klorida dalam air dengan rasio klorida: nitrit adalah 20:1 atau lebih tinggi (Timmons & Ebeling, 2013).

Meskipun air laut memiliki konsentrasi klorida yang sangat tinggi, beberapa spesies ikan laut mungkin masih dapat menunjukkan indikasi keracunan nitrit pada konsentrasi nitrit yang sangat tinggi (Noga, 2010). Toksisitas nitrit sangat bervariasi di antara spesies ikan. Nilai median LC_{50} dapat berkisar dari 0,6 hingga 200 ppm, tergantung pada spesies dan kondisi perairan, penelitian terdahulu merekomendasikan bahwa konsentrasi nitrit sebaiknya tetap di bawah 0,1 ppm untuk menghindari kemungkinan paparan toksisitas jangka panjang. Penelitian lain mendeteksi adanya penurunan pertumbuhan pada ikan zebra dewasa pada paparan nitrit kronis selama 28 hari dengan konsentrasi 73 ppm dan 130 ppm (mg/L) yang signifikan secara statistik. Studi yang sama melaporkan LC_{50} 96 jam untuk ikan zebra dewasa pada 386 ppm (Vosla'rova' *et al*, 2008; Hugs, 2020).

6.1.6 Kadar Amonia (NH_3) dalam Air Akuarium

Hasil pemeriksaan kadar TAN yang diperoleh dalam penelitian ini yakni pada hari ke 7 adalah 0 ppm, sedangkan pada hari ke 14 adalah 0,25 ppm. Hasil pada kelompok perlakuan A, B, C dan Kontrol menunjukkan nilai yang sama. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai TAN dalam air akuarium ikan zebra selama masa penelitian masih dalam batas yang tidak terlalu membahayakan bagi ikan, dan kadar nilai TAN masih dibawah 1 ppm.

Terdapat dua bentuk Amonia yang ada dalam kesetimbangan amonia tidak terionisasi (NH_3) dan ammonia yang terionisasi (NH_4), gabungan dari kedua senyawa kimia ini disebut dengan Total Ammonia Nitrogen (TAN). Ion ammonium (NH_4) jauh

lebih tidak beracun daripada amonia yang tidak terionisasi (NH_3). Prevalensi amonia yang tidak terionisasi (NH_3) sangat tergantung pada pH dan, pada suhu yang lebih rendah dalam sistem kultur. Untuk sebagian besar spesies ikan, kadar amonia terionisasi (NH_3) tidak boleh melebihi 0,05 ppm, dan total amonia nitrogen (TAN) seharusnya tidak melebihi 1 ppm untuk paparan jangka panjang. Lingkungan air untuk tempat budidaya ikan harus menjaga agar kadar nilai TAN sedekat mungkin dengan 0 ppm (Timmons & Ebel, 2013).

Amonia dilepaskan ke lingkungan perairan selama penguraian bahan organik dan sebagai produk sisa metabolisme ikan. Bentuk ammonia yang tidak terionisasi mendominasi pada pH dan suhu yang lebih tinggi dan dianggap lebih beracun bagi ikan, karena lebih mudah melintasi insang. Namun, setelah melewati insang, NH_3 akan diubah menjadi NH_4 , yang lebih beracun bagi tubuh ikan, dapat merusak struktur seluler, dan metabolisme. Peningkatan kadar ammonia dapat menyebabkan peningkatan konsumsi oksigen pada jaringan seiring dengan berkurangnya transport oksigen ke jaringan (Katrina *et al*, 2020).

6. 2 Pemeriksaan *Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Metode deteksi molekuler digunakan untuk melakukan analisis terhadap adanya asam nukleat dalam sampel untuk mengidentifikasi virus. Metode ini merupakan metode deteksi laboratorium yang paling umum digunakan untuk diagnosis klinis COVID-19 adalah *Reverse Transcriptase Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Metode ini adalah sama dengan metode yang telah digunakan dalam

diagnosis dan pengawasan berbagai penyakit virus terdahulu termasuk SARS-CoV dan MERS-CoV (Cheng *et al*, 2020).

Umumnya, RT-qPCR kuantitatif (RT-PCR) memiliki spesifisitas yang tinggi karena merupakan pengujian utama (*gold standart*) untuk diagnosis akhir COVID-19. Namun, sensitivitasnya dapat bervariasi berdasarkan viral load, teknik ekstraksi RNA, sumber pengambilan sampel, dan stadium penyakit selama pengambilan sampel. Memang, hasil positif palsu RT-PCR dapat terkait dengan kontaminasi silang dari sampel dan maupun kesalahan dalam penanganan sampel. Sebaliknya, ketidakakuratan selama tahap pengumpulan, penyimpanan, dan pemrosesan sampel dapat menyebabkan hasil negatif palsu. Beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa sampel dari saluran pernapasan bagian atas yakni (bagian bawah) lubang hidung dan orofaring) lebih diutamakan untuk uji RT-PCR sebagai akibat dari banyaknya virus yang berkembang pada lokasi tersebut (Giuseppe *et al*, 2020).

Pada penelitian ini, pengujian RT-PCR dilakukan untuk melakukan identifikasi keberadaan virus SARS CoV-2 pada ikan zebra, hal ini untuk melihat kemampuan virus SARS CoV-2 dalam menginfeksi ikan Zebra baik melalui intervensi secara langsung ke tubuh ikan zebra maupun infeksi melalui lingkungan. Pengujian RT PCR juga dilakukan untuk menguji sampel air akuarium ikan zebra, hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah ikan zebra memiliki kemampuan untuk menularkan virus SARS-CoV-2 ke lingkungan perairan. Pemeriksaan RT-PCR pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 3 gen target sebagai tanda identifikasi terhadap adanya virus SARS CoV 2 pada sampel uji, yakni gen Orf1b (*Open reading frame 1b*), gen RdRp

(*RNA dependent RNA Polymerase*), dan RPP 30 (*ribonuclease P/MRP subunit p30*).

Batas nilai CT dari hasil RT PCR yang dianggap positif pada penelitian ini adalah 40.

Dengan menggunakan nilai cutoff Ct ini, hasil negatif palsu dapat mungkin saja dapat terjadi. Oleh karena itu, kehadiran bahan seluler, seperti adanya sel inang yang terinfeksi sangat penting digunakan untuk deteksi RNA SARS-CoV-2 yang benar dengan metode RT-PCR pada spesimen. RPP30 dapat berfungsi sebagai indikator untuk konten seluler, atau indikator pengganti untuk kualitas spesimen. Analisis kami menunjukkan bahwa spesimen klinis dengan kandungan seluler yang tinggi, dapat diukur dengan kadar RNA dari gen *housekeeping* ribonuklease P/MRP subunit p30 (RPP30), hal ini dapat memberikan tingkat positif yang jauh lebih tinggi dalam deteksi SARS-CoV-2. Faktanya, deteksi RNA SARSCoV-2 yang ditemukan dalam spesimen saluran pernapasan sangat terkait dengan konten seluler yang diwakili oleh tingkat kehadiran RNA RPP30. Gen *housekeeping* RPP30 ini digunakan sebagai marker keberadaan bahan seluler dan sebagai referensi internal (Yafei *et al*, 2020).

Orf1b (*Open reading Frame*) adalah gen yang mengkode Non structural protein (Nsp) 12-16 pada *Coronavirus*. Gen ini sering dijadikan target sebagai penemuan obat-obat antivirus terhadap virus corona. Gen ini juga merupakan gen yang paling jarang mengalami perubahan / mutasi genetik (*conserved gene*) dalam virus corona. Gen ini digunakan sebagai konfirmatif terhadap adanya virus corona dalam sampel uji (Subissi *et al*, 2014).

Nsp12 (102 kDa) adalah protein yang paling terkonservasi dalam virus corona, dan dengan demikian merupakan enzim sentral dalam replikasi/transkripsi virus

kompleks. Nsp12 ini disebut juga dengan RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) yang menghadirkan semua motif RdRps (Subissi *et al*, 2014). Protokol uji real time RT-PCR pertama yang menargetkan *RNA-dependen RNA polimerase* (RdRp), amplop (E), dan gen nukleokapsid (N) dari SARS-CoV-2 diterbitkan pada 23 Januari 2020. Di antara pengujian ini, gen RdRp memiliki sensitivitas analitik tertinggi (3,8 salinan/reaksi RNA pada deteksi 95% kemungkinan). Dalam uji RdRp yang diterbitkan ini, probe 1 adalah "*pan Sarbeco-Probe*" yang akan mendeteksi virus SARS-CoV-2, SARS-CoV, dan coronavirus yang terkait dengan kelelawar, sedangkan probe 2 (disebut uji "*RdRp-P2*" dalam penelitian ini) dilaporkan spesifik untuk SARS-CoV-2 dan seharusnya tidak mendeteksi SARS-CoV. Khususnya, pengujian ini dirancang dan divalidasi menggunakan teknologi asam nukleat sintetis dan dalam tidak adanya isolat SARS-CoV-2 yang tersedia atau spesimen asli pasien (Corman *et al*, 2019). Uji RdRp yang dilaporkan telah dilaksanakan lebih dari 30 laboratorium di Eropa (Reusken *et al*, 2020).

Pengujian COVID-19 dengan menggunakan target gen RdRp tidak bereaksi silang dengan coronavirus patogen lainnya yang menyerang manusia dan patogen saluran pernapasan lain pada kultur sel dan spesimen klinis, sedangkan uji RdRp-P2 bereaksi silang dengan SARS-CoV pada pengujian dengan kultur sel. Uji COVID-19 dengan menggunakan gen RdRp sangat sensitif dan spesifik dapat membantu meningkatkan keakuratan diagnosis pemeriksaan sampel COVID-19 di Laboratorium (Chan *et al*, 2020).

6.2.1 Pembahasan Hasil RT-PCR Ikan Zebra

Hasil pemeriksaan uji RT PCR dalam penelitian ini menunjukkan hasil positif pada hari pertama dan ketiga post infeksi dari tiga jalur infeksi yang diberikan yakni melalui tetes air (kelompok A), injeksi secara intra peritoneal (kelompok B) dan tetes insang (kelompok C). Hal ini menunjukkan bahwa virus SARS-CoV-2 dapat menginfeksi masuk ke dalam tubuh ikan zebra. Pada kelompok A menunjukkan infeksi yang diperoleh dari lingkungan perairan dengan pemberian titer virus SARS-CoV-2 pada air sebesar $2,25 \times 10^4$ pfu/mL sampai dengan 3×10^4 pfu/ml (Kelompok A2 dan A3) sudah dapat menginfeksi ikan zebra.

Selain didapatkan dari lingkungan, pemberian virus SARS-CoV-2 juga diinfeksi langsung ke dalam tubuh ikan zebra pada Jalur intra peritoneal dengan titer virus sebesar $6,75 \times 10^2$ sampai dengan 9×10^2 pfu/mL (Kelompok B2 dan B3) sudah dapat menginfeksi ikan zebra, sedangkan melalui tetes insang dalam penelitian ini dapat masuk dan menginfeksi ikan zebra dengan titer virus mulai dari 9×10^2 pfu/mL sampai dengan 18×10^2 pfu/mL (kelompok C1 sampai dengan C3).

Kemampuan respon imun yang baik pada ikan zebra memungkinkan ikan zebra untuk dengan cepat dapat mengeliminasi virus atau pathogen yang menginfeksi di dalam tubuh mereka, oleh karena itu hasil RT PCR ikan zebra yang terdeteksi positif adalah pada hari pertama dan ketiga setelah infeksi. Hal ini terlihat juga dengan tidak adanya kematian ikan zebra dalam penelitian ini. Induksi respon imun bawaan antivirus tergantung pada pengenalan komponen virus oleh inang. Sel-sel sistem kekebalan mendeteksi virus melalui reseptor pengenalan pola (*Pattern Recognition Receptors* /

PRRs) yang terletak di dalam sel atau di permukaan sel. Gen TLR (*Toll Like Receptor*) adalah merupakan salah satu bagian penting dari PRR yang dapat berfungsi sebagai pertahanan terhadap patogen. TLR telah dipelajari pada ikan zebra sebagai respons terhadap bakteri dan rangsangan virus. Mengenai pengenalan virus pada ikan zebra, *tlr3*, *tlr7*, *tlr8a/b*, *tlr9* dan *tlr22*, yang unik pada ikan, telah dikaitkan dengan respon terhadap virus. Di satu sisi, *tlr3* dan *tlr22* berbagi kemiripan yang signifikan mengenai lokalisasi seluler dan fungsi molekuler serta dapat mendeteksi replikasi virus dengan mengikat RNA untai ganda (dsRNA) atau poli analog I:C. Di samping itu, *tlr7* dan *tlr8* secara khusus mengenali RNA untai tunggal (ssRNA), dan *tlr9* mengenali DNA CpG yang tidak termetilasi dan terdapat dalam genom virus (Varela *et al*, 2017).

Virus pada ikan umumnya dapat menginfeksi dan menyebabkan penyakit baik pada tahap perkembangan larva maupun pada ikan zebra dewasa. Sebagian besar virus pada ikan memiliki suhu replikasi optimal yang rendah, umumnya lebih rendah dari suhu 24 °C, yang berarti bahwa infeksi eksperimental terjadi pada suhu di bawah suhu pertumbuhan optimal untuk ikan zebra. Meskipun fakta itu dapat dianggap dapat merugikan ikan dan kapasitas respon imunnya, namun pada kenyataannya telah ditunjukkan bahwa ikan zebra mampu menunjukkan respons imun antivirus yang efisien bahkan pada suhu 15 °C. Zebrafish memiliki sistem kekebalan yang sangat berkembang yang memungkinkan studi mendalam tentang aspek-aspek dasar respon imunologi dan interaksinya dengan organisme dan patogen yang berbeda. Komponen seluler utama dari sistem imun bawaan ikan zebra adalah makrofag fagositik dan neutrofil, yang mirip dengan yang ada pada mamalia dalam hal morfologi, bentuk

molekul dan fungsionalitasnya, dimana hal ini sangat penting bagi suatu organisme untuk bisa bertahan dalam melawan pathogen dan infeksi (Varela *et al*, 2017).

Valerio *et al* (2021) juga melaporkan bahwa infeksi SARS CoV-2 yang dilakukan pada larva ikan zebra baik melalui metode perendaman dan juga injeksi pada larva ikan zebra tidak menunjukkan gejala penyakit yang ditimbulkan. RNA Virus dengan mudah terdeteksi pada 6 jam setelah paparan kemudian menurun dan menjadi tidak terdeteksi pada 48 jam setelah paparan. Penelitian dengan menggunakan protein rekombinan Spike SARS CoV-2 yang diinfeksi kepada larva ikan zebra telah dilakukan oleh Sylwia *et al* (2021) dan menunjukkan hasil bahwa, tingkat mRNA gen pengkodean interferon (Ifng) terlihat meningkat drastis pada 6 jam setelah paparan tetapi mereka kembali ke tingkat basal pada 12 jam setelah paparan.

Fenomena ini juga dilaporkan terjadi pada virus SARS-CoV-2 yang dilakukan kultur pada sel. Glenn *et al* (2021) melakukan penelitian dengan menanam virus SARS-CoV-2 pada sel *well-differentiated normal human bronchial epithelial (wdNHBE)* dan sel Vero E6 didapatkan hasil bahwa titer virus SARS-CoV-2 tertinggi pada 72 jam setelah inokulasi kemudian terjadi penurunan titer pada 96 jam setelah infeksi, sedangkan Alexander *et al* (2020) juga telah melakukan pengembangan virus SARS-CoV-2 pada berbagai jenis sel antara lain yaitu Vero E6 (ATCC# CRL-1586), Calu-3 (ATCC# HTB-55), Caco-2 (ATCC# HTB-37), Huh7, A549 (ATCC# CCL-185), dan sel 293T, yang pertumbuhan Virus SARS-CoV-2 paling tinggi terdapat pada 24 jam setelah inokulasi, kemudian terus menurun pada 48 jam , 72 jam , 96 jam setelah inokulasi.

Selain itu, mutasi dari Virus SARS-CoV-2 kemungkinan juga dapat memberikan pengaruh terhadap hasil pemeriksaan RT PCR dalam penelitian ini. Virus SARS-CoV-2 ini memiliki karakteristik yang sering bermutasi. Akumulasi frekuensi mutasi virus dapat disebabkan oleh berbagai hal antara lain yaitu seleksi alam, lingkungan seluler, fitur epidemiologi baru-baru ini, penyimpangan genetik acak, respons imun inang, pengeditan gen, mekanisme replikasi dan sebagainya. SARS-CoV-2 memiliki *fidelitas* yang lebih tinggi dalam proses transkripsi dan replikasinya dibandingkan virus RNA untai tunggal lainnya karena memiliki mekanisme proofreading diatur oleh NSP14. Namun, 13402 mutasi tunggal telah terdeteksi dari 31421 SARS-CoV-2 isolat genom. Frekuensi tinggi di ujung kanan posisi primer atau probe target mungkin akan menghasilkan lebih banyak negatif palsu dalam diagnostic (Rui *et al*, 2020).

