

T E S I S

***IDENTIFIKASI MYXOBOLUS SP PADA FAMILI CYPRINIDAE
DENGAN METODE MOLEKULER DI PROVINSI JAWA TIMUR
DAN JAWA TENGAH***



Oleh :

**AYUDA DYAH NUREKAWATI
NIM : 091324153005**

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2016**

**IDENTIFIKASI *MYXOBOLUS* SP PADA FAMILI CYPRINIDAE
DENGAN METODE MOLEKULER DI PROVINSI
JAWA TIMUR DAN JAWA TENGAH**

T E S I S

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan
Pada Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**AYUDA DYAH NUREKAWATI
NIM : 091324153005**

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2016**

PENETAPAN PENGUJI TESIS

Tesis ini diuji oleh Panitia Penguji Tesis

Pada Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan

Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya

Pada Tanggal : 16 Agustus 2016

Panitia Penguji Tesis

Ketua : Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, M.Sc, drh.

Anggota : 1. Dr. Gunanti Mahasri, Ir., M.Si.

2. Muchammad Yunus, drh, M.Kes, Ph.D

3. Dr. Kismiyati, Ir., M.Si.

4. Dr. Mufasiri, M.Si, drh.

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN TESIS

Saya menyatakan bahwa penelitian Tesis dengan judul, **Identifikasi *Myxobolus sp* pada Famili *Cyprinidae* dengan Metode Molekuler di Provinsi Jawa Timur dan Jawa Tengah** ini benar-benar merupakan karya ilmiah ORISINALITAS dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya dan atau pendapat yang pernah di tulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali sumber yang secara tertulis disitir dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 19 Agustus 2016

Mahasiswa,



Ayuda Dyah Nurekawati
NIM. 091324153005

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga Tesis tentang “Identifikasi *Myxobolus* sp pada famili Cyprinidae dengan Metode Molekuler di Provinsi Jawa Timur dan Jawa Tengah” ini dapat terselesaikan. Tesis ini disusun dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memenuhi Gelar Magister Sains (M.Si) pada Program Studi S2 Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Surabaya. Penulis mengucapkan Terimakasih kepada :

1. Ibu Prof. Dr.Hj. Sri Iswati, SE., M.Si., Ak. selaku Direktur Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
2. Bapak Prof. Dr.Ir Hari Suprpto, M.Agr selaku Koordinator Program Studi S2 Bioteknologi Perikanan dan Kelautan.
2. Ibu Dr. Gunanti Mahasri, Ir., M.Si, selaku Ketua Pembimbing Pertama Sekolah Pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya, yang telah membimbing dan telah memberikan arahan, perhatian dan motivasi selama penyusunan tesis ini terselesaikan.
3. Bapak Muchammad Yunus, drh., M.Kes., Ph.D. selaku Pembimbing Kedua yang telah memberikan arahan, petunjuk dan masukan dalam penulisan tesis ini.
4. Kepala Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I, atas ijinnya menggunakan fasilitas laboratorium terkait penelitian tesis ini.
5. Dosen penguji yang telah memberikan dukungan dan masukan atas terselesaikannya tesis ini, serta orang tua, suami, anak-anakku tercinta dan semua pihak yang telah memberikan doa dan motivasi dengan tulus dan ikhlas selama penulisan ini.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih belum sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk kesempurnaan tesis ini. Semoga bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak yang terkait.

Surabaya, Agustus 2016

Penulis

RINGKASAN

Myxobolus sp dapat menyebabkan kematian pada ikan, parasit myxozoa juga dapat menurunkan nilai ekonomis dari ikan hias air tawar. Penyebaran parasit ini terjadi karena perpindahan parasit dari ikan yang terinfeksi ke ikan sehat, baik secara langsung maupun melalui inang antara pada fase tertentu dari siklus hidup parasit tersebut. Penelitian ini diarahkan pada metode biologi molekuler dari hasil sekuensing dengan hipotesis *phylogenetic tree* untuk menarik kesimpulan mengenai keragaman genetik dan hubungan antara populasi atau spesies.

Metode yang digunakan dalam membangun filogenetika dengan menggunakan karakter molekuler yaitu sekuen DNA pada penelitian kali ini adalah *Neighbour Joining* untuk mengetahui jarak evolusinya dihitung untuk semua pasang sekuen DNA dan sebuah pohon filogenetika di rekonstruksi dari jarak atau perbedaan pasangan basa nukleotida tersebut. Berdasarkan hasil analisa *Neighbour Joining*, hal ini berkaitan dengan uji realibilitas dari sebuah pohon dan uji topologi antara 2 atau lebih pohon yang berbeda berdasarkan set data yang sama yaitu dengan metode Efron's bootstrap.

