

Deteksi *Viral Haemorrhagic Septicemia* pada Komoditas Ikan Air Laut Menggunakan *Real Time*-PCR di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Denpasar, Bali

Detection of *Viral Haemorrhagic Septicemia* in Marine Fisheries Commodity Using *Real Time*-PCR at Fish Quarantine Inspection Agency Denpasar, Bali

Evi Fitriana¹, Hapsari Kenconoati^{1*}, Mohammad Faizal Ulkhaq¹, Arif Habib Fasya¹, Wahyu Nurlita²

¹Program Studi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Kelautan, PSDKU Universitas Airlangga, Banyuwangi, Jawa Timur, Indonesia

²Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan, Denpasar, Bali, Indonesia

Article Info

Received: 2024-01-02

Revised: 2024-01-30

Accepted: 2024-02-06

Online: 2024-02-28

Koresponding:

Hapsari Kenconoati, Program Studi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Kelautan, PSDKU Universitas Airlangga, Banyuwangi, Jawa Timur, Indonesia

E-mail:

hapsari@fpk.unair.ac.id

Abstrak

Komoditas ikan air laut di Indonesia, baik yang diekspor maupun impor, mengalami peningkatan yang signifikan. Peningkatan ini membuka peluang terhadap risiko masuk serta penyebaran hama dan penyakit ikan, baik dalam skala ekspor antarnegara maupun antararea di wilayah Indonesia. Salah satu patogen yang bersifat akut yang dapat menyebabkan kerugian besar adalah virus. Virus yang sering menyerang ikan hias air laut adalah *Viral haemorrhagic Septicemia* virus (VHSV). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi VHSV yang menginfeksi komoditas ikan hias air laut dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Metode RT-PCT meliputi: nekropsi, fiksasi, ekstraksi, amplifikasi, dan pembacaan hasil. Penelitian ini dilakukan di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan. Denpasar, Bali. Berdasarkan hasil uji ditemukan VHS menyerang enam sampel spesies ikan air laut dengan kode yaitu NTC, BC 8.2, BC 9.2, BAR 8.2, 1252, NSR 8.2

Kata kunci: Komoditas ikan air laut, *Real Time*-PCR, *Viral Haemorrhagic Septicemia*

Abstract

Marine fish commodities in Indonesia, both exported and imported, have experienced a significant increase. This increase opens up opportunities for the risk of entry and spread of fish pests and diseases, both on an export scale between countries and between areas within Indonesia. One of the pathogens that is acute that can cause major losses is the virus. The virus that often attacks sea water ornamental fish is *Viral haemorrhagic septicemia*. The purpose of this study was to detect the presence of VHSV that infects marine ornamental fish commodities using

the *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) method which includes from several stages, namely: necropsy, fixation, extraction, amplification, and reading of results. This research was conducted at Fish Quarantine Inspection Agency Denpasar, Bali. Based on the test results, VHS was found to attack six samples of marine fish species with codes namely NTC, BC 8.2, BC 9.2, BAR 8.2, 1252, NSR 8.2.

Keywords: Marine Fish Commodity, Real Time-PCR, *Viral Haemorrhagic Septicemia*

1. Pendahuluan

Komoditas perikanan air laut terdiri dari ikan konsumsi dan ikan hias air laut. Menurut UU No. 7 Tahun 2016 tentang perlindungan dan pemberdayaan nelayan, pembudidaya ikan, komoditas perikanan yaitu hasil dari usaha perikanan yang dapat diperdagangkan, disimpan, dan dipertukarkan. Komoditas perikanan dapat dibedakan berdasarkan jenis habitat dan untuk komoditas perikanan yang berasal dari habitat air laut misalnya ikan kerapu, ikan kakap, ikan tuna, ikan tongkol, ikan lemuru. Produksi perikanan budidaya pada tahun 2017 dapat mencapai 17,22 juta ton, hal ini berbanding lurus dengan peningkatan konsumsi ikan dari tahun 2014 hingga 2017 dapat mencapai 21,9% (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2018).