Meskipun adanya *RNA proofreading exoribonuclease* (nsp14-ExoN), genom SARS-CoV-2 yang beredar menunjukkan beberapa mutasi baik pada manusia maupun hewan. Mutasi ini dapat menyebabkan ketidakcocokan jika terjadi pada primer atau daerah pengikatan probe, sehingga menghasilkan negatif palsu. Selain itu, ketidakcocokan nukleotida tunggal dapat mempengaruhi pada beberapa siklus pertama PCR, tetapi dengan desain yang tepat, deteksi target mungkin tidak terpengaruh (Gribble *et al*, 2021).

Penelitian deteksi SARS CoV-2 pada hewan telah dilakukan dengan mengevaluasi 28 tes PCR diagnostik yang awalnya dikembangkan untuk mendeteksi SARS-CoV-2 pada manusia yang kemudian digunakan untuk mendeteksi SARS-CoV-

2 pada hewan. Enam belas dari 28 tes PCR yang diselidiki menunjukkan setidaknya satu ketidakcocokan dengan target mereka pada ambang 0,5%. Ketidakcocokan ini dikaitkan dengan adanya evolusi berkelanjutan yang terjadi di SARS-CoV-2 pada hewan. Beberapa ketidaksesuaian ini diperkirakan akan berdampak negatif terhadap tes PCR diagnostik. Oleh karena itu, kami menyarankan beberapa modifikasi pada barisan oligo. Saran ini diharapkan mampu menghasilkan pengikatan template yang lebih kuat oleh oligos, meningkatkan sensitivitas yang lebih baik dari tes, dan kepercayaan yang lebih tinggi dalam hasil pemeriksaan. Saat virus SARS-CoV-2 terus berlanjut untuk berevolusi pada hewan dan mengakumulasi mutasi dalam genomnya, sangat penting untuk sering dilakukan pemantauan efek dari mutasi ini terhadap tes PCR diagnostik dan memodifikasinya. Hal Ini akan mengurangi kemungkinan hasil negatif palsu dan diharapkan dapat membantu mengontrol pandemi COVID-19 pada hewan dan manusia (Elaswad & Fawzy, 2021).

Genom ikan zebra mengandung gen yang unik, dan memiliki susunan gen yang sama dengan manusia pada gen yang mengkode ACE2, reseptor SARS-CoV-2. namun, konservasi sederhana asam amino pada ikatan permukaan membuat protein ACE2 pada ikan tidak mungkin mengikat protein spike virus secara efisien (Damas et al, 2020). Terlepas dari prediksi *in silico* ini, kerentanan suatu inang terhadap virus SARS-CoV-2 memerlukan validasi eksperimental, terutama mengingat bahwa banyak reseptor dan koreseptor lain untuk SARS-CoV-2 telah diidentifikasi (Zamorano Cuervo & Grandvaux, 2020).

Dalam larva ikan zebra, berdasarkan sel tunggal transkriptomik, ACE2 sangat diekspresikan dalam subtype enterosit (Postlethwait et al, 2020). Usus juga merupakan organ dengan ekspresi ACE2 terkuat pada manusia. Baru-baru ini telah dilakukan penelitian penggunaan ikan zebra dalam mempelajari COVID-19 dan melaporkan efek patologis pada ikan zebra setelah dilakukan paparan dengan protein spike SARS-CoV-2 rekombinan, termasuk detak jantung yang dipercepat pada larva ikan zebra dan kerusakan penciuman parah yang menyebabkan hiposmia sementara pada ikan zebra dewasa setelah pemberian intranasal (Kraus *et al.*, 2020). Injeksi dari protein spike rekombinan pada ikan zebra dewasa juga telah dilaporkan menyebabkan efek samping (Fernandes *et al.*, 2020). Xenotransplantasi sel paru-paru manusia pada kantung renang ikan zebra dewasa telah diusulkan untuk menguji efek obat herbal pada SARS-CoV-2. Namun, hingga saat ini, tidak ada penilaian mendalam tentang kemampuan SARS-CoV-2 untuk dapat bereplikasi di dalam tubuh ikan zebra yang telah diterbitkan (Balkrisna *et al.*, 2020).

Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, telah menunjukkan bahwa ikan zebra memiliki potensi digunakan sebagai hewan coba terkait dengan infeksi virus SARS-CoV-2, dimana ikan zebra juga mempunyai gen yang mengkode reseptor ACE2 yang berperan sebagai reseptor terhadap virus SARS-CoV-2, walaupun sampai saat ini belum ada yang melaporkan mengenai infeksi virus SARS-CoV-2 secara utuh pada ikan zebra. Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang menggunakan virus SARS-CoV-2 secara utuh untuk diinfeksi ke dalam tubuh ikan zebra dewasa.

6.2.2 Pembahasan Hasil *RT-PCR* Air Akuarium

Pemeriksaan air dengan menggunakan RT PCR pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dua hal, yang pertama yakni kemampuan ikan zebra dapat tertular / terinfeksi virus SARS CoV-2 yang berada pada lingkungan perairan. Sedangkan tujuan yang kedua adalah untuk mengetahui apakah ikan zebra memiliki kemampuan dalam menyebarkan virus SARS CoV-2 ke lingkungan (perairan).

Hasil pemeriksaan RT PCR pada sampel air akuarium menunjukkan bahwa ikan zebra yang diinfeksi virus SARS-CoV-2 dapat menularkan virus ke lingkungan perairan, hal ini terlihat dari kelompok B3 maupun kelompok C1 sampai dengan C3 yang dilakukan infeksi secara langsung ke dalam tubuh ikan zebra namun ditemukan kandungan virus SARS-CoV-2 pada lingkungan air akuarium. Sedangkan pada kelompok A didapatkan kandungan virus SARS-CoV-2 pada air akuarium yang ditetesi virus SARS-CoV-2 dengan titer sebesar $2,25 \times 10^4$ pfu/mL dan 3×10^4 pfu/mL.

Pengukuran suhu Air Akuarium ikan zebra pada masing-masing kelompok perlakuan dalam masa penelitian ini berkisar antara 22 °C dan 23 °C. Hal ini memungkinkan terjadinya penurunan titer SARS CoV-2 yang terdapat pada air sehingga pada pemeriksaan air dengan menggunakan metode RT PCR Kelompok A1 hasilnya negatif sedangkan kelompok A2 dan A3 menunjukkan hasil yang positif pada hari pertama infeksi dan kemudian negatif pada hari berikutnya. Kemungkinan lain adalah terkait konsentrasi virus SARS CoV-2 yang terdapat pada sampel air masih terlalu rendah sehingga pada pemeriksaan RT PCR dengan cut off nilai CT 40 tidak ditemukan adanya virus SARS CoV-2.

Pada jalur injeksi Intraperitoneal, pada penelitian ini menunjukkan bahwa ikan zebra memiliki kemampuan dalam menularkan virus SARS-CoV-2 ke lingkungan perairan pada titer infeksi sebesar 9×10^2 pfu/mL, sedangkan pada kelompok ikan zebra yang diinfeksi dengan titer virus yang lebih rendah daripada 9×10^2 pfu/mL tidak ditemukan adanya kandungan virus SARS-CoV-2 pada lingkungan perairan. Untuk kelompok Jalur infeksi melalui tetes insang, hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa ikan zebra memiliki kemampuan untuk dapat menularkan virus SARS-CoV-2 ke lingkungan perairan pada titer infeksi mulai dari 9×10^2 pfu/mL sampai dengan 18×10^2 pfu/mL (Kelompok C1 sampai C3).

Kestabilan virus SARS CoV-2 terkait kemaampuan bertahannya dalam lingkungan perairan juga sangat dipengaruhi oleh suhu atau temperatur air. Eksperimen tentang kelangsungan hidup virus corona, yang setidaknya sebagian meniru kondisi lingkungan alam, sejauh ini hanya mempertimbangkan pengaruh suhu air. Misalnya, pada suhu $25 \text{ }^\circ\text{C}$, α -CoV menularkan gastroenteritis virus (TGEV), yang dapat menginfeksi babi dan menyebabkan kematian yang tinggi pada anak babi, diperlukan waktu selama 13 hari (air danau) dan 22 hari (reagen air) untuk pengurangan 99% titer virus. Demikian pula, virus hepatitis tikus menular (MHV) menurun 99% selama 10 hari (air danau) dan 17 hari (reagen air). Namun, pada suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$, tidak terjadi penurunan titer virus yang signifikan diamati pada titik akhir eksperimental (maksimum 49 hari). Peneliti memperkirakan bahwa, pada suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$, penurunan 99% titer infeksi TGEV dan MHV akan membutuhkan waktu 220 hari atau bisa lebih dari satu tahun, masing-masing (Casanova *et al*, 2009; Adrian & Piotr, 2020).

Penelitian lain telah menunjukkan bahwa HCoV-229E dan *Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV)* pada kucing jauh kurang stabil dalam air keran yang disaring atau tidak disaring pada 23 °C jika dibandingkan dengan virus polio-1. Penurunan 99,9% pada titer coronavirus diamati setelah 10-12 hari, sedangkan poliovirus-1 ditunjukkan dapat bertahan hidup sampai dengan 43-47 hari. Namun, pada suhu 4 °C, baik HCoV-229E dan FIPV mengungkapkan persistensi yang diperpanjang secara signifikan, perkiraan waktu yang diperlukan untuk penurunan 99% pada titer virus untuk HCoV-229E dan FIPV masing-masing adalah 392 dan 87 hari (Gundy *et al*, 2009; Adrian & Piotr, 2020). SARS-CoV hanya bertahan dua hari dalam air keran yang dideklorinasi pada suhu 20 °C tetapi bertahan setidaknya 14 hari (titik akhir studi) pada suhu 4 °C (Adrian & Piotr, 2020).

Namun demikian, kelangsungan hidup yang diamati secara eksperimental dari coronavirus yang dipelajari dalam air limbah adalah jauh lebih rendah daripada dalam kasus air. Perlu diperhatikan bahwa air limbah yang tidak diolah merupakan sumber mikroorganisme, misalnya bakteri, yang keberadaannya setidaknya sampai batas tertentu dapat mengurangi keberadaan virus (Feichtmayer *et al*, 2017). Dalam limbah primer waktu yang dibutuhkan untuk penurunan titer virus sebesar 99% adalah 1,6 hari (tanpa filter) dan 2,3 hari (dengan filter) untuk HCoV-229E sedangkan 1,7 hari (tanpa filter) dan 1,6 hari (dengan filter) untuk FIPV. Dalam kasus limbah sekunder, pengurangan 99% titer virus terjadi setelah 1,8 hari untuk HCoV-229E dan 1,6 hari untuk FIPV (Gundy *et al*, 2009; Adrian & Piotr, 2020).

Pengaruh suhu air limbah dinyatakan dengan jelas dalam penelitian untuk menyelidiki kelangsungan hidup SARS-CoV pada suhu 20 °C virus dapat bertahan pada air limbah rumah sakit hanya selama 2-3 hari, sementara pada suhu 4 °C tetap terdeteksi setidaknya selama 14 hari, titik akhir studi. Deteksi RNA virus tidak sama dengan infektivitas, seperti yang ditunjukkan dengan jelas pada studi lain di mana materi genomik SARS-CoV terdeteksi dalam air limbah rumah sakit yang tidak diolah, meskipun hal ini terbukti dilakukan dengan menggunakan sel secara *in vitro* (Wang *et al*, 2005; Adrian & Piotr, 2020).

Memahami peran ekosistem perairan dalam konteks ini juga penting dari kesehatan manusia, karena air yang tidak diolah dapat sebagai sumber dari berbagai patogen, digunakan dalam berbagai daerah, terutama yang sanitasinya buruk. Ini juga akan membantu untuk memahami bahwa biota air dapat memainkan peran potensial sebagai inang perantara sehingga manusia dapat tertular virus corona. Proses seperti itu, tetap membutuhkan spike glikoprotein yang memediasi masuknya virus corona ke dalam sel untuk pertama kali dioptimalkan dalam inang untuk dapat berikatan dengan reseptor *human-like angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)*, *alanyl aminopeptidase (CD13)*, *dipeptidyl peptidase 4 (CD26)* atau Reseptor masuk lainnya melalui seleksi alam (Hoffmann *et al*, 2020).

6.3 Pembahasan Histopatologi Ikan Zebra

Pemeriksaan histopatologi pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perubahan pada organ atau jaringan ikan zebra yang dilakukan infeksi

dengan virus SARS-CoV-2 utuh. Beberapa organ yang dilakukan pengamatan histopatologi dalam penelitian ini yakni Insang, Hepar, Usus, Organ Reproduksi, Otot dan Mata.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada jalur pemberian tetes air yang hanya pada Kelompok A3 (pemberian titer virus 3×10^4 pfu/mL) terdapat perubahan pada organ insang mulai dari hari ke 1 sampai dengan hari ke 7 setelah infeksi awal, sedangkan pada organ-organ yang lainnya pada kelompok yang diinfeksi virus SARS-CoV-2 melalui tetes air tidak ditemukan adanya perubahan histopatologi. Kelainan histopatologi yang ditemukan berupa adanya infiltrasi sel radang dan haemorrhagi pada insang ikan zebra.

Pada kelompok perlakuan injeksi peritoneal ditemukan kelainan histopatologi hanya pada Kelompok B3 dengan pemberian virus SARS-CoV2 sebesar 9×10^2 pfu/mL. Kelainan histopatologi yang ditemukan terdapat pada organ insang mulai dari hari ke 1 sampai dengan hari ke 14 setelah infeksi awal, sedangkan pada organ reproduksi dan mata ditemukan pada hari ke 9 dan ke 14 setelah infeksi awal. Kelainan yang ditemukan pada insang ikan zebra kelompok ini adalah berupa infiltrasi sel radang, hiperplasia epitel dan juga hemoragi. Pada organ reproduksi dan mata, kelainan histopatologi ikan zebra yang ditemukan pada kelompok ini yakni berupa hemoragi.

Pada kelompok perlakuan tetes insang sebagai jalur infeksi yang paling banyak menyebabkan perubahan organ atau jaringan dibandingkan dengan jalur infeksi lainnya. Pada kelompok perlakuan ini didapatkan kelainan histopatologi pada organ insang, organ reproduksi dan organ mata, sedangkan pada organ lainnya tidak ditemukan

kelainan histopatologi. Pada organ insang didapatkan adanya kelainan histopatologi pada semua kelompok C1 (9×10^2 pfu/mL), C2 ($13,5 \times 10^2$ pfu/mL), dan C3 (18×10^2 pfu/mL) sampai dengan hari ke 7 setelah proses infeksi, sedangkan pada hari ke 9 dan 14 yang menunjukkan adanya kelainan histopatologi hanya pada kelompok C2 dan C3. Kelainan yang ditemukan pada insang ikan zebra kelompok ini berupa infiltrasi sel radang dan hemoragi. Pada organ reproduksi dan mata ikan zebra kelainan histopatologi yang ditemukan pada kelompok ini yakni berupa hemoragi.

Pada penelitian ini melaporkan bahwa kelainan histopatologi yang paling banyak ditemukan pada ikan zebra dengan infeksi virus SARS-CoV-2 berupa infiltrasi sel radang dan hemoragi. Sedangkan organ yang paling banyak mengalami perubahan secara histopatologi adalah organ insang. Menurut Barreto *et al* (2007), insang sangat sensitif terhadap zat beracun yang terlarut dalam lingkungan berair karena kontak langsung mereka dengan air dalam pertukaran gas. Sejak Hoffman *et al* (2002) melaporkan bahwa insang adalah situs penyerapan potensial untuk agen beracun yang ada di dalam air, dan mereka dianggap sebagai situs utama untuk penyerapan agen beracun, karena dengan karakteristiknya seperti kontak permukaan yang besar, jarak difusi yang kecil, dan aliran berlawanan antara air dan darah (Igor *et al*, 2018).

