

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, 28 Juli 2022



Muhammad Khaliim Jati Kusala

NIM. 061817117308

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

Oleh:

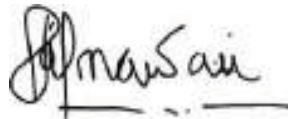
Promotor



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 kehadiran 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 memberikan 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 Achmamiek 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., dan Dr. Aswin Rafif Khairullah, drh., M.Si. yang selalu kompak dan memberikan semangat untuk menyelesaikan Disertasi ini.

Surabaya, 28 Juli 2022

Penulis

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**

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. 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.

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 $6,75 \times 10^2$ pfu/mL 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**

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. 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.

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 pfu/mL 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.

ABSTRAK

**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 Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pertama kali muncul di China dan kemudian menyebar secara sporadis ke seluruh dunia. Salah satu hewan yang banyak dijadikan hewan model dalam berbagai penelitian adalah ikan zebra (*Danio rerio*). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan upaya pengembangan penelitian dalam pengembangan virus SARS-CoV-2 dan produksi benih virus vaksin COVID-19 menggunakan ikan zebra. Penelitian ini menunjukkan bahwa virus SARS-CoV-2 dapat tumbuh dan berkembang di tubuh ikan zebra. Uji *Real Time* PCR (qPCR) dalam penelitian ini menunjukkan hasil positif dari infeksi yang dapat diperoleh dari lingkungan perairan dengan memberikan virus SARS-CoV-2 dalam air dengan titer virus $2,25 \times 10^4$ pfu/mL hingga 3×10^4 pfu/mL. Selain itu virus SARS-CoV-2 juga menginfeksi langsung ke tubuh ikan zebra secara intraperitoneal dengan titer virus $6,75 \times 10^2$ sampai 9×10^2 pfu/mL sedangkan melalui *gill drop* dengan titer virus berkisar antara 9×10^2 pfu/mL hingga 18×10^2 pfu/mL dapat menginfeksi ikan zebra. Infeksi virus SARS-CoV-2 dapat ditemukan di insang, hati, usus, organ reproduksi, otot, dan mata ikan zebra, melalui metode pemeriksaan imunohistokimia (IHC) menunjukkan bahwa ketiga jalur infeksi dapat memberikan persentase positif di atas 50% dari semua kelompok perlakuan. Persentase positif terbesar adalah ikan zebra yang terinfeksi melalui jalur injeksi intraperitoneal dengan titer virus mulai dari $6,75 \times 10^2$ pfu/mL dan *gill drip line* dengan titer virus mulai dari 9×10^2 pfu/mL yang memiliki persentase positif 100% pada semua organ diperiksa. Ringkasnya, dapat disimpulkan bahwa ikan zebra diusulkan sebagai hewan model dalam upaya pengembangan benih vaksin COVID-19.

Keywords : SARS-CoV-2, Ikan zebra, Vaksin, Infeksi, Imunohistokimia.

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 pfu/mL 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 SAMPUL DALAM	i
PRASYARAT GELAR.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
PANITIA PENGUJI	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT.....	xiv
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxii
SINGKATAN ARTI DAN LAMBANG	xxiii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.3.1 Tujuan Umum.....	8
1.3.2 Tujuan Khusus.....	8
1.4 Manfaat Penelitian	9
1.4.1 Manfaat Teoritis	9
1.4.2 Manfaat Praktis.....	9
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 10
2.1 <i>Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2 (SARS CoV-2)</i> .	10
2.1.1 Siklus Infeksi Virus SARS-CoV-2.....	12
2.1.2 Respon Imun Terhadap Infeksi SARS-CoV-2	15
2.2 Perkembangan Vaksin SARS-CoV-2	17
2.2.1 Perkembangan Jenis-Jenis Vaksin.....	22
2.2.1.1 Vaksin Inaktif	22
2.2.1.2 <i>Live Attenuated Vaccines (LAV)</i>	24
2.2.1.3 Vaksin Rekombinan Berbasis Protein	26
2.2.1.4 Vaksin Subunit	28
2.2.1.5 Vaksin Asam Nukleat.....	29
2.2.1.6 Vaksin Vektor Virus.....	33
2.3 Ikan Zebra	36