Potensi pemanfaatan sumberdaya alam hayati ikan di Indonesia dan semakin meningkatnya lalu lintas komoditas perikanan baik antarnegara maupun antararea di dalam wilayah negara Republik Indonesia berpeluang meningkatkan resiko masuk dan tersebarnya hama dan penyakit ikan karantina (HPIK). Hal tersebut dapat mengancam sumber daya alam hayati ikan hias di Indonesia karena akan menurunkan hasil produksi budidaya ikan, baik kuantitas maupun kualitas sehingga akhirnya merugikan perekonomian nasional. Oleh karena itu tindakan pencegahan terhadap masuk dan tersebarnya HPIK perlu dilakukan melalui tindakan karantina ikan pada media pembawa atau produk perikanan yang dilalulintaskan (Flikhah, 2016). Penyakit pada ikan terjadi akibat terpapar patogen, salah satunya adalah virus penyebab infeksi yang hanya dapat hidup di dalam sel hidup, yaitu pada sel hewan (termasuk ikan) yang dapat

menyebabkan kematian akut pada komoditas perikanan dan mengakibatkan kerugian yang sangat signifikan (Mahardika *et al.*, 2020).

Berdasarkan KEPMEN KP 91/2018, *Viral Haemorrhagic Septicemia* virus (VHSV) merupakan penyakit ikan yang masuk ke dalam Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK) golongan 1 sehingga perlu penanggulangan dan pencegahan penyakit. *Viral Haemorrhagic Septicemia* merupakan penyakit virus berbahaya pada ikan, yang menyebabkan mortalitas hingga 100 % dalam waktu 28 hari (Olson, 2013). Infeksi virus tersebut terjadi melalui organ dalam ikan, kulit dan insang. Virus tersebut tidak berdampak pada kesehatan manusia, namun merupakan ancaman ekonomi dan sosial yang serius pada pembudidaya ikan di Indonesia dengan dampak lingkungan yang signifikan terhadap sumberdaya alam dan spesies ikan yang terancam punah (Montero *et al.*, 2011).

Berdasarkan uraian di atas, VHSV merupakan salah satu jenis virus yang masuk ke dalam HPIK golongan 1 (KEPMEN KP 91/2018) sehingga perlu dilakukan pemeriksaan VHSV untuk mengetahui adanya infeksi VHSV pada ikan air laut.

2. Material dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 2 Agustus - 2 Oktober 2021 di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Denpasar Bali. Peralatan yang digunakan untuk pemeriksaan virus yaitu mesin *Real Time* merk Labnet International Inc, PCR Workstation merk Hoefler, *dessecting set*, *microtube* 1,2 ml dan 0,2 ml, mikropipet, mikrotip, *pestle*, *vortex*, *sentrifuge*, *deep freezer*, cawan Petri, Beaker *glass*. Bahan yang digunakan meliputi sampel uji, RNA

extraction solution, chloroform, isopropanol, etanol 75%, alkohol 70%, Diethylpyrocarbonat Double Distilled Water (DEPC ddH₂O), Nuclease Free Water (NFW), pimer F (forward), primer R (reverse), Go Taq qVHS, RT enzyme mix dan probe qVHS.

Prosedur Kerja Nekropsi

Nekropsi merupakan proses pembedahan sampel yang dilakukan untuk mengambil organ yang sesuai dengan jenis uji yang akan dilakukan (Ramlah *et al.*, 2016). Tahap pertama dilakukan pengukuran panjang dan berat sampel ikan hias air laut. Pengukuran ini untuk menentukan organ target yang akan digunakan untuk pemeriksaan virus. Organ yang diambil limpa, hati dan ginjal sebanyak $\pm 0,002$ gr, kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi ethanol 95%.

Fiksasi

Fiksasi merupakan tahap untuk mengawetkan jaringan agar tidak mengalami kerusakan atau tetap pada kondisi sebelumnya (Badan Karantina Ikan, 2017). Fiksasi sampel menggunakan larutan ethanol 95% dan disimpan di *freezer* suhu -20°C untuk menjaga struktur DNA atau RNA tidak terjadi degradasi. Lama waktu penyimpanan hasil fiksasi di BKIPM Denpasar maksimal satu bulan. Semakin cepat sampel diperiksa maka kerusakan sel atau pembusukan jaringan dapat dicegah sehingga diperoleh hasil pemeriksaan yang akurat.