Beberapa penelitian mengenai pengamatan histopatologi pada manusia yang terinfeksi SARS-CoV-2 telah dilakukan. Tian *et al* (2020) melaporkan bahwa pada sistem respirasi manusia yakni organ paru berupa infiltrasi jaringan paru oleh sel inflamasi mononuklear dengan deskuamasi epitel alveolus dan pembentukan membran hialin, penebalan interstisial dengan hiperplasia epitel alveolus tipe II, sel darah merah

terdapat di lumen alveolus bersama dengan pembentukan sumbat fibrin. Hiperplasia difus epitel alveolus tipe II dan adanya nekrosis vaskular fibrinoid dan infiltrasi sel inflamasi terutama neutrofil ke dalam lumen alveolar yang menunjukkan bronkopneumonia. Hal ini serupa dengan perubahan histopatologi yang ditemukan pada sistem respirasi ikan zebra (insang) dalam penelitian ini.

Selain pada organ respirasi, Li *et al* (2020), juga telah melaporkan keberadaan reseptor ACE 2 pada sistem genital manusia (testis). Semua testis yang terinfeksi SARS menunjukkan temuan histologis berupa nekrosis sel germinal yang luas dan penurunan spermatogenesis di tubulus seminiferus. Membran basal menebal dengan fibrosis peritubular bersama dengan infiltrasi leukosit dan kongesti vaskular di jaringan interstisial. SARS-CoV-2 juga dapat menyebabkan aktivasi sitokin inflamasi, yang dapat berpotensi menyebabkan respons autoimun. Mereka dapat menyebabkan orchitis melalui beberapa mekanisme, yang dapat menyebabkan kerusakan testis yang menyebabkan infertilitas dan kemandulan, yang lebih lanjut dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya tumor testis. Gambaran histopatologi yang ditemukan pada penelitian ini pada organ reproduksi ikan zebra berupa haemorrhagi dapat menjadi data pendukung yang melengkapi informasi perubahan organ reproduksi terkait dengan infeksi virus SARS CoV-2.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa infeksi SARS CoV-2 juga dapat menimbulkan perubahan histopatologis berupa haemorrhagi pada mata ikan zebra. Pada manusia juga terdapat penelitian yang dilakukan post mortem pada mata terhadap kerentanan terhadap virus SARS CoV-2. Hasil ini menunjukkan bahwa sel permukaan

okular termasuk konjungtiva rentan terhadap infeksi oleh SARS-CoV-2, dan karena itu dapat berfungsi sebagai portal masuk serta reservoir untuk penularan virus ini antar manusia (Lingli *et al*, 2020).

Sampai saat ini informasi mengenai temuan patologis pada COVID-19 masih sangat terbatas, meskipun virus SARS CoV-2 terutama berpengaruh pada sistem pernapasan dan sistem kekebalan tubuh, tetapi sistem lain seperti kardiovaskular, kemih (ginjal), saluran pencernaan, reproduksi (testis), dan sistem saraf juga memungkinkan dapat terpengaruh akibat infeksi SARS CoV-2, terutama pada pasien usia lanjut, lebih sering jika mempunyai factor komorbid (Deshmukh *et al*, 2021).

6.4 Pembahasan Immunohistokimia Ikan Zebra

Pemeriksaan Immunohistokimia (IHC) merupakan teknik yang kuat dalam mengeksploitasi ikatan spesifik antara antibodi dan antigen untuk mendeteksi dan melokalisasi antigen spesifik dalam sel dan jaringan, yang paling sering terdeteksi dan diperiksa dengan mikroskop cahaya. Immunohistokimia (IHC) adalah metode pengujian tambahan yang banyak digunakan dalam patologi bedah anatomi untuk klasifikasi sel, diagnosis dan menggunakan antibodi yang ditargetkan terhadap antigen tertentu dalam jaringan dan sel tertentu untuk memfasilitasi penentuan jenis sel dan organ asal (Shino *et al*, 2019).

Visualisasi interaksi antigen dengan antibodi dapat dicapai dalam beberapa cara. Contoh yang paling umum, sebuah antibodi yang terkonjugasi menggunakan enzim, seperti peroksidase (HRP) yang dapat mengkatalisis reaksi sehingga dapat

memproduksi warna. Atau, antibodi dapat ditandai juga menggunakan *fluorophore*, seperti *fluorescein* atau *rhodamine*. Jika antibodi terlabel menggunakan HRP maka pewarna yang umum digunakan adalah DAB sehingga terbentuk reaksi perubahan warna menjadi coklat. Jika antibodi terlabel menggunakan *fluorophore* yakni *rhodamin* maka perubahan warna menjadi merah, sedangkan jika *fluorescein* perubahan warna menjadi hijau (Shino *et al*, 2019).

Dalam penelitian ini IHC digunakan untuk mengetahui adanya protein Spike pada jaringan atau organ ikan zebra yang telah diinfeksi dengan virus SARS-CoV-2 melalui tiga jalur infeksi, yakni tetes air, injeksi intraperitoneal dan tetes insang. Beberapa organ yang dilakukan pengamatan imunohistokimia dalam penelitian ini yakni Insang, Hepar, Usus, Organ Reproduksi, Otot dan Mata. Keberadaan protein spike dalam jaringan atau organ ikan zebra ini menunjukkan bahwa ikan zebra dapat terinfeksi virus SARS-CoV-2.

Hasil dalam penelitian ini melalui metode pemeriksaan IHC menunjukkan bahwa ketiga jalur infeksi tersebut dapat memberikan persentase positif di atas 50% pada organ atau jaringan yang telah diperiksa dari semua Kelompok perlakuan A, B dan C. Pada kelompok A1, B1 dan C1 menunjukkan persentase positif sebesar 60% pada semua organ yang diperiksa, sedangkan Kelompok perlakuan A2 dan A3 memiliki persentase positif yang lebih besar yakni 80% pada semua organ yang diperiksa. Hasil yang menunjukkan persentase positif terbesar dalam penelitian ini yakni pada Kelompok B2, B3, C2 dan C3 dimana memiliki persentase positif sebesar 100% pada semua organ yang dilakukan pemeriksaan. Fakta ini menjadi menarik dan

menunjukkan bahwa kelompok yang negatif secara RT PCR ternyata menunjukkan hasil berbeda ketika diperiksa melalui metode IHC.

Hasil ini kemungkinan terkait dengan besarnya konsentrasi virus dalam sampel yang tidak mencukupi sehingga tidak terbaca pada saat dilakukan pemeriksaan menggunakan RT PCR dengan nilai cut off CT 40, namun ternyata ditemukan jejak protein spike SARS CoV-2 dalam organ ikan zebra. Hubungan antara nilai CT PCR dengan terdeteksinya protein Spike, belum banyak informasi. Mutasi dari virus SARS-CoV-2 yang mungkin terjadi ketika menginfeksi inang baru dalam hal ini ikan zebra juga mungkin dapat menyebabkan ketidaksesuaian dengan primer yang digunakan sehingga menyebabkan hasil pada pemeriksaan RT PCR menjadi negatif.

Hasil penelitian ini juga mengungkapkan bahwa keberadaan infeksi SARS-CoV-2 pada organ ikan zebra tidak selalu menimbulkan perubahan secara histopatologi, hal ini terlihat dari hasil histopatologi yang diperoleh pada penelitian ini. Kemampuan sistem imun ikan zebra dalam melawan infeksi virus SARS-CoV-2 kemungkinan dapat meminimalisir efek kerusakan yang ditimbulkan dari infeksi virus SARS-CoV-2, hal ini juga tampak dari tidak adanya kematian ikan zebra dalam proses penelitian ini.

Analisis ulang kumpulan data RNA-seq dari jaringan ikan zebra dewasa menunjukkan ACE2 diekspresikan sangat tinggi pada usus dan bervariasi pada organ hati, dan pada tingkat yang lebih rendah ditemukan di organ lain. Temuan ini mengimplikasikan peran translasi baru untuk ACE2 pada ikan zebra dalam diferensiasi dan patologi yang sebagian besar ditemukan di usus dan hati, di mana efek SARS-

CoV-2 dapat merugikan (Ayse *et al.*, 2020). Dalam larva ikan zebra, berdasarkan sel tunggal transkriptomik, ACE2 sangat diekspresikan dalam subtype enterosit, sejalan dengan hal tersebut telah dilaporkan bahwa usus juga merupakan organ dengan ekspresi ACE2 terkuat pada manusia (Postlethwait *et al.*,2020). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan adanya jejak protein Spike SARS-CoV-2 pada organ Hepar dan Usus Ikan Zebra.

Hasil penelitian lain pada spesimen mata, analisis imunohistokimia mengungkapkan adanya ekspresi ACE2 pada konjungtiva, limbus, dan kornea, dengan pewarnaan yang sangat menonjol di konjungtiva superfisial dan permukaan epitel kornea. Spesimen konjungtiva bedah juga menunjukkan ekspresi ACE2 di epitel konjungtiva, terutama menonjol di epitel superfisial, serta ekspresi lemah atau fokus di substansia propria. Semua spesimen mata dan konjungtiva juga mengekspresikan TMPRSS2. Akhirnya, analisis protein lysat dengan menggunakan Western blot dari epitel kornea manusia yang diperoleh selama operasi refraktif mengkonfirmasi ekspresi ACE2 dan TMPRSS2 (Lingli *et al.*, 2020). Hal ini sejalan dengan penelitian ini yakni dengan ditemukannya jejak protein spike SARS-CoV-2 pada organ mata Ikan Zebra.

Analisis PCR kuantitatif real-time dari beberapa jaringan dari ikan zebra jantan dan ikan zebra betina dewasa menunjukkan bahwa ACE2 sebagian besar diekspresikan di otak dan otot pada kedua jenis kelamin. Analisis ini mengungkapkan ekspresi ACE2 yang lebih tinggi pada jantan jika dibandingkan dengan betina untuk organ berikut: otak, gonad, jantung, otot, dan jaringan adiposa (tubuh gemuk) (Bianca *et al*, 2022). Selain itu, ikan zebra betina dan jantan menunjukkan dimorfisme yang signifikan

dalam ekspresi ACE2 yang bergantung pada usia mereka, dan antara ovarium dan testis di mana yang terakhir memiliki tingkat yang lebih tinggi (Ayse *et al.*, 2020). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan adanya jejak protein spike SARS-CoV-2 pada organ Otot dan Organ Reproduksi Ikan Zebra.

Hasil penelitian infeksi virus SARS-CoV-2 pada ikan zebra, seperti yang pernah dilakukan pada penggunaan virus H5N1 Rekombinan *Reverse genetik* (Kusala, 2019) dan virus H5N1 utuh (*wildtype*) (Lahay, 2017) memberikan gambaran bahwa ikan Zebra dapat digunakan sebagai hewan coba untuk model infeksi virus dengan struktur RNA.

6.5 Kebaruan Penelitian

Kebaruan dalam penelitian ini adalah :

1. Analisa infeksi Virus SARS-CoV2 pada ikan zebra yang menggunakan virus utuh, yang belum ada penelitian sebelumnya dengan menggunakan virus SARS-CoV-2 utuh (*wildtype*) pada hewan coba.
2. Penelitian ini juga memberikan gambaran infeksi pada tiga jalur infeksi yang berbeda yakni tetes air, injeksi intraperitoneal dan tetes insang.
3. Virus SARS-CoV-2 dapat menginfeksi ikan zebra dan ditemukan pada organ Insang, Hepar, Usus, Reproduksi, Mata dan Otot.
4. Fakta menarik ditemukan dalam penelitian ini bahwa virus SARS-CoV-2 dapat masuk dan menginfeksi ikan zebra melalui lingkungan perairan.
5. Ikan zebra memiliki kemampuan dalam menularkan virus SARS-CoV-2 ke lingkungan perairan.

6. Penelitian ini juga memberikan informasi baru mengenai penggunaan titer virus SARS-CoV-2 utuh yang dapat digunakan pada masing-masing jalur infeksi pada ikan zebra.

Hasil infeksi virus SARS-CoV-2 pada ikan zebra ini juga telah dilakukan penanaman kembali dengan menggunakan sel kultur Vero E6 dan didapatkan hasil yang positif pada pasase pertama. Penelitian ini menambahkan informasi sebelumnya dengan virus H5N1 bahwa ikan zebra memiliki potensi yang besar untuk dapat digunakan sebagai hewan coba dalam pengembangan penelitian virus SARS-CoV-2 dan virus RNA lainnya.

6.6 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini sebagai alternatif pengembangan virus SARS-CoV-2 dengan menggunakan Ikan Zebra (*Danio rerio*) dan diharapkan dapat menjadi salah satu upaya sebagai basis untuk mengembangkan cara baru dalam memproduksi vaksin halal di Indonesia masih belum sempurna karena keterbatasan tenaga, waktu, dan materi. Ketersediaan ikan zebra yang homogen dan penggunaan khusus sebagai hewan coba penelitian masih sulit didapatkan di Indonesia. Penelitian ini masih merupakan penelitian dasar yang tentunya masih perlu pengembangan dalam mengkaji variabel lain dan juga mengeksplorasi metode lain guna memperkuat hasil dalam penelitian ini. Adanya pandemi Covid-19 juga menyebabkan ketersediaan bahan penelitian berupa reagen dalam penelitian dan juga sarana penunjang dalam penelitian menjadi terganggu dan membutuhkan waktu yang lebih lama dalam realisasinya.

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan kesimpulan sebagai berikut::

1. Virus SARS-CoV-2 dapat tumbuh dan berkembang di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
2. Infeksi virus SARS-CoV-2 dapat masuk pada organ Insang, Hepar, Usus, Organ Reproduksi, Otot dan Mata pada ikan zebra (*Danio rerio*).
3. Terdapat pengaruh perbedaan jalur infeksi terhadap gambaran pertumbuhan virus SARS-CoV-2 di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
4. Ikan zebra (*Danio rerio*) memiliki kemampuan untuk menyebarkan virus ke lingkungan /air.

7.2 Saran

Penelitian ini telah menunjukkan kemampuan ikan zebra terkait dengan infeksi virus SARS-CoV-2 utuh. Untuk melengkapi dan memperkuat hasil penelitian ini variabel-variabel lain yang belum diteliti dapat dilakukan pengkajian lebih lanjut. Peningkatan titer virus SARS-CoV-2 mungkin dapat dilakukan dalam penelitian berikutnya serta penggunaan ikan zebra sebagai media kultur atau perbanyakan virus SARS CoV-2 juga dapat dilakukan pengkajian lebih lanjut terhadap potensi masing-masing organ pada ikan zebra.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A.B. 2014. Addressing ethical remedies and trust deficit. Science, Technology, Environment and Ethic. International Institute of Advanced Islamic Studies (IAIS) Malaysia.
- Adrian Wartecki and Piotr Rzymiski. 2020. On the Coronaviruses and Their Associations with the Aquatic Environment and Wastewater. *Water* 2020, 12, 1598; doi:10.3390/w12061598
- Alexander S. Jureka y , Jesus A. Silvas y and Christopher F. Basler. 2020. Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2. *Viruses* 2020, 12, 622; doi:10.3390/v12060622
- Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity*. 2020; 52(4): 583-589.
- Amanat, F. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* 26, 1033–1036 (2020).
- Ansori, A. N. M., Kusala, . M. K. J., Normalina, . I., Indrasari, . S., Alamudi, . M. Y., Nidom, . R. V., Santoso, . K. P., Rachmawati, . K. & Nidom, . C. A. (2020) Immunoinformatic Investigation of Three Structural Protein Genes in Indonesian SARS-CoV-2 Isolates. *SRP*, 11 (7), 422-434. doi:10.31838/srp.2020.7.62
- Apritasari, U. 2017. Deteksi Protein Hemagglutinin Virus Influenza H5 dan H3 Pada Ikan Zebra (Danio rerio) Menggunakan Teknik Imunohistokimia (Tesis). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Artois, J., Ippoliti, C., Conte, A., Dhingra, M.S., Alfonso, P., Tahawy, A.E., Elbestawy, A., Ellakany, H.F. and Gilbert, M. (2018) Avian Influenza A (H5N1) Outbreaks in Different Poultry Farm Types in Egypt: The Effect of Vaccination, Closing Status and Farm Size. *BMC Veterinary Research*, 14, 187. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1519-8>
- Axelrod, H.R. 1982. *Tropical Fish* (TFH publication Inc., 1982). Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Ayşe Gökçe Keskus, Melike Tombaz, Burcin I. Arıcı, Fatma B. Dincaslan, Afshan Nab i, Huma Shehwana, Ozlen Konu. *ace2* expression is higher in intestines and liver while being tightly regulated in development and disease in zebrafish. *bioRxiv* 2020.12.24.424209; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.24.424209>
- Balkrishna, A., Solleti, S. K., Verma, S., & Varshney, A. (2020). Application of Humanized Zebrafish Model in the Suppression of SARS-CoV-2 Spike Protein Induced Pathology by Tri-Herbal Medicine Coronil via Cytokine Modulation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21). <https://doi.org/10.3390/molecules25215091>
- Barreto T de R. Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) exposto ao organofosforado