Terdapat puluhan sekuen DNA yang mendeskripsikan spesies *Myxobolus* 18S rDNA pada GenBank. Keseluruhan sekuen tersebut *dialignment* menggunakan aplikasi *ClustalW* pada software MEGA versi 6. Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik *Myxobolus* sp. di lokasi yang berbeda. Kedekatan hubungan sampel kemungkinan karena ada aliran gen yang terjadi akibat letak geografis lokasi yang saling berdekatan. Gambaran yang lebih jelas dapat dilihat pada rekonstruksi pohon filogeni dengan menggunakan metode *Neighbor joining* (NJ) yang merupakan suatu metode yang didasari pada prinsip pengelompokkan taksa berdasarkan nilai jarak evolusioner pasangan *operational taxonomy unit*.

Pengamatan spora *Myxobolus* secara morfologi dan morfometri yang menginfeksi famili Cyprinidae dari Jawa Timur dan Jawa Tengah ukuran yang mendekati adalah *Myxobolus koi*. Berdasarkan pohon filogenetik, *Myxobolus koi* isolate MTR20110316 (Accession KJ725077.1) berasal dari Eropa dan Asia, *M. Pendula* berasal dari Ontario dan *M. ampullicapsulatus* berasal dari China, ini terbukti bahwa *Myxobolus* tersebut belum pernah di publikasikan untuk wilayah Indonesia.

SUMMARY

Myxobolus sp can cause death in fish, parasites myxozoa can also reduce the economic value of freshwater fish. The spread of this parasite occurs due to transfer of parasites from infected fish to healthy fish, either directly or through the host between the specific phases of the life cycle of the parasite. This research is directed at methods of molecular biology of the sequencing results with the hypothesis phylogenetic tree to draw conclusions about the genetic diversity and relationships between populations or species.

The method used in constructing phylogenetic using molecular character is a DNA sequence in the present study is to determine the *Neighbour Joining* evolution distance was calculated for all pairs of DNA sequences and a *phylogenetic tree* in the reconstruction of the distance or differences in the nucleotide base pairs. *Neighbour Joining* based on this analysis, it relates to the reliability test and test of a tree topology between two or more different tree based on the same data set that is by Efron's bootstrap method.

There are dozens of DNA sequences describing the 18S rDNA *Myxobolus* species in GenBank. The whole sequence dialignment using *ClustalW* application on MEGA software version 6. The genetic distance is used to see the close genetic relationship *Myxobolus sp* in different locations. Closeness samples possibly because there was gene flow that occurs due to the geographical location adjacent locations. A clearer picture can be seen in the reconstruction of the *phylogeny tree* by using *Neighbor joining* (NJ) which is a method that is based on the principle of grouping taxa based on the distance evolutionary taxonomy operational partner unit.

Observations spores *Myxobolus* morphological and morphometric that infects the family Cyprinidae of East Java and Central Java size approach is *Myxobolus koi*. Based on the phylogenetic tree, *Myxobolus koi* isolate MTR20110316 (Accession KJ725077.1) came from Europe and Asia, *M. Pendula* come from Ontario and *M. ampullicapsulatus* comes from China, it is evident that *Myxobolus* it has not been published for Indonesia region.

Abstrak

Data morfometri yang digunakan untuk mengidentifikasi *Myxobolus* sp pada famili Cyprinidae yang berasal dari Jawa Timur dan Jawa Tengah menunjukkan adanya varian perbedaan bentuk dan ukuran spora, sedangkan pada jumlah coil filament belum dapat ditentukan dengan pasti. Namun apabila diamati menggunakan fase kontras dapat diperkirakan jumlah coil filament sekitar 7 – 9. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gejala klinis yang terlihat adanya nodul pada insang yang berwarna putih atau kemerahan dan memenuhi rongga insang sehingga operculum tidak dapat menutup dengan sempurna, gerakan ikan tidak aktif, sisik geripis dan warna tubuh agak pucat/gelap. Penyakit parasit *Myxobolus* sp ditemukan menginfeksi famili Cyprinidae yaitu pada ikan mas, ikan koi dan ikan komet pada ukuran benih 3-10 cm. Secara morfometri ukuran *Myxobolus* sp yang ditemukan menginfeksi ikan komet (*Carassius auratus*) pada umumnya lebih panjang $\pm 1-2 \mu\text{m}$, namun secara keseluruhan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Primer yang digunakan untuk amplifikasi merupakan primer spesifik pada 18S rDNA untuk mendeteksi *Myxobolus* sp dengan menggunakan Primer ERIB1 dan ERIB10 (Barta et al.,1997). Berdasarkan hasil pemeriksaan PCR diperoleh pada proses suhu yang sama dengan beberapa tahapan annealing yang berbeda 55°C dan 59 °C, berdasarkan hasil elektroforesis pemeriksaan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fragmen DNA menunjukkan di 2034 bp, secara molekuler semua organ sampel yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan positif terinfeksi *Myxobolus* sp, yang selanjutnya dapat dilakukan proses sekuensing.