Ekstraksi

Ekstraksi merupakan tahap awal proses identifikasi virus. Prinsip ekstraksi yaitu memisahkan asam nukleat dengan komponen sel lainnya. Ada tiga tahap utama dalam ekstraksi materi genetik yaitu perusakan membran sel (lisis), pemisahan materi membran dari bahan padat seperti protein dan selulosa, serta pemurnian materi membran (Langga, 2012). Ekstraksi merupakan langkah awal pemisahan asam nukleat patogen dari sel inangnya tergantung jenis virus

yang akan diuji (Fitriatin and Manan, 2015).

Tahap homogenisasi sampel dilakukan dengan memotong kecil organ target kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml ditambah 500 μ l RNA Extraction Solution yang berfungsi melisis membran dan melarutkan RNA (Annisa, 2012). Selanjutnya ditambah 100 μ l larutan chloroform sebagai pelarut organik kemudian disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh divortex dengan kecepatan tinggi karena *chloroform* sulit larut dalam air (Kurniawati *et al.*, 2019).

Tahap selanjutnya adalah proses penggumpalan RNA yang larut dalam fase air menjadi padat. Hasil larutan yang terbagi menjadi tiga lapisan, diambil lapisan paling atas sebanyak 200 μ L, kemudian dipindahkan ke dalam *microtube* baru berisi 200 μ l isopropanol. Selanjutnya divortex dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm sehingga terpisah antara organel sel dengan DNA (Hanggono and Junaidi, 2015).

Pemberian isopropanol merupakan proses presipitasi RNA. Isopropanol akan mengikat RNA dan menggumpalkannya pada fase air menjadi padat atau terbentuk pellet yang menempel pada dinding *microtube* setelah dilakukan sentrifugasi (Kurniawati *et al.*, 2019). Isopropanol juga berfungsi untuk menghilangkan atau membersihkan residu *chloroform* yang tertinggal pada tahapan ekstraksi sebelumnya. Setelah proses sentrifugasi selesai, supernatan dituang secara perlahan agar pellet RNA tidak ikut terbuang.

Selanjutnya pellet RNA dicuci dengan 500 μ l ethanol 75%, kemudian disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 9000 rpm. Larutan ethanol 75% selanjutnya dibuang kemudian *microtube* dikering anginkan untuk menghilangkan residu ethanol dari pellet RNA. Penghilangan residu ethanol dilakukan dengan cara evaporasi karena ethanol mudah menguap

(Kurniawati *et al.*, 2019). Setelah pellet RNA dikering anginkan, ditambahkan DEPC ddH₂O sebanyak 200 µl, kemudian disimpan dalam suhu -15°C. Larutan DEPC ddH₂O merupakan senyawa kimia yang mampu menginaktivasi enzim ribonuklease melalui modifikasi ikatan kovalen sehingga RNA tidak rusak akibat aktivitas enzim (Gillman, 2002). DEPC ddH₂O juga digunakan untuk menonaktifkan kerja enzim RNAase sehingga tidak terjadi degradasi terhadap struktur RNA dan untuk menyimpan sampel pada suhu -20°C hingga satu bulan (Kurniawati *et al.*, 2019).

Amplifikasi

Amplifikasi merupakan proses untuk memperbanyak rantai atau segmen asam nukleat tanpa mengubah susunan asam nukleat. Tahapannya melalui proses *reverse transcription* di awal proses yang berfungsi merubah virus RNA menjadi DNA berantai. Amplifikasi virus RNA menggunakan metode RT-PCR memiliki prinsip yang terdiri dari empat tahapan yaitu pre-denaturasi, denaturasi, *annealing* dan *extension* (Kurniawati *et al.*, 2019).