- metil paration (Folisuper 600 BR®) (Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). São Paulo: Universidade Federal de São Carlos; 2007. 105 f
- Ben Hu , Hua Guo, Peng Zhou and Zheng-Li Shi. 2020. Characteristics of SARS CoV-2 and COVID-19. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- Benjamin Tsang, Rida Ansari, Robert T. Gerlai. 2020. Maintenance and breeding of zebrafish, with some ethological and ecological considerations in mind. *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817528-6.00002-4>
- Bianca H Ventura Fernandes, Natália Martins Feitosa, Ana Paula Barbosa, Camila Gasque Bomfim, Anali M. B. Garnique, Francisco I. F. Gomes, Rafael T. Nakajima, Marco A. A. Belo, Silas Fernandes Eto, Dayanne Carla Fernandes, Guilherme Malafaia, Wilson G. Manrique, Gabriel Conde, Roberta R. C. Rosales, Iris Todeschini, Ilo Rivero, Edgar Llontop, German G. Sgro, Gabriel Umaji Oka, Natalia F Bueno, Fausto K. Ferraris, Mariana T. Q. de Magalhaes, Renata J. Medeiros, Juliana M. M Gomes, Mara de Souza Junqueira, Katia Conceição, Letícia G. Pontes, Antonio Condino-Neto, Andrea C. Perez, Leonardo J. G. Barcellos, Jose Dias Correa junior, Erick G. Dorlass, Niels O. S. Camara, Edison Luiz Durigon, Fernando Q. Cunha, Rafael H. Nóbrega, Glaucia M. Machado Santelli, Chuck Farah, Flávio P. Veras, Jorge Galindo Villegas, Leticia Costa-Lotufo, Thiago M. Cunha, Roger Chammas, Cristiane R. Guzzo, Luciani R. Carvalho, Ives Charlie-Silva. 2020. Zebrafish studies on the vaccine candidate to COVID-19, the Spike protein: Production of antibody and adverse reaction. *bioRxiv* 10.20.346262; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.20.346262>
- Bianca H. Ventura Fernandes, Natália Martins Feitosa, Ana Paula Barbosa, Camila Gasque Bomfim, Anali M.B. Garnique, Ivana F. Rosa, Maira S. Rodrigues, Lucas B. Doretto, Daniel F. Costa, Bruno Camargo-dos-Santos, Gabrielli A. Franco, João Favero Neto, Juliana Sartori Lunardi, Marina Sanson Bellot, Nina Pacheco Capelini Alves, Camila C. Costa, Mayumi F. Aracati, Letícia F. Rodrigues, Camila C. Costa, Rafaela Hemily Cirilo, Raul Marcelino Colagrande, Francisco I.F. Gomes, Rafael T. Nakajima, Marco A.A. Belo, Percília Cardoso Giaquinto, Susana Luporini de Oliveira, Silas Fernandes Eto, Dayanne Carla Fernandes, Wilson G. Manrique, Gabriel Conde, Roberta R.C. Rosales, Iris Todeschini, Ilo Rivero, Edgar Llontop, Germán G. Sgro, Gabriel Umaji Oka, Natalia Fernanda Bueno, Fausto K. Ferraris, Mariana T.Q. de Magalhães, Renata J. Medeiros, Juliana M. Mendonça-Gomes, Mara Souza Junqueira, Kátia Conceição, Leticia Gomes de Pontes, Antonio Condino-Neto, Andrea C. Perez, Leonardo J.G. Barcellos, José Dias Correa Júnior, Erick Gustavo Dorlass, Niels O.S. Camara, Edison Luiz Durigon, Fernando Q. Cunha, Rafael H. Nóbrega, Glaucia M. Machado-Santelli, Chuck S. Farah, Flavio P. Veras, Jorge Galindo-Villegas, Letícia V. Costa-Lotufo, Thiago M. Cunha, Roger Chammas, Luciani R. Carvalho, Cristiane R. Guzzo, Guilherme Malafaia, Ives Charlie-Silva. Toxicity of spike

- fragments SARS-CoV-2 S protein for zebrafish: A tool to study its hazardous for human health?. *Science of The Total Environment*, Volume 813,2022, 152345, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152345>.
- Broadbent, A. J. et al. Evaluation of the attenuation, immunogenicity, and efficacy of a live virus vaccine generated by codon-pair bias de-optimization of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus, in ferrets. *Vaccine* 34, 563–570 (2016).
- Burggren, W., McMahon, B., & Powers, D. (1991). Respiratory functions of blood. In C. Ladd Prosser (Ed.), *Environmental and metabolic animal physiology. Comparative animal physiology* (4th ed.). WileyLiss, Inc., 605 Third Avenue, New York, NY 10158-0012.
- Casanova, L.; Rutala, W.A.; Weber, D.J.; Sobsey, M.D. Survival of surrogate coronaviruses in water. *Water Res.* 2009, 43, 1893–1898
- Chan JF-W, Yip CC-Y, To KK-W, Tang TH-C, Wong SC-Y, Leung K-H, Fung A YF, Ng AC-K, Zou Z, Tsoi H W, Choi GK-Y, Tam AR, Cheng VC-C, Chan KH, Tsang OT-Y, Yuen K-Y. 2020. Improved molecular diagnosis of COVID- 19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19 RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens. *J Clin Microbiol* 58:e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Chan, J. F. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 221–236 (2020).
- Chen JW, Chen JM. Potential of live pathogen vaccines for defeating the COVID-19 pandemic: History and mechanism. *J Med Virol.* 2020
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020;395:507e13.
- Chen W.H, U. Strych, P.J. Hotez, M.E. Bottazzi, The SARS-CoV-2 vaccine pipeline: an overview, *Curr. Trop. Med. Rep.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00201-6>.
- Chen, W. H. et al. Yeast-expressed SARS-CoV recombinant receptor-binding domain (RBD219-N1) formulated with aluminium hydroxide induces protective immunity and reduces immune enhancement. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.05.15.098079> (2020).
- Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2: a narrative review. *Ann Intern Med.* 2020. <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
- Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, Ng DYM, Wan CKC, Yang P, Wang Q, Peiris M, Poon LLM. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem.* 2020 Apr 1;66(4):549-555. doi: 10.1093/clinchem/hvaa029. PMID: 32031583; PMCID: PMC7108203.

- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25(3):pii2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Cortemeglia, C., Beitinger, T.L.2005. Temperature tolerances of wild-type and red transgenic zebra danios. *Transactions of the American Fisheries Society* 134 (6), 1431e1437.
- Damas, J., Hughes, G. M., Keough, K. C., Painter, C. A., Persky, N. S., Corbo, M., Hiller, M., Koepfli, K.-P., Pfenning, A. R., Zhao, H., Genereux, D. P., Swofford, R., Pollard, K. S., Ryder, O. A., Nweeia, M. T., Lindblad-Toh, K., Teeling, E. C., Karlsson, E. K., & Lewin, H. A. (2020). Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(36), 22311–22322. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010146117>.
- Deshmukh V, Motwani R, Kumar A, Kumari C, and Raza K. 2021. Histopathological observations in COVID-19: a systematic review *J Clin Pathol* 2021;74:7683
- Development and Licensure of Vaccines to Prevent COVID-19. <https://www.fda.gov/media/139638/download> (FDA, 2020).
- Dhama K, Sharun K, Tiwari R, *et al.* COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics. *Hum Vaccin Immunother.* 2020; 16(6): 1232-1238.
- Duffy S. (2018) Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biol.* 2018; 16: e3000003.
- Elaswad, A.; Fawzy, M. Mutations in Animal SARS-CoV-2 Induce Mismatches with the Diagnostic PCR Assays. *Pathogens* 2021, 10, 371. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030371>
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous wastes. *Physiological Reviews*, 85, 97e177.
- Feichtmayer, J.; Deng, L.; Griebler, C. Antagonistic microbial interactions: Contributions and potential applications for controlling pathogens in the aquatic systems. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 2192
- Folegatti, P. M. et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 396, 467–478 (2020).
- Galindo-Villegas, J. The zebrafish disease and drug screening model: A strong ally against Covid-19. *Front. Pharmacol.* 2020, 11, 680.

- Gao, Q. et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* 369, 77–81 (2020).
- Gao, Q. et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* 369, 77–81 (2020).
- George PJ, Tai W, Du L, et al. The potency of an antiMERS coronavirus subunit vaccine depends on a unique combinatorial adjuvant formulation. *Vaccines*. 2020; 8(2): 251.
- Giuseppe Lippi, Ana-Maria Simundica and Mario Plebania. 2019 Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med* 2020; 58(7): 1070–1076. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0285>
- Glenn A. Marsh, Alexander J. McAuley, Sheree Brown, Elizabeth A. Pharo, Sandra Cramer, Gough G. Au1, Michelle L. Baker, Jennifer.A. Barr, Jemma Bergfeld, Matthew P. Bruce, Kathie Burkett, Peter A. Durr, Clare Holmes, Leonard Izzard, Rachel Layton1 / Suzanne Lowther1 /Matthew J. Neave, Timothy Poole, Sarah-Jane Riddell, Brenton Rowe, Elisha Soldani, Vittoria Stevens, Willy W. Suen, Vinod Sundaramoorthy, Mary Tachedjian, Shawn Todd, Lee Trinidad, Sinéad M. Williams, Julian D. Druce, Trevor W. Drew, Seshadri S. Vasan. 2021. In vitro characterisation of SARS-CoV-2 and susceptibility of domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). *ransbound Emerg Dis.* 2022;69:297–307. wileyonlinelibrary.com/journal/tbed. DOI: 10.1111/tbed.13978.
- Gribble, J.; Stevens, L.J.; Agostini, M.L.; Anderson-Daniels, J.; Chappell, J.D.; Lu, X.; Pruijssers, A.J.; Routh, A.L.; Denison, M. The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination. *PLoS Pathog.* 2021, 17, e1009226.
- Gundy, P.M.; Gerba, C.P.; Pepper, I.L. Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food Environ. Virol.* 2009, 1, 10.
- Harapan H, Itoh N, Yufika A, et al. (2020) Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *J Infect Public Health.* 13(5): 667-673.
- Harapan Harapan, Naoya Itoh, Amanda Yufika, Wira Winardi, Synat Keam, Haypheng Te, Dewi Megawati, Zinatul Hayati, Abram L. Wagner, Mudatsir Mudatsir. 2020. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>
- Hobernik, D. & Bros, M. DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3605 (2018)
- Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr. *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002
- Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Kruger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.H.; Nitsche, A.; et al. SARS-CoV-2 Cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020, 181, 271–280

- Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498-503. doi:10.1038/nature12111
- Hsieh, C. L. et al. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science* 369, 1501–1505 (2020)
- Huang L, Rong Y, Pan Q, et al. SARS-CoV-2 vaccine research and development: conventional vaccines and biomimetic nanotechnology strategies. *Asian J Pharm Sci*. 2020.
- Hugs.S.Hammer. 2020. Water Quality For Zebrafish Culture. *The Zebrafish in Biomedical Research.Reservier*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00029-4>
- Igor Victor Ferreira dos Santos, Gisele Custódio de Souza, Giovanna Rocha Santana, Jonatas Lobato Duarte, Caio Pinho Fernandes, Hady Keita, Josué Arturo Velázquez-Moyado, Andrés Navarrete, Irlon Maciel Ferreira, Helison Oliveira Carvalho and José Carlos Tavares Carvalho. 2018. Histopathology in Zebrafish (*Danio rerio*) to Evaluate the Toxicity of Medicine: An Anti-Inflammatory Phytomedicine with Janaguba Milk (*Himatanthus drasticus* Plumel). Licensee IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76670>
- Indwiani Astuti, Ysrafil. 2020. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.020>
- Jaimes J.A, J.K. Millet, A.E. Stout, N.M. Andre, G.R. Whittaker, A tale of two viruses: the distinct spike glycoproteins of feline coronaviruses, *Viruses* 12 (2020)
- Janeway C, Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science; 2008.
- Jean SS, Lee PI, Hsueh PR. Treatment options for COVID-19: The reality and challenges. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020; 53(3): 436-443
- Jin, Y.; Yang, H.; Ji, W.; Wu, W.; Chen, S. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses* 2020, 12, 372
- Joseph and Fagbami. Coronaviruses: a review of their properties and diversity *Afr. J. Clin. Exper. Microbiol.* 2020; 21 (4): 258 – 271 :<https://doi.org/10.4314/ajcem.v21i4.2>
- Jothimani, D., Venugopal, R., Abedin, M.F., Kaliamoorthy, I., Rela, M., 2020.COVID-19 and the liver. *J. Hepatol.* <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.06.006>.
- Katrina N. Murray, David Lains, Sean T. Spagnoli. 2020. Water Quality and Idiopathic Diseases of Laboratory Zebrafish. *The Zebrafish in Biomedical Research*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00039-7>
- Kaur SP, Gupta V. COVID-19 vaccine: A comprehensive status report. *Virus Res*. 2020; 288: 198114
- Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, et al. Prefusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*. 2016; 531(7592): 118-21.

- Krammer, F. 2020. Review SARS CoV-2 Vaccines in Development. Nature Vol.586. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
- Kraus, A., Casadei, E., Huertas, M., Ye, C., Bradfute, S., Boudinot, P., Levraud, J.-P., & Salinas, I. (2020). A zebrafish model for COVID-19 recapitulates olfactory and cardiovascular pathophysiologicals caused by SARS-CoV-2. *BioRxiv*, 2020.11.06.368191. <https://doi.org/10.1101/2020.11.06.368191>
- Kwong, R. W. M., Kumai, Y., & Perry, S. F. (2014). The physiology of fish at low pH: The zebrafish as a model system. *Journal of Experimental Biology*, 217, 651e662.
- Kyriakidis N.C, Andrés López-Cortés, Eduardo Vásconez González, Alejandra Barreto Grimaldos and Esteban Ortiz Prado. 2021. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *npj Vaccines* 6:28 ; <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00292-w>
- Lahay, A.F. 2017. Infeksi Virus Flu Burung Pada Ikan Zebra (Danio rerio) Sebagai Model Studi Infeksi Biota Perairan (Tesis). Sekolah Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya.
- Learmonth, C., & Paulo Carvalho, A. (2015). Acute and chronic toxicity of nitrate to early life stages of zebrafish-setting nitrate safety levels for zebrafish rearing. *Zebrafish*, 00, 1e7.
- Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol* 2020;92:424e32.
- Li M-Y, Li L, Zhang Y, et al. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty* 2020;9:45
- Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal* 2020
- Lingli Zhou, Zhenhua Xu, Gianni M. Castiglione, Uri S. Soiberman, Charles G. Eberhart, Elia J. Duh. 2020. ACE2 and TMPRSS2 are expressed on the human ocular surface, suggesting susceptibility to SARS-CoV-2 infection. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2020.06.007>.
- Liu C, Zhou Q, Li Y, et al. Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases. *ACS Cent Sci*. 2020; 6(3): 315-331
- Lu H, C.W. Stratton, Y.W. Tang, Outbreak of pneumonia of unknown etiology in wuhan China: the mystery and the miracle, *J. Med. Virol.* 92 (4) (2020) 401–402, <https://doi.org/10.1002/jmv.25678>.
- Lu, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565–574 (2020)
- Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (Lond. Engl.)* 2020, 395, 565–574.