Dari hasil BLAST didapat bahwa sampel *Myxobolus* tersebut secara genetik mempunyai 3 kedekatan identity dengan *M. ampullicapsulatus* (95%), *M. koi* (92% dan 96%), *M. Koi isolate MTR20110316* (93% dan 95%). Keseluruhan sekuen tersebut dialignment menggunakan aplikasi *ClustalW* pada software MEGA versi 6. Selanjutnya dari hasil alignment dapat digunakan untuk menyusun pohon filogenetik. Analisa filogenetik dilakukan dengan menggunakan *Neighbor-Joining method version 3.6a2.1*, tidak ada outgroup root.

Hasil filogenetik diatas juga dapat mendukung hipotesa yang menyatakan bahwa spesies *Myxobolus* tergabung menjadi satu monofiletik yaitu kedalam famili Myxobolidae, spesies tersebut dari hasil *Neighbor joining* yang kemudian dibandingkan dengan literatur untuk jenis *Myxobolus koi isolate MTR20110316* (Accession KJ725077.1) berasal dari Eropa dan Asia, *M. Pendula* berasal dari Ontario dan *M. ampullicapsulatus* berasal dari China. Selain itu juga banyak dari spesies yang terdaftar pada GenBank merupakan spesies *Myxobolus* pada famili cyprinidae.

Kata kunci : Identifikasi *Myxobolus* sp pada famili Cyprinidae.

Abstract

Used morfometri data to identify *Myxobolus* sp at cyprinidae family from east java and central java, that are shown various differences at shape and size of spora, while the coil filament number could not be determined certainty. But when observed by phase contrast can be estimated using the number of coils filament amount of 7-9. The results showed that the clinical symptoms are visible nodules on the gills are white or reddish, and meet the gill cavity so operculum can not close completely, the movement of fish are inactive, eroded scales and body color rather pale / dark. Parasitic diseases *Myxobolus* sp found infecting Cyprinidae family that the goldfish, koi and comet fish on seed size 3-10 cm. By using morfometri size of *Myxobolus* sp were found to infect comet fish are generally longer between 1-2 μm , but overall did not show a significant difference. We used specific amplification primer 18S rDNA to detect *myxobolus* by using ERIB1 and ERIB10 (Barta et al., 1997). Based on the results of PCR obtained at the same temperature with several stages annealing different 55°C and 59 °C, based on the results of electrophoresis of PCR fragment DNA shows at 2034 bp, in Molecular all organ samples used in this study showed positive infection *Myxobolus* sp, here in after to do the sequencing process.

BLAST results obtained from samples that are genetically *Myxobolus* has three proximity identity with *M. ampullicapsulatus* (95%), *M. koi* (92% and 96%), *M. Koi* MTR20110316 isolates (93% and 95%). The whole sequence alignment using *ClustalW* application on MEGA software version 6. Further alignment of the results can be used to construct *phylogenetic trees*. *Phylogenetic* analysis performed using the *Neighbor-Joining* method 3.6a2.1 version, no outgroup root.

The results of phylogenetic above can also support the hypothesis that states that *Myxobolus* species belonging to one family into Myxobolidae monophyletic ie, the species of *Neighbor joining* results were then compared with the literature for this type of *Myxobolus koi* isolate MTR20110316 (Accession KJ725077.1) came from Europe and Asia, *M. Pendula* come from Ontario and *M. ampullicapsulatus* originating from China. In addition, many of the species listed in GenBank *Myxobolus* species in the Cyprinidae family.

Key word : Identification *Myxobolus* sp at Cyprinidae family.