Proses pre-denaturasi untuk menyebut proses *reverse transcription* yaitu proses perubahan RNA menjadi DNA, dimana untai tunggal RNA akan diubah menjadi DNA komplemen (cDNA). Proses pre-denaturasi di Balai KIPM Denpasar Bali menggunakan suhu 50°C selama 30 menit tahap pertama, tahapan kedua dengan suhu 95°C. Setelah selesainya proses RT-PCR dilanjutkan proses amplifikasi PCR dimana DNA komplemen (cDNA) akan diperbanyak menggunakan dua pasang primer probe dengan urutan TAGAGGGCCTTGGTGATCTTCTG, primer VHS q forward dengan urutan basa TCTGCGATCTCAGTC AGGAAB dan primer VHS q Reverse dengan urutan basa AACT CGCAGGATGTGTGCGTCC. Penggunaan setiap primer tersebut didesain sudah spesifik untuk mengamplifikasi VHSV (Kurita *et al.*,

2016).

Denaturasi merupakan proses pemisahan antara rantai DNA. Tahap denaturasi DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Tahap denaturasi ini menggunakan suhu 90-95°C karena pada suhu denaturasi tersebut menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa yang komplemen. Proses denaturasi di Balai KIPM Denpasar Bali menggunakan suhu 95°C selama 15 menit. Hal ini sesuai dengan pendapat Kurniawati *et al.* (2019) bahwa pembelahan untai ganda menjadi tunggal memerlukan suhu lebih dari 90°C.

Annealing merupakan proses penempelan primer. Pada tahap ini, primer akan menuju daerah yang spesifik, komplemen dengan urutan primer. Untuk *Real Time* PCR pembacaan analisisnya hanya di daerah *annealing*, karena pada saat *annealing*, *probe* menempel bersama primer. Primer akan menempel pada pangkal (*forward*) dan ujung (*reverse*) masing-masing DNA tunggal (Kurniawati *et al.*, 2019). Pada tahap *annealing*, faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi adalah suhu karena pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimal. Jika suhu terlalu rendah, primer akan menempel pada sisi lain genom sehingga DNA yang terbentuk memiliki spesifisitas rendah dan sebaliknya jika suhu terlalu tinggi akan menyebabkan amplifikasi gagal karena tidak terjadi penempelan primer (Ayu, 2014). Oleh karena itu, suhu *annealing* optimum untuk amplifikasi *Real Time* PCR di Balai KIPM Denpasar menggunakan suhu 60°C dengan waktu 40 detik karena suhu untuk *annealing* di bawah suhu *melting temperature* primer (Ayu, 2014).

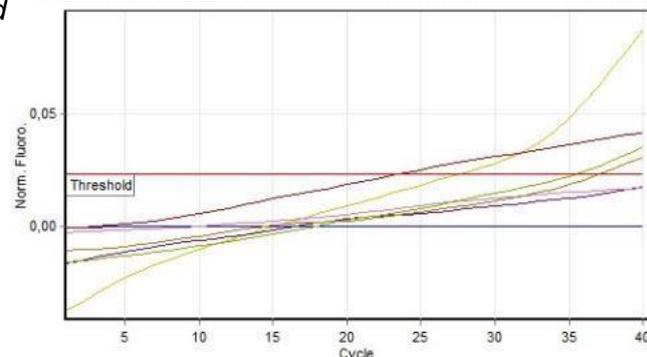
Extension merupakan proses pemanjangan untai baru DNA dari sampel. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan (Kurniawati *et al.*, 2019). Tahap ekstension di Balai KIPM Denpasar menggunakan suhu 72°C dengan waktu 20 detik, sebab proses

pemanjangan DNA pada suhu 70-72°C, kerja enzim lebih optimal.

3. Hasil dan Pembahasan

Grafik amplifikasi sampel VHSV (Gambar 1) menunjukkan garis *threshold* dan *cycle*. Garis *threshold* merupakan garis ambang batas untuk menentukan nilai *cycle threshold*

reaksi RT-PCR ini ditentukan oleh garis ambang batas (*threshold*) yang ditetapkan dalam fase eksponensial dari plot amplifikasi sesuai dengan kurva standarnya (Warg *et al.*, 2014). *Cycle* merupakan siklus yang menandakan proses amplifikasi RT-PCR yang meliputi tahapan denaturasi, *annealing* dan *extension* (Kurniawati *et al.*, 2019).