- Lukassen, S. et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO. J.* 39, e105114 (2020)
- Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 2006;66: 193e292.
- McClure, M. M., McIntyre, P. B., & McCune, A. R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 69, 553e570.
- McIntosh, E.D.G. 2018. Healthcare-Associated Infections: Potential for Prevention through Vaccination. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 6, 19-27. <https://doi.org/10.1177/2515135518763183>
- Menke, A.L., J.M. Spitsbergen., Andre P. M. 2011. Wolterbeek and Ruud A. Woutersen. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish *Toxicologic Pathology*, 39: 759-775.
- Michael R. Toml and Michael J. Mina. 2020. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clinical Infectious Disease CID* 2020:71. DOI: 10.1093/cid/ciaa619.
- Milek, J.; Blicharz-Domańska, K. Coronaviruses in avian species—Review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *J. Vet. Res.* 2018, 62, 249–255
- Muhammad Khaliim Jati Kusala, Arif Nur Muhammad Ansori, Reviany V. Nidom, Setyarina Indrasari, Anis F. Astutik, Irine Normalina, Mohammad Y. Alamudi, Siti Rukmana, Kadek Rachmawati, Kuncoro P. Santoso, Chairul A. Nidom. Primary Cell Culture of Zebrafish (*Danio rerio*) as a material for developing H5N1 Avian Influenza Vaccines. *Research J. Pharm. and Tech.* 2020; 13(12):6140-6146. doi: 10.5958/0974-360X.2020.01071.9
- Nidom, R. V., Ansori, . A. N. M., Indrasari, . S., Normalina, . I., Kusala, . M. K. J., Saefuddin, . A. & Nidom, . C. A. (2020) Recent Updates on COVID-19 Vaccine Platforms and Its Immunological Aspects: A Review. *SRP*, 11 (10), 807-818. doi:10.31838/srp.2020.10.121
- Nidom, R. V., Indrasari, . S., Normalina, . I., Kusala, . M. K. J., Ansori, . A. N. M. & Nidom, . C. A. (2020) Investigation of the D614G Mutation and Antibody-Dependent Enhancement Sequences in Indonesian SARS-CoV-2 Isolates and Comparison to Southeast Asian Isolates. *SRP*, 11 (8), 203-213. doi:10.31838/srp.2020.8.30
- Noga, E. J. (2010). *Fish disease diagnosis and treatment* (2nd ed.). WileyBlackwell, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2121 State Avenue, Ames, IA 50014-58300.
- Normalina, I., Indrasari, . S., Nidom, . R. V., Kusala, . M. K. J., Alamudi, . M. Y., Santoso, . K. P., Rachmawati, . K. & Nidom, . C. A. (2020) Characterization of the Spike Glycoprotein and Construction of an Epitope-Based Vaccine Candidate against Indonesian SARS-CoV-2: In Silico Study. *SRP*, 11 (7), 404-413. doi:10.31838/srp.2020.7.60

- Nuismer SL, Basinski A, Bull JJ. Evolution and containment of transmissible recombinant vector vaccines. *Evol Appl.* 2019; 12(8): 1595-1609
- Oidtmann, B.; Dixon, P.; Way, K.; Joiner, C.; Bayley, A.E. Risk of waterborne virus spread—review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Rev. Aquac.* 2018, 10, 641–669.
- Pandey SC, Pande V, Sati D, *et al.* Vaccination strategies to combat novel corona virus SARS-CoV-2. *Life Sci.* 2020; 256: 117956
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. & Weissman, D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 261–279 (2018).
- Pereira, A., Paulo Carvalho, A., Cruz, C., & Saraiva, A. (2017). Histopathological changes and zootechnical performance in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) under chronic exposure to nitrate. *Aquaculture*, 473, 197e205.
- Perlman, S. Another decade, another coronavirus. *N Engl J Med.* 2020; 382: 760-762. doi: 10.1056/NEJMe2001126
- Phelan AL, Katz R, Gostin LO. The novel coronavirus originating in Wuhan, China: Challenges for global health governance. *JAMA.* 2020; 323(8): 709-710.
- Posthuma CC, te Velthuis AJ, Snijder E. Nidovirus RNA polymerases: complex enzymes handling exceptional RNA genomes. *Virus Res* 2017;234:58e73
- Postlethwait, J. H., Farnsworth, D. R., & Miller, A. C. (2020). An intestinal cell type in zebrafish is the nexus for the SARS-CoV-2 receptor and the Renin AngiotensinAldosterone System that contributes to COVID-19 comorbidities. *BioRxiv*, 2020.09.01.278366. <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.278366>
- Poxton, M. (2003). In J. S. Lucas, & P. C. Southgate (Eds.), *Water quality. Aquaculture farming aquatic animals and plants*. Fishing News Books a Blackwell Publishing Company. Blackwell Publishing Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK
- Promptchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2020;38:1e9.
- Rabi FA, Al Zoubi MS, Kasasbeh GA, Salameh DM, Al-Nasser AD. SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: what we know so far. *Pathogens* 2020;9:231
- Rakusa Krzysztof, Miriam Mojzesza , Magdalena Widzioleka , Niedharsan Pooranachandrana , Felix Teitgeb , Win Surachetpong , Magdalena Chadzinskaa , Dieter Steinhagenb , Mikolaj Adamekb. Antiviral response of adult zebrafish (*Danio rerio*) during tilapia lake virus (TiLV) infection. *Fish and Shellfish Immunology* 101 (2020) 1–8.
- Reusken CBEM, Broberg EK, Haagmans B, Meijer A, Corman VM, Papa A, Charrel R, Drosten C, Koopmans M, Leitmeyer K, on behalf of EVDLabNet and ERLI-Net. 2020. Laboratory readiness and response for novel coronavirus (2019-nCoV) in expert laboratories in 30 EU/EEA countries, January 2020.

Euro Surveill 25(6):pii2000082. <https://doi.org/10.2807/15607917.ES.2020.25.6.2000082>.

- Robertson, B. The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon, *Dev. Comp. Immunol.* 80 (2018) 41–52, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.005>.
- Rui Wang, Y. Hozumi, C. Yin, et al., Mutations on COVID-19 diagnostic targets, *Genomics* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.028>
- Schaefer SR, Mackenzie JM, Pekosz A. The ORF7b protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is expressed in virusinfected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J Virol.* 2007; 81(2): 718–31.
- Shang W, Yang Y, Rao Y, et al. The outbreak of SARSCoV-2 pneumonia calls for viral vaccines. *NPJ Vaccines.* 2020; 5: 18.
- Shi, J. et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* 368, 1016–1020 (2020).
- Shino Magaki, Seyed A. Hojat, Bowen Wei, Alexandra So, and William H. Yong. 2019. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. Springer Science+Business Media, LLC. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Sit, T. H. C. et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5> (2020).
- Spence, R., Fatema, M. K., Reichard, M., Huq, K. A., Wahab, M. A., Ahmed, Z. F., et al. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69, 1435e1448.
- Subissi, L., Imbert, I., Ferron, F., Collet, A., Coutard, B., Decroly, E., & Canard, B. (2014). SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12-16: replicative enzymes as antiviral targets. *Antiviral research*, 101, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.11.006>
- Sumber Pengertian. 2018. Pengertian Vaksin, Sejarah dan Jenis-jenisnya. <http://www.sumberpengertian.co/pengertian-vaksin-sejarah-dan-jenis-jenisnya>. Diakses tanggal 2 Maret 2021
- Summerfelt, S. T., & Sharrer, M. J. (2004). Design implication of carbon dioxide production within biofilters contained in recirculating salmonid culture systems. *Aquacultural Engineering*, 32, 171e182.
- Sungnak W, Huang N, Becavin C, Berg M, Network H. SARS-CoV-2 entry genes are most highly expressed in nasal goblet and ciliated cells within human airways. arXiv preprint arXiv 2020.
- Sylwia D. Tyrkalska, Alicia Martínez-López, Ana B. Arroyo, Francisco J. Martínez-Morcillo, Sergio Candel, Diana García-Moreno, Pablo Mesa-del-Castillo, María L. Cayuela, Victoriano Mulero. 2021. A zebrafish model of COVID-19-associated cytokine storm syndrome reveals differential proinflammatory activities of Spike proteins of SARS-CoV-2 variants of concern. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.05.471277>.

- Tian S, Xiong Y, Liu H, *et al.* Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol* 2020;33:1007–14
- Tian, S., Xiong, Y., Liu, H., Niu, L., Guo, J., Liao, M., Xiao, S.Y., 2020. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod. Pathol.* 33 (6), 1007–1014. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0536-x>.
- Timmons, M. B., & Ebeling, J. M. (2013). *Recirculating aquaculture* (3rd ed.). Ithaca Publishing Company LLC, 126 Sunset Drive, Ithaca, NY 14850.
- Valerio Laghi, Veronica Rezelj, Laurent Boucontet, Pierre Boudinot, Irene Salinas, Georges Lutfalla, Marco Vignuzzi, Jean-Pierre Levraud. 2021. Exploring zebrafish larvae as a COVID-19 model: probable SARS-COV-2 replication in the swim bladder. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2021.04.08.439059>
- Varela, M.; Figueras, A.; Novoa, B. Modelling viral infections using zebrafish: Innate immune response and antiviral research. *Antivir. Res.* 2017, 139, 59–68.
- Ventura Fernandes, B. H., Feitosa, N. M., Barbosa, A. P., Bomfim, C. G., Garnique, A. M. B., Gomes, F. I. F., Nakajima, R. T., Belo, M. A. A., Eto, S. F., Fernandes, D. C., Malafaia, G., Manrique, W. G., Conde, G., Rosales, R. R.C., Todeschini, I., Rivero, I., Llontop, E., Sgro, G. G., Oka, G. U., ...Charlie-Silva, I. (2020). Zebrafish studies on the vaccine candidate to COVID-19, the Spike protein: Production of antibody and adverse reaction. *BioRxiv*, 2020.10.20.346262. <https://doi.org/10.1101/2020.10.20.346262>
- Vogel, A. B. et al. Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses. *Mol. Ther.* 26, 446–455 (2018).
- Vosla'rova', E., Piste'kova', V., Svobodova', Z., & Beda'nova', I. (2008). Nitrite toxicity to *Danio rerio*: Effects of subchronic exposure on fish growth. *Acta Veterinaria Brno (Czech Republic)*, 77, 455e460
- Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181, 281–292 (2020).
- Wang, X.W.; Li, J.; Guo, T.; Zhen, B.; Kong, Q.; Yi, B.; Li, Z.; Song, N.; Jin, M.; Xiao, W.; et al. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan hospital and the 309th Hospital of the Chinese People's Liberation Army. *Water Sci. Technol.* 2005, 52, 213–221.
- Wang, X.-W.; Li, J.-S.; Jin, M.; Zhen, B.; Kong, Q.-X.; Song, N.; Xiao, W.-J.; Yin, J.; Wei, W.; Wang, G.-J.; et al. Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J. Virol. Methods* 2005, 126, 171–177
- White. R, Rose.K, and Zon.L. 2013. Zebrafish Cancer : The State Of Arth and The Path Forward. www.nature.com/nrc/journal/V13/ng/full/nrc3589.html
- Workenhe. S.T, M.L. Rise, M.J.T. Kibenge, F.S.B. Kibenge, The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses, *Mol. Immunol.* 47 (2010) 2525–2536, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.06.009>

- Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Hu, Y.; Song, Z.-G.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; et al. Complete genome characterisation of a novel coronavirus associated with severe human respiratory disease in Wuhan, China. *bioRxiv* 2020.
- Wu, J. T., Leung, K. & Leung, G. M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet* 395, 689–697 (2020)
- Y. Wan, J. Shang, R. Graham, R.S. Baric, F. Li, Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS, *J. Virol.* (2020), <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>.
- Yafei Zhang, Changtai Wang, Mingfeng Han, Jun Ye, Yong Gao, Zhongping Liu, Tengfei He, Tuantuan Li, Mengyuan Xu, Luping Zhou, Guizhou Zou, Mengji Lu Zhenhua Zhang. 2020. Discrimination of False Negative Results in RT-PCR Detection of SARSCoV-2 RNAs in Clinical Specimens by Using an Internal Reference. *Virologica Sinica* (2020) 35:758–767. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00273-8>.
- Yi Y, Lagniton PN, Ye S, Li E, Xu R-H. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *Int J Biol Sci* 2020;16: 1753e66.
- Zahangir, MdM., Haque, F., & Mostakim, G. M. (2015). Secondary stress responses of zebrafish to different pH: Evaluation in a seasonal manner. *Aquaculture Reports*, 2, 91e96.
- Zamorano Cuervo, N., & Grandvaux, N. (2020). ACE2: Evidence of role as entry receptor for SARS-CoV-2 and implications in comorbidities. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.61390>
- Zhang, Q. et al. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1817796> (2020).
- Zhao, X. et al. Broad and differential animal angiotensin-converting enzyme 2 receptor usage by SARS-CoV-2. *J. Virol.* 94, e00940-20 (2020).
- Zhu, F.-C. et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 396, 479–488 (2020).
- Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020.
- Zumla A, Hui DS, Azhar EI, Memish ZA, Maeurer M. Reducing mortality from 2019-nCoV: host-directed therapies should be an option. *Lancet* 2020;395: e35e6.
- Zupin, L., Pascolo, L., Zito, G., Ricci, G., Crovella, S., 2020. SARS-CoV-2 and the next generations: which impact on reproductive tissues? *J. Assist. Reprod. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01917-0>.

LAMPIRAN

Lampiran 1

Tabel Berat Badan ikan Zebra Kelompok A (satuan gram)

No	Kelompok A1	Kelompok A2	Kelompok A3	Kontrol
1	0,890	0,659	0,462	0,580
2	0,621	0,937	0,406	0,765
3	0,439	0,222	0,385	0,301
4	0,315	0,315	0,430	0,584
5	0,447	0,320	0,322	0,935
6	0,421	0,418	0,310	0,330
7	0,328	0,230	0,300	0,280
8	0,634	0,335	0,486	0,386
9	0,732	0,488	0,270	
10	0,653	0,821	0,220	
11	0,345	0,495	0,290	
12	0,516	0,300	0,280	
13	0,748	0,778	0,650	
14	0,530	0,266	0,304	
15	0,237	0,230	1,100	

Lampiran 2

Tabel Berat Badan ikan Zebra Kelompok B (satuan gram)

No	Kelompok B1	Kelompok B2	Kelompok B3	Kontrol
1	0,240	0,525	0,563	0,386
2	0,203	0,225	0,450	0,415
3	0,590	0,290	0,615	0,571
4	0,260	0,260	0,502	0,385
5	0,761	0,587	0,237	0,613
6	0,484	0,280	0,378	0,361
7	0,330	0,628	0,522	0,359
8	0,448	0,371	0,438	0,350
9	0,306	0,748	0,530	
10	0,431	0,275	0,545	
11	0,785	0,581	0,385	
12	0,285	0,457	0,270	
13	0,300	0,234	0,514	
14	0,270	0,454	0,320	
15	0,250	0,584	0,430	

Lampiran 3

Tabel Berat Badan ikan Zebra Kelompok C (satuan gram)

No	Kelompok C1	Kelompok C2	Kelompok C3	Kontrol
1	0,425	0,438	0,695	0,375
2	0,245	0,285	0,821	0,415
3	0,303	0,314	0,609	0,568
4	0,313	0,521	0,284	0,445
5	0,276	0,721	0,407	0,550
6	0,435	0,280	0,223	0,279
7	0,295	0,463	0,286	0,398
8	0,446	0,308	0,573	0,335
9	0,912	0,704	0,306	
10	0,432	0,242	0,618	
11	0,295	0,278	0,430	
12	0,463	0,432	0,376	
13	0,786	0,416	0,424	
14	0,663	0,414	0,348	
15	0,250	0,271	0,301	

Lampiran 4

Tabel Pengukuran pH Air Akuarium

Kelompok	Hari ke 1	Hari ke 3	Hari ke 7	Hari ke 9	Hari ke 14
A1	7,50	7,65	7,35	7,59	7,32
A2	7,23	7,31	7,23	7,52	7,12
A3	6,94	6,34	7,20	7,41	7,22
B1	6,66	6,31	6,69	7,44	7,31
B2	6,57	6,57	7,22	7,45	7,32
B3	6,59	6,65	7,26	7,39	7,46
C1	6,50	6,74	6,68	7,23	7,47
C2	6,55	6,66	7,30	7,25	7,54
C3	6,56	6,77	7,25	7,13	7,45
Kontrol A	6,68	6,93	7,35	7,00	7,01
Kontrol B	6,52	6,67	6,90	7,10	7,22
Kontrol C	6,65	6,80	7,03	7,21	7,33

Lampiran 5

Tabel Pengukuran Suhu Air Akuarium (°C)

Kelompok	Hari ke 1	Hari ke 3	Hari ke 7	Hari ke 9	Hari ke 14
A1	22,80	23,00	22,70	22,30	21,70
A2	23,80	23,30	22,90	22,70	21,90
A3	24,30	24,30	22,30	23,20	21,90
B1	23,80	24,10	24,10	23,60	22,10
B2	23,20	23,30	23,70	23,60	22,10
B3	23,20	23,50	23,80	24,30	22,80
C1	23,70	24,00	23,70	23,80	22,80
C2	23,40	24,00	23,40	23,60	22,60
C3	23,00	23,30	23,20	23,70	22,30
Kontrol A	22,60	23,20	22,90	23,60	22,20
Kontrol B	23,20	23,30	23,70	23,60	22,80
Kontrol C	23,90	23,00	23,20	23,40	22,70

Lampiran 6

Tabel Hasil Pengukuran DO Air Aquarium (Satuan ppm)