2.3.1 Taksonomi dan Klasifikasi Ikan Zebra	36
2.3.2 Morfologi Ikan Zebra.....	37
2.3.3 Reproduksi Ikan Zebra.....	39
2.3.4 Habitat dan Kebiasaan Makan Ikan Zebra.....	40
2.3.5 Penelitian Virus dengan Menggunakan Ikan Zebra.....	40
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	42
3.1 Skema Kerangka Konseptual Penelitian	42
3.2 Kerangka Konseptual.....	43
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	49
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	49
4.2 Variabel Penelitian.....	52
4.2.1 Variabel Bebas.....	52
4.2.2 Variabel Tergantung	52
4.2.3 Variabel Kendali.....	52
4.2.4 Definisi Operasional Variabel	53
4.2.4.1 Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	53
4.2.4.2 Hasil Real Time PCR <i>Cycles Tresshold</i> (Nilai CT)	53
4.2.4.3 Gambaran Histopatologi.....	53
4.2.4.4 Gambaran Imunohistokimia	54
4.2.4.5 Virus SARS-CoV-2	54
4.3 Materi Penelitian	55
4.3.1 Bahan Penelitian	55
4.3.2 Alat Penelitian	56
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....	57
4.4.1 Tempat Penelitian	57
4.4.2 Waktu Penelitian	57
4.5 Prosedur Penelitian	57
4.5.1 Persiapan Akuarium	57
4.5.2 Persiapan Sampel Ikan	57
4.5.3 Preparasi Stok Virus SARS-CoV-2.....	58
4.5.4 Perlakuan Infeksi Virus SARS-CoV-2 pada Ikan Zebra.....	58
4.5.5 Pengambilan dan Preparasi Sampel Organ Ikan Zebra	59
4.5.6 Ekstraksi RNA.....	59
4.5.7 <i>Real Time</i> PCR (RT-PCR).....	60
4.5.8 Histopatologi Organ Ikan Zebra.....	61
4.5.9 Pembuatan Preparat Imunohistokimia.....	63
4.5.10 Pembacaan Preparat Histopathology.....	64
4.5.11 Pembacaan Preparat Immunohistokimia.....	65
4.6 Analisa Data.....	65
4.7 Kerangka Alur Penelitian.....	66

BAB 5	HASIL PENELITIAN	67
5.1	Isolat Virus SARS-CoV-2.....	67
5.2	Penggunaan Ikan Zebra.....	67
5.3	Pengukuran Kualitas Air Akuarium.....	69
5.3.1	Pengukuran pH Air Akuarium.....	69
5.3.2	Pengukuran suhu Air Akuarium.....	70
5.3.3	Pengukuran Kadar Oksigen Terlarut dalam Air Akuarium.....	71
5.3.4	Pengukuran Kadar Nitrat (NO ₃) dalam Air Akuarium.....	72
5.3.5	Pengukuran Kadar Nitrit (NO ₂) dalam Air Akuarium	73
5.3.6	Pengukuran Total Amonia Nitrogen, NH ₃ , dan NH ₄	73
5.4	Hasil Pemeriksaan <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	74
5.4.1	Hasil <i>RT-PCR</i> Ikan Zebra.....	74
5.4.2	Hasil <i>RT-PCR</i> Air Zebra	79
5.5	Histopatologi Ikan Zebra	80
5.5.1	Gambaran Histopatologi Perlakuan Tetes Air.....	80
5.5.2	Gambaran Histopatologi Perlakuan Injeksi Intraperitoneal	83
5.5.3	Gambaran Histopatologi Perlakuan Tetes Insang	87
5.6	Imunohistokimia Ikan Zebra.....	91
5.6.1	Imunohistokimia Perlakuan Tetes Air.....	92
5.6.2	Imunohistokimia Perlakuan Injeksi Intra Peritoneal	98
5.6.3	Imunohistokimia Perlakuan Tetes Insang	103
BAB 6	PEMBAHASAN	108
6.1	Kualitas Air Akuarium.....	108
6.1.1	pH Air Akuarium.....	109
6.1.2	Temperatur Air Akuarium.....	111
6.1.3	Kadar Oksigen Terlarut (DO) Dalam Air Akuarium	113
6.1.4	Kadar Nitrat (NO ₃) dalam Air Akuarium.....	115
6.1.5	Kadar Nitrit (NO ₂) dalam Air Akuarium.....	117
6.1.6	Kadar Amonia (NH ₃) dalam Air Akuarium	119
6.2	Pemeriksaan <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	120
6.2.1	Pembahasan Hasil RT-PCR Ikan Zebra	123
6.2.2	Pembahasan Hasil RT-PCR Air Akuarium	129
6.3	Pembahasan Histopatologi Ikan Zebra	133
6.4	Pembahasan Imunohistokimia Ikan Zebra.....	136
6.5	Kebaruan Penelitian	140
6.6	Keterbatasan Penelitian.....	141
BAB 7	KESIMPULAN.....	143
7.1	Kesimpulan	143
7.2	Saran	143

