

Infeksi Betanodavirus pada Ikan Kakap di Kepulauan Riau

Betanodavirus Infection in Barramundi in Riau Islands

Achmad Bahtiar Rifai^{1*}, Titis Wulandari², Desi Surastini³,
Pramudya Dwi Wahyu Irawanto³

¹Pusat Karantina Ikan, Jalan Merdeka Timur Gambir, Jakarta Pusat, ²STKIP Muhammadiyah Muara Bungo, Jalan Rangkayo Hitam, Muara Bungo, Jambi, ³Stasiun Karantina Ikan Batam, Jalan M Nahar No.1 Batam Center, Batam.

*Corresponding author: abherifai@gmail.com

Abstrak

Penyakit yang dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat tinggi adalah virus dan salah satunya adalah Betanodavirus atau biasa disebut *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Infeksi VNN merupakan penyakit yang terdaftar di The Office International des Epizooties (OIE) dan menjadi masalah utama di dalam produksi perikanan laut di dunia. Virus ini mampu menginfeksi ikan dari ukuran benih sampai ukuran konsumsi dalam kurun waktu yang singkat mencapai kematian dengan frekuensi 80% sampai 100%. Penyakit tersebut dapat menginfeksi ikan kakap putih dan tersebar hampir diseluruh provinsi Kepulauan Riau. Penelitian ini menggunakan metode pengambilan sampel ikan hidup yang menunjukkan gejala VNN dan ikan baru mati. Sampel penelitian diperoleh dari beberapa kota dan kabupaten di Provinsi Kepulauan Riau antara lain Kota Batam, Kabupaten Bintan, dan Kabupaten Tanjung Balai Karimun, pemilihan sampel berdasarkan dari gejala klinis dan angka kematian ikan. Kemudian sampel dinekropsi untuk diambil organ mata dan otak, selanjutnya di amplifikasi menggunakan primer dengan target gen RNA 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa VNN telah terdeteksi di Provinsi Kepulauan Riau yaitu Kota Batam, Kabupaten Bintan, dan Kabupaten Tanjung Balai Karimun.

Kata kunci: *Lates calcarifer*, kakap putih, *Viral Nervous Necrosis*

Abstract

Diseases that can cause very high economic losses are viruses and one of them is Betanodavirus or commonly called *Viral Nervous Necrosis* (VNN). VNN is a disease registered by The Office International des Epizooties (OIE) and is a major problem in marine fishery production in the world. This virus is able to infect fish from larva size to consumption size in a short period of time to reach death with a frequency of 80% to 100%. The disease can infect barramundi and is spread throughout the Riau Islands. This study used a live fish sampling method showing VNN signs and freshly dead fish. The research samples were obtained from several cities and districts in the Riau Islands Province, including Batam City, Bintan Regency, and Tanjung Balai Karimun Regency, the sample selection was based on clinical symptoms and fish mortality. Then the samples were necropsied for eye and brain organs, then amplified using primers targeting the RNA 2 gene. The results showed that VNN had been detected in the Riau Islands Province, i.e. Batam City, Bintan Regency, and Tanjung Balai Karimun Regency.

Keywords: *Lates calcarifer*, Barramundi, *Viral Nervous Necrosis*

Received: 8 Desember 2021

Revised: 28 Januari 2022

Accepted: 1 Maret 2022

PENDAHULUAN

Ikan kakap merupakan salah satu komoditi unggulan perikanan budidaya dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi di Provinsi Kepulauan Riau, sehingga budidaya ikan tersebut banyak diminati oleh para pembudidaya didaerah pesisir pulau. Salah satu enis ikan kakap yang banyak

diminati konsumen adalah ikan kakap putih (*lates calcarifer*). Ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) merupakan salah satu komoditas budidaya laut unggulan indonesia, karena memiliki pertumbuhan yang relatif cepat (Windarto *et al.*, 2019). Menurut Rayes *et al.* (2013), pertumbuhan kakap putih dapat mencapai laju pertumbuhan harian sebesar 0.51%/hari. Menurut Purba *et al.*