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Prasyarat Gelar	ii
Pengesahan	iii
Penetapan Penguji	iv
Pernyataan Orisinalitas	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan	vii
Summary	viii
Abstrak	ix
Abstract	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	6
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Tujuan umum	7
1.3.2 Tujuan khusus.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
1.4.1 Manfaat teoritis.....	8
1.4.2 Manfaat praktis.....	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Jenis Ikan Famili Cyprinidae	9
2.2 Klasifikasi Ikan Mas	12
2.2.1 Morfologi Ikan Mas	13
2.2.2 Habitat Ikan Mas	14
2.3 Ikan Koi (<i>Cyprinus Carpio</i>)	14

2.3.1	Klasifikasi ikan koi (<i>Cyprinus Carpio</i>)	14
2.3.2	Morfologi ikan koi (<i>Cyprinus Carpio</i>)	15
2.3.3	Habitat ikan koi (<i>Cyprinus Carpio</i>)	16
2.4	Ikan Komet	17
2.4.1	Klasifikasi Ikan Komet	17
2.4.2	Morfologi Ikan Komet	17
2.4.3	Habitat Ikan Komet	18
2.5	<i>Myxobolus sp</i>	19
2.5.1	Klasifikasi dan Morfologi <i>Myxobolus sp</i>	19
2.5.2	Siklus Hidup <i>Myxobolus sp</i>	24
2.6	<i>Myxobolus</i> Pada Ikan	27
2.7	Epidemiologi	29
2.8	Gejala Klinis	30
2.9	Kasus-kasus di Lapangan	32
2.10	Cara Pencegahan dan Penanggulangan	33
2.11	Pengujian <i>Myxobolus sp.</i>	34
2.11.1	Teknik konvensional	34
2.11.2	Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	34
2.11.3	Sekuensing DNA	38
2.11.4	Filogenetik molekuler	39
BAB III	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	41
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	41
BAB IV	METODOLOGI	44
4.1	Waktu dan Tempat	44
4.2	Bahan dan Peralatan	44
4.2.1	Bahan	44
4.2.2	Peralatan	45
4.3	Metode Penelitian	45
4.4	Prosedur Penelitian	46
4.4.1	Alur kerja	46
4.4.2	Penentuan sampel kolam dan ikan	46
4.5	Identifikasi <i>Myxobolus sp</i> dengan metode konvensional	47
4.6	Pemeriksaan dengan Metode PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	47
4.7	Sekuensing	50
4.8	Analisa Data	51

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	52
5.1 Hasil	52
5.1.1 Hasil Analisa Gejala Klinis	52
5.1.2 Hasil Pemeriksaan Molekuler	60
5.1.2.1 PCR	60
5.1.2.2 Sekuensing	65
5.1.2.3 Analisis Nukleotida <i>Myxobolus</i> sp	66
5.2 Pembahasan	69
5.2.1 Morfologi dan Morfometri Spora	69
5.2.2 Analisis Molekuler dan Sekuensing	71
 BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	75
6.1 Kesimpulan	75
6.2 Saran	75
 DAFTAR PUSTAKA	76
 LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Jenis Ikan Mas Konsumsi.....	11
2.2 Jenis Ikan Mas Hias	11
2.3 Jenis Ikan Mas Koki	12
2.4 Morfologi Ikan Mas	14
2.5 Morfologi Ikan Koi	16
2.6 Morfologi Ikan Komet.....	18
2.7 Bentuk Spora <i>Myxobolus</i>	23
2.8 Morfologi <i>Myxobolus</i>	23
2.9 Siklus Hidup <i>Myxobolus sp</i>	27
2.10 Gambaran Klinis Insang Ikan Koi yang Terserang <i>Myxobolus sp</i>	30
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	43
4.1 Alur Kerja Penelitian.....	46
5.1 Gambaran Klinis Infeksi <i>Myxobolus</i> pada ikan di wilayah Blitar, Tulungagung dan Kediri	53
5.2 Gambaran Klinis Infeksi <i>Myxobolus</i> pada ikan di wilayah Magelang dan Semarang	54
5.3 Pewarnaan <i>Myxobolus</i> dengan Giemsa	56
5.4 Pewarnaan <i>Myxobolus</i> dengan Lugol	57
5.5 Pengukuran Spora <i>Myxobolus</i>	58
5.6 Elektroforesis pada Suhu Gradien	63
5.7 Elektroforesis PCR	63
5.8 Elektroforesis PCR	64
5.9 Elektroforesis PCR	64
5.10 Elektroforesis PCR	65
5.11 Neighbor Joining 1000x Bootstrap	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Ciri dan pengukuran morfologi dari <i>Myxobolus koi</i> yang diisolasi dari insang ikan koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	22
5.1 Data wilayah famili Cyprinidae yg terinfeksi <i>Myxobolus</i> sp di wilayah Jatim dan Jateng	54
5.2 Hasil identifikasi spora <i>Myxobolus</i> pada organ insang ikan di Jatim	59
5.3 Hasil identifikasi spora <i>Myxobolus</i> pada organ insang ikan di Jateng	60
5.4 Temperature annealing yg optimum yang positif terinfeksi <i>Myxobolus</i> pada famili cyprinide di Jatim dan Jateng.....	62
5.5 Matrik perbedaan nukleotida.....	67
5.6 Blast Analysis.....	68