Kelompok	Hasil Pengukuran DO	
	Hari ke 7	Hari ke 14
A1	5 sampai 8	5 sampai 8
A2	5 sampai 8	5 sampai 8
A3	5 sampai 8	5 sampai 8
B1	5 sampai 8	5 sampai 8
B2	5 sampai 8	5 sampai 8
B3	5 sampai 8	5 sampai 8
C1	5 sampai 8	5 sampai 8
C2	5 sampai 8	5 sampai 8
C3	5 sampai 8	5 sampai 8
Kontrol A	5 sampai 8	5 sampai 8
Kontrol B	5 sampai 8	5 sampai 8
Kontrol C	5 sampai 8	5 sampai 8

Lampiran 7

Tabel Hasil Pengukuran Nitrat (NO₃) Air Aquarium (Satuan mg/L)

Kelompok	Hasil Pengukuran Nitrat (NO ₃)	
	Hari ke 7	Hari ke 14
A1	0	0-12,5
A2	0	0-12,5
A3	0	0-12,5
B1	0	0-12,5
B2	0	0-12,5
B3	0	0-12,5
C1	0	0-12,5
C2	0	0-12,5
C3	0	0-12,5
Kontrol A	0	0
Kontrol B	0	0
Kontrol C	0	0

Lampiran 8

Tabel Hasil Pengukuran Nitrit (NO₂) Air Akuarium (Satuan mg/L)

Kelompok	Hasil Pengukuran Nitrogen Dioksida (NO ₂)	
	Hari ke 7	Hari ke 14
A1	<3	<3
A2	<3	<3
A3	<3	<3
B1	<3	<3
B2	<3	<3
B3	<3	<3
C1	<3	<3
C2	<3	<3
C3	<3	<3
Kontrol A	<3	<3
Kontrol B	<3	<3
Kontrol C	<3	<3

Lampiran 9

Tabel Hasil Pengukuran Total Amonia Nitrogen (TAN) NH_3 dan NH_4 Air Aquarium
(Satuan mg/L)

Kelompok	Hasil Pengukuran Total Amonia Nitrogen (NH_3 dan NH_4)	
	Hari ke 7	Hari ke 14
A1	0	0,25
A2	0	0,25
A3	0	0,25
B1	0	0,25
B2	0	0,25
B3	0	0,25
C1	0	0,25
C2	0	0,25
C3	0	0,25
Kontrol A	0	0,25
Kontrol B	0	0,25
Kontrol C	0	0,25

Lampiran 10

Tabel Persentase Positif Immuhistokimia (IHC)

Organ	Perlakuan (Persentase Positif)		
	Tetes Air	Injeksi Intra Peritoneal	Tetes Insang
Insang	A1 (60 %)	B1 (60 %)	C1 (60 %)
	A2 (80 %)	B2 (100 %)	C2 (100 %)
	A3 (80 %)	B3 (100 %)	C3 (100 %)
Hepar	A1 (60 %)	B1 (60 %)	C1 (60 %)
	A2 (80 %)	B2 (100 %)	C2 (100 %)
	A3 (80 %)	B3 (100 %)	C3 (100 %)
Usus	A1 (60 %)	B1 (60 %)	C1 (60 %)
	A2 (80 %)	B2 (100 %)	C2 (100 %)
	A3 (80 %)	B3 (100 %)	C3 (100 %)
Organ Reproduksi	A1 (60 %)	B1 (60 %)	C1 (60 %)
	A2 (80 %)	B2 (100 %)	C2 (100 %)
	A3 (80 %)	B3 (100 %)	C3 (100 %)
Otot	A1 (60 %)	B1 (60 %)	C1 (60 %)
	A2 (80 %)	B2 (100 %)	C2 (100 %)
	A3 (80 %)	B3 (100 %)	C3 (100 %)
Mata	A1 (60 %)	B1 (60 %)	C1 (60 %)
	A2 (80 %)	B2 (100 %)	C2 (100 %)
	A3 (80 %)	B3 (100 %)	C3 (100 %)

Lampiran 11

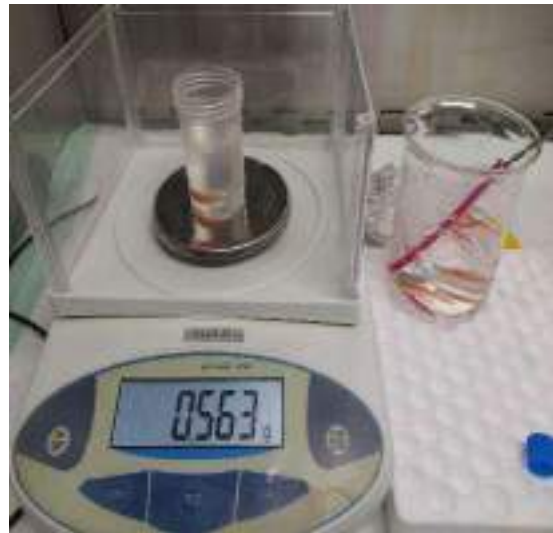
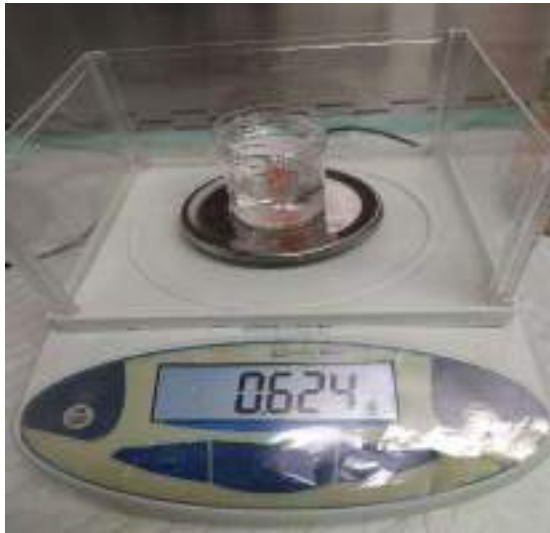
Dokumentasi Riset Ikan Zebra



Penelitian di dalam Animal BSL-3 Professor Nidom Foundation



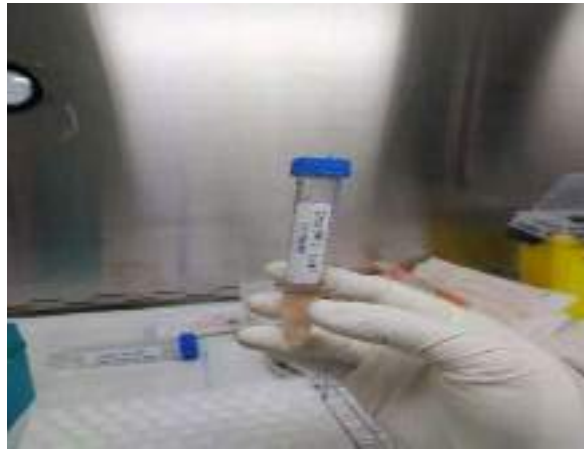
Ikan Zebra yang digunakan dalam penelitian



Penimbangan Berat Badan Ikan Zebra



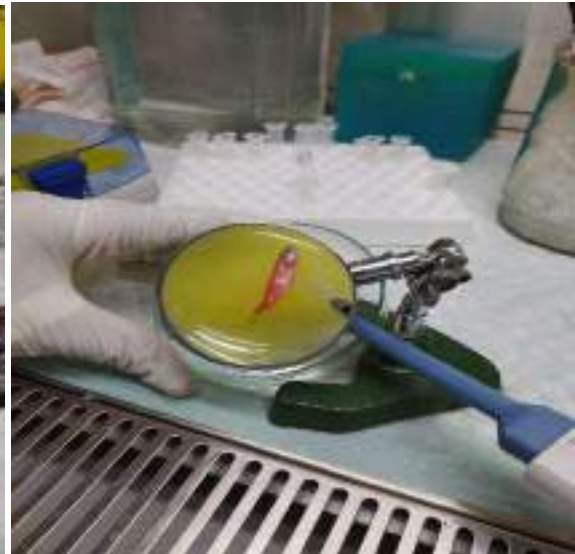
Proses Anastesi Ikan Zebra



Isolat Virus yang digunakan



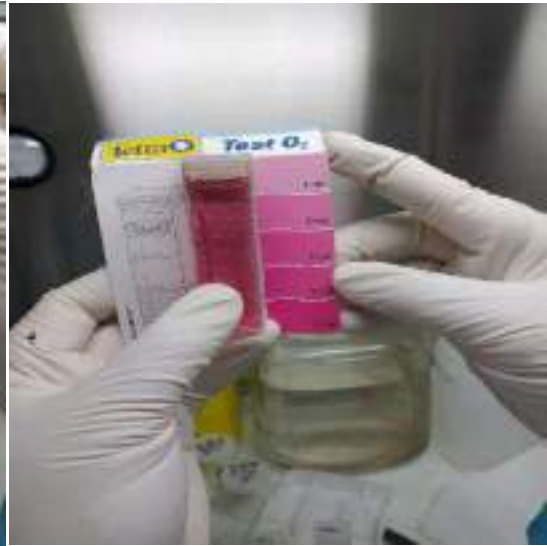
Infeksi Jalur Injeksi Intra Peritoneal



Infeksi Jalur Tetes Insang



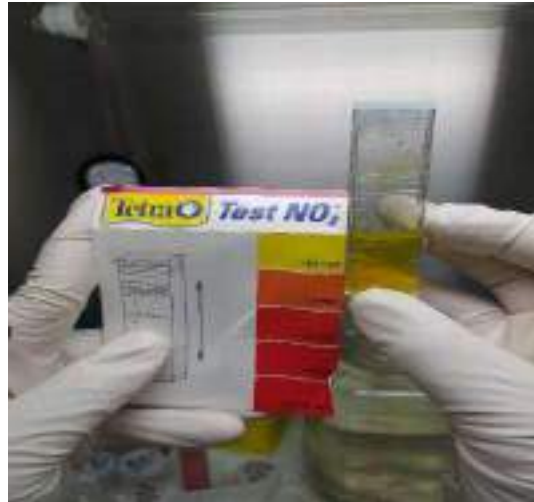
Pengukuran kadar NO_3 dalam air



Pengukuran kadar O_2 dalam air



Pengukuran kadar NH_3 NH_4 dalam air



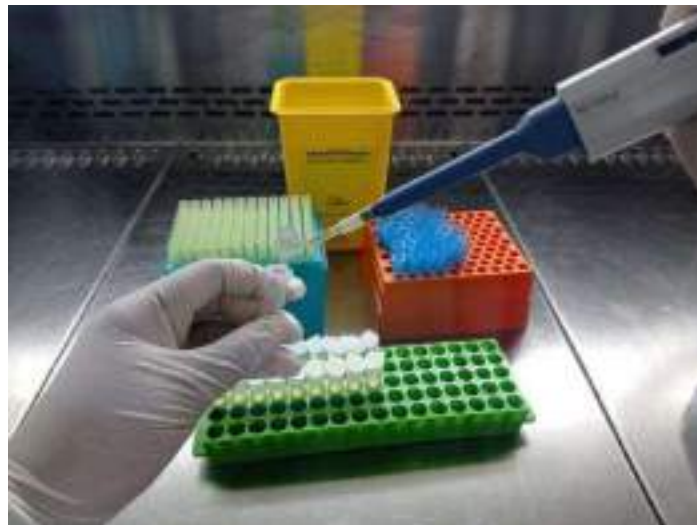
Pengukuran kadar NO_2 dalam air



Proses sifon pembersihan air akuarium



Pengukuran pH air



Proses ekstraksi RNA

Lampiran 12



Professor Nidom Foundation

Yayasan Professor Nidom

Institutional Animal Care and Use Committee

Jl. Wisma Permai Blok AA-2, Surabaya, 60115, Telp/Fax. (031) 5922972

Nomor : 010121/IACUC/VII/2021
Perihal : **Persetujuan Protokol IACUC**

Surabaya, 11 Januari 2021

Kepada Yth.
Muhammad Khalim Jati Kusala, drh., M.Si
Professor Nidom Foundation (PNF)
Peserta Program PMDSU Tahun 2017

Bersama ini diberitahukan *The Institutional Animal Care and Use Committee* - Professor Nidom Foundation (IACUC-PNF) telah menyetujui Protokol Penggunaan Hewan Coba pada penelitian yang berjudul :

**ANALISIS INFEKSI SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME
CORONAVIRUS 2 (SARS-COV-2) PADA IKAN ZEBRA (DANIO RERIO)
SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN SEED VIRUS VAKSIN COVID 19**

Adapun persetujuan ini berlaku selama 2 (dua) tahun :

Tanggal Persetujuan : 07 Januari 2021
Tanggal Berakhir : 07 Januari 2023

Selama masa persetujuan ini, dilakukan evaluasi dan peninjauan setiap tahun dan evaluasi berikutnya dilakukan tidak melebihi tanggal 07 Januari 2023.

Demikian Surat Persetujuan disampaikan untuk menjadi pegangan selama melakukan penelitian yang menggunakan hewan coba.

Atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.

Ketua IACUC-PNF

Dr. Setyarina Indrasari, drh. MVet.

Lampiran 13

Beberapa Publikasi yang telah dilakukan dalam masa studi S3

Research J. Pharm. and Tech. 15(12): December 2020

ISSN 0974-3618 (Print)
0974-360X (Online)

www.rjptonline.org



RESEARCH ARTICLE

Primary Cell Culture of Zebrafish (*Danio rerio*) as a material for developing H5N1 Avian Influenza Vaccines

Muhammad Khalim Jati Kusala^{1,2}, Arif Nur Muhammad Ansori^{1,2}, Reviany V. Nidom^{1,3}, Setyarina Indrasari^{1,2}, Anis F. Astutik², Irine Normalina², Mohammad Y. Alamudi², Siti Rukmana², Kadek Rachmawati^{1,4}, Kuncoro P. Santoso^{1,4}, Chairul A. Nidom^{1,2,*}

¹Doctoral Program in Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115, Indonesia.

²Professor Nidom Foundation, Surabaya, 60115, Indonesia.

³PT. Riset AIRC Indonesia, Surabaya, 60115, Indonesia.

⁴Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115, Indonesia.

*Corresponding Author E-mail: nidomca@fkh.unsair.ac.id

ABSTRACT:

In recent decades, zebrafish (*Danio rerio*) has been widely used as a model of biological experiments not only in the immunology and oncology aspects but also experimental animals for infectious diseases in human and fishes. The virus used in this study was the H5N1 avian influenza reverse genetic virus obtained from the Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia. We revealed that TCID₅₀ was 3.1623×10^7 mL, then the virus was developed by inoculating into the primary cell culture and we performed HA test. Samples that showed positive results on the HA test then performed RNA extraction and confirmed by one-step RT-PCR. It can be seen from the presence of cytopathogenic effects (CPE) in primary cell cultures and also can be seen from HA titers in viral harvest samples from the primary cells of zebrafish (*Danio rerio*) that shows the same result of HA titers is 2⁵. In conclusion, the present study demonstrated that there is an alternative development of new primary cell sources which leads to halal aspects of the production of avian influenza H5N1 vaccines.

KEYWORDS: *Danio rerio*, Primary Cells, H5N1.

INTRODUCTION:

Vaccination is one of the efforts to control an infectious disease, both human and animal which is preventive and efficient. However, the concept of vaccination has recently also been used to control non-infectious diseases such as cancer prevention. The vaccination process begins with the determination of the appropriate antigen for prevention followed by the formulation at the next stage. Determination of vaccine antigen will be adjusted to the character of the antigen and modulation of the antibody system that will be caused. The process from upstream to downstream, must follow the provisions of national and international regulations, including provisions on halal processes so that Muslims can use the vaccines^{1,2}.

In addition, the level of lawfulness has become a concern, given that one third of the world's population are Muslim. Viral vaccines are generally multiplied using embryonic chicken eggs. However, this widely used influenza vaccine production platform has several disadvantages³. Production of vaccine based on mammalian cell culture has different advantages compared to the production of egg-based vaccines that are common today. Cell culture-based vaccines are easier to improve and have reduced risk for mutations that produce antigenic changes⁴.