(2016), kakap putih merupakan salah satu jenis ikan air laut yang memiliki kandungan omega-3, kandungan protein sekitar 20%, dan mempunyai kadar lemak sebesar 5%. Salah satu kendala dalam budidaya perikanan adalah kasus penyakit, penyakit pada ikan merupakan suatu keadaan abnormal yang ditandai dengan penurunan kemampuan ikan secara gradual dalam mempertahankan fungsi fisiologis normal.

Penyakit yang menyerang ikan kakap antara lain bakteri, parasit, jamur dan virus. Salah satu penyakit ikan yang dapat menyebabkan kematian masal adalah Betanodavirus atau biasa disebut *Viral Nervous Necrosis* (VNN). VNN adalah penyakit yang terdaftar oleh *The Office International des Epizooties* (OIE) dan menjadi masalah utama di dalam produksi perikanan laut di dunia (Yuwanita, 2013). VNN dapat menyerang sistem saraf pusat, retina mata, serta organ reproduksi. Penyakit ini umumnya dapat menginfeksi hampir pada seluruh fase pertumbuhan ikan (stadia larva dan benih), serta mortalitasnya dapat mencapai 100%. Penularan penyakit ini dapat terjadi secara vertikal maupun horizontal. Gejala umum VNN antara lain nafsu makan menurun, ikan sangat lemah, warna tubuh pucat, dan gejala spesifik berupa pergerakan yang tidak terkoordinasi, seperti berenang tidak terarah, berputar-putar, hiperaktif, terbalik, serta sering menghentakkan kepala ke atas permukaan air secara sporadik (Gomez *et al.*, 2006).

Betanodavirus/VNN merupakan family *Nodaviridae*, penyakit ini dapat menyebabkan kematian yang sangat tinggi pada stadium larva dan dewasa pada berbagai spesies ikan laut (Prihartini, 2016). *Betanodavirus* tidak memiliki amplop, berbentuk *icosahedral*, dan memiliki ukuran diameter 20-30 nm, memiliki dua *strand positive-sense* RNA yang dikenal dengan RNA1 dan RNA 2. RNA 1 mengkode RNA *dependent* RNA polymerase (RdRp), enzim mitokondria, dan bertanggungjawab sebagai replikasi virus (Nopadon *et al.*, 2009), sedangkan RNA 2 mengkode protein kapsid (Low *et al.*, 2017).

International Comitee Of Taxonomy Virus (ICTV) tahun 2018 membagi genus Betanodavirus menjadi empat spesies antara lain *Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus*

(BFNNV), *Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus* (RGNNV), *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV), dan *Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus* (TPNNV). Sejak tahun 1990 virus tersebut ditemukan dan diberikan nama VNN atau Viral Encephalopathy dan Retinopathy. *Office International des Epizooties* (2000), menyatakan bahwa virus tersebut telah berhasil ditemukan di Amerika Utara, Ikan yang terinfeksi menunjukkan berbagai kelainan saraf, yang ditandai dengan vakuolisasi dan nekrosis seluler dalam sistem saraf pusat dan retina (Curtis *et al.*, 2001). Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan genomik VNN pada ikan Kakap putih dengan analisis RT-PCR sehingga dapat menggambarkan distribusi virulensi VNN secara kualitatif.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel

Sampel penelitian diperoleh dari beberapa kabupaten di Provinsi Kepulauan Riau antara lain Kota Batam, Kabupaten Bintan, dan Kabupaten Tanjung Balai Karimun. Pemilihan sampel berdasarkan dari gejala klinis dan angka kematian ikan. Setiap daerah sampel diambil sebanyak 10 sampel. Sampel yang dipilih adalah ikan yang sakit dan menunjukan gejala klinis VNN. Sampel ikan berasal dari beberapa farm yang ada di 3 kota/kabupaten di provinsi kepulauan Riau. Sampel yang dapat digunakan untuk pemeriksaan VNN yaitu dari sampel ikan hidup dan ikan mati. Ikan mati yang belum mengalami autolisis dalam keadaan beku masih bisa dilakukan pemeriksaan PCR. Sampel yang akan diperiksa dinekropsis terlebih dahulu (dibedah), kemudian pisahkan organ mata dan otak untuk pemeriksaan VNN. jumlah organ yang digunakan yaitu 10-30 mg untuk keperluan ekstraksi RNA.

Metode Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan *RNasy[®] Blood and Tissue Kit* dari Qiagen. Sampel organ mata dan otak sebanyak 30 mg dipotong kecil-kecil kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 ml, tahapan selanjutnya dilakukan sesuai dengan panduan perusahaan.

Hasil RNA kemudian disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C .

Metode Amplifikasi

Amplifikasi PCR tahap pertama dilakukan dengan total volume 25 μl larutan reaksi yang terdiri dari 13 μl RNase-free water, 5 μl *Qiagen one Step RT-PCR 5 \times* (Qiagen), 1,5 μl *primer forward* (10 μM), 1,5 μl *primer reverse* (10 μM), 1 μl *Qiagen onestep RT-PCR Enzyme Mix* dan 2 μl sampel DNA. Siklus amplifikasi diawali dengan *Reverse Transcription* 50°C selama 30 menit dan pre denaturasi 95°C selama 15 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* untuk semua primer $57,3^{\circ}\text{C}$ selama 40 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 40 detik dan dilanjutkan dengan ekstensi akhir 1 siklus pada suhu 72°C selama 10 menit.

Amplifikasi PCR dilakukan dengan total volume 25 μl larutan reaksi yang terdiri dari 7 μl RNase-free water, 12,5 μl HotStarTaq Master Mix 2 \times (Qiagen), 0,5 μl primer forward (10 μM), 0,5 μl primer reverse (10 μM), 2,5 μl coral load dan 2 μl sampel DNA (Tabel 1). Siklus amplifikasi diawali dengan pre denaturasi 94°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 40 detik, *annealing* untuk semua primer 50°C selama 40 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 40 detik dan dilanjutkan dengan ekstensi akhir 1 siklus pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan 1.5% agarose gel dan pewarnaan menggunakan SYBR Green 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Marker yang digunakan adalah DNA marker 100bp. Analisis hasil data dilakukan secara deskriptif dengan membandingkan hasil pengamatan gejala klinis, hasil dikonfirmasi dengan uji RT-PCR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Masalah utama dalam budidaya ikan hingga saat ini salah satunya adalah penyakit. Penyakit ini dapat menyebabkan kerugian ekonomi serta dapat menyebabkan pertumbuhan terhambat dan proses pemeliharaan lebih lama. Kematian ikan yang disebabkan karena penyakit mengakibatkan

menurunnya atau hilangnya produksi sehingga menyebabkan kerugian ekonomis (Abdullah *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil sampel penelitian pada ikan kakap putih menunjukkan perilaku ikan antara lain nafsu makan berkurang, gerakan lemah, berenang tidak normal (memutar-mutar), pembesaran gelembung renang pada beberapa sampel. Menurut Sembiring (2018), ikan yang terinfeksi oleh VNN menunjukkan gejala yaitu, gerakan renang yang lemah, nafsu makan menurun, mengalami anemia, bercak merah pada insang dan terdapat pembengkakan pada organ (Tabel 2).