DAFTAR PUSTAKA	144
LAMPIRAN	156

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Perhitungan Titer Virus SARS-COV	51
5.1 Hasil RT-PCR Ikan Zebra	75
5.2 Persentase positif Hasil RT-PCR Ikan Zebra	76
5.3 Hasil RT-PCR Air	78
5.4 Hasil Histopatologi Kelompok A	81
5.5 Hasil Histopatologi Kelompok B	84
5.6 Hasil Histopatologi Kelompok C	88
5.7 Hasil Immunohistokimia Kelompok A.....	94
5.8 Hasil Immunohistokimia Kelompok B.....	99
5.9 Hasil Immunohistokimia Kelompok C.....	104

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Diagram Skematik Struktur Virus Corona.....	11
2.2 Mekanisme Infeksi SARS-CoV-2 dan Siklus Hidupnya	15
2.3 Gambaran Jalur pengembangan Vaksin.....	19
2.4 Diagram skema platform vaksin COVID-19	22
2.5 Gambaran pengembangan vaksin terhadap SARS-CoV-2	36
2.6 Morfologi Ikan Zebra.....	38
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	42
4.1 Skema kerangka alur penelitian	66
5.1 Isolat Laboratorium Professor Nidom Foundation	67
5.2 Diagram Rata-rata berat badan Ikan Zebra yang digunakan.....	68
5.3 Ikan Zebra yang digunakan dalam penelitian ini	69
5.4 Diagram pH Air Akuarium.	70
5.5 Diagram Suhu Air Akuarium.....	71
5.6 Diagram hasil RT-PCR Ikan Zebra.....	76
5.7 Diagram hasil RT PCR Air Akuarium.....	79
5.8 Gambaran Histopatologi Organ Insang A3 dan Kontrol	82
5.9 Gambaran Histopatologi Organ Insang B3 dan Kontrol.....	85
5.10 Gambaran Histopatologi Organ Reproduksi B3 dan Kontrol.....	86
5.11 Gambaran Histopatologi Organ Mata B3 dan Kontrol	87
5.12 Gambaran Histopatologi Organ Insang kelompok C dan Kontrol.....	89
5.13 Gambaran Histopatologi Organ Reproduksi kelompok C dan Kontrol...	90
5.14 Gambaran Histopatologi Organ Mata Kelompok C dan Kontrol	91
5.15 Gambaran imunohistologi organ insang kelompok A	95
5.16 Gambaran imunohistologi organ hepar kelompok A	95
5.17 Gambaran imunohistologi organ usus kelompok A.....	96
5.18 Gambaran imunohistologi organ Reproduksi kelompok A	96
5.19 Gambaran imunohistologi organ Otot kelompok A.....	97
5.20 Gambaran imunohistologi organ Mata kelompok A.....	97
5.21 Gambaran imunohistologi organ Insang kelompok B	100
5.22 Gambaran imunohistologi organ Hepar kelompok B	100
5.23 Gambaran imunohistologi organ Usus kelompok B	101
5.24 Gambaran imunohistologi organ Reproduksi kelompok B.....	101
5.25 Gambaran imunohistologi organ Otot kelompok B	102
5.26 Gambaran imunohistologi organ Mata kelompok B.....	102
5.27 Gambaran imunohistologi organ Insang kelompok C	105
5.28 Gambaran imunohistologi organ Hepar kelompok C	105
5.29 Gambaran imunohistologi organ Usus kelompok C	106
5.30 Gambaran imunohistologi organ Reproduksi kelompok C.....	106

5.31 Gambaran imunohistologi organ Otot kelompok C	107
5.32 Gambaran imunohistologi organ Mata kelompok C	107

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
Lampiran 1	Berat Badan ikan Zebra Kelompok A (satuan gram)	156
Lampiran 2	Berat Badan ikan Zebra Kelompok B (satuan gram)	157
Lampiran 3	Berat Badan ikan Zebra Kelompok C (satuan gram)	158
Lampiran 4	Pengukuran pH Air Akuarium.....	159
Lampiran 5	Pengukuran Suhu Air Akuarium (°C)	160
Lampiran 6	Hasil Pengukuran DO Air Akuarium (Satuan ppm).....	161
Lampiran 7	Hasil Pengukuran Nitrat (NO ₃) Air Akuarium (Satuan mg/L) .	162
Lampiran 8	Hasil Pengukuran Nitrit (NO ₂) Air Akuarium (Satuan mg/L) .	163
Lampiran 9	Hasil Pengukuran Total Amonia Nitrogen (TAN) NH ₃ dan NH ₄	164
Lampiran 10	Persentase Positif Immuhistokimia (IHC).....	165
Lampiran 11	Dokumentasi Riset Ikan Zebra	166
Lampiran 12	Surat Persetujuan Protokol IACUC.....	169
Lampiran 13	Beberapa Publikasi yang telah dilakukan dalam masa studi S3	170

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>
TNFa	: <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>
RLR	: <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 Lymphoid 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>