Essio et al. revealed that the H5N1 subtype was detected in the hemolymph of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in three different waters in Egypt and was also found in the oocyte shell (*Conus mediterraneus*)⁵. Gabor et al. stated that zebrafish (*Danio rerio*) infection with seasonal influenza viruses showed that zebrafish (*Danio rerio*) was positively affected by seasonal influenza viruses with an increase in virus titers to cause death over time⁶. This study aimed to make an

Received on 29.11.2019 Modified on 10.02.2020
Accepted on 28.01.2020 © RJPT All right reserved.
Research J. Pharm. and Tech. 15(12): 6140-6146
DOI: 10.5958/0974-360X.2020.01071.3

Characterization of the Spike Glycoprotein and Construction of an Epitope-Based Vaccine Candidate against Indonesian SARS-CoV-2: *In Silico* Study

Erwin Nordiningsih^{1,2*}, Setiawati Indrasari^{1,2,3}, Restiary U. Nidom^{1,2,4}, Muhammad K. J. Kusala^{1,2}, M. Yusuf Alamudi^{1,2}, Kinroed D. Santoso^{1,2}, Kadek Bachtiawati^{1,5}, Chairul A. Nidom^{1,2,4,5}

¹Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia.

²PADIA Lab, Surabaya, Indonesia.

³Faculty of Medicine Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

⁴PT. Riset AERC, Surabaya, Indonesia.

⁵Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

Corresponding Author: Chairul A. Nidom, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia. Phone: +62 31 5030255. E-mail address: nidomca@fkh.unair.ac.id / nidomca@pafinstitute.org.

ABSTRACT

Introduction: SARS-CoV-2, a new member of the coronavirus family that originated from Wuhan, China, is the agent of COVID-19 pandemic and has rapidly spread globally.

Objective: We characterized the spike (S) glycoprotein gene from the Indonesian SARS-CoV-2 isolates to investigate its genetic composition, predict the B cell epitopes, and construct the molecular phylogenetic among Indonesian SARS-CoV-2 isolates.

Methods: We employed Wuhan-Hu-1 isolates available in GenBank, NCBI and Institute Indonesian SARS-CoV-2 isolates acquired from the database (GISAID EpiCoV). We performed using the MEGA X for genetic and amino acid mutations and construct molecular phylogenetic tree. We used IEDB web server to predict epitopes, evaluated allergenicity by applying Allertop v2.0 web server, and non-toxic antigen applying the ToxinPred web server.

Results: In overall, we discovered that the Indonesian SARS-CoV-2 isolates genetic composition do not have significant changes compared with the reference sequence based on the S glycoprotein gene. In addition, we proposed NS4SPSTPKCYGVPYSLNLDLCPNY as a candidate for a peptide-based vaccine against COVID-19. Furthermore, we also presented the molecular phylogenetic of Indonesian SARS-CoV-2 isolates and other coronavirus. **Conclusion:** In summary, this study supplied data regarding mutation in the S glycoprotein and we proposed a candidate for peptide-based vaccine against COVID-19. However, this research still requires further genetic analysis and we recommend improvement in the molecular epidemiological surveillance as COVID-19 in Indonesia.

Keywords: COVID-19, *in silico*, SARS-CoV-2, vaccine design.

Correspondence:

Chairul A. Nidom

Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
Phone: +62 31 5030255. E-mail address: nidomca@fkh.unair.ac.id / nidomca@pafinstitute.org.

INTRODUCTION

A virus that was causing a new pneumonia outbreak was reported in China in the late 2019¹. Subsequently, SARS-CoV-2 was recognized as the agent². Since then, the virus has appeared sporadically all over China and in many other nations worldwide³. COVID-19 is the illness lead by the new virus, named by the World Health Organization⁴. In addition, the Johns Hopkins University has created an online website that tracks COVID-19 cases reported in real-time every day from various affected countries⁵. Today, approximately 20 million people globally infected by the new virus, about 125,000 incidents in Indonesia. In the past, several types of coronavirus have caused diseases in humans⁶. The coronavirus family consists of Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus⁷. They are a RNA genome of about 32 kb with 65 to 125 nm in diameter. The membrane, envelope, spike, and nucleocapsid are structural proteins encoded by the genome⁸. The S glycoprotein has also recently emerged as a prime prospective antigen in formulation of a SARS-CoV-2 vaccine. The two main reasons for this are that it (1) mediates interactions with host cells by binding to ACE2 receptors and (2) engages in surface exposure and is thus immediately recognized by the host immune system⁹.

Molecular epidemiology research is an important tool for monitoring new and emerging viruses. Indonesia is one of the Association of Southeast Asian Nations that have reported the entire series of SARS-CoV-2 genomes in their respective regions along with Brunei, Myanmar, Vietnam, Singapore, Timor Leste, Malaysia, Thailand, and Cambodia. Currently, research groups are racing to generate vaccines for SARS-CoV-2 worldwide and protein-based vaccines becoming one of the most advanced types of vaccines. The private sector is at the forefront of this work¹⁰. Simultaneously, other potential therapeutic alternatives against COVID-19 have been described by AI-Tawfiq, remdesivir and chloroquine are potent inhibit SARS-CoV-2¹¹. Nonetheless, presently there are no potent medication contrary to COVID-19. Currently, we characterized the S glycoprotein gene from the fourteen Indonesian SARS-CoV-2 isolates to investigate its genetic composition, predict the B-cell epitopes, and construct the molecular phylogenetic.

Materials and Methods

Indonesian SARS-CoV-2 isolates and nucleotide sequence preparation

We obtained the S glycoprotein gene via the GISAID EpiCoV¹². We used the reference virus (Wuhan-Hu-1)

RESEARCH ARTICLE

Infectious Bronchitis and Infectious Bursal Disease: Evaluation of Maternal Antibody Level on Day-Old Chick

Firdaus Imansari^{1*}, Heri Irawan², Arif N. M. Ansori², Muhammad K. J. Kusala³, Siti Rukmana³, Setyarina Indrasari³, Muhammad Yunus¹, Chairul A. Nidom^{1,3*}

¹Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115, Indonesia.

²PT. Wonokoyo Jany Corporation, Surabaya, 60241, Indonesia.

³Professor Nidom Foundation, Surabaya, 60115, Indonesia.

*Corresponding Author E-mail: nidomea@fkb.uad.ac.id

ABSTRACT:

The aim of this study was to determine the maternal antibody in terms of Infectious Bronchitis (IB) and Infectious Bursal Disease (IBD) in newly-hatched chicks at the spread of hatching time. 90 samples each of residual yolk sac and blood serum from newly-hatched chicks taken from three different periods of hatching hatch windows group (HW): HW-1 (33-23 h before pull chick), HW-2 (23-13 h before pull chick), and HW-3 (13 h before pull chick) were used in this study. Indirect ELISA method was performed to measure IB and IBD antibody titer. The values of IB and IBD titer were statistically analyzed using Two-Way ANOVA followed by LSD test. Interestingly, this study indicated that there was no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the three hatch window groups in terms of the yolk sac of IB and IBD maternal antibody level, but there was statistically significant difference ($p < 0.05$) in terms of IB and IBD maternal antibody level in blood serum between the three HW groups. In sum, it can be concluded that HW-2 (23-13h before pull chick) is the most effective hatching time in terms of IB and IBD maternal antibody level.

KEYWORDS: Day-Old Chick, Hatch Window, Infectious Bronchitis, Infectious Bursal Disease, Maternal Antibody

INTRODUCTION:

One of the determinants of the success of poultry farming, in this case chickens, is broiler seedlings, known as Day-Old Chick (DOC). DOC has a strategic role in the development of poultry, so it is very necessary to have good quality DOC¹.

Poultry farms, especially chickens, need to be constantly improved in order to produce optimally. However, to achieve these goals is not easy, because there are various problems that must be faced. The main problem and the toughest challenge for poultry farming is the emergence of diseases, so that management must be carried out efficiently and professionally². Important diseases that invade birds caused by viruses such as Infectious Bronchitis (IB) and Infectious Bursal Disease (IBD).

IB is an acute and contagious respiratory disease in chickens, in layers can cause urogenital tract disorders and reduce egg production³. The interests of IB in the chicken farming industry are IB virus infection can cause growth disorders, decrease feed efficiency, complex diseases in the chicken respiratory tract, and easily transmitted. The most important disadvantage due to IB virus infection is the decrease in egg production and quality, such as irregular egg shape, soft eggshell, liquid egg albumin and its quantity⁴.

IBD or gamboro is a disease in chickens over the age of three weeks⁵. The target of IBD virus infection is the cells of the immune system in the bursa of Fabricius and various lymphoid organs, resulting in an emphasis on the chicken's immune system and a failure of the immune system (immunosuppressive)⁶. The immunosuppressive effect caused by IBD virus infection results in chickens being more sensitive to various diseases. In addition, IBD virus infection can cause a response that is not optimal for various vaccination programs⁷.

Received on 09/05/2019 Modified on 12/06/2019
Accepted on 01/07/2019 © RJPT All right reserved.
Research J. Pharm. and Tech. 2019, 12(11): 2-11 20
DOI: 10.5958/0974-360X.2019.00923.5

5525

Materials and Methods:
Indonesian SARS-CoV-2 isolates and nucleotide sequence preparation
We obtained the S glycoprotein gene via the GISAID EpiCoVTM. We used the reference virus (Wuhan-Hu-1)

Abstract highlighted in a green background, suggest in formulation of a SARS-CoV-2 vaccine. The two main reasons for this are that it (1) mediates interactions with host cells by binding to ACE2 receptors and (2) engages in surface exposure and is thus immediately recognized by the host immune system⁸.



Pathological and Molecular Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from *Gallus gallus* in Java, Indonesia

A.N.M. Anzor^{1*}, M.K.J. Kusala^{1*}, R.V. Nidom^{2*}, S. Indrasari^{3*},
K. Zarkasie⁴, K.P. Santoso⁵, C.A. Nidom^{1,2,3}

10.18805/IJAR.B-1301

ABSTRACT

Background: Known as the vital avian disease in Indonesia, Newcastle disease (ND) has surged all over Indonesia which cause an immense drop in poultry industry. This investigation intended to examine the pathological and molecular characteristics of the latest Newcastle disease virus (NDV) derived from *Gallus gallus* in Java, Indonesia.

Methods: The samples were inoculated on the embryonic chicken eggs (ECEs), then identified using the hemagglutination test (HA test), insulated isothermal PCR (iPCR) and hemagglutination inhibition test (HI test). It conducted the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using MSF1 and MSF2 primers and followed by nucleotide sequencing for the fusion protein gene. B-cell epitope prediction analysis was applied using the Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) and VaxiJen v2.0 to predict its immunogenicity. In addition, it also performed the histopathological examination by applying hematoxylin and eosin staining.

Result: The results identified two viruses, NDV-1 and NDV-2, based on the fusion protein gene. Significantly, the cleavage site motif of NDV1 is "GRGGRLL" (avirulent) and whereas for NDV2 is "RRRKRFL" (virulent). Furthermore, it also predicted the "CKMGGRPSTKNPAP" peptide from NDV1 could be an immunogenic epitope candidate with a BepiPred linear epitope prediction score of 17.08. In summary, it suggests that NDV1 isolate can be used as a reference for vaccine design in Indonesia.

Key words: Avian paramyxovirus type-1, Fusion protein gene, Molecular characterization, Newcastle disease, Pathological.

INTRODUCTION

To meet the required amount and quality of animal protein, eggs and chicken can be the primary source for this need. Consequently, people would like to fulfill their protein needs with those sources which brings a large impact on poultry farming like in Indonesia. As its meat and eggs are inexpensive supply of animal protein widely available globally, thus, the poultry industry is a fundamental provider to global food supply. In 2013, the United States was ranked first as a producer of poultry meat, whereas in Asia, Indonesia was in the fourth position after China, India and Iran (Wahyono and Utami, 2018).

Avian paramyxovirus serotype-1 (APMV-1), also commonly known as NDV caused ND. ND has the possibility to cause catastrophic losses, due to the fact that it is an extremely contagious and deadly disease in poultry industry and is an A listed disease categorized by the Office International des Epizooties (OIE) (Ganar et al., 2014; Chowdhary et al., 2020). Affliction by a virulent NDV is associated with paralysis, neurological, respiratory, and high mortality in poultry (Mohanaibal et al., 2018). Furthermore, ND also can determine any economic losses due to the death, growth retardation, and decreased egg production, as well as other losses connected with post-vaccination responses (Corrax et al., 2012). One of the attempts to fight against NDV is through a vaccination program (Ganar et al., 2014).

Moreover, NDV has a single serotype (APMV-1) and a genome size of about 15.2 kb which is single stranded, not segmented, negative-sense RNA genomes that encode

Vaccinology Laboratory, Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia.

¹Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

²Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia.

³PT. Riset AIRC Indonesia, Surabaya, Indonesia.

⁴PT. Global Biosains Teknologi, Bogor, Indonesia.

Corresponding Author: C.A. Nidom, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

Email: nidomca@fkh.unair.ac.id; nidomca@pfninstitute.org

How to cite this article: Anzor, A.N.M., Kusala, M.K.J., Nidom, R.V., Indrasari, S., Zarkasie, K., Santoso, K.P. and Nidom, C.A. (2021). Pathological and Molecular Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from *Gallus gallus* in Java, Indonesia. Indian Journal of Animal Research. DOI: 10.18805/IJAR.B-1301.

Submitted: 10-09-2020 Accepted: 15-04-2021 Online: 00-04-2021

nucleocapsid protein (NP), fusion protein (F), phosphoproteins (P), RNA-dependent RNA polymerases or RdRps (L), matrix protein (M), hemagglutinin-neuraminidase protein (HN), and two collateral nonstructural proteins (V and W) (Ganar et al., 2014). Among the aforementioned proteins, F protein is the main target of the immune response and has the high immunogenic properties (Putri et al., 2021). NDV can infect almost all species in poultry industry, both wild and domesticated species. In addition, ND outbreaks have occurred in almost all countries in the world (Ewles et al., 2017; Nath and Kumar, 2017), including Indonesia (Putri et al., 2021).



Viroinformatics investigation of B-cell epitope conserved region in SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 isolates originated from Indonesia to develop vaccine candidate against COVID-19

[Investigación viroinformática de la región conservada del epítipo de células B en el linaje SARS-CoV-2 B.1.1.7 aislamientos originados en Indonesia para desarrollar una vacuna candidata contra COVID-19]

Arif N. M. Ansofi^{1*}, Beviary V. Nidemi^{1,2*}, Muhammad K. J. Kusala³, Setyarina Indrasari^{4,5}, Irine Normalisa⁶, Astria N. Nidemi⁴, Balqis Aiffah^{4,5}, Kartika B. Sari^{4,5}, Nur I. Ramadhaniyah^{4,5}, Muhammad Y. Alamudli⁷, Umi Cahyaningsih⁸, Kusoro P. Saiboo^{4,5}, Heri Kuswanto⁹, Chaiul A. Nidomi^{1,2*}

¹Curriculum and Vaccine Formulation Research Group, Professor Mufid Foundation, Surabaya, Indonesia.

²School of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

³Riset ABC Indonesia Surabaya, Indonesia.

⁴Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

⁵Faculty of Science and Data Analytics, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya, Indonesia.

⁶Faculty of Veterinary Medicine, IPB University, Bogor, Indonesia. *Both authors contributed equally.

*Email: arife@fkh.ub.ac.id, beviary@fkh.ub.ac.id, chaiul@fkh.ub.ac.id

Abstract

Context: SARS-CoV-2, a member of family Coronaviridae and the causative agent of COVID-19, is a virus which is transmitted to human and other mammals.

Aim: To analyze the B-cell epitope conserved region and viroinformatics-based study of the SARS-CoV-2 lineage from Indonesian B.1.1.7 isolates to invent a vaccine candidate for overcoming COVID-19.

Methods: The sequences of seven Indonesian B.1.1.7 isolates, Wuhan-Hu-1 isolate, and WU04 isolate were extracted from the GISAID EpiCoV and GenBank, NCM. MEGA X was employed to understand the transformations of amino acid in the S protein and to develop a molecular phylogenetic tree. The IEDB was implemented to reveal the linear B-cell epitopes. In addition, PEP-FOLD3 web server was utilized to perform peptide modeling, while docking was performed using PatchDock, FlexDock, and the PyMOL software. Moreover, *in silico* cloning was developed by using SnapGene v.3.2.1 software.

Results: In this study, the changes of amino acid in all seven Indonesian B.1.1.7 isolates were uncovered. Furthermore, various peptides based on the B-cell epitope prediction, allergenicity prediction, toxicity prediction from S protein to generate a vaccine contrary to SARS-CoV-2 were identified. Furthermore, the development of *in silico* cloning using pET plasmid was successfully achieved.

Conclusions: This study exhibits the transformations of amino acid in Indonesian B.1.1.7 isolates, and proposes four peptides ("LTPGDSGGWYAG", "VRQIAFQGTGRAD", "ILPDYKISKRS", and "KNHISPDVYLC") from S protein as the candidate for a peptide-based vaccine. However, further advance trials such as *in vitro* and *in vivo* testing are involved for validation.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, vaccine design, viroinformatics.