Hasil deteksi VNN pada sampel ikan Kakap putih terlihat pada Gambar 1. Sampai saat ini, penyakit ini telah dilaporkan lebih dari 120 spesies pada 30 famili dari 11 orde yang berbeda terutama ikan laut yang rentan terhadap infeksi (Tan *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2016). Selain itu VNN dapat menginfeksi ikan air tawar seperti Lele cina (*Pasotus*), Lele Australia (*Tandanus tandanus*), Baramundi (*L. calcarifer*), Medaka (*Oryzias latipes*), Guppy (*Poecilia reticulata*) dan Zebrafis (*Danio rerio*). Ikan yang terinfeksi menunjukkan tanda-tanda klinis yang berbeda tergantung spesies, umur dan suhu lingkungan (Ghiasi *et al.*, 2016). Tanda-tanda umum yang spesifik dan umum teramati pada spesies yang berbeda adalah kebiasaan berenang abnormal, luka dan hiperflasia gelembung renang yang membuat bagian perut membesar.

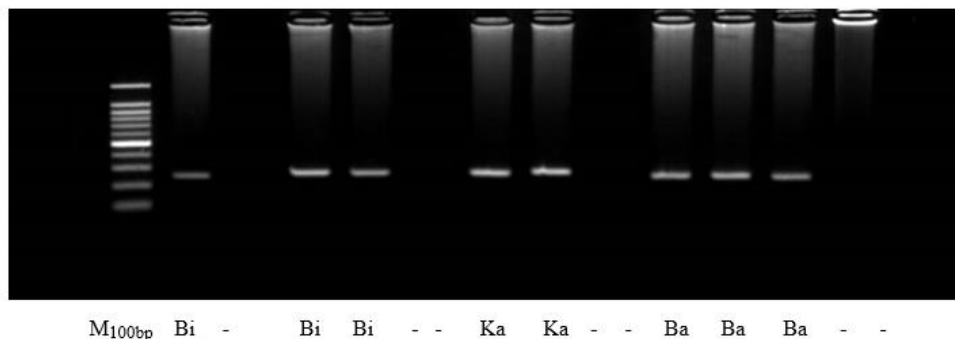
Deteksi terhadap keberadaan VNN dilakukan pada semua sampel dari beberapa kabupaten di Provinsi Kepulauan Riau yaitu Kota Batam, Kabupaten Bintan, dan Kabupaten Tanjung Balai Karimun. Sampel dari Kota Batam menunjukkan 3 positif terhadap VNN dan 7 negatif, dari Kabupaten Bintan menunjukkan 2 sampel positif dan 8 sampel negatif, sedangkan dari Kabupaten Tanjung Balai Karimun menunjukkan 2 sampel positif dan 8 sampel negatif. Hasil amplifikasi PCR ditampilkan pada Gambar 1. Beberapa peneliti sudah merancang primer untuk mendeteksi VNN, namun pada penelitian ini primer yang digunakan dirancang oleh Thiéry *et al.*, 1999 dengan target gen adalah RNA 2 yang merupakan target yang kuat dan sensitif untuk identifikasi infeksi *Betanodavirus*

Tabel 1. Sekuen primer untuk amplifikasi

Primer	Target	Sekuen primer ^a	Panjang amplicon	Referensi
F2	RNA2	(F) CGTGTTCAGTCAT GTGTTCGCT	420 bp	Thiéry <i>et al.</i> , 1999
R3		(R) CGAGTCAACACGGGGTGAAGA		
F'2	RNA2	(F) GTTCCCTGTACAACGATTCC	294 bp	Thiéry <i>et al.</i> , 1999
R'3		(R) GGA-TTTGACGGGGCTGCTCA		

Tabel 2. Hasil uji RT-PCR ikan kakap putih menunjukkan infeksi VVN stadium berat/sedang

No	Provinsi	Kota/Kabupaten	Jenis Sampel	Jumlah Sampel	Gejala Klinis
1	Kepulauan Riau	Batam	Kakap	10	Nafsu makan menurun, berenang memutar, kematian diatas 50%
2	Kepulauan Riau	Bintan	Kakap	10	Ikan terlihat lemah, berenang tidak beraturan (memutar), exoptalmia, insang pucat.
3	Kepulauan Riau	Tanjung Balai Karimun	Kakap	10	Nafsu makan berkurang, berenang tidak beraturan (memutar),



Gambar 1. Deteksi keberadaan *Betanodavirus* pada sampel asal Kabupaten Bintan, Kabupaten Tanjung Balai Karimun, dan Kota Batam. 2 sampel positif dari Bintan, 2 sampel positif dari Tanjung Balai Karimun dan 3 positif dari Kota Batam. M 100 bp; Kontrol positif, NTC: *non template control*.