Gambar 1. Grafik Amplifikasi sampel Uji

Nilai CT hasil deteksi sampel VHSV (Tabel 1) merupakan perpotongan antara garis *threshold* dengan standar kurva sampel yang diuji, dan *copies* merupakan jumlah konsentrasi virus (Kurniawati *et al.*, 2019). Apabila nilai CT muncul, menunjukkan bahwa sampel

tersebut positif terinfeksi VHSV. Apabila nilai CT dan jumlah *copies* tidak muncul menunjukkan sampel negatif VHSV, karena tidak terdapat perpotongan garis *threshold* dengan standar kurva (Kurniawati *et al.*, 2019).

Tabel 1. Hasil deteksi sampel pada *Viral Haemorrhagic Septicemia* (VHS)

No.	Colour	Name	Type	CT	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1		Positif 10 ⁵	Standard	27,81	350.000	17.874
2		NTC	NTC			
3		BC 8.2	Unknown			
4		BC 9.2	Unknown			
5		BAR 8.2	Unknown	23,78		230.716
6		1252	Unknown	37,21		45
7		NSR 8.2	Unknown	35,62		124

Keterangan: Positif 10⁵ = Standart pengenceran 1x, NTC = No Template Control, (BAR,BC,NSR) = Nama Perusahaan, warna berbeda menunjukkan perbedaan pada setiap sampel yang diuji, sedangkan kode merupakan nama dari setiap perusahaan.

Informasi pemeriksaan virus di BKIPM) Denpasar, Bali dilakukan terhadap 44 sampel dari enam spesies ikan air laut. Hasil pemeriksaan menunjukkan sebanyak 12 sampel terdeteksi VHSV. *Viral Haemorrhagic Septicemia* tidak menular ke manusia, atau ikan konsumsi yang terinfeksi tidak akan mengakibatkan penularan virus, virus ini eksklusif untuk ikan.

Penularan VHSV ke ikan lain melalui media air. Ikan yang bersentuhan dengan cairan tubuh yang terinfeksi seperti limbah ekskretoris seperti urin atau feses, atau cairan reproduksi seperti sperma dan cairan ovarium, kemungkinan besar membawa virus. Spesies lain seperti burung pemangsa dapat menjadi pembawa penyakit. Burung pemangsa memakan ikan yang terinfeksi dan mengeluarkannya ke dalam air sehingga berpotensi menemukan inang baru (Goodwin and Merry, 2011).

Mekanisme penularan VHSV terjadi ketika virus bersentuhan dengan sel inang potensial. Glikoprotein G cocok atau mengikat molekul reseptor pada membran sel inang sebagai proses endositosis. Virus dan membran vesikel (sel inang) menyatu, untaian RNA dilepaskan ke dalam sitoplasma. Selanjutnya mRNA direplikasi menjadi RNA. RNA ini kemudian berikatan dengan protein lain membentuk utas yang akhirnya terpisah sehingga membentuk virus baru untuk mencari inang baru (Kim *et al.*, 2014).

Sampel Ikan hias air laut yang diperiksa di BKIPM Denpasar, Bali sebagian besar tidak menunjukkan gejala klinis tetapi dinyatakan positif. Hal ini sesuai pendapat Hershberger *et al.* (2010) bahwa penyebaran virus dalam populasi tidak harus ditandai dengan kematian massal, namun banyak individu di dalam populasi tersebut yang menjadi inang pembawa penyakit.

4. Kesimpulan

Sebanyak 44 sampel dari enam spesies ikan air laut yang diperiksa di BKIPM Denpasar, terdapat 12 sampel yang terdeteksi *Viral*

Haemorrhagic Septicemia dengan menggunakan RT-PCR.