Resumen

Contexto: SARS-CoV-2, un miembro de la familia Coronaviridae y el agente causante de COVID-19, es un virus que se transmite a humanos y otros mamíferos.

Objetivo: Analizar la región conservada del epítipo de células B y el estudio basado en viroinformática del linaje SARS-CoV-2 de los aislados B.1.1.7 de Indonesia para inventar una vacuna candidata para superar COVID-19.

Método: Las secuencias de siete aislamientos B.1.1.7 indonesios, el aislado Wuhan-Hu-1 y el aislado WU04 se extrajeron de GISAID EpiCoV y GenBank, NCM. Se empleó MEGA X para comprender las transformaciones de aminoácidos en la proteína S y para desarrollar un árbol filogenético molecular. El IEDB se implementó para revelar los epítipos de células B lineales. Además, se utilizó el servidor web PEP-FOLD3 para realizar el modelado de péptidos, mientras que el acoplamiento se realizó mediante PatchDock, FlexDock y el software PyMOL. Además, la clonación *in silico* se desarrolló utilizando el software SnapGene v.3.2.1.

Resultados: En este estudio, se descubrieron los cambios de aminoácidos en los siete aislamientos de B.1.1.7 de Indonesia. Además, se identificaron varios péptidos basados en la predicción del epítipo de células B, la predicción de la alergenicidad, la predicción de la toxicidad de la proteína S para generar una vacuna contraria al SARS-CoV-2. Además, se logró con éxito el desarrollo de la clonación *in silico* utilizando el plásmido pET.

Conclusiones: Este estudio exhibe las transformaciones de aminoácidos en aislados B.1.1.7 de Indonesia y propone cuatro péptidos ("LTPGDSGGWYAG", "VRQIAFQGTGRAD", "ILPDYKISKRS" y "KNHISPDVYLC") de la proteína S como candidato para una vacuna basada en péptidos. Sin embargo, para la validación se requieren más ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Palabras Clave: COVID-19, SARS-CoV-2, vaccine design, viroinformatics.

ARTICLE INFO
Received: May 10, 2021,
Revised in revised form: June 1, 2021,
accepted: June 5, 2021,
Available Online: June 25, 2021.



Recent Updates on COVID-19 Vaccine Platforms and Its Immunological Aspects: A Review

Rostiany V. Nidom^{1,2}, Ari N. M. Anwar^{1,2}, Setyurina Indrasari^{1,2}, Iriana Normalina^{1,2}, **Muhammad K. I. Kusala^{1,2}**, Asip Saifuluddin³, Chairul A. Nidom^{1,2,4*}

¹Coronavirus and Vaccine Formulation Research Group, Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia.

²Riset AIRC Indonesia, Surabaya, Indonesia.

³Universitas Al-Azhar Indonesia, Jakarta, Indonesia.

⁴Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

*Corresponding Author: Chairul A. Nidom, Professor Nidom Foundation

E-mail address: nidomca@pufinstitute.org / nidomca@fkh.unsr.ac.id

ABSTRACT

SARS-CoV-2 firstly emerged in China and sporadically transmitted worldwide. In March 2020, WHO announced that the infection was a pandemic. The outbreak and rapid transmission of COVID-19 have endangered the global health and the economy. This crisis has called for an extensive scientific mobilization of studies on SARS-CoV-2 concerning its clinical aspects, characteristics, and its mechanism of transmission. Although many scientists have published the treatment options against COVID-19, currently, there is not any approved medications against the virus yet. COVID-19 vaccine development has started in many research centers and pharmaceutical industries following the announcement of the agent and the full genome of SARS-CoV-2 sequenced. Recently, the collected data described that COVID-19 vaccine candidates grouped into the following types: protein-based, epitope, inactivated or live-attenuated virus, virus-like particle, nucleic acid-based, and viral vectors. Therefore, the present review gives a sneak peek of recent updates on COVID-19 vaccine construction worldwide and COVID-19 vaccine's acceptance in Indonesia.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Vaccine Platforms.

Correspondence:

Chairul A. Nidom

Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia

E-mail: nidomca@pufinstitute.org / nidomca@fkh.unsr.ac.id

INTRODUCTION

SARS-CoV-2 firstly occurred in China and then transmitted sporadically worldwide¹. In March 2020, WHO announced that the infection was a pandemic, COVID-19 outbreak and rapid transmission have endangered the global health and the economy. This crisis has called for extensive scientific mobilization of studies on SARS-CoV-2 focusing its clinical aspects, characteristics, and its mechanism of transmission, with the ultimate aim of counteracting the devastating outcomes²⁻⁴. At present, the seventh coronavirus has infected approximately 61 million people globally causing more than 1.4 million deaths. Furthermore, there are more than 300,000 cases and around 16,000 people died in Indonesia. These data are based on the Johns Hopkins University online website that tracks COVID-19 cases in real-time⁵.

The coronavirus family is classified into four different genera: *Deltacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Betacoronavirus*, and *Alphacoronavirus*. Animals and humans can be infected by coronaviruses⁶. The SARS-CoV-2 genome is a single-stranded positive-sense RNA of roughly 30,000 nucleotides. There are four structural proteins encoded by the genome: nucleocapsid (N), membrane (M), spike (S), and envelope (E)⁷. The spike protein was the primary target antigen in the SARS-CoV-2 vaccine⁸. Previously, the candidate for a peptide-based vaccine against the virus based on the four structural proteins was identified^{9,10}. In addition, the interaction between the host and the virus that causes infection involves a complex response of the immune system^{11,12}. On the other hand, we demonstrated the paradoxical

phenomenon called antibody-dependent enhancement (ADE) in the Indonesian isolates¹³. Therefore, ADE has become a tipping point in the cultivation of antibody-based therapies and vaccines^{14,15}. Currently, scientists are attempting to generate vaccines to fight against SARS-CoV-2 worldwide, with protein-based vaccines becoming the most advanced types and the private sector is at the forefront of this study¹⁶⁻¹⁸. Even with the recent study publication from Ivers et al on the treatment options against COVID-19, currently, there is not any approved medication (drugs or vaccines) against the virus yet¹⁹. Therefore, the present review gives a sneak peek of recent updates on the development of COVID-19 vaccine worldwide.

Next-Generation COVID-19 Vaccine Platforms

COVID-19 vaccine development has started in many research centers and pharmaceutical industries following the announcement of SARS-CoV-2 agent and its full genome recognized. Recently, the available assemble data stated that COVID-19 vaccine candidates were grouped into the following types: protein-based, epitope, inactivated or live-attenuated virus, virus-like particle, nucleic acid-based, and viral vectors^{15,16} (Figure 1). Today, approximately nine months after the prevalence of novel coronavirus, vaccine and antiviral products are still in progress due to the pandemic paradigm development with several medication options and vaccines are in clinical trials globally^{16,17}. In regard to this matter, we considered traversing the new concepts and latest cultivation in each type of vaccine to formulate a potent vaccine contrary to COVID-19.

Immunoinformatic Investigation of Three Structural Protein Genes in Indonesian SARS-CoV-2 Isolates

Arif N. M. Anasri^{1,2*}, Muhammad N. I. Kusala^{1,3*}, Irine Normalina^{1,4,5}, Setyarina Indrasari^{1,4,5,6}, Mohammad Y. Alamudi^{1,7}, Reviyani V. Nidom^{1,7,8}, Kuncoro P. Santoso¹, Kadek Rachmaswati¹, Chairul A. Nidom^{1,9,10*}

¹Coronavirus and Vaccine Formulation Research Group, Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia.

²Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

³PADIA Lab, Surabaya, Indonesia.

⁴Faculty of Medicine Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

⁵PT. Riset AIRC Indonesia, Surabaya, Indonesia.

⁶Both authors contributed equally to this manuscript.

Corresponding Author: Chairul A. Nidom, Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia; Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia. Phone: +62-31-5030255. E-mail address: nidomca@idh.unair.ac.id / nidomca@pafoundation.org

ABSTRACT

Introduction: SARS-CoV-2 has crossed the species barrier to infect human. It is a highly spreading virus that has posed a significant public threat and is a considerable burden on the global economy and human health. **Objective:** We characterized the nucleocapsid phosphoprotein (N), membrane protein (M), and envelope protein (E) genes of Indonesian isolates to investigate genetic composition, predict B-cell epitopes, and construct a molecular phylogenetic tree. **Methods:** In the present work, we retrieved the sequences of 18 Indonesian isolates from the GISAID EpiCoV and the Wuhan-Hu-1 isolate (reference sequence) from GenBank, NCBI. We used MEGA X to identify mutations in the three structural protein genes and to construct a molecular phylogenetic tree. The IEDB tool employed to reveal the linear B-cell epitopes and other parameters. Allergenicity prediction was evaluated using AllergenFP and ToxinPred and performed to analyze non-toxic antigens predicted. **Results:** In this study, we report the genetic composition of three structural protein genes in Indonesian SARS-CoV-2 isolates. Furthermore, we identified the peptide: RRGFGQTQVFGDQESRQQTDS from nucleocapsid phosphoprotein to generate a peptide-based vaccine contrary to SARS-CoV-2. **Conclusion:** In summary, we propose a candidate for a peptide-based vaccine contrary to SARS-CoV-2. However, advance trials such as *in vitro* and *in vivo* testing are involved for validation.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, structural protein genes, vaccine design

Correspondence:

Chairul A. Nidom
Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia Faculty of Veterinary
Medicine Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia. Phone: +62-31-
5030255. E-mail address: nidomca@idh.unair.ac.id /
nidomca@pafoundation.org

INTRODUCTION

SARS-CoV-2 is the seventh coronavirus that has crossed the species barrier to infect human. The virus was first declared in China in 2019 and appeared sporadically all over China and many other nations worldwide¹. In March 2020, the WHO declared that the infection was a pandemic. The sudden outbreak and quick deployment of COVID-19 have endangered the global health and economy. This crisis has called for extensive scientific mobilization for studies on SARS-CoV-2 concerning its characteristics, mechanism of transmission, and clinical aspects, with the ultimate aim of counteracting the devastating outcomes²⁻⁴. At present, the virus has infected approximately 20 million people globally with more than 750,000 global deaths. In Indonesia alone, there are more than 120,000 cases and around 6,000 deaths. These data are based on the Johns Hopkins University online website that tracks COVID-19 cases globally in real-time⁵. Animals and humans can be infected by coronaviruses. The coronavirus family is composed of four different genera: Alpha-, Gamma-, Beta-, and Deltacoronavirus. Alphacoronavirus and Betacoronavirus infect animals and humans, whereas Deltacoronavirus and Gammacoronavirus infect only animals. SARS-CoV-2 belongs to Coronaviridae (Betacoronavirus), a family that has formerly caused epidemics. SARS-CoV-1 and MERS-CoV SARS-CoV-2 genome is single-stranded positive-sense RNA roughly 30,000 nucleotides. This genome encodes four structural proteins: spike (S), nucleocapsid

(N), membrane (M), and envelope (E)⁶. Zeng et al. mentioned that the nucleocapsid phosphoprotein is a very immunogenic and plentifully expressed protein throughout infection⁷. The nucleocapsid phosphoprotein is regularly applied in serological evaluation or vaccine construction⁸. Today, a small number of researches concentrate on the nucleocapsid phosphoprotein, and an updated concept of the Indonesian isolates nucleocapsid phosphoprotein is in urgent need. However, there are no reports about the Indonesian SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins.

The molecular epidemiological data of the SARS-CoV-2 in Indonesia remains unclear. Research on molecular epidemiology is a vital instrument for observing new emerging viruses. There is a need to establish further studies in molecular epidemiology to understand the probable impact of the disease⁹. In addition, Indonesia is one of the ASEAN that have informed the entire series of SARS-CoV-2 genomes in their respective areas. Currently, scientists are attempting to generate vaccines against SARS-CoV-2 worldwide, with protein-based vaccines becoming one of the most advanced types and the private sector is at the forefront of this study¹⁰. Although Jean et al. have published the treatment options against COVID-19, presently there are no approved drugs or vaccines against the virus¹¹. In the present study, we characterized the nucleocapsid phosphoprotein, envelope protein, and membrane protein genes of Indonesian SARS-CoV-2

Investigation of the D614G Mutation and Antibody-Dependent Enhancement Sequences in Indonesian SARS-CoV-2 Isolates and Comparison to Southeast Asian Isolates

Reviana V. Nidom^{1,2}, Setyarina Indracari^{1,2}, Irine Normalina¹, **Muhammad K. J. Kusala¹**, Arif N. M. Ansori¹, Chairul A. Nidom^{1,2,3*}

¹Coronavirus and Vaccine Formulation Research Group, Professor Nidom Foundation, Surabaya, 60115, Indonesia.

²PT. Riset AERC Indonesia, Surabaya, 60115, Indonesia.

³Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60113, Indonesia.

*Corresponding Author: Chairul A. Nidom, Professor Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia, Phone: +62-31-5722704, E-mail address: nidomca@pnfainstitute.org.

ABSTRACT

Introduction: SARS-CoV-2 is a newly spreading virus that poses a major burden on global human health and the economy. Therefore, it is essential to develop COVID-19 vaccines. Vaccine construction might not be easy, as a consequence of mutations and antibody-dependent enhancement (ADE). **Objective:** We first reported the D614G mutation and ADE sequences in Indonesian SARS-CoV-2 isolates and compared these isolates to those from other Southeast Asian countries. **Methods:** In this study, we extracted the SARS-CoV-2 genome of 40 Indonesian isolates from the GISAID EpiCoV database and the Wuhan-Hu-1 isolate (reference sequence) from GenBank, NCBI. We used BioEdit v7.2.5 to identify the D614G mutation and ADE sequences in the spike protein. Then, we rendered the spike protein using the SWISS-MODEL web server and PyMOL v2.4. **Results:** We identified the D614G missense mutation in 20 Indonesian SARS-CoV-2 isolates and isolates from six other Southeast Asian countries. In addition, we identified the ADE sequence **RTLYQGVNCH¹** in the Wuhan-Hu-1 isolate, which had changed into **RTLYQGVNCH²** in recent mutated isolates. **Conclusion:** We conclude that the D614G mutation might affect ADE activities. A rapid but cautious approach to the vaccine development and other therapies developed for COVID-19 seems needed until we have more data on the role of the D614G mutation and ADE. However, further studies including *in vitro* and *in vivo* assessments are essential for validation of these results.

Keywords: antibody-dependent enhancement, COVID-19, genetic mutation, SARS-CoV-2

Corresponding Author: Chairul A. Nidom, Professor, Nidom Foundation, Surabaya, Indonesia, Phone: +62-31-5722704, E-mail address: nidomca@pnfainstitute.org.

INTRODUCTION

SARS-CoV-2 was firstly identified in China and emerged sporadically all over the world¹. In March 2020, the WHO announced that the infection was a pandemic. The sudden outbreak and rapid dispersion of COVID-19 have endangered global health and the economy. This crisis has called for extensive scientific mobilization of studies on SARS-CoV-2 concerning its clinical aspects, characteristics, and mechanism of transmission, with the ultimate aim of counteracting the devastating outcomes^{2,3}. To date, the seventh coronavirus has infected approximately 28 million people globally with more than 900,000 deaths worldwide. In addition, there are more than 200,000 cases and around 8,500 deaths in Indonesia. These data are based on the Johns Hopkins University online website that tracks COVID-19 cases in real-time⁴.

Animals and humans can be infected by coronaviruses. The coronavirus family is composed of four different genera: Deltacoronavirus, Gammatocoronavirus, Betacoronavirus, and Alphacoronavirus. SARS-CoV-2

belongs to Coronaviridae⁵. The SARS-CoV-2 genome is a single-stranded positive-sense RNA of roughly 30,000 nucleotides. This genome encodes four structural proteins: membrane (M), envelope (E), nucleocapsid (N), and spike (S)⁶. The spike protein has recently emerged as the primary target antigen in the formulation of a SARS-CoV-2 vaccine⁷. Previously, we identified the candidate for a peptide-based vaccine against COVID-19 based on the spike protein⁸. In addition, the interaction between the host and the virus that causes infection involves a complex response of the immune system. In the normal state, the immune system of the host will respond to the presence of viruses/antigens by activating the complement pathway that will destroy infected cells. Antibodies, as one of the main components of the host's defense system, can facilitate the virus entry into the host cells, causing a lot of damage and resulting in quite severe clinical impacts. This paradoxical phenomenon is known as antibody-dependent enhancement (ADE). Recently, ADE has become a tipping point in the cultivation of antibody-based therapies and vaccines. Furthermore,