(Nishizawa *et al.*, 1999; Grotmol *et al.*, 2000; Azad *et al.*, 2005). Saat ini, uji RT-PCR dengan atau tanpa nested PCR telah dikembangkan sebagai alat *diagnostic* yang kuat tersendiri atau kombinasi dengan kultur sel (Furusawa *et al.*, 2007).

Viral Nerveous Necrosis (VNN), atau *Viral Ecephalopathy and Retinopathy* (VER) merupakan penyakit yang disebabkan oleh betanodavirus dan telah mengakibatkan kematian massal ikan budidaya laut, terutama stadia larva dan *juvenil* (Bovo *et al.*, 1999). Kejadian penyakit VNN di Indonesia dilaporkan terjadi pertama kali

pada tahun 1997, di daerah Banyuwangi, Jawa Timur pada budidaya Kakap Putih (*Lates calcaliver*) kemudian menyebar ke Bali pada tahun 1998, dan merambah ke pembenihan Kerapu di Bali yang menyebabkan kematian massal 100% (Zafran *et al.*, 1998).

Berdasarkan hasil penelitian Senggagau (2011), menunjukkan bahwa Kerapu Macan rentan terhadap virus VNN. Hasil yang hampir sama juga ditunjukkan pada penelitian mengenai pemetaan pathognomik pada larva kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) (Yuwanita *et al.*, 2013). Benih nila pada penelitian Senggagau (2011),

terinfeksi VNN dari nodavirus yang diisolasi dari kerapu tikus yang terinfeksi VNN yang menyebabkan kematian massal. Penelitian ini menunjukkan bahwa benih nila dapat menjadi media pembawa virus (VNN).

Berdasarkan analisis genom virus VNN, Karakteristik dari 4 genotipe virus tersebut memiliki homologi yang tinggi. Genotipe virus yang memiliki homologi yang tinggi antara lain *bar fin flounder nervous necrosis virus* (BFNNV), *tiger puffer NNV* (TPNNV), *striped jack NNV* (SJNNV), dan *red spotted grouper NNV* (RGNNV) (Nishizawa *et al.*, 1999; Shetty *et al.*, 2012; Janina dan Kim, 2016). Bigarre *et al.* (2009) menjelaskan bahwa RNA 1 memberikan informasi adanya hubungan genetik antara *Oreochromis sp.*, *sea bass*, dan *Redspottle Grouper Nervous Necrosis Virus* (RGBBV). Odaviruses merupakan pembawa RNA 2 terkait dengan RGNNV dan RNA 1 berhubungan dengan *Striped Jack Nervous Virus* (SJNNV).

Penyakit VNN sangat sulit dikendalikan apabila sudah menginfeksi ikan budidaya, untuk itu perlunya kontrol dan pencegahan agar virus tersebut tidak masuk kedalam area budidaya. Salah satu yang dapat mencegah virus tersebut adalah vaksinasi. Vaksinasi sangat penting untuk mencegah penyakit terutama selama tahap primer dan beberapa peneliti melaporkan prosedur yang efektif dalam mengendalikan penyakit (Furusawa *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2016; Vimal *et al.*, 2014).