Daftar Pustaka

- Annisa. (2012). Isolasi RNA dan pengklonaan gen tripsin kation dan pankreas sapi ke *Escherichia coli* DH5 α . Skripsi. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Departemen Biologi. Universitas Indonesia.
- Ayu. L. (2014). Pengaruh suhu annealing pada program PCR terhadap keberhasilan amplifikasi DNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah. Thesis. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Flikhah, A. R. I. (2016). Implementasi peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor PER. 19/MEN/2010 tentang pengendalian sistem jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan (Studi mengenai pelaksanaan pemberian sertifikat ekspor ikan di Balai Karantina Kelas I kota Surabaya Jawa Timur). *Jurnal Penelitian Administrasi Publik*, 2(2):463-478.
- Fitriatin, E. & Manan, A. (2015). Pemeriksaan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada ikan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 7(2):149-152.
- Gillman, M. (2002). *Current protocols in molecular biology*. Texas: John Wiley & Sons Inc.
- Goodwin, A. E. & Merry G. E. (2011). Replication and persistence of VHSV IVb in freshwater turtles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94:173-177.

- Hanggono, B. & Junaidi, M. (2015). Deteksi penyakit viral pada udang vannamei (*Litopennaus vannamei*) dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Ilmu Perikanan*, 6(1):4-6.
- Hershberger, P.K., Gregg, J.L., & Grady, C.A. (2010). Susceptibility of three stocks of Pacific herring to Viral Hemorrhagic Septicemia. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(1):1-7.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2018, Januari). Produktivitas perikanan Indonesia pada: Forum Merdeka Barat 9 Kementerian Komunikasi Informatika. Jakarta.
- Badan Karantina Ikan. (2017). Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan Nomor 73/KEP-BKIPM/2017 tentang pedoman dan ketentuan terkait karantina ikan, pengendalian mutu, dan keamanan hasil perikanan. Jakarta: Badan Karantina Ikan.
- Kim, S-H., Thu, B. J., Skall, H. F., Vendramin, N., & Evensen, Ø. (2014). A single amino acid mutation (I1012F) of the RNA polymerase of marine Viral Hemorrhagic Septicemia Virus changes *in vitro* virulence to rainbow trout gill epithelial cells. *Journal of Virology*, 88(13):7189-7195.
- Kurita, J., Mori, K., & Olesen, J. N. (2016). Virulence of Viral Haemorrhagic Septicemia virus (VHSV) genotype III in rainbow trout. *Journal of Veterinary Research*, 47(4):2-4.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, & Hayati, N. (2019). Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional dan *Real Time* - PCR untuk deteksi virus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Technoo-Fish*, 3(1):19-30.
- Langga, I. F., Restu, M., & Kuswinanti, T. (2012). Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi DNA tanaman bitti (*Vitex cofassus* Reinw) serta analisis keragaman genetik dengan teknik RAPD-PCR. *Jurnal Sains & Teknologi*, 12(3):265-276.
- Mahardika, K. Mastuti, I., Roza, D., Syahidah, D., Astuti, W. W., Ismi, S., & Zafran, Z. (2020). Pemantauan insidensi penyakit pada ikan kerapu dan kakap di hatchery dan keramba jaring apung di Bali Utara. *Jurnal Riset Akuakultur*, 15(2):89-102.
- Montero, J., Garcia, J., Ordas, M. C., Casanova, I., Gonzalez, A., Villena, A., Coll, J., & Tafalla, C. (2011). Specific regulation of the chemokine response to Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) at the entry site. *Journal of Virology*, 85(9):4046-4056.
- Olson, W, J. (2013). Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Great Lakes Strain IVb: Viral detection, mechanisms of infection, and host-virus interactions in the yellow perch (*Perca flavescens*). Theses and Dissertations. University of Wisconsin Milwaukee. UWM Digital Commons. <https://dc.uwm.edu/etd/323>
- Ramlah, E., Soekendarsi, Z., & Hasyim. (2016). Perbandingan kandungan gizi ikan nila *Oreochromis niloticus* asal danau Mawang Kabupaten Gowa dan danau Universitas Hasanuddin Kota Makassar.
- Warg, J. V., Clement, T. C., Cornwell, E. R., Cruz, A., Getchell, R. G., Giray, C., Goodwin, A. E., Groocock, G. H., Faisal, M., Kim, R., Merry, G. M., Phelps, N. B. D., Reising, M. M., Standish, I., Zhang, Y., & Toohey-Kurth, K. (2014).

Detection and surveillance of viral
hemorrhagic septicaemia virus
using real-time RT-PCR. I. Initial

comparison of four protocols.
Diseases of Aquatic Organisms,
111:1-13