Kebersihan yang ketat dapat membantu mengendalikan VNN di hatceri (Tan *et al.*, 2001; Bigarre *et al.*, 2009; Shetty *et al.*, 2012). Tidak ada daur ulang air dan sterilisasi kimia air laut selama siklus penetasan berhasil mengurangi penyakit VNN di tempat penetasan ikan barramundi (Azad *et al.*, 2005). Langkah-langkah biosekuriti dan praktek kebersihan umum, seperti treatment UV, penerapan sanitasi, pemantauan berkala dan desinfeksi tangki dan filter biologis, desinfeksi peralatan dan penurunan faktor stress serta kepadatan larva dan *juvenile* sangat disarankan (Uwanita, 2018).

KESIMPULAN

Betanodavirus atau VNN telah terdeteksi di Provinsi Kepulauan Riau antara lain Kota Batam, Kabupaten Bintan, dan Kabupaten Tanjung Balai Karimun yang menginfeksi ikan kakap putih. VNN juga dapat menginfeksi ikan lain seperti kerapu, lele Cina, lele Australia dan Guppy.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pusat Karantina Ikan dan Stasiun KIPM Batam yang telah mengizinkan kami untuk melakukan penelitian tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., Ramli, R., Ridzuan, M. S. M., Murni, M., Hashim, S., Sudirwan, F., Abdullah, S. Z., Mansor, M. N., Amira, S., Saad, M. Z., & Amal, M. N. A. (2017). The presence of vibriaceae, betanodavirus and iridovirus in marine cage cultured fish Role of fish size, water physicochemical parameters and relationships among the pathogens. *Aquaculture Reports*, 7, 57-65.
- Azad, I. S., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasu, A. R., Poornima, M., Kailasam, M., & Rajan, J. J. S. (2005). Nodavirus infection causes mass mortalities in hatchery produced larvae of Asian seabass *Lates calcarifer* Bloch first report from India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 113-118.
- Bigarre, L., Cabon, J., Baud, M., Heimann, M., Body, A., Lieffrig, F., & Castric, J. (2009). Outbreak of betanodavirus infection in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in fresh water. *Journal of Fish Diseases*, 32, 667-673.
- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F., & Mas, D. (1999). Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Research*, 63, 143-146.

- Costa, J. Z., & Thompson, K. D. (2016). Understanding the interaction between betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology*, 53, 35-49.
- Curtis, P. A., Drawbridge, M., Iwamoto, T., Nakai, T., Hedrick, R. P., & Gendron, A. P. (2001). Nodavirus infection of juvenile white sea-bass (*Atracto scionnobilis*) cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *Journal of Fish Diseases*, 24, 263–271.
- Furusawa, R., Okinaka, Y., Uematsu, K., & Nakai, T. (2007). Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77, 119-125.
- Ghiasi, M., Binaii, M., Ghasemi, M., Fazli, H., & Zorriehzakra, M. J. (2016). Haematobiochemical disorders associated with nodavirus like-agent in adult leaping mullet *Liza saliens* Risso 1810 in the Caspian Sea. *Virus Disease*, 27, 12-18.
- Gomez, D. K., Lim, D. J., Baeck, G. W., Youn, H. J., Shin, N. S., & Youn, H. Y. (2006). Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *Veterinary Science*, 7(4), 369–374.
- Grotmol, S., Nerlan, A. H., Biering, E., Totland, G. K., & Nishizawa, T. (2000). Characterisation of the capsid protein gene from nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reversetranscriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Diseases in Aquatic Organism*, 39, 79-88.
- Janina, Z. C., & Kim, D. T. (2016). Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology*, 53, 35-49.
- Low, C. F. C., Nataqain, S. B., Chee, H. Y., Rozaini, M. Z. H., & Najiah, M. (2017). Betanodavirus Dissection of the viral life cycle. *Journal of Fish Diseases*, 40, 1–8.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T., & Muroga, K. (1999). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1633–1636.
- Nopadon, P., Aranya, P., Tipaporn, T., Toshihiro, N., Takayuki, K., Masashi, M., & Makoto, E. (2009). Nodavirus associated with pathological changes in adult spotted coralgroupers (*Plectropomus maculatus*) in Thailand with viral nervous necrosis. *Research in Veterinary Science*, 87, 97–101.
- Purba, E. P., Ilza, M., & Leksono, T. (2016). Study Penerimaan Konsumen terhadap Steak (Fillet) Ikan Kakap Putih Flavor Asap. *Jurnal Online Mahasiswa*, 3(2), 1-11.
- Prihartini, N. C. (2016). Distribusi Pathognomik Virulensi VNN (*Viral Nervous Necrotic*) Pada Benih Nila (*Oreochromis sp.*). *Jurnal Ilmu Perikanan*, 7(2), 51-56.
- Rayes, R. D., Sutresna, I. W., Diniarti, N., & Supii, A. I. (2013). Pengaruh Perubahan Salinitas Terhadap Pertumbuhan dan Sintasan Ikan Kakap Putih (*Lates calcarifer Bloch*). *Jurnal Kelautan*, 6(1), 47-56.
- Sembiring, S. B. M., Wibawa, G. S., Mahardika, K., Widiastuti, Z., & Haryanti. (2018). Prevalensi Infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dan *Iridovirus* Pada Hatcheri Dan Budidaya Ikan Laut. *Media Akuakultur*, 13 (2), 83-90.

- Senggagau, B. (2011). Uji Resistensi Terhadap Virus Vnn Pada Beberapa Spesies Ikan Ekonomis. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 1(1), 43-48.
- Shetty, M., Maiti, B., Santhosh, K. S., Venugopal, M. N., & Karunasagar, I. (2012). Betanodavirus of marine and freshwater fish distribution genomic organization diagnosis and control measures. *Indian Journal of Virology*, 23, 123.
- Thiery, R., Cozien, J., de Boisseson, C., Boscher, K. S., & Nevarez, L. (1999). Genomic classification of new betanodavirus Isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *Journal of General Virology*, 85, 3079-3087.
- Tan, C., Huang, B., Chang, S. F., Ngoh, G. H., Munday, B., & Chen, S. C. (2001). Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *Journal of General Virology*, 82, 647-653.
- Uwanita, R., Buwono, N. R., & Putra, H. F. E. (2018). Pengaruh Dunaliella Salina Terhadap Polimorfonuklear Leukosit Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) Yang Diinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 10(2).
- Vimal, S., Farook, M., Madan, N., Abdul, M., Nambi, S., Taju, K., Venu, G., Subburaj, S., Thirunavukkarasu, A., & Hameed. A. S. (2014). Development, distribution and expression of a DNA vaccine against nodavirus in Asian Seabass, Lates calcarifer (Bloch, 1790). *Aquaculture Research*, 47(4), 1209-1220.
- Windarto, S., Hastuti, S., Subandiyono, Nugroho, R. A., & Sarjito. (2019). Performa pertumbuhan ikan kakap putih (lates calcarifer bloch, 1790) yang dibudidayakan dalam sistem keramba jaring apung (KJA). *Jurnal Sains Akuakultur Tropis*, 3(1), 56-60.
- Xie, J., Huang, R., & Lai, Y. (2016). Prokaryotic production of virus-like particle vaccine of betanodavirus Vaccine design Methods and protocols. *Vaccines for Veterinary Diseases*, 11(2), 211-223.
- Yuwanita, R., Yanuhar, U., & Hardoko. (2013). Pathognomonic of Viral Nervous Necrotic (VNN) virulence on larvae of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Advance Environmental Biology*, 7(6), 1074-1081.
- Zafran, I., Koesharyani, Roza, D., Jhonny, F., & Yuasa. (1998). Peningkatan sintasan ikan kerapu tikus dengan penambahan vitamin dan immunostimulan kedalam pakan segar. *Seminar Teknologi Perikanan Pantai*, 164-168.
